

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Exatas

Departamento de Química

Denise Versiane Monteiro de Sousa

**APLICAÇÃO DE CAMPOS ELÉTRICOS E MATERIAIS
NANOESTRUTURADOS POR *LAYER-BY-LAYER* NO PREPARO DE
AMOSTRAS DE SALIVA E OUTRAS MATRIZES COMPLEXAS**

Belo Horizonte

2022

UFMG/ICEX/DQ. 1.499
T. 684

Denise Versiane Monteiro de Sousa

**APLICAÇÃO DE CAMPOS ELÉTRICOS E MATERIAIS
NANOESTRUTURADOS POR *LAYER-BY-LAYER* NO PREPARO DE
AMOSTRAS DE SALIVA E OUTRAS MATRIZES COMPLEXAS**

Tese apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências - Química.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Mathias Orlando

Coorientador: Prof. Dr. Fabiano Vargas Pereira

Belo Horizonte

2022

Ficha Catalográfica

S725a Sousa, Denise Versiane Monteiro de.
2022 Aplicação de campos elétricos e materiais
T nanoestruturados por layer-by-layer no preparo de
amostras de saliva e outras matrizes complexas
[manuscrito] / Denise Versiane Monteiro de Sousa.
2022.

143 f. : il., gráfs., tabs.

Orientador: Ricardo Mathias Orlando.

Coorientador: Fabiano Vargas Pereira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais - Departamento de Química.

Inclui bibliografia.

1. Química analítica - Teses. 2. Preparação de amostra (Química)- Teses. 3. Fármacos - Teses. 4. Materiais nanoestruturados - Teses. 5. Saliva - Exame - Teses. 6. Drogas - Abuso - Teses. 7. Medicamentos - Abuso - Teses. 8. Cromatografia líquida - Teses. 9. Espectrometria de massa - Teses. 10. Campos elétricos - Teses. 11. Filmes finos - Teses. I. Orlando, Ricardo Mathias, Orientador. II. Pereira, Fabiano Vargas, Coorientador. III. Título.

CDU 043



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

"Aplicação de Campos Elétricos e Materiais Nanoestruturados Por Layer-by-layer No Preparo de Amostras de Saliva e Outras Matrizes Complexas"

Denise Versiane Monteiro de Sousa

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Prof. Ricardo Mathias Orlando - Orientador
UFMG

Prof. Fabiano Vargas Pereira - Coorientador
UFMG

Profa. Júnia de Oliveira Alves Binatti
CEFET-MG

Prof. Eduardo Costa Figueiredo
UNIFAL

Prof. Bruno Gonçalves Botelho
UFMG

Profa. Adriana Nori de Macedo
UFMG



Documento assinado eletronicamente por **Adriana Nori de Macedo, Professora do Magistério Superior**, em 14/06/2022, às 17:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ricardo Mathias Orlando, Professor do Magistério Superior**, em 14/06/2022, às 18:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fabiano Vargas Pereira, Professor do Magistério Superior**, em 14/06/2022, às 19:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Bruno Goncalves Botelho, Professor do Magistério Superior**, em 14/06/2022, às 20:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Júnia de Oliveira Alves Binatti, Usuário Externo**, em 15/06/2022, às 09:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Eduardo Costa de Figueiredo, Usuário Externo**, em 15/06/2022, às 10:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1522481** e o código CRC **16E9CFBD**.

AGRADECIMENTOS

A Deus por iluminar o meu caminho e a minha trajetória até aqui.

Aos meus pais, Pedro e Fátima, que são minhas fortalezas, e a todos os meus familiares por todo apoio, carinho, compreensão e por acreditarem em mim.

Ao Caio pelo companheirismo e por dividir comigo os meus sonhos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ricardo Mathias Orlando, por todos os ensinamentos e colaboração para o meu desenvolvimento científico, pela confiança e pelo incentivo sempre. Ao Prof. Dr. Fabiano Vargas Pereira pela orientação e parceria neste trabalho.

Aos meus colegas do LAMS pelas trocas de conhecimento, pela companhia, pelos bolos e pelas boas risadas. Sem dúvida tornaram essa jornada mais fácil e prazerosa.

Aos colegas do LEMB, em especial à Marina, pelo apoio técnico. Ao Prof. Dr. Ruben Dario Sinisterra Millán e à Prof. Dra. María Esperanza Cortés Segura por disponibilizarem amostras, equipamentos e o laboratório para execução das análises cromatográficas. À Prof. Dra. Clésia Cristina Nascentes pela colaboração nos trabalhos desenvolvidos e pelas palavras de acalanto. Ao Prof. Dr. Rodrigo Lassarote Lavall e ao CTNano-UFMG por disponibilizarem os nanotubos de carbono para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao CNPQ pela bolsa de pesquisa concedida. Ao INCTAA (Processos 465768/2014-8 e 2014/50951-4), à Rede Mineira de Ciências Forenses (Projeto RED-00042-16), ao projeto PROCAD Segurança Pública e Ciências Forenses (Processo 88881.516313/2029-01 Edital n.16/2020) e à FAPEMIG (Projeto APQ-01842-16 e 26079) por todo apoio financeiro.

Por fim, a todos os meus amigos, que estiveram sempre presentes e que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

A necessidade de determinar compostos em baixas concentrações a partir de matrizes complexas, como as amostras biológicas, torna o desenvolvimento de técnicas de preparo de amostras um grande desafio e uma tarefa constante. Neste contexto, esse trabalho propõe o emprego de campos elétricos, o desenvolvimento e a aplicação de materiais nanoestruturados por *Layer-by-Layer* (LBL) em processos de extração. A primeira estratégia é desenvolvida no capítulo III e apresenta três aplicações de eletroextração multifásica (MPEE) utilizando uma ponta de papel comercial. A ponta de papel foi primeiramente caracterizada, a qual apresentou características importantes para um suporte e sorvente, como simplicidade composicional (predominantemente celulose), porosidade, hidrofobicidade e estabilidade física e química. O método usando MPEE e UHPLC-MS/MS foi eficiente para a determinação de cocaína em saliva, enquanto os métodos usando MPEE, UHPLC-PDA e DIA (DIA; análises de imagens digitais) foram eficientes para a determinação de doxorrubicina em saliva. Ambos apresentaram figuras de mérito aceitáveis e adequadas para o objetivo proposto, inclusive seletividade. Vale ressaltar, a compatibilidade da MPEE com diferentes técnicas de separação e detecção e, portanto, a sua versatilidade. Já no capítulo IV, a outra estratégia foi baseada no desenvolvimento de filmes nanoestruturados por LBL e aplicação na extração de fármacos, drogas de abuso e inseticidas. Para isso, o filme (PDDA/MWCNT)₁₀ foi depositado sobre a ponta de papel e sobre frascos de borossilicato. A deposição linear das 10 bicamadas foi confirmada por espectroscopia UV-Vis e a morfologia do filme foi avaliada. A ponta de papel-(PDDA/MWCNT)₁₀ foi aplicada na MPEE dos diferentes compostos a partir de saliva, os quais foram posteriormente determinados por UHPLC-MS/MS. Nesse caso, o revestimento da ponta de papel não favoreceu a extração. Em contrapartida, o frasco de borossilicato-(PDDA/MWCNT)₁₀ apresentou resultados positivos para a extração desses compostos a partir da saliva. Essa aplicação se expandiu para amostras de urina e água superficial, alcançando um aumento significativo do sinal analítico de até 12 vezes. Ademais, esses materiais podem ser reutilizados por no mínimo 5 vezes. Por fim, as estratégias utilizadas, os

materiais e métodos desenvolvidos representam grandes avanços para a área de preparo de amostras e podem ainda ser explorados para diversas aplicações.

Palavras-chave: Eletroextração multifásica. Filme multicamadas. Cromatografia líquida. Espectrometria de massas. Fármacos.

ABSTRACT

The need to determine compounds in low concentrations from complex matrices, such as biological samples, makes the development of sample preparation techniques a great challenge and a constant task. In this context, this work proposes the use of electric fields, the development and application of Layer-by-Layer (LBL) nanostructured materials in extraction processes. The first strategy is developed in Chapter III and presents three applications of multiphase electroextraction (MPEE) using a commercial paper point. The paper point was first characterized, which presented important characteristics for a support and sorbent, such as compositional simplicity (predominantly cellulose), porosity, hydrophilicity and physical and chemical stability. The method using MPEE and UHPLC-MS/MS was efficient for the determination of cocaine in saliva, while the methods using MPEE, UHPLC-PDA and DIA (DIA; digital image analysis) were efficient for the determination of doxorubicin in saliva. Both presented acceptable and adequate figures of merit for the proposed objective, including selectivity. It is worth mentioning the compatibility of MPEE with different separation and detection techniques and, therefore, its versatility. In Chapter IV, the other strategy was based on the development of nanostructured films by LBL and application in the extraction of drugs and insecticides. For this, the (PDDA/MWCNT)₁₀ film was deposited on the paper point and on borosilicate bottle. Linear deposition of the 10 bilayers was confirmed by UV-Vis spectroscopy and film morphology was evaluated. The paper point-(PDDA/MWCNT)₁₀ was applied to the MPEE of the different compounds from saliva, which were later determined by UHPLC-MS/MS. In this case, the coating of the paper material did not favor the extraction. In contrast, borosilicate bottle-(PDDA/MWCNT)₁₀ showed positive results for the extraction of these compounds from saliva. This application has expanded to urine and surface water sampling, achieving a significant increase of the analytical signal by at least 12 times. Furthermore, these materials can be reused. Finally, the strategies used, the materials and methods developed represent great advances in the area of sample preparation and can still be explored for several applications.

Keywords: Multiphase electroextraction. Multilayer film. Liquid chromatography. Mass spectrometry. Drugs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação do espaço ortogonal tridimensional RGB	32
Figura 2. Classificação das técnicas de microextração assistidas por campos elétricos	36
Figura 3. Processo de montagem de filmes LBL pela técnica de imersão	48
Figura 4. Estrutura química da cocaína	52
Figura 5. Estrutura química da doxorrubicina	54
Figura 6. Conjunto experimental utilizado no processo de MPEE: microtubos de polipropileno modificados para contato elétrico (A) e dispositivo multipiços de 66 lugares com as pontas de papel posicionadas sobre o suporte (B)	55
Figura 7. Figura esquemática do sistema de MPEE.....	56
Figura 8. Pontas de papel comerciais	57
Figura 9. Imagens obtidas por MEV em diferentes magnificações (A) e o espectro EDS (B) da ponta de papel.....	72
Figura 10. Espectro FTIR da ponta de papel.....	73
Figura 11. Difratoograma de raios-X (A) e curvas de TG e de dTG (B) da ponta de papel	73
Figura 12. Efeito do solvente orgânico na fase doadora sobre a MPEE de cocaína (A; n = 5) e efeito das soluções ACN:NH ₄ Ac 25 mmol L ⁻¹ (20:80 v/v) e ACN:MeOH:HAc (45:45:10 v/v/v) sobre a dessorção da cocaína extraída (B; n = 5). A área do pico foi normalizada pelo maior valor médio obtido em cada experimento.....	75
Figura 13. Superfície de resposta, obtida pelo planejamento Doehlert, para avaliação do potencial elétrico e do tempo aplicados na MPEE de cocaína em saliva e determinação por UHPLC-MS/MS	76
Figura 14. Cromatogramas dos extratos do branco e cromatogramas dos extratos fortificados (1 µg L ⁻¹) referentes à saliva artificial (A) e à saliva real (B). Os cromatogramas referem-se à transição de quantificação (304 > 182 m/z).....	78
Figura 15. Gráfico de dispersão dos resíduos em função das concentrações da curva de calibração da cocaína em saliva artificial	78

Figura 16. Eficiência de extração (EF) para a cocaína em saliva artificial por MPEE (A; n = 5) e comparação entre extrações da cocaína (25 µg L ⁻¹) a partir de saliva artificial (S1) e de saliva real (B; S2-S6; n = 5).....	82
Figura 17. Efeito da composição da fase orgânica (A) e efeito do solvente orgânico na fase doadora (B) sobre a MPEE de doxorubicina e do padrão interno (n = 3).....	83
Figura 18. Superfície de resposta, obtida pelo planejamento Doehlert, para a avaliação do potencial elétrico e do tempo aplicados na MPEE de doxorubicina (A) e do padrão interno (B) em saliva, e determinação por UHPLC-PDA.....	85
Figura 19. Mapa de contorno, obtido pelo planejamento de misturas Centroide-Simplex, para a avaliação da solução de dessorção para a doxorubicina extraída.....	86
Figura 20. Avaliação do procedimento de dessorção da doxorubicina e do padrão interno extraídos (n = 3). Ultra = ultrassom.....	87
Figura 21. Cromatogramas do extrato do branco e do extrato fortificado, na concentração de 50 µg L ⁻¹ para a doxorubicina e 300 µg L ⁻¹ para o padrão interno (A) e a curva de calibração, obtida pelo método de MPEE de doxorubicina em saliva real e determinação por UHPLC-PAD (B; n = 5).....	88
Figura 22. Eficiência de extração (EF) para a doxorubicina em saliva real por MPEE (A; n = 3) e comparação entre extrações de doxorubicina a partir de 5 amostras de saliva real (A; S1-S5; n = 5), sendo que a S1 foi usada em todo processo de validação.....	90
Figura 23. Intensidade dos canais RGB para as pontas de papel com e sem limpeza (A; n = 3) e imagens das pontas de papel com e sem limpeza após a MPEE de doxorubicina (1 mg L ⁻¹) em saliva artificial (B).....	91
Figura 24. Superfície de resposta, obtida pelo planejamento Doehlert, para avaliação do potencial elétrico e do tempo aplicados na MPEE de doxorubicina em saliva e determinação por DIA.....	92
Figura 25. Curva de calibração obtida pela MPEE de doxorubicina em saliva real e determinação por DIA (n = 5).....	93
Figura 26. Representação da folha de grafeno (A) e dos nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT; B).....	96

Figura 27. Esquema representativo do processo de formação das multicamadas de PDDA/MWCNT.....	102
Figura 28. Pontas de papel (A) e frascos de borossilicato (B) antes (material da esquerda) e após (material da direita) a deposição do filme (PDDA/MWCNT) ₁₀	107
Figura 29. Espectros UV-Vis obtidos pela deposição de 10 bicamadas PDDA/MWCNT em quartzo (A) e a absorvância em 256 nm em função do número de bicamadas (B)	109
Figura 30. Imagens do filme (PDDA/MWCNT) ₁₀ sobre a ponta de papel (A) e sobre o frasco de borossilicato (B), em diferentes magnitudes	110
Figura 31. Cromatogramas dos extratos de saliva artificial fortificados na concentração de 200 µg L ⁻¹ para os diferentes compostos. Os cromatogramas referem-se à transição de quantificação para cada composto analisado.....	111
Figura 32. Porcentagem de extração de vários compostos por MPEE, usando as pontas de papel revestidas ou não revestidas com o filme (PDDA/MWCNT) ₁₀ , e determinação por UHPLC-MS/MS, n = 3	112
Figura 33. Efeito do tempo para a extração de vários compostos pelo frasco de borossilicato-(PDDA/MWCNT) ₁₀ , n = 3.....	113
Figura 34. Efeito da composição da solução para a dessorção de vários compostos extraídos pelo frasco de borossilicato-(PDDA/MWCNT) ₁₀ , n = 3	114
Figura 35. Extração de vários compostos pelo frasco de borossilicato-(PDDA/MWCNT) ₁₀ a partir de diferentes matrizes, n = 3	115
Figura 36. Comparação entre as áreas do pico de vários compostos extraídos pelo frasco de borossilicato-(PDDA/MWCNT) ₁₀ a partir de 700 µL (ou 0,7 mL) e 10 mL de urina artificial (A) e de água superficial (B), n = 3.....	116
Figura 37. Estudo de reutilização do frasco de borossilicato-(PDDA/MWCNT) ₁₀ na extração de vários compostos a partir de amostras de saliva artificial (A), urina artificial (B) e água superficial (C), n = 5	119

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Trabalhos descritos na literatura envolvendo técnicas de preparo de amostras assistidas por campos elétricos para análise de compostos bioquimicamente ativos, fármacos, drogas e seus metabólitos em fluidos biológicos.....	39
Tabela 2. Trabalhos descritos na literatura envolvendo a aplicação de filmes nanoestruturados por LBL em técnicas de preparo de amostras para matrizes biológicas	49
Tabela 3. Condições cromatográficas e do sistema MS/MS para a determinação de cocaína.....	60
Tabela 4. Condições cromatográficas para a determinação da doxorrubicina	65
Tabela 5. Parâmetros de regressão da curva de calibração e os respectivos somatórios de ER para cada fator de ponderação (w). Onde: aw, bw e rw representam as estimativas de MMQP para os coeficientes linear, angular e de correlação, respectivamente	79
Tabela 6. Figuras de mérito para o método de MPEE de cocaína em saliva e determinação por UHPLC-MS/MS	80
Tabela 7. Figuras de mérito para o método de MPEE de doxorrubicina em saliva e determinação por UHPLC-PDA.....	89
Tabela 8. Figuras de mérito para o método de MPEE de doxorrubicina em saliva e determinação por DIA	93
Tabela 9. Compostos avaliados na extração pelo filme nanoestruturado LBL e suas respectivas propriedades	98
Tabela 10. Condições cromatográficas e do sistema MS/MS para a determinação dos fármacos, drogas de abuso e inseticidas	104
Tabela 11. Avaliação da reprodutibilidade de 5 frascos de borossilicato-(PDDA/MWCNT) ₁₀ na extração de vários compostos a partir de amostras de saliva artificial, urina artificial e água superficial	117

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
ATR	Reflexão total atenuada (<i>Attenuated Total Reflectance</i>)
CE	Eletroforese capilar (<i>Capillary Electrophoresis</i>)
CS	Quitosana (<i>Chitosan</i>)
CZE	Eletroforese capilar de zona (<i>Capillary Zone Electrophoresis</i>)
CYECS	Quitosana modificada com cloridrato de cisteamina (<i>Cysteamine Hydrochloride-Modified Chitosan</i>)
C ₄ D	Detector condutométrico sem contato acoplado capacitivamente (<i>Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detector</i>)
DAH	Diaminohexano
DIA	Análises de imagem digital (<i>Digital Image Analysis</i>)
DLLME	Microextração líquido-líquido dispersiva (<i>Dispersive Liquid-Liquid Microextraction</i>)
DPV	Voltametria pulsada diferencial (<i>Differential Pulse Voltammetry</i>)
dTG	<i>Derivate Thermogravimetric</i>
EA-SPE	Extração em fase sólida assistida por campos elétricos (<i>Electric Field-Assisted Solid Phase Extraction</i>)
EA-SPME	Microextração em fase sólida assistida por campos elétricos (<i>Electric Field-Assisted Solid Phase Microextraction</i>)
EDS	Detector de raios-X por energia dispersiva (<i>Energy Dispersive Detector</i>)
EE	Eletroextração (<i>Electroextraction</i>)
EME	Eletroextração em membrana (<i>Electromembrane Extraction</i>)
ENB	1-etil-2-nitrobenzeno
ESI	Ionização por eletronebulização (<i>Electrospray Ionization</i>)
2-ETH	2-etil hexanol
μ-EE	Micro-eletroextração (<i>Micro-Electroextraction</i>)
cEE	Eletroextração capilar (<i>Capillary Electroextraction</i>)

μ -EME	Micro-eletroextração em membrana (<i>Micro-Electromembrane Extraction</i>)
FA	Fases aceptoras
FD	Fase doadora
FIA	Análise por injeção em fluxo (<i>Flow Injection Analysis</i>).
FID	Dectector de ionização por chama (<i>Flame Ionization Detector</i>)
FLM	Membrana líquida livre (<i>Free Liquid Membrane</i>)
FO	Fase orgânica
FTIR	Infravermelho com transformada de Fourier (<i>Fourier Transform Infrared</i>)
G-EME	<i>Gel-Electromembrane Extraction</i>
GC	Cromatografia a gás (<i>Gas Chromatography</i>)
HA	Ácido hialurônico (<i>Hyaluronic Acid</i>)
HDL	Lipoproteína de alta densidade (<i>High-Density Lipoprotein</i>)
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
LBL	<i>Layer-by-Layer</i>
LC	Cromatografia Líquida (<i>Liquid Chromatography</i>)
LD	Limite de Detecção
LED	Diodos emissores de luz (<i>Light-Emitting Diode</i>)
LDL	Lipoproteína de baixa densidade (<i>Low-Density Lipoprotein</i>)
LLE	Extração líquido-líquido (<i>Liquid-Liquid Extraction</i>)
LLME	Microextração líquido-líquido (<i>Liquid-Liquid Microextraction</i>)
LQ	Limite de Quantificação
MALDI	Ionização e dessorção a laser assistida por matriz (<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization</i>)
MEPS	Microextração por sorvente empacotado (<i>Microextraction by Packed Sorbent</i>)
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MMQP	Método dos Mínimos Quadrados Ponderados
MMQO	Método dos Mínimos Quadrados Ordinários

MPEE	Eletroextração multifásica (<i>Multiphase Electroextraction</i>)
MRM	Monitoramento de Reações Múltiplas
MS	Espectrometria de massas (<i>Mass Spectrometry</i>)
MS/MS	Espectrometria de massas sequencial (<i>tandem Mass Spectrometry</i>)
MSPE	Extração em fase sólida magnética (<i>Magnetic Solid Phase Extraction</i>)
MSPD	Dispersão da matriz em fase sólida (<i>Matrix Solid Phase Dispersion</i>)
MWCNT	Nanotubos de carbono de paredes múltiplas (<i>Multi-Wall Carbon Nanotubes</i>)
NPPE	2-nitrofenil pentil éter
NPOE	2-nitrofenil octil éter
NTC	Nanotubos de carbono
Pa-EME	Eletroextração em membrana em paralelo (<i>Parallel-Electromembrane Extraction</i>)
PDA	Detector de arranjo de fotodiodos (<i>Photodiode Array Detector</i>)
PDDA	Poli (dialildimetilamônio)
PET	Politereftalato de etileno
POM	Polioxometalato
PSS	Poli (estireno sulfonato)
RGO	Óxido de grafeno reduzido
SBSE	Extração sortiva em barra (<i>Stir Bar Sorptive Extraction</i>)
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliácridamida com dodecil-sulfato de sódio (<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>)
SLM	Membrana líquida suportada (<i>Supported Liquid Membrane</i>)
SPE	Extração em fase sólida (<i>Solid Phase Extraction</i>)
SPME	Microextração em fase sólida (<i>Solid Phase Microextraction</i>)
SWCNT	Nanotubos de carbono de parede simples (<i>Single-Wall Carbon Nanotubes</i>)
TG	Termogravimétrica
TOF	Detector de tempo de voo (<i>Time Of Flight</i>)
UHPLC	Cromatografia líquida de ultra performance (<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>)

UV	Detector de ultravioleta (<i>Ultraviolet detector</i>)
W	Fator de ponderação (<i>Weighting factor</i>)
2-phase EME	Eletroextração em membrana bifásica (<i>2-phase Electromembrane Extraction</i>)
3-phase EE	Eletroextração trifásica (<i>3-phase Electroextraction</i>)

Sumário

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO	24
1.1. Introdução	24
1.2. Objetivos	26
CAPÍTULO II - REVISÃO DA LITERATURA	27
2.1. Fármacos e drogas de abuso em matrizes biológicas	27
2.1.1. Saliva: uma matriz alternativa e promissora	27
2.2. Técnicas analíticas para a determinação de fármacos e drogas em matrizes biológicas	29
2.3. Preparo de amostras para matrizes biológicas	33
2.3.1. Novas estratégias utilizadas no preparo de amostras	34
2.3.1.1. Aplicação de campos elétricos em técnicas de preparo de amostras	34
2.3.1.2. Nanomateriais em técnicas de preparo de amostras	44
Filmes nanoestruturados pela técnica <i>Layer-by-Layer</i>	45
Montagem de filmes nanoestruturados por <i>Layer-by-Layer</i>	47
Aplicação de filmes nanoestruturados por <i>Layer-by-Layer</i> em técnicas de preparo de amostras	48
CAPÍTULO III - ELETROEXTRAÇÃO MULTIFÁSICA DE COCAÍNA E DOXORRUBICINA EM SALIVA USANDO PONTA DE PAPEL COMERCIAL	52
3.1. Considerações gerais	52
3.2. Parte experimental.....	55
3.2.1. Sistema de MPEE	55
3.2.2. Reagentes, amostras e materiais	56
3.2.3. Caracterização do material sorvente	58
3.2.3.1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	58
3.2.3.2. Espectroscopia no infravermelho (ATR-FTIR).....	58
3.2.3.3. Análises térmicas	58
3.2.3.4. Difração de raios-X.....	59
3.2.4. MPEE de cocaína em saliva e determinação por UHPLC-MS/MS	59
3.2.4.1. Procedimento de MPEE e de dessorção	59
3.2.4.2. Determinação da droga por UHPLC-MS/MS.....	59
3.2.4.3. Avaliação das condições de extração e de dessorção	60

Efeito do solvente orgânico na fase doadora	60
Avaliação da composição da solução de dessorção	61
Efeito do potencial elétrico e do tempo de extração.....	61
3.2.4.4. Validação do método	61
Seletividade.....	62
Linearidade	62
Efeito matriz	62
Limite de detecção e limite de quantificação.....	63
Recuperação e precisão	63
Eficiência de extração	64
Comparação entre salivas de fontes distintas e saliva artificial.....	64
3.2.5. MPEE de doxorubicina em saliva e determinação por UHPLC-PDA.....	64
3.2.5.1. Procedimento de MPEE e de dessorção	64
3.2.5.2. Determinação do fármaco por UHPLC-PDA.....	65
3.2.5.3. Avaliação das condições de extração e de dessorção	65
Efeito da composição da fase orgânica	65
Efeito do solvente orgânico na fase doadora	66
Efeito do potencial elétrico e do tempo de extração.....	66
Avaliação da composição da solução de dessorção	66
Avaliação do tipo de dessorção	67
3.2.5.4. Validação do método	67
Seletividade.....	67
Linearidade	67
Limite de detecção e limite de quantificação.....	68
Recuperação, precisão, eficiência de extração e comparação entre salivas de fontes distintas	68
3.2.6. MPEE de doxorubicina em saliva e determinação por DIA	69
3.2.6.1. Procedimento de MPEE	69
3.2.6.2. Determinação do fármaco por DIA	69
3.2.6.3. Avaliação das condições de extração	69
Avaliação da limpeza da ponta de papel.....	70
Efeito do potencial elétrico e do tempo de extração.....	70
3.2.6.4. Validação do método	70

3.3. Resultados e discussão	71
3.3.1. Caracterização do material sorvente	71
3.3.2. MPEE de cocaína em saliva e determinação por UHPLC-MS/MS	74
3.3.2.1. Avaliação das condições de extração e de dessorção	74
Efeito do solvente orgânico na fase doadora	74
Avaliação da composição da solução de dessorção	74
Efeito do potencial elétrico e do tempo de extração	75
3.3.2.2. Validação do método	77
Seletividade	77
Linearidade	77
Efeito Matriz	80
Limite de detecção e limite de quantificação	80
Recuperação e precisão	81
Eficiência de extração	81
Comparação entre salivas de fontes distintas e saliva artificial	82
3.3.3. MPEE de doxorrubicina em saliva e determinação por UHPLC-PDA	82
3.3.3.1. Avaliação das condições de extração e de dessorção	82
Efeito da composição da fase orgânica	82
Efeito do solvente orgânico na fase doadora	83
Efeito do potencial elétrico e do tempo de extração	84
Avaliação da composição da solução de dessorção	85
Avaliação do tipo de dessorção	86
3.3.3.2. Validação do método	87
Seletividade	87
Linearidade	87
Limite de detecção, limite de quantificação, recuperação e precisão	88
Eficiência de extração	89
Comparação entre salivas de fontes distintas	89
3.3.4. MPEE de doxorrubicina em saliva e determinação por DIA	90
3.3.4.1. Avaliação das condições de extração	90
Avaliação da limpeza da ponta de papel	90
Efeito do potencial elétrico e do tempo de extração	91

3.3.4.2. Validação do método	92
Linearidade	92
Limite de detecção, limite de quantificação, recuperação e precisão	94
3.4. Conclusões	94
CAPÍTULO IV - PRODUÇÃO DE FILMES NANOESTRUTURADOS POR LAYER-BY-LAYER E APLICAÇÃO NA EXTRAÇÃO DE FÁRMACOS, DROGAS DE ABUSO E INSETICIDAS A PARTIR DE SALIVA E OUTRAS MATRIZES COMPLEXAS	96
4.1. Considerações gerais	96
4.2. Parte experimental.....	99
4.2.1. Reagentes, amostras e materiais.....	99
4.2.2. Montagem e caracterização do filme (PDDA/MWCNT) ₁₀	100
4.2.2.1. Preparo dos substratos.....	100
4.2.2.2. Preparo da solução de PDDA e da dispersão de MWCNT	101
4.2.2.3. Montagem do filme (PDDA/MWCNT) ₁₀	101
4.2.2.4. Caracterização do filme (PDDA/MWCNT) ₁₀	101
Potencial Zeta	101
Espectroscopia UV-Vis	102
Microscopia eletrônica de varredura	102
4.2.3. Aplicação da ponta de papel-(PDDA/MWCNT) ₁₀ na eletroextração multifásica de fármacos, drogas de abuso e inseticidas a partir de saliva	103
4.2.3.1. Procedimento de MPEE e de dessorção	103
4.2.3.2. Determinação dos fármacos, drogas de abuso e inseticidas por UHPLC-MS/MS	103
4.2.4. Aplicação do frasco de borossilicato-(PDDA/MWCNT) ₁₀ na extração de fármacos, drogas de abuso e inseticidas a partir de saliva, urina e água de córrego	105
4.2.4.1. Procedimento de extração.....	105
4.2.4.2. Avaliação das condições de extração e de dessorção	105
4.2.4.3. Extração de fármacos, drogas de abuso e inseticidas a partir de diferentes matrizes	106
4.2.4.4. Avaliação da reprodutibilidade dos frascos de borossilicato-(PDDA/MWCNT) ₁₀	106
4.2.4.5. Avaliação da reutilização dos frascos de borossilicato-(PDDA/MWCNT) ₁₀	106

4.3. Resultados e discussão	107
4.3.1. Montagem e caracterização do filme (PDDA/MWCNT) ₁₀	107
4.3.2... Aplicação da ponta de papel-(PDDA/MWCNT) ₁₀ na eletroextração multifásica de fármacos, drogas de abuso e inseticidas a partir de saliva	110
4.3.3. Aplicação do frasco de borossilicato-(PDDA/MWCNT) ₁₀ na extração de fármacos, drogas de abuso e inseticidas a partir de saliva, urina e água de córrego	113
4.3.3.1. Avaliação das condições de extração e de dessorção	113
4.3.3.2. Extração de fármacos, drogas de abuso e inseticidas a partir de diferentes matrizes	114
4.3.3.3. Avaliação da reprodutibilidade dos frascos de borossilicato-(PDDA/MWCNT) ₁₀	116
4.3.3.4. Avaliação da reutilização dos frascos de borossilicato-(PDDA/MWCNT) ₁₀	118
4.4. Conclusões	120
CAPÍTULO V - CONCLUSÕES E OBSERVAÇÕES FINAIS	122
REFERÊNCIAS.....	124
APÊNDICE.....	141

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO

1.1. Introdução

Determinações analíticas para analitos em baixíssimas concentrações e ainda em amostras complexas demandam técnicas analíticas sensíveis, seletivas e, preferencialmente, de baixo impacto ambiental. Porém, por mais seletiva e sensível que seja a técnica analítica, ela ainda apresentará algumas limitações, as quais podem, pelo menos em parte, ser minimizadas pela etapa de preparo de amostras (Bordin *et al.*, 2015). A etapa de preparo de amostras tem por objetivo a separação da substância alvo a partir da matriz, minimizando o efeito de interferentes, e favorecendo a pré-concentração ou a conversão do analito em uma forma mais adequada à análise. Conseqüentemente, é observada uma melhoria na seletividade, na sensibilidade e na resolução dos problemas analíticos (Bordin *et al.*, 2015; Borges & de Figueiredo & Queiroz, 2015; Campos *et al.*, 2015; Niu *et al.*, 2018).

Com o desenvolvimento de novas tecnologias para a extração e a concentração de substâncias em nível traço, tornou-se possível a determinação de metais, fármacos, drogas e seus metabólitos, mesmo quando presentes em matrizes complexas, como as amostras biológicas. Embora muitos sejam os avanços nessa área, diferentes estratégias são abordadas na tentativa de minimizar as limitações das técnicas de preparo de amostras convencionais, como as fontes de erros, a baixa seletividade, o longo tempo de análise, o elevado consumo de solventes e amostras, além do custo (Bordin *et al.*, 2015; Campos *et al.*, 2015; Niu *et al.*, 2018).

Nos últimos anos, a associação de campos elétricos às técnicas usuais tem sido uma eficiente abordagem para tal finalidade, com destaque para a eletroextração em membrana (EME) (Drouin *et al.*, 2019; Pedersen-Bjergaard & Huang & Gjelstad, 2017; Pedersen-Bjergaard, 2019) e as recentes modalidades de eletroextração (EE) (Raterink *et al.*, 2013; Schoonen *et al.*, 2014; Orlando *et al.*, 2019; Oedit *et al.*, 2020; Oedit & Hankemeier & Lindenbarg, 2021; He *et al.*, 2021). O campo elétrico aplicado tem a função de promover a migração eletroforética de espécies carregadas, favorecendo a velocidade de transferência da amostra para uma fase de interesse e

garantindo seletividade ao processo (Campos *et al.*, 2015; Majors, 2014; Yamini & Seidi & Rezazadeh, 2014; Wuethrich & Haddad & Quirino, 2016).

Além da aplicação de campos elétricos, outras pesquisas direcionadas à busca e à utilização de materiais com maior potencial extrativo, propriedades diferenciadas, dimensões reduzidas, facilidade de síntese e/ou baixo custo têm sido desenvolvidas (Ahmadi *et al.*, 2017; Nazario *et al.*, 2016; Tang & Zhang & Lee, 2016; Xu *et al.*, 2016). A presença característica de uma periodicidade adicional de constituintes também pode originar outros atributos ao material sorvente tornando-o passível para novas aplicações tecnológicas (Borges & Mano, 2014; Richardson & Björnmalm & Caruso, 2015; Richardson *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2019).

Nesse contexto, materiais nanoestruturados obtidos pela técnica de deposição camada por camada ou *Layer-by-Layer* (LBL) sobre um substrato, podem conferir as vantagens de interações seletivas e maior afinidade com o meio, e por isso aplicações em diversas áreas são encontradas (catálise, óptica, separações, energia e biomedicina) (Borges & Mano, 2014; Richardson & Björnmalm & Caruso, 2015). Além da seletividade, os filmes multicamadas automontados podem apresentar alta estabilidade física, química e/ou térmica, devido às fortes interações sequenciais entre as camadas depositadas (Zhang *et al.*, 2019).

Diante das vantagens apresentadas anteriormente e com base nos avanços recentes na área de eletroextração e na obtenção de materiais sorventes mais eficientes para o preparo de amostras, o presente trabalho propõe duas estratégias para a extração de fármacos, drogas de abuso e inseticidas a partir de amostras de saliva. A primeira se baseia na eletroextração multifásica (MPEE) usando um sorvente de celulose comercial e um dispositivo multipólos. A segunda envolve a produção de filmes nanoestruturados por LBL sobre o sorvente celulósico e frascos de borossilicato, usando nanotubos de carbono (NTC) e um polímero catiônico (poli(dialildimetilamônio); PDDA), para a sorção efetiva e seletiva dos compostos alvo a partir de saliva. A determinação dos analitos extraídos foi realizada por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (UHPLC-MS/MS) e acoplada à detecção por arranjo de fotodiodos (UHPLC-PDA), além de análises de

imagens digitais (DIA). Os materiais nanoestruturados também foram aplicados em outras amostras complexas (urina e de água de córrego).

1.2. Objetivos

Este trabalho tem como objetivo principal desenvolver metodologias eficientes e materiais sortivos para a extração de fármacos, drogas de abuso e inseticidas a partir de saliva e outras amostras complexas, usando como abordagens o preparo de amostras assistido por campos elétricos e materiais nanoestruturados pela técnica LBL.

Para melhor compreensão, os objetivos específicos foram divididos em duas partes:

1ª Parte: Eletroextração multifásica usando um sorvente celulósico comercial (ponta de papel) e um dispositivo multipoços

- Caracterizar a ponta de papel por diferentes técnicas analíticas;
- Aplicar a ponta de papel no processo de MPEE de cocaína e doxorrubicina em saliva e determinar os analitos por UHPLC-MS/MS, UHPLC-PDA ou DIA;
- Avaliar as condições de extração e de dessorção e, por fim, validar os métodos desenvolvidos.

2ª Parte: Produção de materiais sorventes nanoestruturados pela técnica LBL e aplicação no preparo de amostras

- Produzir materiais sorventes nanoestruturados pela técnica LBL, usando as pontas de papel e os frascos de borossilicato como substratos, e NTC e PDDA como materiais de revestimento;
- Caracterizar as multicamadas e a morfologia do filme nanoestruturado;
- Aplicar os materiais revestidos pelo filme nanoestruturado no sistema de MPEE e na extração de fármacos, drogas de abuso e inseticidas a partir de saliva e outras amostras complexas e determinar os analitos por UHPLC-MS/MS;
- Avaliar as condições de extração e de dessorção e, por fim, avaliar alguns parâmetros do método desenvolvido.

CAPÍTULO II - REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Fármacos e drogas de abuso em matrizes biológicas

Para o diagnóstico de doenças e suas progressões, monitoramento terapêutico, análises clínicas e toxicológicas têm-se a disponibilidade de uma gama de amostras biológicas, dentre elas plasma, sangue, urina, soro, saliva, suor, mecônio, humor vítreo, cabelo, leite materno, entre outras. Características interessantes como menor complexidade composicional, estabilidade, facilidade de coleta e maior janela de detecção têm atraído a atenção para amostras alternativas em detrimento dos fluidos tradicionais urina, sangue e plasma (Bordin *et al.*, 2015; Dasgupta, 2017; Niu *et al.*, 2018).

Amostras de suor permitem a detecção de fármacos e drogas dias após o consumo, enquanto amostras de cabelo permitem detectar até anos. O cabelo é uma matriz menos passível de adulteração, substituição e diluição durante o processo de coleta, como é feito com amostras de urina (Bordin *et al.*, 2015; Dasgupta, 2017; Niu *et al.*, 2018). Algumas drogas também são armazenadas de forma relativamente estável no humor vítreo durante processos de putrefação ou de extensas reações químicas, fazendo com que este fluido tenha grande visibilidade para análises *postmortem* (Bordin *et al.*, 2015). Investigações ainda mais específicas, como a exposição fetal às drogas (incluindo as drogas de abuso) pela mãe, podem ser realizadas através do mecônio, pela acumulação de substâncias no intestino do feto (Bordin *et al.*, 2015; Dasgupta, 2017). Além das amostras citadas acima, destaca-se a saliva como uma importante matriz, a qual será abordada detalhadamente a seguir.

2.1.1. Saliva: uma matriz alternativa e promissora

A saliva, ou fluido oral (termo amplo), tem sido utilizada principalmente para a verificação do uso recente de fármacos e drogas psicoativas por motoristas ou vítimas de acidentes e em ambientes de trabalho, e por isso vários trabalhos estão descritos na literatura empregando essa matriz (Bassoti *et al.*, 2020; Fiorentin *et al.*, 2017; Malaca *et al.*, 2019; Millan-Santiago *et al.*, 2021; Saar-Reismaa *et al.*, 2020; Scherer *et al.*, 2020; Schepens *et al.*, 2017;

Sorribes-Soriano *et al.*, 2019, 2020). O biofluido é classificado como um líquido incolor que apresenta células desprendidas da mucosa bucal, uma mistura de salivas secretadas por glândulas bucais e até mesmo restos de alimentos. Quimicamente é composto por água (~98%), proteínas (0,7%, geralmente amilase), glicoproteínas e eletrólitos, e no geral o seu pH é levemente ácido (Bordin *et al.*, 2015; UNODC, 2014).

Fármacos e drogas são incorporados à saliva a partir do sangue por difusão passiva, ultrafiltração ou secreção ativa, e podem ser detectados na forma não metabolizada. A difusão passiva é o principal mecanismo de transferência, sendo restrita aos compostos com baixo peso molecular (< 500 Da), não ionizados ou não ligados a proteínas (Bordin *et al.*, 2015; Choo & Huestis, 2004). Nesse contexto, variações no pH (de 5,5 até 7,9) podem alterar a relação de concentração dos compostos entre a saliva e o plasma (S/P). Geralmente, substâncias básicas apresentam uma razão S/P maior do que 1 e tendem a ficar retidas na saliva, enquanto que para as substâncias ácidas essa razão é menor do que 1 e, portanto, se concentram no sangue (Choo & Huestis, 2004; UNODC, 2014).

Como vantagens dessa matriz têm-se a facilidade de coleta, que por sua vez não é invasiva, não requer profissional treinado e é passível de monitoramento. Como consequências há menores chances de adulteração, como ocorre com amostras de urina. Vale mencionar a maior concentração do fármaco/droga original frente aos metabólitos e a possibilidade de estabelecer uma relação entre a concentração da substância na saliva e a sua fração livre no plasma, que por sua vez, depende da quantidade de proteínas nesse fluido (Al Za'Abi & Deleu & Batchelor, 2003; Choo & Huestis, 2004). Ademais, é possível obter múltiplas amostras e têm-se a disponibilidade de materiais comerciais para coleta (como exemplos Omni-Sal[®], OraSure[®], OraTect[®] e Salivette[®]) e de dispositivos de imunoensaio para análise local e imediata (Bordin *et al.*, 2015; Choo & Huestis, 2004; UNODC, 2014).

Já como limitações, pode-se citar: o curto tempo de detecção (algumas horas até 1-2 dias, sendo um pouco maior para drogas básicas), inconveniente quando se quer determinar o histórico de uso da substância; volume restrito (geralmente menor do que 1 mL) e elevada viscosidade da amostra; concentrações de compostos de interesse em

nível traço; e possibilidade de contaminação por medicamentos/drogas ingeridos pelas vias nasais e pela boca (Bordin *et al.*, 2015; Choo & Huestis, 2004; UNODC, 2014).

Quanto à coleta de saliva, há dois procedimentos principais: expelir diretamente em frascos de vidro e de polipropileno, ou a absorção em materiais sorventes, como por exemplo, *swab* ou “almofadas” de algodão. Para o segundo caso, é necessária uma etapa posterior de extração dos compostos a partir do sorvente por centrifugação ou pelo uso de uma solução tampão (Choo & Huestis, 2004; UNODC, 2014).

2.2. Técnicas analíticas para a determinação de fármacos e drogas em matrizes biológicas

A identificação e a quantificação de fármacos, drogas e seus metabólitos em matrizes biológicas é uma tarefa desafiadora, especialmente, pela baixa concentração frequente desses compostos (níveis ppb e ppt) e pela variedade e quantidade de substâncias orgânicas e inorgânicas interferentes nessas matrizes (Niu *et al.*, 2018).

Muitas vezes a substância é previamente identificada por testes rápidos, contudo, resultados positivos requerem a confirmação por métodos analíticos mais confiáveis, precisos e sensíveis. Os métodos analíticos mais utilizados para tal finalidade recorrem das técnicas de cromatografia a gás (GC), cromatografia líquida (LC), espectrometria de massas (MS) e eletroforese capilar (CE) (Baciu *et al.*, 2015; Niu *et al.*, 2018; Tamama, 2021). O uso dessas técnicas é encorajado pela compatibilidade com os níveis de concentração das substâncias alvo em matrizes biológicas.

A cromatografia permite a separação de compostos em uma mistura pela distribuição deles entre duas fases (fase estacionária e fase móvel) que estão em contato direto. Em GC a distribuição de compostos voláteis ocorre entre uma fase estacionária sólida ou líquida e uma fase móvel gasosa, já em LC a distribuição ocorre pela partição dos componentes entre uma fase móvel líquida e uma fase estacionária. LC ainda apresenta a possibilidade de analisar substâncias não voláteis e termicamente instáveis, e geralmente dispensam a etapa de derivatização. Os

métodos cromatográficos conferem alta eficiência de separação e sensibilidade às análises (Cass & Cassiano, 2015; Collins & Braga & Bonato, 2006).

CE fundamenta-se na separação de espécies iônicas ou ionizáveis pela diferença de mobilidade em um meio condutivo e sob a influência de um campo elétrico. A separação ocorre em um capilar, no qual é aplicada uma diferença de potencial e por onde passa o fluxo de amostra. A mobilidade eletroforética e a separação das espécies carregadas dependem do tamanho do íon e da magnitude das cargas (Da Silva *et al.*, 2007; See & Ali, 2018). Esta técnica apresenta alta capacidade de separação, baixo consumo de amostra e solventes, possibilidade de automação, alta resolução e menor custo quando comparada a cromatografia, porém a limitação desta técnica está relacionada à sua baixa detectabilidade (Baciu *et al.*, 2015; See & Ali, 2018).

Além das técnicas de separação supracitadas, destaca-se a MS, que se baseia na análise da matéria a partir da formação de íons em uma fase gasosa, usando um espectrômetro de massas. O espectrômetro de massas, através da aplicação de campos elétricos e/ou magnéticos, é responsável pela medida da relação massa/carga (m/z) das espécies carregadas e suas respectivas abundâncias (Vessecchi *et al.*, 2011). Uma etapa crucial nesse processo é a transformação dos componentes da amostra em íons livres na fase gasosa, que pode ser realizada pelas etapas de vaporização e ionização, sequenciais ou simultâneas. Dentre as fontes de ionização, destacam-se as fontes que operam à pressão atmosférica, como exemplo, a ionização por eletrospray (ESI). Na ESI, a amostra líquida é direcionada para um capilar metálico de diâmetro reduzido, no qual é aplicada uma diferença de potencial em kV. A diferença de potencial aplicada promove a separação de cargas presentes na amostra e assim, pequenas gotas contendo alta densidade de carga elétrica chegam à extremidade do capilar, formando o cone de Taylor e o *spray*. As gotas passam por processos progressivos de dessolvatação, resultando na repulsão eletrostática dentro das gotículas e posterior formação de íons gasosos. Por fim, esses íons são separados pela razão m/z e destinados ao detector (Cass & Cassiano, 2015).

A associação da cromatografia ou da CE com a espectrometria de massas acarreta em maior rapidez das análises, capacidade de analisar compostos com tempos

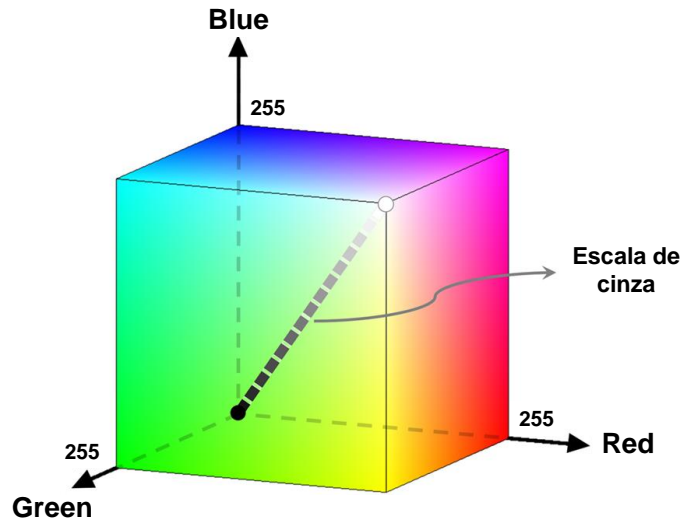
de retenção similares ou idênticos, e maior sensibilidade analítica. Além disso, elevada seletividade e especificidade podem ser alcançadas quando se usa espectrômetros de massas sequenciais (Bordin *et al.*, 2015; Cass & Cassiano, 2015).

A espectroscopia UV-Vis também é integrada as técnicas citadas anteriormente, apresentando menor custo do que a MS. Essa técnica é fundamentada nos fenômenos de interação da radiação eletromagnética, a qual se encontra na região de 190 a 800 nm, com a matéria. Nessa interação, podem ocorrer fenômenos isolados ou simultâneos de absorção, reflexão, dispersão, refração, entre outros (Passos & Saraiva, 2019; Fernandes *et al.*, 2020). Segundo a lei de Lambert-Beer, a absorvância (capacidade da matéria de absorver a radiação emitida) é proporcional à concentração do analito presente na amostra, dentro de alguns limites, podendo estabelecer uma correlação linear entre esses dois parâmetros. O sinal luminoso proveniente da amostra é convertido em sinal elétrico por diferentes tipos de detectores. O detector PDA é multicanal e tem a capacidade de monitorar o espectro completo em um curto espaço de tempo. Ademais, esse tipo de detecção trata-se de um processo não destrutivo, permitindo a sua utilização em sistemas em fluxo e sequencial à cromatografia líquida, tão bem como, seguida de outros detectores (Passos & Saraiva, 2019).

Além das técnicas convencionais, outras estratégias têm sido abordadas para determinações *in situ* através de aparatos de baixo custo e de fácil acesso. Nesse contexto, surgiram os métodos colorimétricos baseados na captura de imagens digitais por câmeras digitais, webcams, scanners ou smartphones (Diniz, 2019; Fernandes *et al.*, 2020). Nas análises colorimétricas ocorrem principalmente os fenômenos de transmissão e de reflexão da radiação visível, através da interação com a substância presente em um solvente ou em um suporte sólido. Essa radiação recebida pode ser de diferentes fontes, incluindo os diodos emissores de luz (LED) (Fernandes *et al.*, 2020). Os dispositivos de captura geram imagens digitais através do espaço ortogonal tridimensional RGB (*Red, Green e Blue*). Nessa dimensão, os componentes de cor são representados por valores entre 0 e 255, totalizando 256 tons para cada canal e 768 variáveis para o histograma RGB. Assim, as coordenadas de

máximo no espaço tridimensional RGB são: [255, 0, 0] para o canal R, [0, 255, 0] para o canal G e [0, 0, 255] para o canal B (Diniz, 2019), conforme mostrado na **figura 1**.

Figura 1. Representação do espaço ortogonal tridimensional RGB



Fonte: Adaptado de Diniz (2019).

Os sinais analíticos obtidos em cada canal RGB podem ser usados de maneira direta ou podem ser convertidos em absorvância ou transmitância, sendo posteriormente correlacionados com a concentração do analito. Além da acessibilidade, os métodos colorimétricos por imagem requerem consumo reduzido de energia, de solventes e de amostras, apresentam autonomia de operação, rapidez e praticidade nas análises, geralmente são não destrutíveis, e ainda possibilitam determinações *in situ* em função da portabilidade dos dispositivos (Fernandes *et al.*, 2020). Dois trabalhos recentes demonstraram a aplicabilidade dessa técnica na determinação de fenazopiridina em amostras de urina, usando um smartphone (Baharfar *et al.*, 2018), e na determinação de corantes antimicrobianos em extratos de peixe, usando um scanner de mesa (Orlando *et al.*, 2019). Ambos concentraram o analito em um material sorvente para a posterior detecção por imagem, obtendo resultados satisfatórios, inclusive baixos limites de detecção (unidades de ng mL^{-1}).

2.3. Preparo de amostras para matrizes biológicas

Uma determinação analítica muitas vezes requer várias etapas, como a amostragem, o preparo de amostras, a separação, a detecção e determinação do teor e, por fim, o tratamento de dados. A etapa de preparo de amostras consiste em procedimentos físicos e/ou químicos para a transferência em massa do composto de interesse (analito ou interferente) de uma fase doadora (amostra) para uma fase aceptora. A transferência do analito promove a sua concentração ou retenção na fase aceptora, enquanto a transferência de interferentes promove um *clean-up* da amostra (Wuethrich & Haddad & Quirino, 2016). Além disso, esta etapa pode ter apenas o objetivo de compatibilizar física e/ou quimicamente a amostra com o sistema analítico utilizado (Campos *et al.*, 2015).

Desta forma, o preparo de amostras confere a redução de interferentes e a minimização do efeito matriz para a análise química, assim como o aumento significativo da seletividade, da sensibilidade e do tempo de vida útil dos sistemas e dispositivos analíticos (Bordin *et al.*, 2015; Borges & de Figueiredo & Queiroz, 2015; Campos *et al.*, 2015; Niu *et al.*, 2018).

Diversas técnicas são abordadas e utilizadas para aplicações bioanalíticas, por exemplo, a precipitação proteica, a extração e a microextração líquido-líquido (LLE e LLME), a extração e a microextração em fase sólida (SPE e SPME), a extração por *headspace*, a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME), a microextração por sorvente empacotado (MEPS), a dispersão da matriz em fase sólida (MSPD), a extração sortiva em barra (SBSE), entre outras (Bordin *et al.*, 2015; Borges & de Figueiredo & Queiroz, 2015; Niu *et al.*, 2018).

Os processos em microescala e automatizados são preferíveis por requerer pequena quantidade de amostra e solventes, obter maiores fatores de pré-concentração e possibilitar análises mais rápidas, ininterruptas e com maior frequência analítica e reprodutibilidade (Campos *et al.*, 2015; Borges & de Figueiredo & Queiroz, 2015).

2.3.1. Novas estratégias utilizadas no preparo de amostras

Embora as técnicas de preparo de amostra convencionais, como a precipitação proteica, a LLE, a SPE e suas variações, apresentem suas vantagens, elas ainda exibem pouca seletividade, capacidade de pré-concentração insuficiente ou são dispendiosas. Além do mais, demandam altos tempos de análise e são consideradas a maior fonte de erros em análises químicas (Bordin *et al.*, 2015; Campos *et al.*, 2015; Niu *et al.*, 2018). Portanto, algumas estratégias são adotadas para aumentar a eficiência e a velocidade de transferência da substância alvo durante o preparo de amostras (Wuethrich & Haddad & Quirino, 2016; Niu *et al.*, 2018), como exemplos:

- O aumento da área de contato entre as fases doadora e aceptora, pela diminuição do volume de solvente ou material extrator;
- O uso de forças direcionadoras, como pressão, aquecimento, irradiação por microondas, ultrassom e campos elétricos;
- A exploração das propriedades físico-químicas de materiais sorventes e desenvolvimento de novos materiais.

2.3.1.1. Aplicação de campos elétricos em técnicas de preparo de amostras

O crescente número de publicações envolvendo o emprego de campos elétricos em técnicas de preparo de amostras nas últimas duas décadas e todos os avanços nessa área demonstram a potencialidade dessa estratégia (Campos *et al.*, 2015; Drouin *et al.*, 2019; Majors, 2014; Pedersen-Bjergaard, 2019; Pedersen-Bjergaard & Huang & Gjelstad, 2017; Wuethrich & Haddad & Quirino, 2016; Seip & Gjelstad & Pedersen-Bjergaard, 2015; Yamini & Seidi & Rezazadeh, 2014).

A aplicação do campo elétrico permite o aumento da cinética e da taxa de transferência de compostos carregados de uma fase doadora (amostra) para uma fase aceptora, conseqüentemente há um ganho na eficiência e redução no tempo de extração. Métodos de extração baseados na força do campo elétrico são somente aplicáveis a compostos ionizáveis nas condições do meio, contribuindo para maior seletividade e remoção de interferentes. Ademais, o uso

reduzido de solventes orgânicos é reportado (Campos *et al.*, 2015; Majors, 2014; Wuethrich & Haddad & Quirino, 2016; Yamini & Seidi & Rezazadeh, 2014).

Os estudos envolvendo a extração líquido-líquido assistida por campos elétricos iniciaram-se com Stichlmair & Schmidt & Proplesch (1992), porém essa técnica só foi impulsionada com o trabalho de Pedersen-Bjergaard & Rasmussen (2006) envolvendo sistemas de microextração com uma fase líquida suportada (membranas líquidas) em fibras ocas de polipropileno e com a aplicação de campos elétricos, sendo muito utilizada em matrizes complexas de fluidos biológicos, alimentos e ambientais.

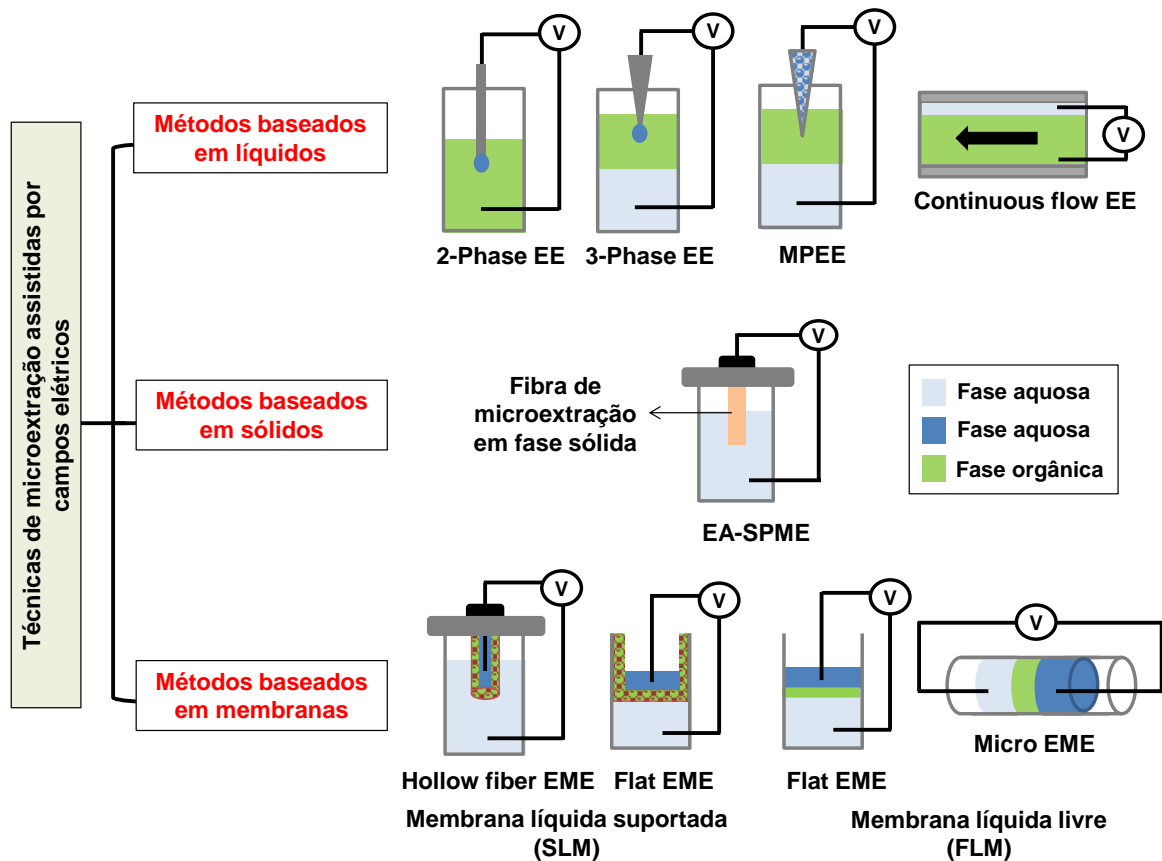
Várias técnicas foram desenvolvidas e têm sido utilizadas ao longo dos últimos anos, como por exemplo: a eletrodialise, a eletrofiltração, a polarização por concentração de íons, a EE e suas diferentes modalidades (como exemplo, a eletroextração capilar), a EME e suas diferentes modalidades, a extração e a microextração em fase sólida assistidas por campos elétricos (EA-SPE e EA-SPME), entre outras (Campos *et al.*, 2015; Drouin *et al.*, 2019; Majors, 2014; Pedersen-Bjergaard & Huang & Gjelstad, 2017; Pedersen-Bjergaard, 2019; Seip & Gjelstad & Pedersen-Bjergaard, 2015; Wuethrich & Haddad & Quirino, 2016; Yamini & Seidi & Rezazadeh, 2014). Das técnicas de microextração mais recentes, podemos classificá-las em três principais grupos: extrações baseadas em líquidos, em sólidos e em membranas, conforme mostrado na **figura 2**. Dependendo da interpretação, uma modalidade pode ser classificada em mais de um método, como por exemplo, a MPEE pode ser classificada como método baseado em líquidos ou em sólidos, no último caso o material suporte será considerado também como uma fase acceptora (modelo descrito posteriormente).

As técnicas EME e EE, a segunda nas modalidades trifásica e multifásica, representam hoje o estado da arte nessa área e serão discutidas de forma detalhada.

Na EME, a tensão é aplicada sobre as fases doadora e acceptora líquidas, que por sua vez são separadas por uma membrana líquida ou membrana líquida suportada. As membranas líquidas suportadas caracterizam-se por solventes orgânicos imiscíveis nas demais fases e imobilizados por um material sólido, geralmente polímeros (como o polipropileno). Hoje em dia, a EME é a técnica de extração assistida por campos elétricos mais utilizada, devido às altas taxas de recuperação, à

miniaturização, à automatização dos sistemas e ao uso direto da fase aceitadora em técnicas analíticas de separação e detecção (Campos *et al.*, 2015; Drouin *et al.*, 2019; Pedersen-Bjergaard & Huang & Gjelstad, 2017; Pedersen-Bjergaard, 2019). Já a EE é baseada na transferência de espécies carregadas de uma fase doadora líquida de grande volume para uma fase aceitadora líquida de menor volume, sem necessariamente, a presença de fases intermediárias (Campos *et al.*, 2015; Yamini & Seidi & Rezazadeh, 2014).

Figura 2. Classificação das técnicas de microextração assistidas por campos elétricos



EE (eletroextração); EME (eletroextração em membrana); 2-Phase (bifásica); 3-Phase (trifásica); MPEE (eletroextração multifásica); Continuous flow (fluxo contínuo) EA-SPME (microextração em fase sólida assistida por campos elétricos); Hollow fiber (fibra oca); Flat (plana); SLM (membrana líquida suportada); FLM (membrana líquida livre).

Fonte: Autoria própria.

A presença de fase(s) intermediária(s) às fases doadora e aceitadora proporciona uma seletividade extra à análise; em contrapartida há um aumento da resistência total

do sistema (Orlando *et al.*, 2019; Raterink *et al.*, 2013). Tanto na EME quanto na EE, o cátodo é alocado na fase doadora e o ânodo é alocado na fase acceptora para a extração de analitos básicos protonados; o contrário é utilizado para analitos ácidos desprotonados.

Raterink *et al.* (2013) publicaram um trabalho inovador envolvendo um processo de eletroextração líquido-líquido trifásico (*3-phase* EE) para a determinação de acetilcarnitinas em plasma. Esse sistema, apresenta 3 fases imiscíveis e uma fase acceptora líquida na forma de gota, imersa na fase orgânica e sustentada por uma ponteira condutora (**figura 2**). Como vantagens desta técnica, os autores reportaram a seletividade (principalmente pela escolha da fase orgânica, que se comporta como filtro) e o pequeno tempo de análise. Porém, foi obtido baixo fator de enriquecimento (até 5,1% para 3 min de extração) e foi verificada a limitação do potencial elétrico aplicado (até 140 V) devido à instabilidade da gota pendente.

Outros trabalhos recentes e muito relevantes envolvem um sistema de MPEE, desenvolvido em um *plate* multipoços para até 66 análises simultâneas (Moreira, 2018; Orlando *et al.*, 2019). Como diferença para o sistema trifásico, a fase acceptora é suportada por um material sorvente (ponta de papel de uso odontológico), o que permitiu contornar o problema de instabilidade da gota pendente reportado por Raterink *et al.* (2013) e, por conseguinte, a aplicação de um potencial elétrico e de tempos de extração mais elevados.

O sistema multifásico foi aplicado na extração de diferentes compostos em amostras biológica, ambiental e de alimentos (Moreira, 2018; Orlando *et al.*, 2019; Amador *et al.*, 2021; Avelar & Nascentes & Orlando, 2021). A utilização de diversas técnicas para a quantificação dos analitos extraídos também demonstra a versatilidade do sistema de extração. A aplicação apresentada por Amador *et al.* (2021) e por Avelar & Nascentes & Orlando (2021) contou com a modificação do material sorvente para papel cromatográfico, o qual possuía uma ponta triangular. Em todos os trabalhos, os autores destacaram a seletividade e o *clean-up* da amostra, favorecidos pela presença de fases com características distintas e sequenciais no sistema, e também o elevado fluxo de trabalho, devido à plataforma multipoços de extração.

Assim como os trabalhos de EE citados acima, outros estudos demonstraram eficiência na EME envolvendo extrações simultâneas em dispositivos multiposos (Drouin *et al.*, 2017; Eibak *et al.*, 2014; Vardal *et al.*, 2018, 2019). Outro grande avanço nessa área aborda o desenvolvimento de dispositivos automatizados e em regime *on line* com sistemas de separação e detecção (Fuchs *et al.*, 2016; He *et al.*, 2021; Hansen *et al.*, 2018; Oedit *et al.*, 2020; Oedit & Hankemeier & Lindenburg, 2021; Petersen *et al.*, 2011; 2012), diminuindo assim o tempo e garantindo a reprodutibilidade das análises.

Devido a todos esses avanços e às diferentes modalidades de extração com aplicação de campos elétricos, muitos estudos são descritos na literatura abrangendo a determinação de drogas, fármacos e outros compostos de interesse para bioanálises, usando fluidos biológicos. Além dos trabalhos já citados anteriormente, na **tabela 1** são apresentados outros exemplos relevantes. O uso de fluidos alternativos ainda é pouco explorado nessa área, ao contrário dos fluidos tradicionais (plasma e urina). Sendo isso um fator motivador para aplicação de saliva na MPEE.

Como em qualquer técnica de extração, alguns fatores podem influenciar o rendimento e a eficiência do processo e, portanto, devem ser estudados e devidamente otimizados. Dessa maneira, os principais parâmetros que afetam as extrações assistidas por campos elétricos serão discutidos a seguir.

Tabela 1. Trabalhos descritos na literatura envolvendo técnicas de preparo de amostras assistidas por campos elétricos para análise de compostos bioquimicamente ativos, fármacos, drogas e seus metabólitos em fluidos biológicos

Analitos	Matriz	Preparo de amostra	Técnica analítica	Ref
Metanfetamina	Urina	EA-SPME	GC-MS	Tan <i>et al.</i> (2013)
Peptídeos	Plasma e urina	cEE	LC-MS	Lindeburg <i>et al.</i> (2010, 2012a)
Acetilcarnitinas	Urina	cEE	LC-MS	Lindeburg <i>et al.</i> (2012b)
Acetilcarnitinas	Urina	μ-EE	LC-MS	Schoonen <i>et al.</i> (2014)
Metabólitos	Urina	2-phase EE	CE-MS	Oedit & Hankemeier & Lindenburg (2021)
Aminas biogênicas	Urina	3-phase EE	CE-UV	Oedit <i>et al.</i> (2020)
Propranolol, amitriptilina, bupivacaína e oxeladina	Plasma e urina	3-phase EE	FIA-MS	He <i>et al.</i> (2021)
Cocaína e lidocaína	Saliva	MPEE	UHPLC-MS/MS	Moreira (2018)
Cocaína e lidocaína	Saliva	MPEE	PS-MS	Amador <i>et al.</i> (2021)
Antidepressivos tricíclicos	Saliva	MPEE	UHPLC-MS/MS e PS-MS	Avelar & Nascentes & Orlando (2021)
Antidepressivos tricíclicos	Urina	EME-EE	GC-FID	Nojavan <i>et al.</i> (2018)
Antineoplásicos e metabólitos	Plasma	EME	UHPLC-MS/MS	Piskacková <i>et al.</i> (2021)
Antidepressivos, anfetaminas e opioides	Sangue, plasma e urina	Nano-EME	LC-MS	Hansen <i>et al.</i> (2018)
Anfetaminas e opioides	Urina	EME	CE-UV	Koruni <i>et al.</i> (2014)
Levamisol	Plasma, urina e saliva	EME	HPLC-UV	Seidi <i>et al.</i> (2011)
Anti-hipertensivos	Saliva	EME	HPLC-UV	Seidi & Yamini & Rezazadeh (2011)
Antidepressivos tricíclicos	Plasma, urina e saliva	EME-DLLME	GC-MS	Karami & Yamini (2021)
Pseudoefedrina, lidocaína e propranolol	Leite materno	EME	HPLC-UV	Asadi & Tabani & Nojavan (2018)
Aminas bioativas	Saliva	EME	CZE-C ₄ D	Liu <i>et al.</i> (2014)
Anfetaminas e opioides	Saliva	EME	LC-MS	Lodoen <i>et al.</i> (2013)
Propranolol, diltiazem e lidocaína	Plasma e urina	LLME-EME	HPLC-UV	Rahimi & Nojavan & Maghsoudi (2020)
Morfina e codeína	Plasma e urina	G-EME	HPLC-UV	Rahimi & Nojavan & Tabani (2020)
Fenazopiridina	Urina	EME	UHPLC-UV e DIA	Bahafar <i>et al.</i> (2018)
Benzodiazepinas e derivados	Plasma	EME	UHPLC-MS/MS	Vardal <i>et al.</i> (2018, 2019)
Amitriptilina, propranolol, bupivacaína e haloperidol	Plasma	Pa-EME	CE-UV	Drouin <i>et al.</i> (2017)
Antidepressivos	Plasma e urina	Pa-EME	MS e UHPLC-MS	Eibak <i>et al.</i> (2014)
Metadona e metabólitos	Fígado de ratos	Flow-EME	LC-MS	Fuchs <i>et al.</i> (2016)
Amitriptilina e metabólitos	Fígado de ratos	EME	UV e MS	Petersen <i>et al.</i> (2011, 2012)
Quetiapina, citalopram, amitriptilina, metadona e sertralina	Plasma	EME	LC-MS	Huang <i>et al.</i> (2014)
Anti-inflamatórios	Soro e urina	2-phase μ-EME	CE-UV	Slampova & Kuban (2019)

EA-SPME (extração em fase sólida assistida por campos elétricos); cEE (eletroextração capilar); EE (eletroextração); EME (eletroextração em membrana); 2-phase (bifásica); 3-phase (trifásica); MPEE (eletroextração multifásica); DLLME (microextração líquido-líquido dispersiva); LLME (microextração líquido-líquido); G- (em gel); Pa- (em paralelo); μ- (micro); Flow- (em fluxo); LC (cromatografia líquida); MS (espectrometria de massas); GC (cromatografia a gás); CE (eletroforese capilar); UV (detector de ultravioleta); FIA (análise por injeção de fluxo); UHPLC (cromatografia líquida de ultra-performance); MS/MS (espectrometria de massas sequencial); PS (ionização por *paper spray*); FID (detector por ionização em chama); HPLC (cromatografia líquida de alta performance); CZE (eletroforese capilar de zona); C₄D (detector condutométrico sem contato acoplado capacitivamente); DIA (análise por imagem digital); Ref (referência).

Collins & Arrigan (2009) explicam através da equação abaixo (**Eq. 1**) a relação de dependência entre a variação do potencial elétrico e a distribuição de espécies iônicas (k_D) entre duas fases líquidas imiscíveis. Assim, a quantidade do íon distribuído entre as fases pode ser controlada pela alteração do potencial elétrico no meio.

$$\ln k_D = \frac{zF}{RT} (E - E^\circ) \quad (\mathbf{Eq. 1})$$

Onde: E é o potencial de transferência iônica no equilíbrio, ou diferença de potencial da célula galvânica entre as células; E° é a diferença do potencial padrão de transferência que é relatada pela transferência de energia livre de Gibbs; z é a carga do íon distribuído na interface das fases imiscíveis; R é a constante universal dos gases; F é a constante Faraday; T é a temperatura do sistema.

A relação entre a velocidade de migração de uma espécie química carregada quando em solução e o campo elétrico no meio é denominada de mobilidade eletroforética (μ_e), a qual depende apenas das características do íon (carga elementar, carga efetiva e raio iônico) e da viscosidade do meio (Borges & de Figueiredo & Queiroz, 2015), conforme mostrado na **Eq. 2**.

$$\mu_e = \frac{v}{E} = \frac{ze}{6\pi\eta r} \quad (\mathbf{Eq. 2})$$

Onde: v é a velocidade de migração do íon; E é o campo elétrico; z é a carga efetiva do íon; e é a carga elementar do íon solvatado; r é o raio do íon solvatado; η é a viscosidade do meio.

Logo, a força motriz da transferência de espécies carregadas é o campo elétrico (E), que é diretamente proporcional à diferença de potencial aplicada, ou voltagem (**Eq. 3**) (Yamini & Seidi & Rezazadeh, 2014). Já a corrente elétrica (I), descrita como o fluxo de carga elétrica em um meio, tem uma relação direta com a voltagem e inversa

com a resistência do sistema, conforme mostra a primeira lei de Ohm (**Eq. 4**) (Skoog *et al.*, 2018). Assim, elevada corrente elétrica é gerada quando se tem alta voltagem ou a resistência do sistema é pequena.

$$E = \frac{V}{d} \quad (\text{Eq. 3})$$

$$I = \frac{V}{R} \quad (\text{Eq. 4})$$

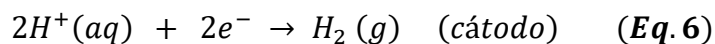
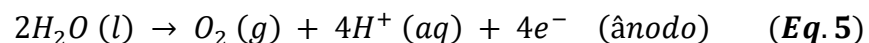
Onde: V é a voltagem; d é a distância entre os eletrodos; R é a resistência do sistema.

Nesse sentido, a rápida migração dos compostos de interesse, favorecida pela diferença de potencial, corrobora para uma redução significativa do tempo de extração, alcançando fatores de enriquecimento e recuperações significativas em apenas segundos ou poucos minutos (He *et al.*, 2021; Hansen *et al.*, 2018; Orlando *et al.*, 2019). Essa é uma das grandes vantagens das técnicas assistidas por campos elétricos quando comparadas as técnicas que utilizam apenas difusão e/ou convecção como meios de transferência.

Embora o potencial elétrico e o tempo de extração tenham influência positiva na quantidade de espécies carregadas extraídas, efeitos variados ocorrem pelo aumento demasiado desses dois parâmetros. Huang *et al.* (2016) debatem que os sistemas de EME atingem rapidamente um estado de equilíbrio, ou estado estacionário, em relação à transferência das espécies carregadas e, portanto, a extensão do tempo de extração se torna desnecessária. Elevados valores de corrente elétrica e de tempo de extração podem acarretar o acúmulo de íons na interface de fases imiscíveis, aumentando assim, a resistência à passagem de compostos carregados. Nesse processo, a passagem forçada e excessiva de cargas entre as fases promove a geração de calor pelo efeito Joule, que se não efetivamente dissipado pode levar ao superaquecimento do sistema (Campos *et al.*, 2015; Seip & Gjelstad & Pedersen-Bjergaard, 2015; Yamini & Seidi & Rezazadeh, 2014). Por sua vez, o superaquecimento do sistema pode

resultar na evaporação do solvente orgânico ou na sua dissolução na amostra (Seidi *et al.*, 2012). A saturação da fase aceptora com o tempo também pode promover o retorno dos compostos extraídos para as demais fases (Raterink *et al.*, 2013). Ademais, Slampova & Kuban (2019) relatam a decomposição de diclofenaco durante a aplicação de 120 V em um sistema de EME.

A falta de reprodutibilidade e a perda da eficiência de extração pelo aumento do tempo e do potencial elétrico aplicado também podem ser correlacionadas às reações de eletrólise que ocorrem na interface solução-eletrodo, conforme exemplificam as **Eq. 5 e 6** (Drouin *et al.*, 2019; Huang *et al.*, 2016). Essas reações provocam a mudança no pH das fases aceptora e doadora aquosas e, conseqüentemente, a alteração ou neutralização da carga dos analitos. Como resultados desse fenômeno, o retorno dos analitos extraídos para as outras fases e a formação de bolhas no sistema podem ocorrer (Drouin *et al.*, 2019; Huang *et al.*, 2016; Seip & Gjelstad & Pedersen-Bjergaard, 2015; Yamini & Seidi & Rezazadeh, 2014).



Como os dois fatores anteriores, a escolha criteriosa do solvente orgânico é de grande importância e por isso é parâmetro comumente estudado. A natureza ou composição do solvente orgânico tem influência no coeficiente de difusão dos compostos presentes no sistema, portanto, uma eficiente transferência depende da compatibilidade de lipofilicidade com os analitos (Drouin *et al.*, 2019; Raterink *et al.*, 2013; Yamini & Seidi & Rezazadeh, 2014). Nos sistemas multifásicos, o solvente orgânico é tido como fase intermediária, evitando a passagem de compostos indesejáveis para a fase aceptora e conferindo seletividade à análise (Raterink *et al.*, 2013). Além do coeficiente de partição adequado, o solvente orgânico deve atender a outros critérios, como: (i) baixa solubilidade em água ($< 1 \text{ g L}^{-1}$) e elevado ponto de ebulição (ou baixa pressão de vapor), evitando a evaporação e a

solubilização do solvente orgânico nas demais fases; (ii) baixa viscosidade e condutividade elétrica suficiente para permitir a migração de espécies carregadas, além de uma resistência elétrica capaz de manter a corrente elétrica o mais baixo possível (recomendável $\leq 50 \mu\text{A}$), mesmo que em condições de altas tensões; (iii) compatibilidade com o suporte sólido nos sistemas SLM, mantendo o solvente orgânico imobilizado nos poros do suporte (Drouin *et al.*, 2019; Yamini & Seidi & Rezazadeh, 2014). Esses critérios visam à integridade e à estabilidade do solvente durante todo o processo de extração.

Dentre os solventes orgânicos mais utilizados em EE e EME, podemos citar os álcoois alifáticos de média a alta polarizabilidade e os compostos nitro-aromáticos de alta polarizabilidade, os quais interagem fortemente com os compostos carregados por ligação de hidrogênio. O 2-nitrofenil octil éter (NPOE), o 2-nitrofenil pentil éter (NPPE) e o 1-etil-2-nitrobenzeno (ENB) apresentam elevado número de grupos receptores de H (3 a 4) e ausência de grupos doadores de H, o que favorece a interação com analitos básicos protonados de baixa polaridade ($\log P > 2$). Já o 1-heptanol, o 1-octanol, o 1-nonanol e o 2-etil hexanol (2-ETH) apresentam 1 grupo receptor de H e 1 grupo doador de H, podendo ser utilizados em extrações analitos básicos ou ácidos (Drouin *et al.*, 2019; Yamini & Seidi & Rezazadeh, 2014). Em detrimento do uso de solventes puros, algumas estratégias têm sido adotadas para facilitar a transferência dos analitos carregados pela fase orgânica, como a adição de solventes solúveis em água (por exemplo, o metanol ou a acetonitrila) (Orlando *et al.*, 2019) ou de agentes íons pareantes (por exemplo, o bis-(2-etil-hexil)fosfato e o tris-(2-etil-hexil)fosfato) (Drouin *et al.*, 2019; Pedersen-Bjergaard & Huang & Gjelstad, 2017; Yamini & Seidi & Rezazadeh, 2014).

Outro fator importante é o pH das fases envolvidas no processo de extração (Yamini & Seidi & Rezazadeh, 2014). Nesse contexto, soluções ácidas são empregadas na fase aceptora para manter os analitos básicos protonados e retidos nessa fase, enquanto soluções básicas são usadas para analitos ácidos desprotonados (Drouin *et al.*, 2019). Apesar da maior influência do pH da fase aceptora sobre a eficiência de extração, também é necessário o controle desse parâmetro na

fase doadora, para garantir que os analitos estejam efetivamente ionizados (Yamini & Seidi & Rezazadeh, 2014).

Como dito anteriormente, a transferência de espécies carregadas em técnicas que empregam campos elétricos ocorre principalmente por migração eletroforética, mas processos de difusão e convecção também ocorrem. A difusão pode ser manipulada pela composição das fases, enquanto que a convecção pode ser beneficiada pela agitação da amostra. Além da convecção, a agitação reduz a camada estagnada e garante a reposição dos analitos entre as fases imiscíveis. Dessa maneira, é possível obter altos níveis de recuperação em tempos menores (Campos *et al.*, 2015; Drouin *et al.*, 2019). Embora a agitação seja favorável, a maioria dos dispositivos de EE e EME são operados em modo estático, devido ao pequeno volume dos compartimentos e a instabilidade das fases envolvidas.

Todas as vantagens e possibilidades apresentadas nesse tópico motivam o desenvolvimento de metodologias para a extração de drogas de abuso, fármacos e outros compostos a partir de amostras de saliva, usando a MPEE.

2.3.1.2. Nanomateriais em técnicas de preparo de amostras

A eficiência de extração depende principalmente da capacidade de interação, do tempo e da área de contato entre o sorvente/solvente e o analito. Nos métodos baseados em sólidos, a sorção pode ser ajustada pela escolha criteriosa de um material sorvente já existente ou pelo desenvolvimento de novos materiais com propriedades diferenciadas (Ahmadi *et al.*, 2017; Nazario *et al.*, 2016; Tang & Zhang & Lee, 2016).

Além da seletividade, é interessante que os materiais sorvivos apresentem alta área superficial, estabilidade física e química, propriedades magnéticas, dispersibilidade em água, anfifilicidade e, não menos importante, facilidade de síntese e/ou baixo custo (Nazario *et al.*, 2016; Tang & Zhang & Lee, 2016).

Nesse contexto, a aplicação de nanomateriais em técnicas de preparo de amostras tem ganhado atenção de diversos grupos de pesquisa. Os nanomateriais apresentam dimensões reduzidas, tipicamente de 1 a 100 nm, podem apresentar diferentes morfologias e são facilmente funcionalizáveis. Essas características têm

efeitos positivos para a termodinâmica e para a cinética da extração. Entre os materiais mais utilizados, podemos citar os nanomateriais de carbono, as nanopartículas metálicas, as nanopartículas magnéticas, os nanomateriais baseados em sílica e os nanosorventes baseados em polímeros (incluindo os polímeros molecularmente impressos) (Ahmadi *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2016). Além desses, destacam-se os filmes nanoestruturados pela técnica LBL, os quais podem ser produzidos para aplicações diversas (Borges & Mano, 2014; Richardson & Björnmalm & Caruso, 2015; Richardson *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2019).

Filmes nanoestruturados pela técnica *Layer-by-Layer*

O interesse pelos filmes finos constituídos de multicamadas automontadas pela técnica LBL se dá, principalmente, pela versatilidade, simplicidade de execução e o custo relativamente baixo de produção, necessitando de poucos aparatos de laboratório e, em geral, dispensando o uso e a exposição a solventes orgânicos (Borges & Mano, 2014). LBL baseia-se na deposição de materiais camada por camada sobre um determinado substrato, sendo possível obter o controle da espessura nanométrica das camadas depositadas e das propriedades físico-químicas dos filmes formados (Borges & Mano, 2014; Richardson & Björnmalm & Caruso, 2015; Richardson *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2019).

Materiais formados por multicamadas foram inicialmente propostos por Iler (1966), envolvendo interações eletrostáticas com adsorção alternada de partículas coloidais carregadas eletricamente. Posteriormente, Maoz *et al.* (1988) propuseram a formação das camadas através de interações químicas, geralmente ligações covalentes e utilizaram o termo "*self-assembly*". Já na década de 90, Decher *et al.* (1997), baseados nas ideias de Iler (1966), propuseram um sistema multicamadas empregando moléculas contendo grupos iônicos, como compostos anfifílicos e polieletrólitos, denominando de técnica *Layer-by-Layer*.

A versatilidade da técnica está relacionada principalmente com a possibilidade de usar substratos de diferentes tamanhos, formas e porosidade, como superfícies planas, membranas, fibras, material biológico, partículas e nanopartículas magnéticas, tão bem como uma variedade de materiais de recobrimento biológicos ou sintéticos,

como polímeros, biomateriais (proteínas, lipídios, DNA, polissacarídeos carregados e vírus), e substâncias inorgânicas carregadas (nanopartículas, argila, nanofolhas e cristais de zeólita modificados). A escolha dos materiais de revestimento permite o desenvolvimento de filmes funcionais para interações pré-determinadas com o meio, tendo aplicabilidade em diversas áreas, como óptica, catálise, energia, separação e biomedicina (Borges & Mano, 2014; Richardson *et al.*, 2015).

As forças de adesão das camadas que conferem estabilidade aos filmes LBL são as interações ou as reações que ocorrem entre os materiais intercalados. Embora as interações eletrostáticas sejam as mais comuns, também são abordadas as interações hidrofóbicas, a coordenação química, a transferência de cargas, as interações bioespecíficas e do tipo *host-guest*, além das ligações de hidrogênio e das ligações covalentes. O fator eletrostático permite interações iônicas fortes e conseqüentemente a formação de filmes mais uniformes e estáveis. Contudo, as interações do tipo bioespecíficas, *host-guest* ou por coordenação química garantem interações mais específicas e seletivas (Borges & Mano, 2014; Zhang *et al.*, 2019). As interações entre camadas conferem propriedades especiais ou melhoradas aos filmes multicamadas quando comparados a outros compósitos, como: maior resistência à tração e à ruptura, capacidade de amortecimento, índice de refração manipulável, maior condutividade térmica e elétrica, elevada barreira para gases, entre outras (Zhang *et al.*, 2019).

Os métodos baseados em forças eletrostáticas ocorrem inteiramente em meio aquoso e soluções diluídas, gerando filmes compatíveis com sistemas biológicos e aplicações biomédicas. Nesses sistemas, a compreensão dos parâmetros pH, temperatura, força iônica, propriedades dos polieletrólitos e dos solventes utilizados, é importante para o controle dos processos de crescimento e das características (espessura, rugosidade, estrutura interna, estabilidade, entre outros) dos filmes automontados (Borges & Mano, 2014). Por exemplo, a variação do pH do meio pode alterar o grau de ionização dos polieletrólitos utilizados no sistema LBL, influenciando drasticamente na espessura das camadas (Choi & Rubner, 2005; Shiratori & Rubner, 2000).

Desenvolvimentos tecnológicos nessa área são focados especialmente na diminuição do tempo de deposição das camadas, no maior domínio das propriedades

dos filmes formados em substratos planares, na abolição do uso de forças direcionadoras complexas e de difícil associação com sistemas de larga escala (como exemplo, a centrifugação), na diminuição da agregação de substratos particulados e no desenvolvimento de sistemas automatizados. A automatização dos processos gera maior reprodutibilidade para os filmes nanoestruturados e possibilita a produção contínua e em larga escala (Richardson *et al.*, 2016).

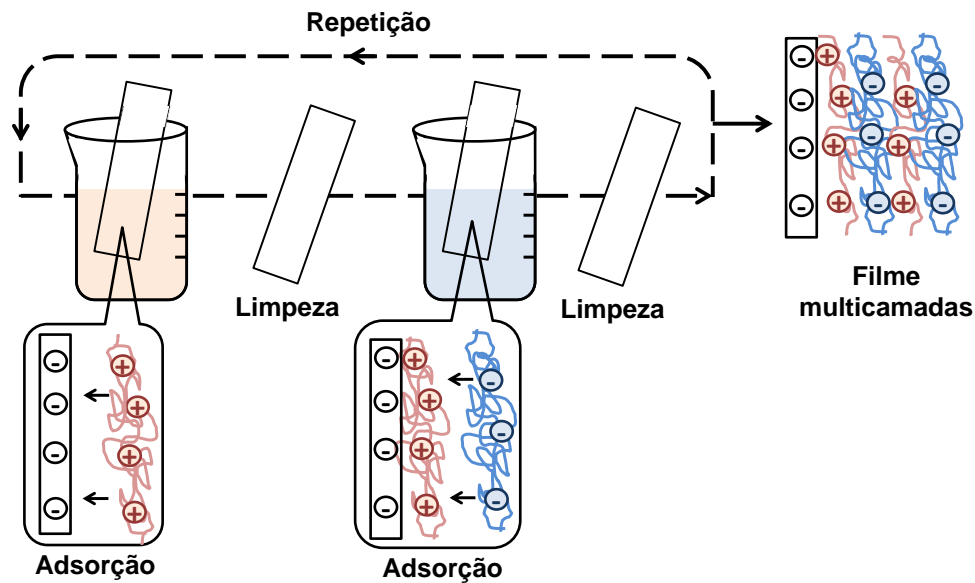
Montagem de filmes nanoestruturados por *Layer-by-Layer*

Diferentes forças dirigentes (imersão, rotação, alta gravidade, pulverização, eletrodeposição, magnetismo, filtração, entre outras) são exploradas para aumentar a eficiência de deposição das multicamadas em sistemas LBL. Essas forças são aplicadas nas cinco técnicas convencionais de montagem dos filmes finos: imersão, *spin*, *spray*, eletromagnética e fluídica (Richardson & Björnmalm & Caruso, 2015; Richardson *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2019).

A técnica por imersão é a mais utilizada e caracteriza-se pela imersão alternada do substrato em soluções contendo as camadas de revestimento e soluções de limpeza, conforme esquematizado na **figura 3**. A solução de limpeza promove a remoção do material não adsorvido (ou em excesso), evitando assim a contaminação da próxima solução em que o material será mergulhado. Para essa técnica, é possível utilizar substratos de diferentes formas e tamanhos (de 10 nm até 1 m) (Richardson & Björnmalm & Caruso, 2015), porém, uma etapa adicional de separação (geralmente, centrifugação ou filtração) é necessária quando se trabalha com materiais não planares, como partículas e fibras (Richardson & Björnmalm & Caruso, 2015; Zhang *et al.*, 2019).

Uma das grandes vantagens da montagem por imersão é a facilidade de operação e a dispensa de equipamentos e vidrarias de elevado custo. Porém quando se trabalha com substratos volumosos e/ou em grande escala, há um gasto considerável com as soluções de revestimento. Nesse caso, uma alternativa é a reutilização dessas soluções, desde que se tenha um controle para evitar contaminações (Richardson & Björnmalm & Caruso, 2015; Zhang *et al.*, 2019).

Figura 3. Processo de montagem de filmes LBL pela técnica de imersão



Fonte: Adaptado de Ariga & Hill & Ji (2007).

Os filmes produzidos por essa técnica apresentam camadas com dimensões ≤ 15 nm (Richardson & Björnmalm & Caruso, 2015) e uma estrutura interpenetrada, ou seja, não são tão organizados quanto os filmes obtidos por outras técnicas (Richardson & Björnmalm & Caruso, 2015; Zhang *et al.*, 2019). Ademais, a deposição das camadas sobre o material se dá por difusão aleatória e, por isso, maiores tempos de contato entre o material e a solução de revestimento podem ser requeridos (até 12 h) (Richardson & Björnmalm & Caruso, 2015). Portanto, melhorias na técnica envolvem o aumento da cinética de adsorção das camadas através da agitação das soluções e da automatização dos sistemas.

Aplicação de filmes nanoestruturados por *Layer-by-Layer* em técnicas de preparo de amostras

Como exposto anteriormente, a técnica LBL apresenta aplicações em diversas áreas, inclusive na de separações. Nesse segmento, membranas multicamadas são usadas em sistemas de filtração e nanofiltração, de osmose reversa e de separação de gases (Joseph *et al.*, 2014). Apesar do amplo uso dos filmes nanoestruturados por LBL

nos sistemas de separação por membranas, as aplicações em técnicas de preparo de amostras ainda são escassas. Alguns exemplos de extrações a partir de amostras biológicas são apresentados na **tabela 2**.

Tabela 2. Trabalhos descritos na literatura envolvendo a aplicação de filmes nanoestruturados por LBL em técnicas de preparo de amostras para matrizes biológicas

Substrato-(Camadas LBL)n n = número de bicamadas	Aplicação	Preparo de amostra	Técnica analítica	Ref
Nanopartículas magnéticas de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-(HA/CS)}_{10}$	Glicopeptídeos em amostras biológicas (proteínas extraídas do fígado de camundongos, de frango e imunoglobulina G humana)	MSPE	MALDI-TOF e LC-MS/MS	Xiong <i>et al.</i> (2013)
Nanopartículas magnéticas de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@SiO}_2\text{-(HA-DAH/HA-CB[6])}_5$	Lipoproteínas de baixa densidade em plasma humano	MSPE	UV-Vis	Jiang & Li & Jia (2018)
Nanopartículas magnéticas de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@SiO}_2\text{-(POM/CYECS)}_4$	Fosfopeptídeos em amostras de leite desnatado, saliva humana, soro e células A549	MSPE	MALDI-TOF	Jiang & Li & Jia (2019)
Microesferas de sílica-(PDDA/PSS/PDDA/MWCNT) ₁	Proteínas básicas em solução de albumina de soro bovino	SPE	UV-Vis e SDS-PAGE	Du <i>et al.</i> (2008)
Grafite-(dendrímero/RGO) ₂	Antineoplásico em amostras de urina e soro humanos	SPME	DPV	Hatamluyi & Eshaghi (2017)

HA (ácido hialurônico); CS (quitosana); MSPE (extração em fase sólida magnética); MALDI (ionização e dessorção a laser assistida por matriz); TOF (tempo de voo); MS (espectrometria de massas); LC (cromatografia líquida); MS/MS (espectrometria de massas sequencial); DAH (diaminohexano); CB[6] (cucurbit[6]uril); UV (detector de ultravioleta); Vis (visível); POM (Polioxometalato); CYECS (quitosana modificada com cloridrato); PDDA (polidialildimetilamônio); PSS (poli estireno sulfonato); MWCNT (nanotubos de carbono de paredes múltiplas); SPE (extração em fase sólida); SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil- sulfato de sódio); RGO (óxido de grafeno reduzido); SPME (microextração em fase sólida); DPV (voltametria pulsada diferencial); Ref (referência).

Nanopartículas magnéticas foram eficientemente modificadas por LBL e utilizadas em procedimentos de MSPE. Xiong *et al.* (2013) alcançaram fatores de pré-concentração de até 111 vezes durante a extração de glicopeptídeos a partir de diferentes amostras biológicas e usando nanopartículas de Fe_3O_4 cobertas por camadas de ácido hialurônico e quitosana. Em uma abordagem similar, Jiang & Li & Jia (2018) apresentaram recuperações de até 91,08% de LDL a partir de amostras de plasma humano em 30 min de extração. Enquanto Jiang & Li & Jia (2019) apresentaram 92,6% de extração de fosfopeptídeos em amostras biológicas e de leite

desnatado em 30 min, podendo reutilizar os materiais nanoestruturados sem alterações de eficiência por até 20 ciclos de extração.

Du *et al.* (2008, 2012) também demonstraram a deposição efetiva de camadas de PDDA, PSS e nanotubos de carbono em microesferas de vidro e em lâ de quartzo, para uso na SPE. As colunas de SPE foram empregadas para a extração de proteínas básicas em solução de albumina de soro bovino (Du *et al.*, 2008) e em ovo branco (Du *et al.*, 2012). Nanotubos de carbono apresentam uma grande capacidade sortiva, contudo, problemas como agregação, lixiviação e resistência a passagens das fases líquidas são ainda desafios no uso desses materiais em sistemas de extração. A deposição das nanopartículas sobre o filme de PDDA/PSS proporcionou maior estabilidade e menor resistência ao fluxo no sistema de SPE. Os resultados desses trabalhos exibem desvio padrão relativo entre colunas menor ou iguais a 7% e fatores de enriquecimento duas vezes maior quando comparado a colunas empacotadas apenas com os nanotubos de carbono.

Além das aplicações em amostras biológicas, outros autores apresentaram o uso filmes LBL para a extração de compostos em amostras ambientais (He *et al.*, 2017; Luo *et al.*, 2014; Niu *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2011) e em amostras de alimentos (Du *et al.*, 2012; Lv *et al.*, 2015). Neste contexto, Niu *et al.* (2012) trouxeram uma nova abordagem de SPE para a extração de poluentes orgânicos em amostras de água, usando filmes de tióis/nanopartículas de prata/polidopamina automontados em garrafas PET (politereftalato de etileno) de 100 mL. A grande novidade desse trabalho é a possibilidade de extrações durante as etapas de transporte e armazenamento. Porcentagens de extração de 30 a 45% foram alcançadas com apenas 1 min de contato entre o material e as amostras, entretanto, tempos mais elevados foram necessários para o estabelecimento do equilíbrio químico. Os autores justificam esse tempo elevado (18 h) pela difusão dos analitos através das camadas mais internas do filme. Além do mais, os filmes mostraram estabilidade durante 20 extrações sequenciais e uma reprodutibilidade considerável entre garrafas (desvio padrão relativo < 5% para a comparação de 11 garrafas).

Os estudos citados nesse tópico exibem resultados importantes de resistência e reprodutibilidade de execução dos materiais nanoestruturados, tão bem como a

eficiência em técnicas de preparo de amostras convencionais. Vale ressaltar a resistência dos filmes diante de processos de dessorção severos usando altas temperaturas (Zhang *et al.*, 2011) ou solventes orgânicos fortes (He *et al.*, 2017; Lv *et al.*, 2015; Niu *et al.*, 2012). Ademais, esses trabalhos confirmam a versatilidade da técnica pelo uso de substratos diversificados (nanopartículas magnéticas, lã de quartzo, microesferas e fibras de sílica, biomassa bacteriana, garrafa PET e grafite).

Diante das vantagens apresentadas nesses últimos tópicos, pretende-se a produção de novos materiais sorventes nanoestruturados por LBL para aplicação no sistema de MPEE e na extração de diferentes compostos a partir de amostras de saliva e outras amostras complexas.

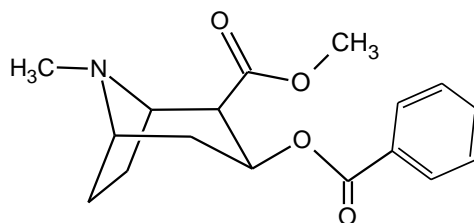
CAPÍTULO III - ELETROEXTRAÇÃO MULTIFÁSICA DE COCAÍNA E DOXORRUBICINA EM SALIVA USANDO PONTA DE PAPEL COMERCIAL

3.1. Considerações gerais

A abordagem de eletroextração multifásica utilizada nesse trabalho foi desenvolvida pelo nosso grupo de pesquisa e já demonstrou grande aplicabilidade e eficiência na extração de compostos orgânicos ionizáveis (Moreira, 2018; Orlando *et al.*, 2019; Avelar & Nascentes & Orlando, 2021; Amador *et al.*, 2021). O sistema de MPEE utiliza uma ponta de papel comercial, capaz de atuar como material suporte e como sorvente, sendo passível de estudo e modificação para melhoria do processo de extração. Assim, esse capítulo apresenta a caracterização da ponta de papel e a aplicação do sistema de MPEE para a extração de cocaína e de doxorubicina em saliva.

A cocaína (3-benzoiloxi-8-metil-8-azabicyclo; **figura 4**) é um potente estimulante e viciante que atua diretamente no sistema nervoso central, de amplo uso e que há anos tornou-se um problema de saúde pública mundial. Seu uso provoca um intenso estado de euforia e alerta, sendo administrada por via intranasal (quando insuflada na forma de sal cloridrato em pó), por via intravenosa (quando o sal é dissolvido em água e injetado) e, ainda, por via pulmonar (quando fumada na forma de base livre ou “crack”) (Drummer, 2004; Goldstein *et al.*, 2009).

Figura 4. Estrutura química da cocaína



Programa Chemscketch 12.0.

O tempo de permanência dessa droga no plasma, na urina e no fluido oral é de 12-48 h após o uso, tornando possível a investigação, principalmente, em casos de

intoxicação emergencial e de uso em ambiente e horário de trabalho. Embora a cocaína seja rapidamente metabolizada, principalmente em benzoilecgonina e éster metilecgonina, o pKa da droga (8,6) favorece o seu aprisionamento no fluido oral, ocasionando em concentrações da droga não metabolizada bem mais elevadas nesse biofluido quando comparado ao plasma (Bosker & Huestis, 2009). Portanto, a saliva é uma amostra em potencial para determinação do uso recente de cocaína.

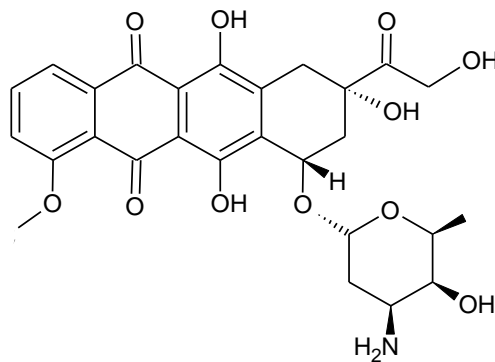
Por apresentar um sítio básico (grupo amina) a cocaína é facilmente protonada em meios ácidos ou levemente ácidos, tornando esse composto passível de aplicação em sistemas de extração assistidos por campos elétricos. Além disso, quando protonada, a droga apresenta um $\text{Log } P_{\text{octanol/água}} = 2,3$, o que indica sua tendência de particionar em uma fase orgânica frente a uma fase aquosa. Por esses motivos, uma das aplicações desse capítulo conta com a MPEE de cocaína em saliva e, em sequência, a sua quantificação por UHPLC-MS/MS. Ademais, tanto a EE quanto a EME já se mostraram eficientes para a extração de cocaína a partir de diferentes fluídos biológicos (Amador *et al.*, 2021; Avelar & Nascentes & Orlando, 2021; Hansen *et al.*, 2018; Koruni *et al.*, 2014; Moreira, 2018).

Já a doxorubicina (DOXO) é um antibiótico antitumoral (também conhecido como antineoplásico ou quimioterápico) da classe das antraciclinas, a qual também inclui a daunorrubicina (DAUNO), a epirubicina, a idarrubicina, entre outros. As antraciclinas podem ser usadas como agente único ou de forma combinada no tratamento de diversos tipos de câncer. Em especial, a doxorubicina é usada como agente primário no tratamento de tumores sólidos e linfomas (Bachur, 2002). Sua estrutura química é mostrada na **figura 5**, compreendendo uma função ácida (aglicona tetracíclica planar) e outra básica (amino açúcar conjugado). Além disso, esse fármaco apresenta uma cor vermelha intensa (Pashaei & Mehrabi & Shekarchi, 2020).

Embora as antraciclinas sejam amplamente utilizadas, elas apresentam efeitos adversos ao organismo, inclusive cardiotoxicidade. A cardiotoxicidade limita a quantidade de fármaco administrado e pode levar ao aumento da morbidade e da mortalidade cardiovascular dos pacientes (Pashaei & Mehrabi & Shekarchi, 2020). A meia vida das antraciclinas no plasma excede 24 horas, podendo ser detectadas em

períodos longos após a administração intravenosa. Concentrações de até $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ são encontradas nesse fluido. Ao contrário do que ocorre em amostras de plasma, esses fármacos apresentam alta estabilidade em saliva e soro (Bachur, 2002; Maudens & Stove & Lambert, 2011). Porém, são escassos e não tão recentes os estudos envolvendo determinações em saliva (Bressolle *et al.*, 1992; Celio *et al.*, 1983; Maudens *et al.*, 2009).

Figura 5. Estrutura química da doxorubicina



Programa Chems sketch 12.0.

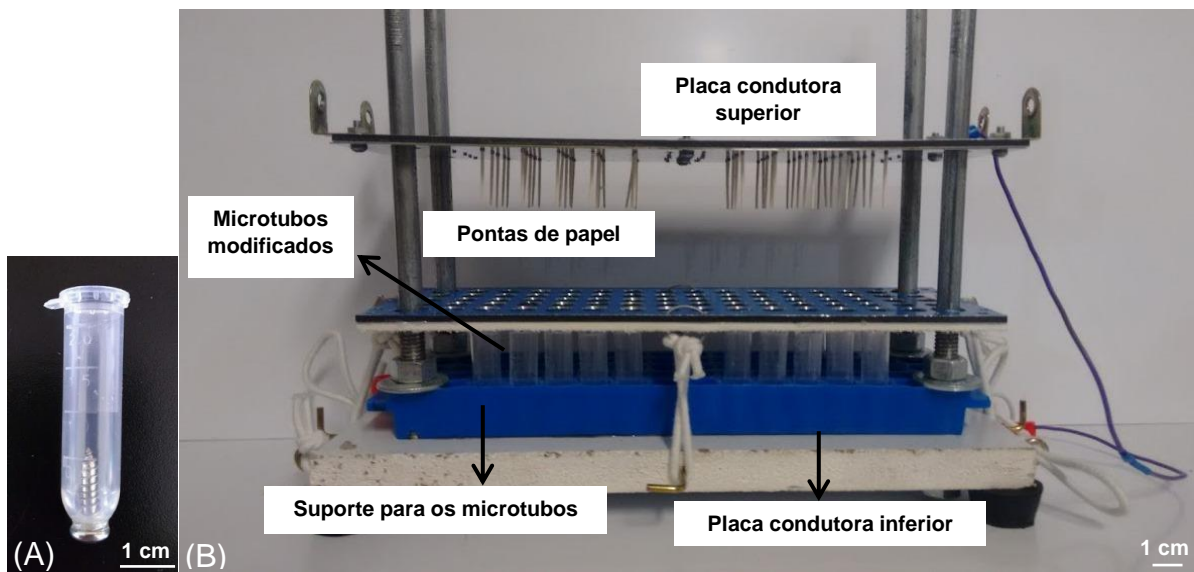
Devido aos efeitos tóxicos, fazem-se necessários métodos analíticos, principalmente que envolvam técnicas de microextração, para o estudo clínico e/ou monitoramento da concentração dos agentes quimioterápicos em amostras biológicas. Assim, ao considerar as características da doxorubicina (presença dos grupos ionizáveis e a cor característica), esse capítulo também propõe a MPEE desse fármaco a partir de saliva e posterior quantificação por UHPLC-PDA e DIA. Além disso, Piskácková *et al.* (2021) já mostraram a possibilidade da EME de doxorubicina e outros antineoplásicos a partir de amostras de plasma e as suas vantagens (elevadas recuperações e eficiente *clean-up* da amostra) quando comparada às técnicas de LLE e PP.

3.2. Parte experimental

3.2.1. Sistema de MPEE

O conjunto experimental de MPEE consiste de microtubos de polipropileno contendo um eletrodo na base (parafuso de aço inoxidável) (**figura 6A**), que atuam como porta amostras, e um dispositivo multipoços (*plate*) de 66 lugares (**figura 6B**), para múltiplas extrações. O *plate* apresenta um contato elétrico na parte inferior de cada poço e uma placa metálica condutora superior, onde são colocadas as fasesceptoras. As partes inferior e superior do *plate* foram então conectadas a uma fonte de potencial elétrico.

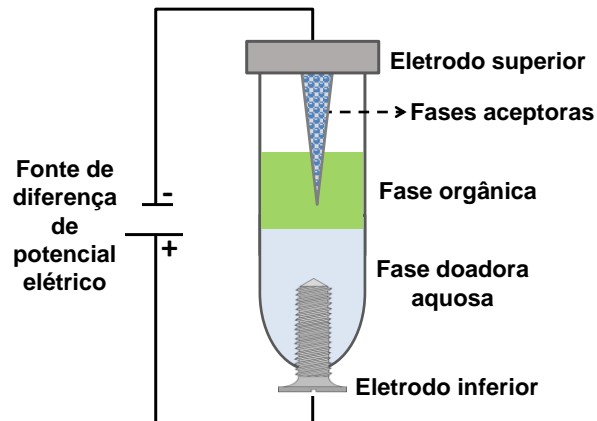
Figura 6. Conjunto experimental utilizado no processo de MPEE: microtubos de polipropileno modificados para contato elétrico (A) e dispositivo multipoços de 66 lugares com as pontas de papel posicionadas sobre o suporte (B)



O sistema de extração é composto pela fase doadora aquosa inferior (FD), seguida da fase orgânica imiscível (FO) e, por último, as fasesceptoras (FA; ponta de papel sorvente embebida na solução eletrolítica) imersas parcialmente na fase orgânica, conforme mostrado na **figura 7**. Nesse esquema, o potencial elétrico foi aplicado entre as fases doadora e receptoras, usando uma fonte de eletroforese

K33-300 V (Kasvi, China). Para a determinação e o controle da corrente elétrica no sistema foi utilizado um multímetro Tekpower TP4000ZC com um comunicador RS-232, o qual foi conectado a um computador contendo o software Multi Meter Interface.

Figura 7. Figura esquemática do sistema de MPEE



3.2.2. Reagentes, amostras e materiais

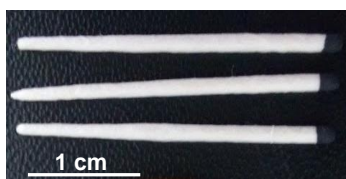
Os sais cloreto de cálcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; Synth, Brasil), cloreto de magnésio hexahidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; Synth, Brasil), cloreto de potássio (KCl; Sigma-Aldrich, EUA), hidrogenofosfato de potássio (K_2HPO_4 ; Synth, Brasil), dihidrogefosfato de potássio (KH_2PO_4 ; Vetec, Brasil), acetato de amônio (NH_4Ac ; Merck, EUA), carboximetilcelulose sal dissódico (Synth, Brasil) e α -amilase (J.T. Baker, EUA) utilizados nessa etapa apresentam grau analítico. Ácido fórmico, ácido acético (HAc), metanol (MeOH) e acetonitrila (ACN) foram obtidos de J.T. Baker (EUA). Etanol, 1-octanol, 2-ETH e acetato de etila foram adquiridos de Sigma-Aldrich (Alemanha). A solução alvejante comercial, contendo hipoclorito de sódio (12% m/m) e cloro ativo (2-2,5% m/m), foi adquirida de um supermercado local. Água deionizada (18,2 M Ω cm) foi obtida através do sistema de purificação Milli-Q Simplicity 185 (Millipore, EUA).

Solução estoque de cocaína na concentração de 1 g L^{-1} foi adquirida de Cerilliant (EUA). Já as soluções de doxorubicina e daunorrubicina foram preparadas a partir dos padrões de cloridrato de doxorubicina e de cloridrato de daunorrubicina (European Pharmacopea, França). Ambas foram armazenadas sob refrigeração.

A saliva artificial foi preparada conforme descrito por Arain *et al.* (2014), utilizando $0,084 \text{ g L}^{-1}$ de α -amilase e os diferentes sais KCl ($0,625 \text{ g L}^{-1}$), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($0,166 \text{ g L}^{-1}$), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($0,059 \text{ g L}^{-1}$), K_2HPO_4 ($0,804 \text{ g L}^{-1}$) e KH_2PO_4 ($0,326 \text{ g L}^{-1}$), com alteração apenas da concentração de carboximetilcelulose para $8,0 \text{ g L}^{-1}$. O pH final da saliva artificial foi 6,7. Já as amostras de saliva real foram obtidas de 6 voluntários do sexo feminino e masculino com faixa etária entre 23 e 31 anos, os quais consentiram em participar desse estudo. Os voluntários foram orientados a coletar a saliva em tubos de polipropileno, sem estimulação e pelo menos 30 min após a ingestão de comidas e de escovar os dentes. Os estudos foram baseados nos princípios da Declaração de Helsinki para experimentos envolvendo seres humanos, após sua aprovação no Comitê de Ética em pesquisas (COEP) da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG (CAEE 32011214600005149).

Para a realização dos experimentos foram utilizados os seguintes materiais: uma balança analítica AE 260 Range (Mettler, Brasil), o sistema de MPEE apresentado no tópico 3.2.1, um pHmetro JK-PHM-005 (JKI, China) e um agitador do tipo Vortex (Velp Scientifica, Itália). O material sorvente utilizado no processo de extração é caracterizado por uma ponta de papel comercial (# 80) da marca Tanari (Tanariman Industrial LTDA, Brasil), conforme mostrado na **figura 8**. As pontas de papel apresentam $\sim 3 \text{ cm}$ de comprimento.

Figura 8. Pontas de papel comerciais



3.2.3. Caracterização do material sorvente

Para aplicar a ponta de papel no processo de extração e, em outro momento, modificar a sua superfície pela técnica LBL, o sorvente foi primeiramente caracterizado pelas técnicas descritas abaixo.

3.2.3.1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para obter informações sobre a morfologia superficial e a composição elementar da ponta de papel foi utilizado um microscópio eletrônico de varredura FEI Quanta 3D SEM-FIB (Louisiana State University, Louisiana) equipado com um detector de raios-X por energia dispersiva (EDS; XFlash 5010 Bruker Nano Berlin, Alemanha). A amostra foi previamente recoberta com uma fina camada de carbono (~15 nm) para tornar o material condutor.

3.2.3.2. Espectroscopia no infravermelho (ATR-FTIR)

Informações estruturais sobre a ponta de papel foram obtidas por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e reflexão total atenuada (ATR), através de um espectrômetro Perkin Elmer Spectrum (EUA) com cristal de diamante/ZnSe e detector de LiTaO₃. A região do espectro analisada foi de 500 a 4000 cm⁻¹, com resolução de 4 cm⁻¹ e 16 varreduras.

3.2.3.3. Análises térmicas

As características de degradação da ponta de papel foram investigadas utilizando uma termobalança DT-60 (Shimatzu, EUA) a uma razão de 10°C min⁻¹, de 25-500°C e sob uma atmosfera inerte de N₂. As curvas de dTG (*Derivate Thermogravimetric*) foram obtidas pelas curvas termogravimétricas (TG) e pelo programa Origin 9.0 (EUA). A massa média de amostra utilizada para as análises foi de 3 mg.

3.2.3.4. Difração de raios-X

Padrões de difração de raios-X foram obtidos por um difratograma XRD-7000 (Shimadzu, Japão) com um tubo de Cu ($\lambda = 1,54060 \text{ \AA}$), operando a uma tensão de 40 kV e 30 mA. O ângulo de incidência variou de 5 a 40° em uma escala 2θ , com velocidade de 2° min^{-1} .

3.2.4. MPEE de cocaína em saliva e determinação por UHPLC-MS/MS

3.2.4.1. Procedimento de MPEE e de dessorção

O procedimento de MPEE foi realizado utilizando os aparatos apresentados no tópico 3.2.1 e condições específicas de FD (1000 μL total), FO (750 μL de 1-octanol), de FA (solução de ácido acético 400 mmol L^{-1} , pH = 3, embebida na ponta de papel), e de tempo de extração e potencial elétrico. Cuidados com o nivelamento das pontas de papel em análises simultâneas e para manter o papel úmido durante toda a análise foram tomados, a fim de obter resultados reprodutíveis.

Após a extração, o analito foi dessorvido da ponta de papel com 250 μL de uma solução de dessorção por 30s em vortex. A solução resultante foi então misturada a 250 μL de água deionizada e direcionada à análise por UHPLC-MS/MS.

3.2.4.2. Determinação da droga por UHPLC-MS/MS

A determinação da cocaína foi realizada por um sistema de cromatografia líquida Acquity UPLCTM H-Class acoplado a um espectrômetro de massas TQD triplo quadrupolo (Waters Inc., EUA) com uma fonte de ionização por ESI no modo positivo. As condições cromatográficas e do sistema MS/MS utilizadas neste tópico estão descritas na **tabela 3**. O *software* Masslynx 4.1 (Waters Corporation, EUA) foi utilizado para controlar o sistema UPLC-MS/MS e para o tratamento dos dados obtidos.

Tabela 3. Condições cromatográficas e do sistema MS/MS para a determinação de cocaína

CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS		
Coluna	Acquity UPLC BEH C18 (1,7 μ m; 2,1 mm; 50 mm)	
Temperatura da coluna e do amostrador	45 e 25°C	
Fase móvel	Água e ácido fórmico 0,1%, v/v (A) Metanol e ácido fórmico 0,1%, v/v (B)	
Gradiente (tempo, % B)	0,00 min, 40% B; 0,20 min, 40% B; 0,40 min, 95% B; 0,70 min, 95% B; 0,71 min, 40% B; 2,00 min, 40% B	
Tempo total de corrida	2 min	
Vazão da fase móvel	0,4 mL min ⁻¹	
Volume de injeção	5 μ L	
CONDIÇÕES DO SISTEMA MS/MS		
Modo de operação	MRM (Monitoramento de Reações Múltiplas)	
Transição	Voltagem do cone	Energia de colisão
304 >182 m/z (quantificação)	13 V	20 V
304 > 82 m/z (confirmação)	13 V	20 V
	Fonte ESI+	
Voltagem do capilar	3300 V	
Vazão do gás de dessolvatação (N₂)	650 L h ⁻¹	
Temperatura de dessolvatação	450°C	
Temperatura da fonte	150°C	
Vazão do gás do cone (N₂)	40 L h ⁻¹	

3.2.4.3. Avaliação das condições de extração e de dessorção

Inicialmente as condições de extração foram baseadas no trabalho de Moreira (2018), com exceção da etapa de agitação das fases doadora e orgânica anterior a eletroextração. Porém, na tentativa de obter maior reprodutibilidade para as análises e melhores porcentagens de extração, alguns testes foram executados.

Efeito do solvente orgânico na fase doadora

Num primeiro momento, a presença de um solvente orgânico na fase doadora foi avaliada de forma univariada. Para tal avaliação, adicionou-se ACN na proporção de

50:50 v/v à saliva artificial, fortificada na concentração de 1 mg L^{-1} de cocaína, respeitando o volume final de FD de $1000 \mu\text{L}$. Condições específicas de extração e dessorção: 300 V e 30 min; solução de dessorção = ACN: NH_4Ac 25 mmol L^{-1} (20:80 v/v).

Avaliação da composição da solução de dessorção

Visando melhorar o processo de dessorção da droga a partir da ponta de papel, duas composições para a solução de dessorção foram estudadas: ACN: NH_4Ac 25 mmol L^{-1} (20:80 v/v) e ACN:MeOH:HAc (45:45:10 v/v/v). Esse estudo também foi realizado de forma univariada e as condições específicas de extração foram: FD = saliva artificial fortificada (1 mg L^{-1} de cocaína):ACN (50:50 v/v); 300 V e 30 min.

Efeito do potencial elétrico e do tempo de extração

O potencial elétrico aplicado e o tempo de extração foram avaliados de forma multivariada através do planejamento experimental do tipo Doehlert. O tempo de extração foi avaliado no intervalo de 5 a 35 min e o potencial elétrico entre 0 e 400 V, com 7 diferentes experimentos e triplicata do ponto central. Os pontos experimentais são mostrados na **tabela A1**. Para tais experimentos, as condições específicas de extração e de dessorção empregadas foram: FD = saliva artificial fortificada (1 mg L^{-1} de cocaína):ACN (50:50 v/v); solução de dessorção = ACN:MeOH:HAc (45:45:10 v/v/v).

Os dados obtidos foram tratados através da planilha eletrônica para o Planejamento Doehlert, desenvolvida por Teófilo & Ferreira (2006). Já a superfície de resposta e o gráfico de pareto foram gerados a partir do *software* Statistica (StatSoft, versão 8.0).

3.2.4.4. Validação do método

Após a etapa de avaliação das condições de extração e de dessorção, alguns estudos sistemáticos foram realizados com o intuito de verificar a confiabilidade dos

resultados obtidos e a adequabilidade do método analítico proposto. As figuras de mérito avaliadas são descritas a seguir.

As condições de extração e dessorção empregadas durante a validação foram: FD = saliva artificial ou real fortificadas:ACN (50:50 v/v); FO = 1-octanol; FA = solução de ácido acético 400 mmol L⁻¹ embebida na ponta de papel; 300 V e 35 min; solução de dessorção = ACN:MeOH:HAc (45:45:10 v/v/v).

Seletividade

A seletividade do método foi avaliada através dos cromatogramas dos extratos do branco (amostra sem o analito) e dos extratos fortificados (nível de concentração baixo; 1 µg L⁻¹). Os extratos foram obtidos pela extração de amostras de saliva artificial e real.

Linearidade

A curva de calibração foi construída a partir de extrações da saliva artificial fortificada nas concentrações de 1, 5, 10, 25, 50, 75 e 100 µg L⁻¹ de cocaína e em quintuplicata. Os dados obtidos foram ajustados ao Método dos Mínimos Quadrados Ponderados (MMQP) e diferentes fatores de ponderação (w) foram estudados, seguindo o protocolo de Almeida & Castel-Branco & Falcão (2002).

Após a ponderação, a avaliação da linearidade seguiu a metodologia proposta por Souza & Junqueira (2005), incluindo o tratamento de outliers (Teste de Jacknife) e a avaliação da normalidade (Teste Ryan-Joiner; estatística R), da independência (Teste de Durbin-Watson; estatística d) e da homocedasticidade (Levene modificado; estatística t_L) dos resíduos e, por fim, a ANOVA para determinar a significância do modelo e o desvio de linearidade.

Efeito matriz

Para estimar o efeito do uso da saliva artificial no processo de validação foram construídas duas curvas de calibração, uma em saliva real e outra em saliva artificial, ambas fortificadas após a extração nas concentrações de 1, 5, 10, 25, 50, 75 e

100 µg L⁻¹. As extrações foram realizadas em quintuplicata para cada nível de concentração. Os dados obtidos foram tratados conforme descrito para o parâmetro de linearidade, e as curvas foram comparadas através do Teste-*F* e do Teste-*t*.

Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (*LD*) e o limite de quantificação (*LQ*) foram determinados com base no desvio padrão da área do pico do branco (*n* = 15) e no coeficiente angular da curva de calibração, conforme as equações abaixo (**Eq. 7 e 8**).

$$LD = 3,3 * \frac{\text{desvio padrão do branco}}{\text{coeficiente angular da curva de calibração}} \quad (\text{Eq. 7})$$

$$LQ = 10 * \frac{\text{desvio padrão do branco}}{\text{coeficiente angular da curva de calibração}} \quad (\text{Eq. 8})$$

Recuperação e precisão

Para avaliação da recuperação e precisão do método, a saliva artificial foi fortificada com cocaína em quatro níveis de concentração diferentes (*LQ*; baixa, 5 µg L⁻¹; intermediária, 25 µg L⁻¹; alta, 100 µg L⁻¹). Cada nível de concentração foi submetido ao processo de extração por 5 vezes no mesmo dia e em dois dias consecutivos.

A recuperação média percentual (*R*) foi calculada conforme a **Eq. 9**. Já a precisão foi avaliada em termos de repetibilidade, ou precisão intra-ensaio (*n* = 5), e precisão intermediária, ou precisão inter-ensaio (*n* = 15), ambas determinadas pelo coeficiente de variação (*CV*), de acordo com a **Eq. 10**.

$$R (\%) = \frac{\text{concentração média determinada}}{\text{concentração teórica}} * 100 \quad (\text{Eq. 9})$$

$$CV (\%) = \frac{\text{desvio padrão da concentração determinada}}{\text{concentração média determinada}} * 100 \quad (\text{Eq. 10})$$

Eficiência de extração

A eficiência de extração (*EF*) foi determinada pela comparação direta entre a área do pico cromatográfico do analito extraído e do extrato da matriz fortificado, de acordo com a **Eq. 11**. As extrações foram realizadas em saliva artificial fortificada em sete concentrações diferentes (1, 5, 10, 25, 50, 75 e 100 µg L⁻¹) e em quintuplicata. Os resultados médios foram comparados através do teste da ANOVA.

$$EF(\%) = \frac{\text{área do pico do analito extraído}}{\text{área do pico do extrato fortificado}} * 100 \quad (\text{Eq. 11})$$

Comparação entre salivas de fontes distintas e saliva artificial

Nesta etapa foram realizadas extrações a partir de amostras de saliva real de 5 cinco voluntários e de saliva artificial. As amostras foram fortificadas na concentração de 25 µg L⁻¹ e as extrações foram realizadas em quintuplicata. Os resultados foram comparados e avaliados por ANOVA.

3.2.5. MPEE de doxorubicina em saliva e determinação por UHPLC-PDA

3.2.5.1. Procedimento de MPEE e de dessorção

As condições de extração utilizadas seguiram a aplicação anterior, porém, com algumas adaptações, inclusive para os volumes de FD (1200 µL total, sendo 700 µL de amostra e 500 µL de solvente orgânico) e de FO (350 µL de solvente orgânico).

Após a extração, a doxorubicina foi dessorvida da ponta de papel, usando 200 µL de uma solução de dessorção, em vortex e/ou em banho ultrassônico. Em seguida, 150 µL de água deionizada foram adicionados à solução de dessorção e a

mistura resultante foi analisada por UHPLC-PDA. Neste método, a daunorrubicina foi utilizada como padrão interno.

3.2.5.2. Determinação do fármaco por UHPLC-PDA

A análise cromatográfica foi realizada em um sistema Acquity UPLC™ H-Class com detecção por PDA. As condições cromatográficas utilizadas são descritas na **tabela 4**. Os espectros foram obtidos na região do UV-Vis, de 200 a 700 nm, e o comprimento de onda de 500 nm foi selecionado para a quantificação da doxorubicina e do padrão interno. Assim como na aplicação anterior, o tratamento de dados e o monitoramento do sistema foram realizados pelo *software* Masslynx 4.1.

Tabela 4. Condições cromatográficas para a determinação da doxorubicina

CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS	
Coluna	Acquity UPLC BEH C18 (1,7 µm; 2,1mm; 50 mm)
Temperatura da coluna	35°C
Temperatura da amostra	25°C
Fase móvel	Água e ácido fórmico 0,1% v/v (A) ACN e ácido fórmico 0,1% v/v (B)
Gradiente (tempo, % B)	0,00 min, 25% B; 0,30 min, 25% B; 2,00 min, 95% B; 2,50 min, 95% B; 2,51 min, 25% B; 4,00 min, 25% B
Tempo total de corrida	4 min
Vazão da fase móvel	0,4 mL min ⁻¹
Volume de injeção	10 µL

3.2.5.3. Avaliação das condições de extração e de dessorção

Efeito da composição da fase orgânica

Nesta etapa, os solventes 1-octanol e 2-ETH foram avaliados, de forma univariada, para a escolha da melhor fase orgânica. As condições específicas de extração e de dessorção foram: FD = saliva artificial fortificada (1 mg L⁻¹ de DOXO

e 1 mg L⁻¹ de DAUNO):ACN (58:42 v/v); 300 V e 20 min; dessorção em vortex (30 s) seguida de banho ultrassônico (5 min), usando solução de ACN:MeOH:HAc (45:45:10 v/v/v).

Efeito do solvente orgânico na fase doadora

Os solventes ACN, metanol e etanol foram adicionados à matriz, individualmente, a fim de avaliar o seu potencial no processo de transferência do analito da fase doadora para a fase orgânica. As condições específicas de extração e de dessorção foram: FD = saliva artificial fortificada (1 mg L⁻¹ de DOXO e 1 mg L⁻¹ de DAUNO): solvente orgânico (58:42 v/v); FO = 1-octanol; 300 V e 20 min; dessorção em vortex (30 s) seguida de banho ultrassônico (5 min), usando solução de ACN:MeOH:HAc (45:45:10 v/v/v).

Efeito do potencial elétrico e do tempo de extração

O potencial elétrico e o tempo de extração foram avaliados através do planejamento experimental Doehlert. O tempo de extração variou de 5 a 35 min e o potencial elétrico variou de 50 a 300 V, com 7 diferentes experimentos e triplicata no ponto central. Os pontos experimentais estudados são apresentados na **tabela A2**. As condições específicas de extração e dessorção foram: FD = saliva artificial fortificada (1 mg L⁻¹ de DOXO e 1 mg L⁻¹ de DAUNO):ACN (58:42 v/v); FO = 1-octanol; dessorção em vortex (30 s) seguida de banho ultrassônico (5 min), usando solução de ACN:MeOH:HAc (45:45:10 v/v/v). Os dados obtidos foram tratados usando a planilha eletrônica desenvolvida por Teófilo & Ferreira (2006), enquanto a superfície de resposta e o gráfico de pareto foram gerados a partir do software Statistica (StatSoft, versão 8.0).

Avaliação da composição da solução de dessorção

A composição da solução de dessorção foi avaliada através do planejamento de misturas ternário do tipo Centróide-Simplex, usando diferentes proporções de ACN, metanol e água, ambos contendo 10% v/v de HAc. O arranjo de experimentos é mostrado na **tabela A3**, com 7 experimentos diferentes e triplicata no ponto central. As

condições específicas de extração e dessorção foram: FD = saliva artificial fortificada (1 mg L^{-1} de DOXO e 1 mg L^{-1} de DAUNO):ACN (58:42 v/v); FO = 1-octanol; 300 V e 35 min; dessorção em vortex (30 s) seguida de banho ultrassônico (5 min). Os dados obtidos foram tratados pelo software Statistica (StatSoft, versão 8.0) e a superfície de resposta e o gráfico de pareto foram gerados.

Avaliação do tipo de dessorção

Os efeitos da dessorção em vortex seguida ou não da dessorção em banho ultrassônico foram avaliados de forma univariada. A dessorção em vortex durou 30 s, enquanto a dessorção em banho ultrassônico durou 5 ou 10 min. As condições específicas de extração e dessorção foram: FD = saliva artificial fortificada (1 mg L^{-1} de DOXO e 1 mg L^{-1} de DAUNO):ACN (58:42 v/v); FO = 1-octanol; 300 V e 35 min; dessorção usando solução de H_2O :ACN:MeOH:HAc (30:30:30:10 v/v/v/v).

3.2.5.4. Validação do método

Após a avaliação das condições de extração e de dessorção, algumas figuras de mérito foram estudadas para o método desenvolvido. As condições de extração e dessorção utilizadas nesta etapa foram: FD = saliva real fortificada:ACN (58:42 v/v); FO = 1-octanol; FA = ponta de papel embebida com solução de ácido acético 400 mmol L^{-1} ; 300 V e 35 min; dessorção em banho ultrassônico (5 min) usando solução de H_2O :ACN:MeOH:HAc (30:30:30:10 v/v/v/v).

Seletividade

Para a avaliação da seletividade, os cromatogramas do extrato do branco e do extrato fortificado ($50 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ de DOXO e $300 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ DAUNO) de saliva real foram comparados.

Linearidade

Trabalhos da literatura envolvendo a determinação de doxorubicina em fluidos biológicos apresentam uma faixa de concentração ampla e variada

(Ahmadi & Madrakian & Afkhami, 2015; Haghshenas & Madrakian & Afkhami, 2016; Lachatre *et al.*, 2000; Maliszewska *et al.*, 2018; Mazzucchelli *et al.*, 2017; Maudens *et al.*, 2009; Soriano *et al.*, 2018; Stratigou *et al.*, 2020; Vajdle *et al.*, 2014; Xie *et al.*, 2018). Neste trabalho optou-se por utilizar uma faixa de 50 a 500 $\mu\text{g L}^{-1}$, a qual compreende as concentrações do fármaco encontradas em saliva humana por Bressolle *et al.* (1992) e Celio *et al.* (1983).

Foi construída uma curva de calibração em saliva real nas concentrações de 50, 125, 200, 275, 350, 425 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ e em quintuplicada. Os dados obtidos foram adequadamente ajustados ao método de regressão dos mínimos quadrados ordinários (MMQO) e a avaliação da linearidade seguiu a metodologia proposta por Souza & Junqueira (2005), conforme indicado no tópico 3.2.4.4. O padrão interno foi adicionado às amostras de saliva real, na concentração de 300 $\mu\text{g L}^{-1}$, anteriormente ao processo de extração e a relação entre as áreas do pico do analito e do padrão interno foi utilizada.

Limite de detecção e limite de quantificação

Os extratos das amostras branco não apresentaram sinal analítico nos tempos de retenção do analito e do padrão interno, portanto, os limites foram determinados experimentalmente a partir de extrações da saliva real fortificada em níveis baixos de concentração ($\leq 50 \mu\text{g L}^{-1}$). O *LD* foi estabelecido como a menor concentração detectável do analito, enquanto o *LQ* foi determinado como a menor concentração com recuperação e precisão aceitáveis.

Recuperação, precisão, eficiência de extração e comparação entre salivas de fontes distintas

Os ensaios de recuperação, precisão, eficiência de extração e comparação entre salivas de fontes distintas foram realizados conforme descrito na aplicação anterior, no tópico 3.2.4.4. A recuperação e a precisão foram avaliadas nos níveis de concentração de 50 (*LQ*), 275 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$, em sextuplicata para cada nível de concentração nos intra-ensaios. Para tais ensaios o padrão interno foi adicionado às amostras de saliva

real, na concentração de $300 \mu\text{g L}^{-1}$. A eficiência de extração foi determinada em 3 níveis de concentração (50 , 275 e $500 \mu\text{g L}^{-1}$) e em quintuplicata para cada nível. Já para a comparação entre salivas de fontes distintas, foram utilizadas amostras provenientes de 6 voluntários, incluindo a que foi utilizada em todo processo de validação, e fortificadas nas concentrações de $275 \mu\text{g L}^{-1}$ para a DOXO e de $300 \mu\text{g L}^{-1}$ para a DAUNO. Cada amostra foi avaliada em quintuplicata.

3.2.6. MPEE de doxorubicina em saliva e determinação por DIA

3.2.6.1. Procedimento de MPEE

As condições de extração utilizadas seguem as descritas no tópico 3.2.5.1 e, após a extração, a doxorubicina foi quantificada diretamente por DIA.

3.2.6.2. Determinação do fármaco por DIA

Para a determinação da DOXO por imagem digital, as pontas de papel contendo o analito extraído foram inicialmente colocadas em placas de Petri e lá deixadas para secar durante 10 min. Quando secas, as pontas foram digitalizadas usando um scanner de mesa (CanonScan LiDE110; Tokyo, Japan) com uma lâmpada LED tricolor (RGB, 24 bits). As imagens obtidas apresentam uma resolução de 600 ppp (pixels por polegada) e foram salvas no formato “.tif”.

Através do software Photofiltre7, uma região de 15×15 pixels da imagem digitalizada, mais especificamente a região do material sorvente contendo o analito, foi selecionada e decomposta em histogramas RGB. O sinal de cada componente de cor variou de 0 a 255, considerando que em um espaço ortogonal tridimensional RGB a coordenada $[0, 0, 0]$ refere-se à cor preta e a coordenada $[255, 255, 255]$ refere-se à cor branca. Esses valores foram usados da forma como coletados, sem conversão.

3.2.6.3. Avaliação das condições de extração

Como alguns parâmetros de extração já foram avaliados para o método com determinação por UHPLC-PDA, como a composição da FD e da FO, não foi observada a necessidade de avaliá-los novamente.

Avaliação da limpeza da ponta de papel

Pretendendo uma melhor detecção e discriminação do analito extraído na ponta de papel, a limpeza da ponta de papel foi realizada e avaliada. Assim, as pontas foram deixadas em contato com a solução alvejante por 30 min, seguida de sucessivos enxagues com água deionizada e posterior secagem em temperatura ambiente. Após a limpeza, a digitalização das pontas originais e limpas foi realizada e o resultado foi comparado. Para complementar, as pontas de papel foram submetidas ao processo de extração e, por fim, analisados. As condições específicas de extração foram: FD = saliva artificial fortificada (1 mg L^{-1} de DOXO):ACN (58:42 v/v); FO = 1-octanol; 300 V e 10 min.

Efeito do potencial elétrico e do tempo de extração

O potencial elétrico e o tempo de extração foram estudados através do planejamento experimental Doehlert. Os níveis avaliados variaram de 50 a 300 V para o potencial elétrico e de 2 a 20 min para o tempo de extração, com 7 diferentes experimentos e triplicata no ponto central. Os pontos experimentais são mostrados na **tabela A4**. As condições específicas de extração foram: FD = saliva artificial fortificada (1 mg L^{-1} de DOXO):ACN (58:42 v/v); FO = 1-octanol. Os dados foram tratados através da planilha eletrônica desenvolvida por Teófilo & Ferreira (2006) e a superfície de resposta e o gráfico de pareto foram gerados a partir do software Statistica (StatSoft, versão 8.0).

3.2.6.4. Validação do método

Para o método desenvolvido, a linearidade, os limites de detecção e de quantificação, e os ensaios de recuperação e precisão foram avaliados conforme os procedimentos descritos no tópico 3.2.5.4. As condições de extração foram: FD = saliva real fortificada:ACN (58:42 v/v); FO = 1-octanol; 300 V e 20 min.

3.3. Resultados e discussão

3.3.1. Caracterização do material sorvente

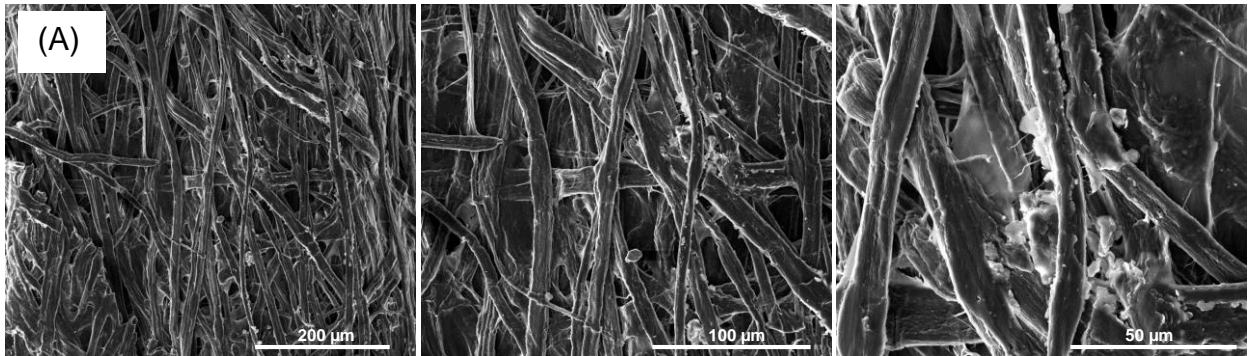
A caracterização teve como finalidade o conhecimento das características morfológicas e físico-químicas do sorvente. Através das imagens obtidas por MEV (**figura 9A**), foi possível observar a presença de fibras de celulose, as quais são homogêneas, apresentam formato de tira e um diâmetro que variou entre 4 e 20 μm . As superfícies das fibras se revelaram bem irregulares e rugosas, além de apresentarem uma camada externa e partículas esféricas aderidas. Estas últimas podem estar associadas à presença de goma adraganta e ao silicato de sódio, conforme descrito pelo fabricante. Já as análises por EDS mostraram que o material apresenta uma composição química elementar principal de carbono (C) e oxigênio (O), além de traços de cálcio (Ca), silício (Si) e enxofre (S), como é mostrado na **figura 9B**.

O espectro na região do infravermelho (**figura 10**) apresenta bandas de absorção características da celulose I. Os picos entre 1158 e 890 cm^{-1} são atribuídos à estrutura sacarídea da celulose, um deles em $\sim 1028 \text{ cm}^{-1}$ refere-se à vibração de estiramento da ligação C-O e à vibração da ligação C-H e, outro em $\sim 1103 \text{ cm}^{-1}$, refere-se à vibração de estiramento do grupo C-O-C (ligação éter glicosada). A presença das bandas em ~ 1639 e 3300 cm^{-1} é atribuída à vibração de deformação da ligação O-H em moléculas de água absorvidas e à vibração de estiramento da ligação O-H, respectivamente, as quais demonstram a tendência hidrofílica do material analisado (Wang *et al.*, 2018). Já o pico em $\sim 1428 \text{ cm}^{-1}$ é característico da vibração de deformação $-\text{CH}_2$, enquanto o pico em $\sim 2896 \text{ cm}^{-1}$ refere-se à vibração de estiramento da ligação C-H alifática (Battistel *et al.*, 2018; Costa *et al.*, 2015; Kouadri & Satha, 2018; Souza *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018).

As características de cristalinidade também foram avaliadas e o difratograma de raios-X (**figura 11A**) apresentou picos característicos de celulose I. Os picos bem definidos e não dispersivos em $2\theta = 15,8^\circ$ (101), $22,3^\circ$ (002) e $34,3^\circ$ (040) (Souza *et al.*, 2018) permitem definir uma estrutura cristalina para a ponta de papel, além de indicar a ausência de componentes amorfos, como a hemicelulose, a lignina,

as pectinas ou a celulose amorfa (Wang *et al.*, 2018). O padrão de raios-X é coerente com os resultados obtidos por espectroscopia na região do infravermelho.

Figura 9. Imagens obtidas por MEV em diferentes magnificações (A) e o espectro EDS (B) da ponta de papel



O perfil de degradação térmica para a amostra é ilustrado nas curvas de TG e dTG (**figura 11B**). O termograma demonstra o comportamento típico da celulose frente a sua degradação térmica em dois estágios bem definidos: o primeiro ocorre com a perda de ~4% em massa, entre 30 e 100°C, e o segundo ocorre com a perda de ~78% em massa, entre 270 e 380°C. A pequena redução de massa no primeiro estágio equivale à perda de água de hidratação (Wang *et al.*, 2018). Já o decaimento no segundo estágio equivale à degradação da celulose, confirmada pelo pico em 356°C na curva de dTG (Battistel *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018). A massa residual pode estar

associada com a presença de compostos inorgânicos refratários na ponta de papel, como o silicato de sódio, ou até mesmo com a goma adraganta.

Figura 10. Espectro FTIR da ponta de papel

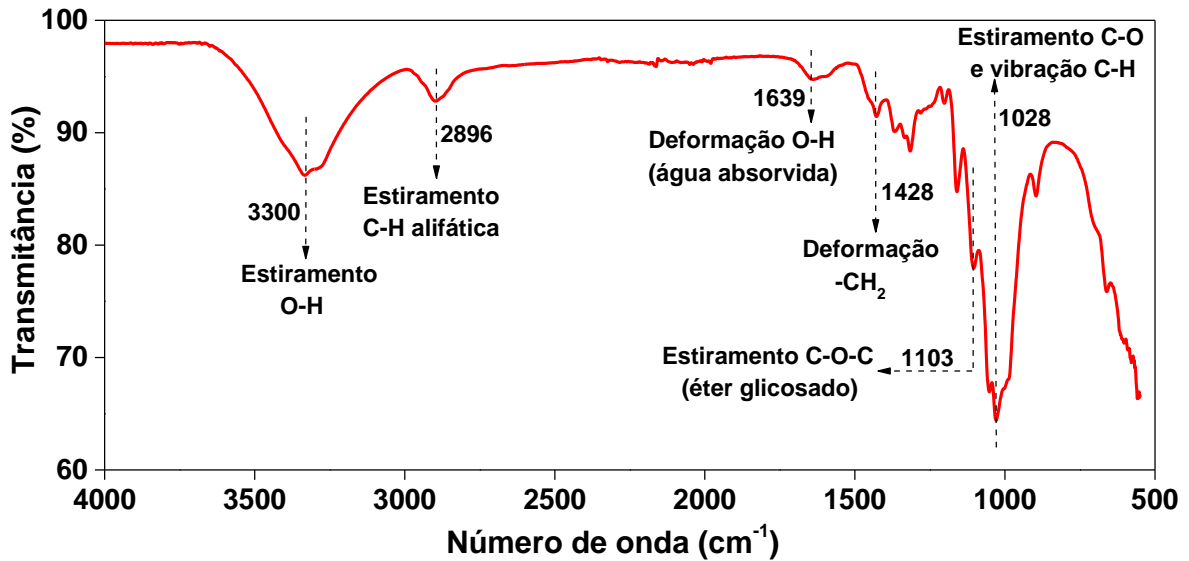
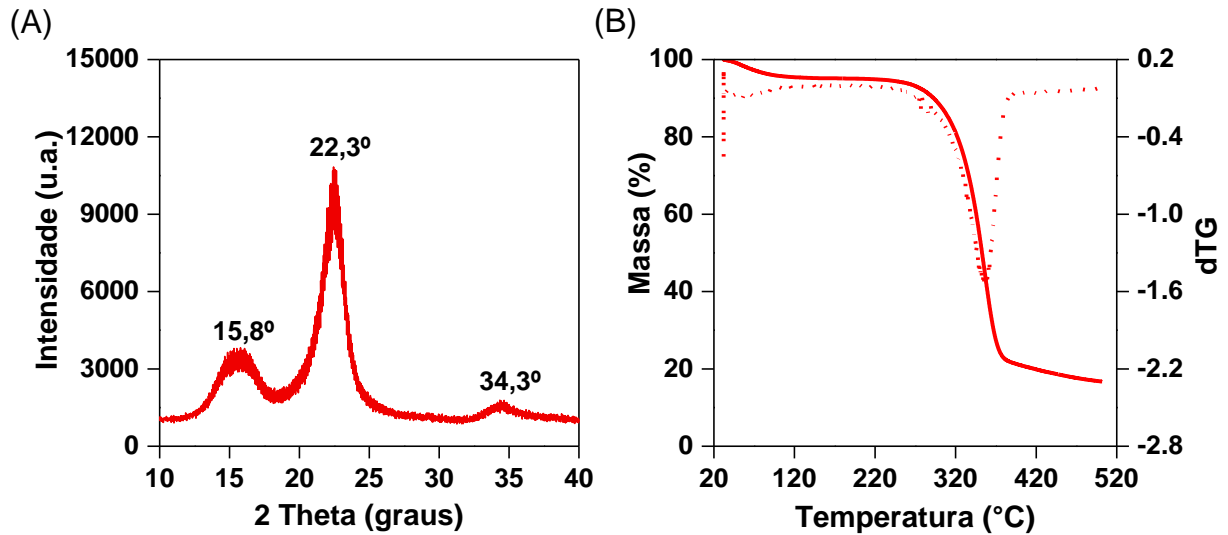


Figura 11. Difratograma de raios-X (A) e curvas de TG e de dTG (B) da ponta de papel



3.3.2. MPEE de cocaína em saliva e determinação por UHPLC-MS/MS

3.3.2.1. Avaliação das condições de extração e de dessorção

Efeito do solvente orgânico na fase doadora

A transferência do analito através do sistema multifásico é um grande desafio e depende da composição das fases. O solvente orgânico na FD diminui a tensão interfacial entre as fases imiscíveis em contato, aquosa e orgânica, além de reduzir a condutividade elétrica do meio e, por conseguinte, aumentar o campo elétrico na fase a qual foi adicionado (Raterink *et al.*, 2013). O uso de ACN na FD (50:50 v/v) foi eficiente para a extração de corantes antimicrobianos em extrato de peixe, usando o sistema MPEE (Orlando *et al.*, 2019). Assim, essa condição foi avaliada em um teste preliminar.

A adição de ACN à saliva artificial aumentou consideravelmente a quantidade de cocaína extraída (**figura 12A**). Além de aumentar o campo elétrico no meio, a ACN é parcialmente solúvel no 1-octanol, colaborando para a difusão passiva dos analitos para a fase orgânica. Ao mesmo tempo, essa solubilização parcial não acarretou em problemas estruturais para o sistema, já que o eletrodo inferior permaneceu imerso apenas na FD e as FA continuaram em contato apenas com a FO.

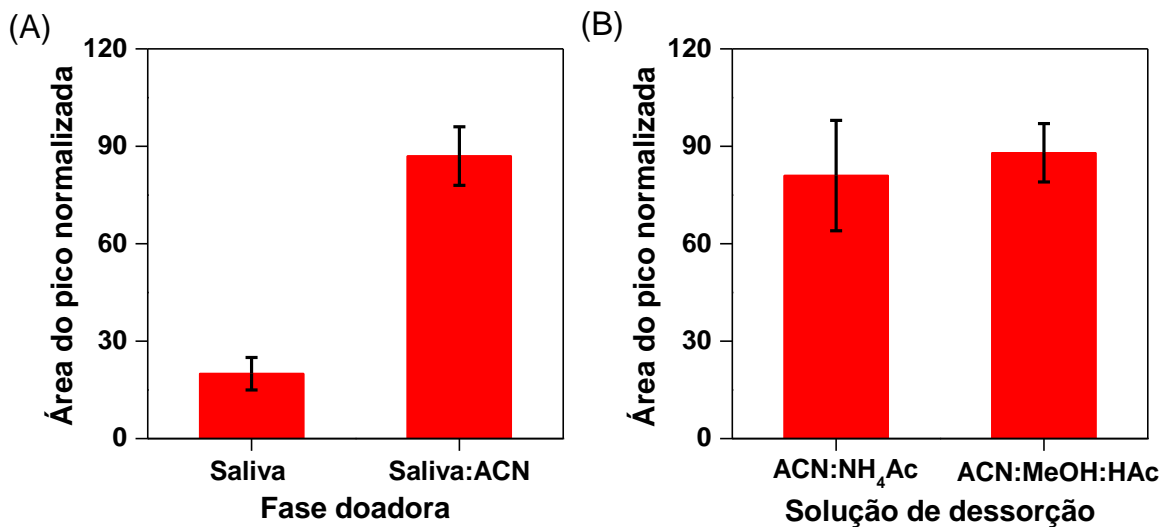
Avaliação da composição da solução de dessorção

Ao alcançar as fases aceptoras, o analito pode estabelecer diferentes tipos de interação. Assim, após a extração, fazem-se necessárias a quebra dessas interações e a dessorção dos compostos de interesse a partir da ponta de papel para um meio compatível como os sistemas de separação e detecção. Considerando o sucesso de misturas de metanol e ACN para a eluição de cocaína em sistemas SPE (Boissel *et al.*, 2016; Danaceau & Haynes & Chambers, 2017), uma solução contendo ACN:MeOH:HAc (45:45:10 v/v/v) foi comparada à solução utilizada por Moreira (2018), contendo ACN:NH₄Ac 25 mmol L⁻¹ (20:80 v/v).

Embora o resultado do estudo das soluções de dessorção (**figura 12B**) não tenha demonstrado diferença estatística significativa, acredita-se que a mistura de solventes orgânicos e ácido acético possa ser mais eficiente para a quebra das

possíveis interações hidrofóbicas entre a cocaína e as cadeias poliméricas de celulose do sorvente. Já a adição de ácido à mistura pode facilitar a troca iônica do analito protonado nos grupos hidrofílicos de interação com o sorvente. Ademais, a superfície da ponta de papel detém 1-octanol após a extração, o que pode dificultar a dessorção do analito por uma solução mais aquosa e o que pode ter gerado uma maior falta de reprodutibilidade quando a solução ACN:NH₄Ac 25 mmol L⁻¹ (20:80 v/v) foi usada. Assim, a solução ACN:MeOH:HAc (45:45:10 v/v/v) foi escolhida para as demais etapas.

Figura 12. Efeito do solvente orgânico na fase doadora sobre a MPEE de cocaína (A; n = 5) e efeito das soluções ACN:NH₄Ac 25 mmol L⁻¹ (20:80 v/v) e ACN:MeOH:HAc (45:45:10 v/v/v) sobre a dessorção da cocaína extraída (B; n = 5). A área do pico foi normalizada pelo maior valor médio obtido em cada experimento



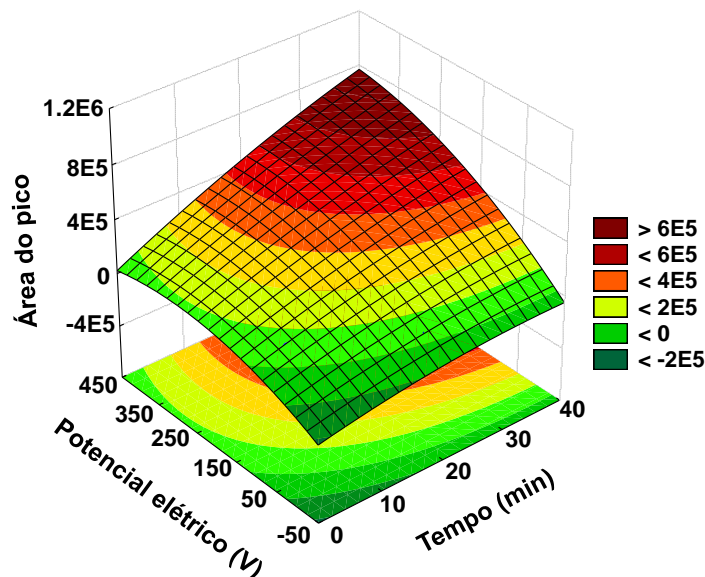
Efeito do potencial elétrico e do tempo de extração

Considerando a influência do tempo e do potencial elétrico em sistemas de extração assistidos por campos elétricos e do possível compromisso entre esses dois parâmetros, eles foram avaliados pelo planejamento experimental Doehlert. Os dados obtidos foram analisados por ANOVA, através da qual foi possível verificar que o modelo explica 98,97% da variabilidade na resposta ($R^2 = 0,9897$). Além disso, a

regressão mostrou-se significativa ($F_{\text{calc}} = 159,63 > F_{\text{crit}} (0,99; 3; 5) = 12,06$) e que não apresentou falta de ajuste ($F_{\text{calc}} = 30,32 < F_{\text{crit}} (0,99; 3; 2) = 99,17$). Os efeitos de primeira ordem foram significativos e positivos, enquanto o efeito de interação entre as duas variáveis não foi significativo (informações obtidas pelo gráfico de pareto).

A superfície de resposta gerada (**figura 13**) confirma a contribuição positiva, tanto em magnitude quanto em direção, dos fatores analisados para a quantidade de cocaína extraída. Ademais, o experimento conduzido sem aplicação de campo elétrico (0 V) não apresentou extração significativa (apenas 1% em valor normalizado), comprovando assim, a melhoria drástica na transferência do analito com a aplicação do campo elétrico.

Figura 13. Superfície de resposta, obtida pelo planejamento Doehlert, para avaliação do potencial elétrico e do tempo aplicados na MPEE de cocaína em saliva e determinação por UHPLC-MS/MS



Os resultados obtidos são coerentes com a discussão realizada por Yamini & Seidi & Rezazadeh (2014), fundamentada na relação direta entre potencial-campo elétrico e tempo de extração-quantidade de íons transferidos.

Todavia, conforme já discutido, a escolha de valores muito elevados para esses parâmetros pode causar a falta de reprodutibilidade e a diminuição da eficiência de extração (Campos *et al.*, 2015; Drouin *et al.*, 2019; Huang *et al.*, 2016; Seip & Gjelstad & Pedersen-Bjergaard, 2015; Yamini & Seidi & Rezazadeh, 2014), principalmente, pela perda da capacidade de troca das fasesceptoras. Por esses motivos e pelas respostas similares para os potenciais de 300 e 400 V, as condições escolhidas foram de 300 V e 35 min.

3.3.2.2. Validação do método

Seletividade

Os cromatogramas dos extratos do branco e os cromatogramas dos extratos fortificados ($1 \mu\text{g L}^{-1}$), tanto de saliva real quanto de saliva artificial, são comparados na **figura 14**. É possível verificar que para o branco não há sinal significativo de interferentes no tempo de retenção do analito (0,51 min, conforme é mostrado nos cromatogramas dos extratos fortificados) para ambas as salivas. Esses resultados demonstram a seletividade do método e também indicam que as etapas de preparo de amostras e separação foram eficientes.

Linearidade

A heterocedasticidade dos dados foi verificada pelo Teste Levene modificado, o qual revelou que há uma diferença significativa entre as variâncias para os níveis de concentração estudados ($t_{L\text{calc}} = 3,16 > t_{L\text{crit}} (0,95; 32) = 2,04$). Esse resultado foi comprovado através da **figura 15**, que mostra que os resíduos não estão aleatoriamente distribuídos ao redor do eixo x e que o desvio padrão da resposta é proporcional à concentração. Esse comportamento é comum em métodos bioanalíticos que apresentam uma ampla faixa de concentração, de duas ou mais ordens de magnitude (Almeida & Castel-Branco & Falcão, 2002).

Figura 14. Cromatogramas dos extratos do branco e cromatogramas dos extratos fortificados ($1 \mu\text{g L}^{-1}$) referentes à saliva artificial (A) e à saliva real (B). Os cromatogramas referem-se à transição de quantificação ($304 > 182 \text{ m/z}$)

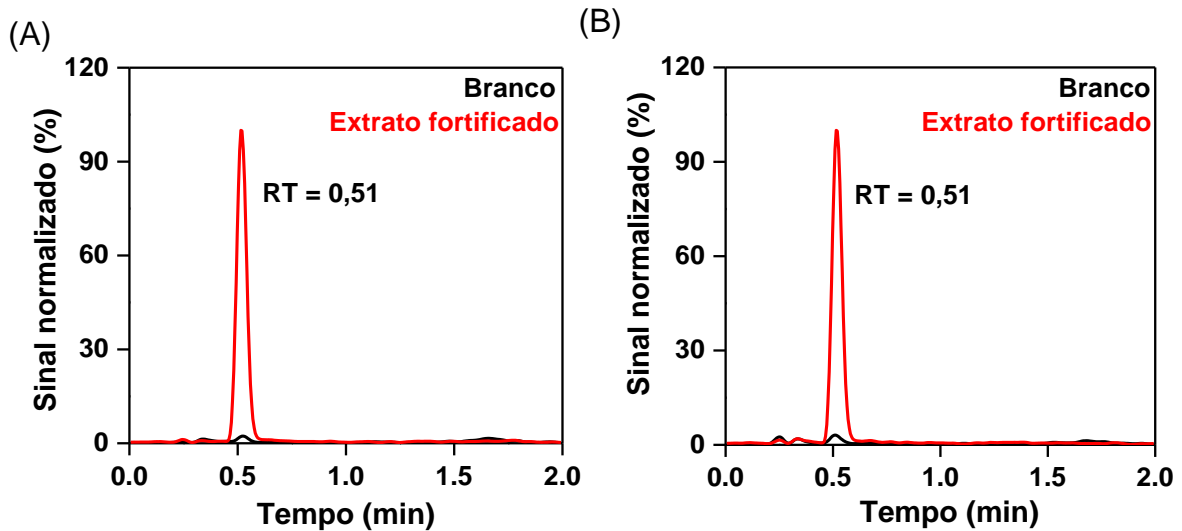
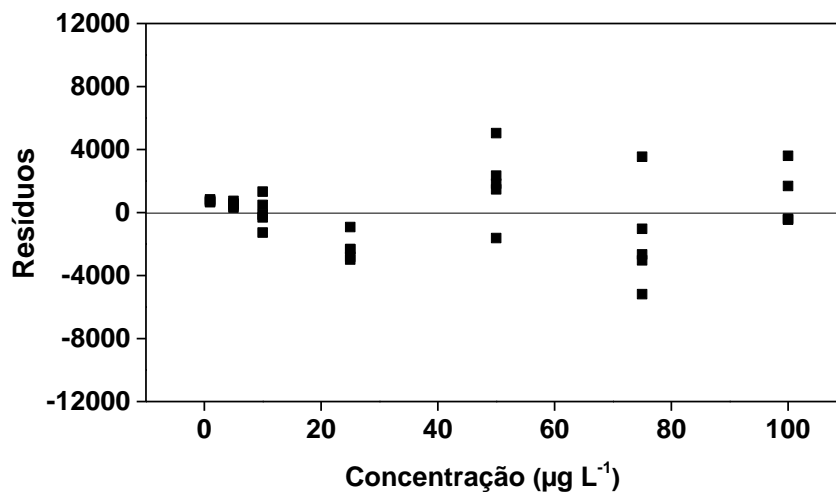


Figura 15. Gráfico de dispersão dos resíduos em função das concentrações da curva de calibração da cocaína em saliva artificial



Considerando essa situação, os parâmetros de regressão da curva de calibração foram estimados pelo MMQP, o qual visa atribuir maior peso aos dados que apresentam menor variância e assim tornar as variâncias entre os grupos mais

homogêneas. Para melhor ajustar os dados à linha de regressão, diferentes fatores de ponderação ($1, 1/x^{1/2}, 1/x, 1/x^2, 1/y^{1/2}, 1/y$ e $1/y^2$) foram comparados através da soma dos erros relativos dos dados ($\sum ER; \%$), conforme mostrado na **Eq. 12** (Almeida & Castel-Branco & Falcão, 2002). Os resultados estão expressos na **tabela 5**.

$$ER (\%) = \frac{\text{conc. calculada pela regressão ponderada} - \text{conc. teórica}}{\text{conc. teórica}} * 100 \text{ (Eq. 12)}$$

Tabela 5. Parâmetros de regressão da curva de calibração e os respectivos somatórios de ER para cada fator de ponderação (w). Onde: a_w , b_w e r_w representam as estimativas de MMQP para os coeficientes linear, angular e de correlação, respectivamente

w	Parâmetros de regressão da			$\sum ER (\%)$
	curva de calibração ponderada			
	a_w	b_w	r_w	
1	-831	837	0,9974	650
$1/x^{1/2}$	-416	828	0,9977	378
$1/x$	-196	819	0,9974	250
$1/x^2$	-74	795	0,9952	233
$1/y^{1/2}$	-426	827	0,9977	385
$1/y$	-200	816	0,9973	255
$1/y^2$	-73	782	0,9947	242

A regressão sem ponderação ($w = 1$) apresentou maior $\sum ER$ (650%) quando comparada às regressões ponderadas. Dentre os fatores estudados, o $w = 1/x^2$ apresentou menor $\sum ER$ e foi considerado o melhor ajuste para os dados. Após a escolha do fator de ponderação, os dados foram tratados e os resíduos padronizados ($n = 31$) apresentaram normalidade ($R_{\text{calc}} = 0,9551 > R_{\text{crit}} (0,99) = 0,9503$) e homocedasticidade ($t_{L\text{calc}} = 2,03 < t_{L\text{crit}} (0,99; 29) = 2,76$). O teste de correlação ou independência dos resíduos foi não conclusivo ($d_{\text{lower}} (0,99) = 1,15 < d_{\text{calc}} = 1,23 < d_{\text{upper}} (0,99) = 1,27$). Através da ANOVA, foi possível verificar que o modelo apresentou regressão significativa ($F_{\text{calc}} = 764105,94 > F_{\text{crit}} (0,95; 1; 29) = 4,18$) e não exibiu falta de

ajuste ($F_{\text{calc}} = 3,19 < F_{\text{crit}} (0,95; 5; 24) = 3,90$). A equação da regressão e o coeficiente de determinação estão na **tabela 6**. Sendo assim, é possível afirmar que o método apresentou linearidade, quando a ponderação foi aplicada.

Tabela 6. Figuras de mérito para o método de MPEE de cocaína em saliva e determinação por UHPLC-MS/MS

Faixa de trabalho	Equação da regressão ($1/x^2$)	R^2	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	
1-100 $\mu\text{g L}^{-1}$	$y = 795x - 74$	0,9904	0,3	0,8	
	Recuperação (%)		Precisão (CV; %)		
Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Intra-ensaio (n = 5)			Inter-ensaio (n = 15)	
0,8 (LQ)	104	87	81	97	10
5	87	84	96	88	13
25	85	80	84	83	5
75	81	92	115	95	10

Efeito Matriz

Os dados das curvas de calibração das salivas artificial e real (n = 31 para a saliva artificial e n = 35 para a saliva real) foram ajustados ao MMQP ($w = 1/x^2$) e o efeito matriz foi avaliado. O Teste-F indicou que as variâncias das curvas são estatisticamente equivalentes, já que $F_{\text{calc}} = 1,02 < F_{\text{crit}} (0,95; 33; 29) = 1,84$, e o Teste-t mostrou que não há efeito matriz significativa para as concentrações estudadas, já que $t_{\text{inclinação}} = 0,03$ e $t_{\text{interceção}} = 0,01 < t_{\text{crit}} (0,95; 62) = 2,00$. Portanto, o uso da saliva artificial é adequado às demais etapas de validação do método, considerando a facilidade do preparo e maior semelhança com a matriz frente aos solventes utilizados.

Limite de detecção e limite de quantificação

O método proposto apresentou baixos LD e LQ (**tabela 6**) e, portanto, boa detectabilidade ou sensibilidade, mesmo não sendo desenvolvido para extrações em

condições exaustivas. Os limites obtidos são coerentes ou menores do que os valores apresentados por outros trabalhos da literatura envolvendo a determinação de cocaína em saliva (Bassoti *et al.*, 2020; Fiorentin *et al.*, 2017; Malaca *et al.*, 2019; Millan-Santiago *et al.*, 2021; Saar-Reismaa *et al.*, 2020; Schepens *et al.*, 2017; Sorribes-Soriano *et al.*, 2019) e possibilitam o uso do método para análises clínicas e de interesse forense.

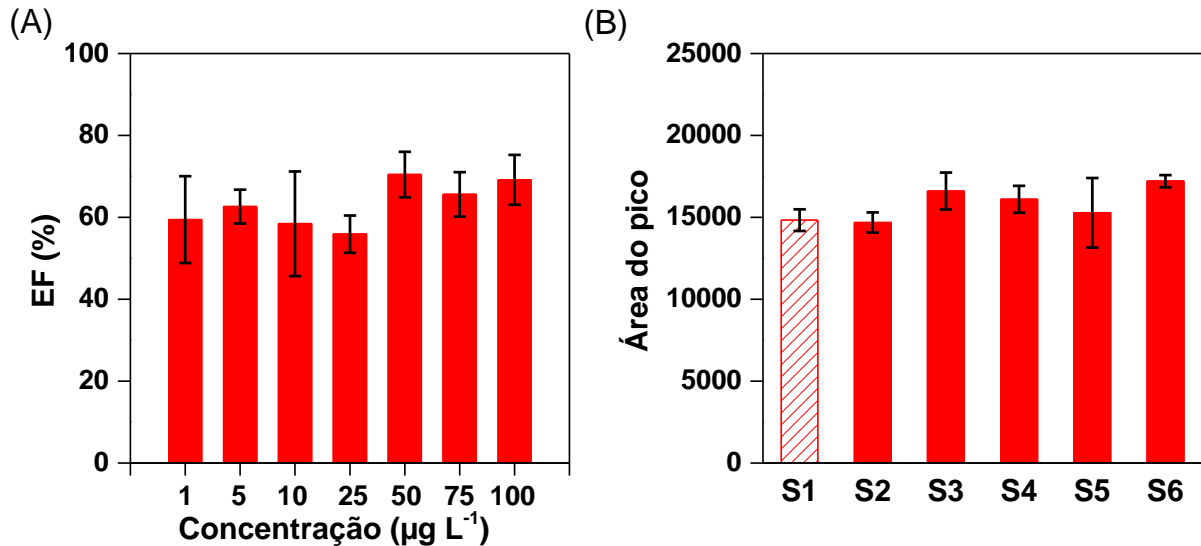
Recuperação e precisão

Considerando o guia da AOAC (2016), para concentrações na ordem de 1 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, a recuperação esperada é de 40-120% e 80-110%, respectivamente, enquanto que a precisão esperada é de até 30% e 15%, respectivamente. Os valores obtidos (**tabela 6**) estão próximos ou abaixo desses limites, inclusive para o *LQ*. Sendo assim, dentro das limitações do método, é possível afirmar que o método apresenta recuperação e precisão aceitáveis.

Eficiência de extração

Os resultados de eficiência de extração (em termos percentuais) para a saliva artificial fortificada nas 7 concentrações da curva de calibração são apresentados na **figura 16A**. A *EF* variou de 56 a 70% com um *CV* máximo de 12% para a quintuplicata. Considerando que o método de extração proposto apresenta uma quantidade limitada de solução eletrolítica acceptora (volume aproximado de 50 μL), restringindo a quantidade de analito extraído, tão bem como um escopo não exaustivo, ainda assim, mostrou-se bastante eficiente para a faixa de trabalho estudada. Embora a ANOVA tenha demonstrado que há diferença significativa entre as médias do percentual de *EF* ($F_{\text{calc}} = 13,74 > F_{\text{crit}} (0,95; 6; 28) = 2,45$), é possível identificar o mínimo de eficiência que o método proposto consegue alcançar.

Figura 16. Eficiência de extração (EF) para a cocaína em saliva artificial por MPEE (A; n = 5) e comparação entre extrações da cocaína ($25 \mu\text{g L}^{-1}$) a partir de saliva artificial (S1) e de saliva real (B; S2-S6; n = 5)



Comparação entre salivas de fontes distintas e saliva artificial

Por fim, o teste comparativo de extrações a partir da saliva artificial e de 5 salivas reais fortificadas na concentração de $25 \mu\text{g L}^{-1}$ é mostrado na **figura 16B**. Os valores obtidos foram comparados pela ANOVA, a qual indica que não há diferença significativa entre as médias para as diferentes salivas ($F_{\text{calc}} = 2,80 < F_{\text{crit}}(0,95; 5; 17) = 2,81$), inclusive para a saliva artificial que foi usada em todo o processo de validação. Esses resultados permitem concluir que há homogeneidade entre amostras e/ou que houve uma eficiente eliminação de interferentes durante o processo de extração pelo uso do campo elétrico e pelo uso de uma fase orgânica intermediária (1-octanol).

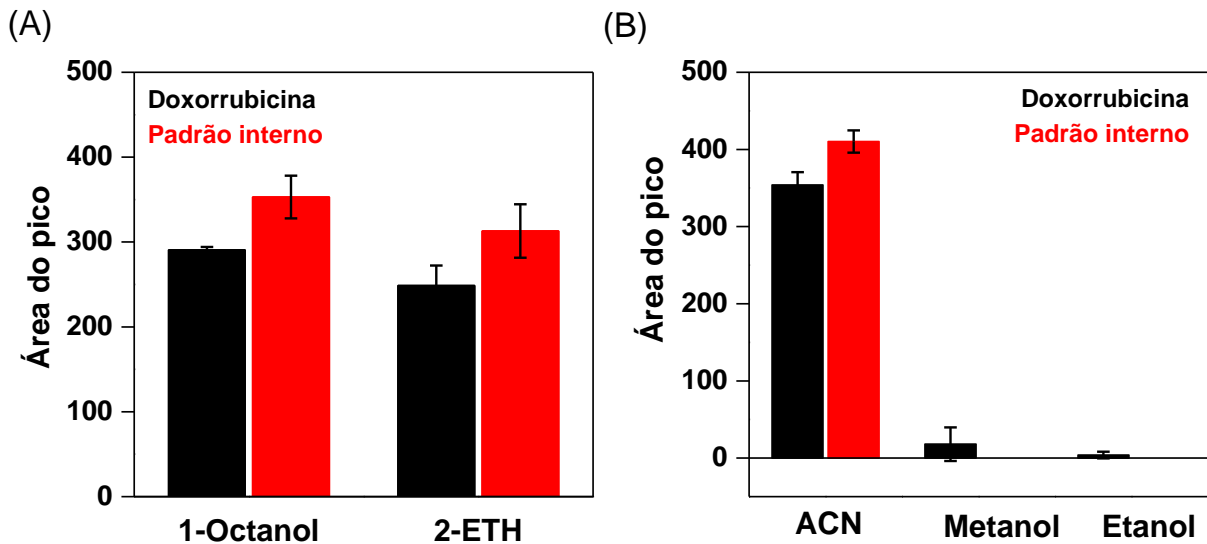
3.3.3. MPEE de doxorrubicina em saliva e determinação por UHPLC-PDA

3.3.3.1. Avaliação das condições de extração e de dessorção

Efeito da composição da fase orgânica

A escolha correta da composição da FO para uso no sistema de MPEE tem grande importância, considerando que é a fase que apresenta maior resistência à passagem dos compostos carregados, maior volatilidade e maior possibilidade de perda durante o processo de extração. Embora o 1-octanol e o 2-ETH apresentem características semelhantes, um grupo aceptor de hidrogênio e interagem fortemente por ligações de hidrogênio com compostos protonados, é possível observar que o primeiro exibiu um desempenho melhor na extração de DOXO e do padrão interno em saliva artificial, conforme mostrado na **figura 17A**. Portanto, o 1-octanol foi escolhido para as próximas etapas.

Figura 17. Efeito da composição da fase orgânica (A) e efeito do solvente orgânico na fase doadora (B) sobre a MPEE de doxorubicina e do padrão interno (n = 3)



Efeito do solvente orgânico na fase doadora

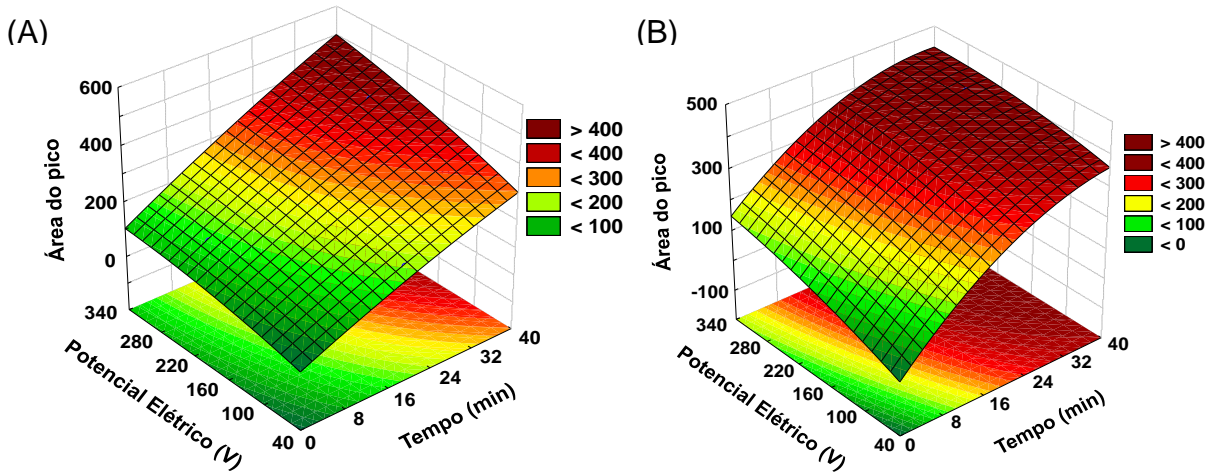
O resultado da extração da DOXO e do padrão interno em saliva artificial quando foram adicionados os solventes ACN, metanol e etanol na fase doadora, na proporção de 42% (v/v), é apresentado na **figura 17B**. A ACN apresentou melhor performance, enquanto o metanol e o etanol diminuíram drasticamente a extração dos compostos.

Tal resultado pode ser explicado pela menor condutividade elétrica da ACN quando comparada aos demais solventes estudados ($1,5 \times 10^{-9} \text{ S cm}^{-1}$ para o metanol, $1,4 \times 10^{-9} \text{ S cm}^{-1}$ para o etanol e $6,0 \times 10^{-10} \text{ S cm}^{-1}$ para a acetonitrila) (Smallwood, 1996), aumentando assim o campo elétrico no meio e a eletromigração das espécies carregadas. Portanto, a ACN foi selecionada para as etapas seguintes.

Efeito do potencial elétrico e do tempo de extração

A melhor condição para o potencial elétrico e para o tempo de extração foi avaliada através do planejamento Doehlert. Através da ANOVA foi possível aferir que o modelo é capaz de explicar 98,67% da variância dos dados para a doxorubicina ($R^2 = 0,9867$) e 99,56% para o padrão interno ($R^2 = 0,9956$). Além disso, a regressão foi significativa ($F_{\text{calc, DOXO}} = 98,36$ e $F_{\text{calc, DAUNO}} = 46,96 > F_{\text{crit}}(0,95; 2; 6) = 5,14$) e o modelo não apresentou falta de ajuste ($F_{\text{calc, DOXO}} = 8,17$ e $F_{\text{calc, DAUNO}} = 8,87 < F_{\text{crit}}(0,95; 4; 2) = 19,25$). Os efeitos de primeira ordem foram significativos e positivos, porém o efeito de segunda ordem não foi significativo. Além disso, o efeito do tempo foi bem superior (informações obtidas pelo gráfico de pareto). A superfície de resposta (**figura 18**) revela um aumento na resposta experimental com a elevação dos níveis do tempo e do potencial para os dois compostos, embora a extração do padrão interno tenha alcançado resultados satisfatórios em níveis menores para os parâmetros em relação ao analito. Diante dos resultados obtidos, optou-se pelas condições de 300 V e 35 min.

Figura 18. Superfície de resposta, obtida pelo planejamento Doehlert, para a avaliação do potencial elétrico e do tempo aplicados na MPEE de doxorubicina (A) e do padrão interno (B) em saliva, e determinação por UHPLC-PDA

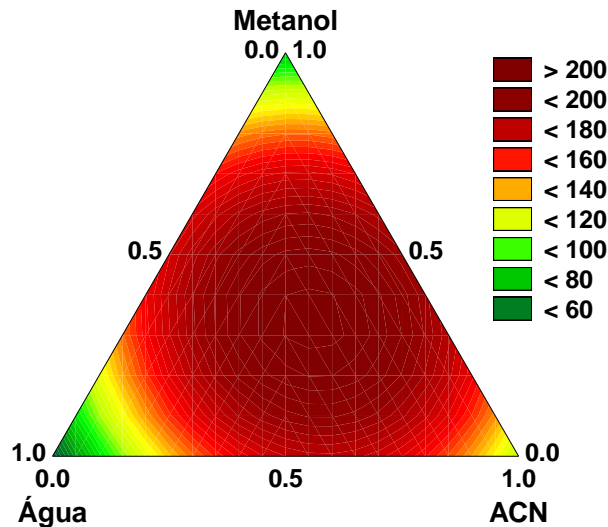


Avaliação da composição da solução de dessorção

Com as condições de extração devidamente selecionadas, misturas dos solventes água, ACN e metanol, contendo 10% v/v de HAc, foram avaliadas para a dessorção do analito a partir da ponta de papel. Como resultado do planejamento experimental tem-se que o modelo explica 96% da variância dos dados ($R^2 = 0,9600$), além disso, apresentou regressão significativa ($F_{\text{calc}} = 24,03 > F_{\text{crit}}(0,95; 5, 5) = 5,05$) e não exibiu falta de ajuste ($F_{\text{calc}} = 1,47 < F_{\text{crit}}(0,95; 1, 4) = 7,71$). Para o padrão interno o modelo apresentou falta de ajuste e por esse motivo os parâmetros foram escolhidos apenas em função do analito. Os efeitos de primeira ordem foram significativos apenas para o metanol e para a ACN, porém os efeitos de segunda ordem demonstram uma interação positiva entre os solventes (informações obtidas pelo gráfico de pareto). Conforme mostra o mapa de contorno (**figura 19**), a mistura composta pelos três solventes, acrescidos de HAc, resultou em maiores respostas experimentais. As antraciclinas são compostos polares e apresentam boa solubilidade tanto em água quanto em solventes orgânicos polares (Pashaei & Mehrabi & Shekarchi, 2020). Considerando

essas informações e os resultados obtidos, a solução de H₂O:ACN:MeOH:HAc, na proporção de 30:30:30:10 v/v/v/v, foi escolhida.

Figura 19. Mapa de contorno, obtido pelo planejamento de misturas Centroide-Simplex, para a avaliação da solução de dessorção para a doxorrubicina extraída

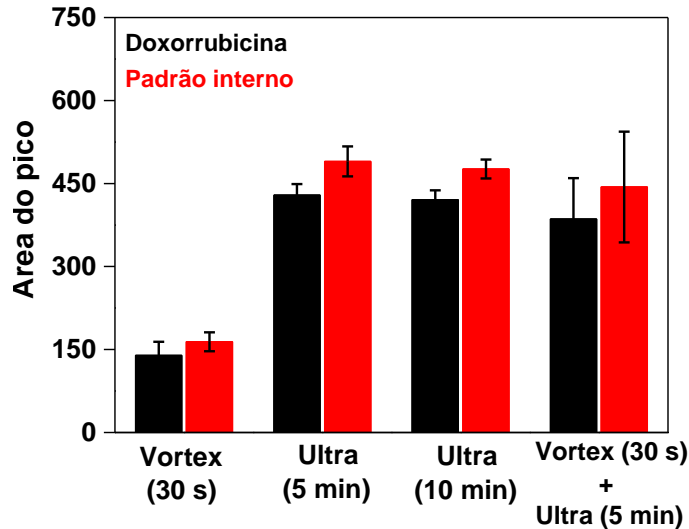


Avaliação do tipo de dessorção

A cor do analito permitiu identificar que a dessorção em vortex por 30 s não era suficiente para extrair o analito da ponta de papel. Assim, viu-se a necessidade de estudar o procedimento de dessorção através da agitação em vortex e da sonicação em ultrassom. Os resultados são mostrados na **figura 20**.

A agitação em vortex mostrou pouca contribuição para a dessorção e a sonicação em ultrassom por 5 min foi suficiente nesse processo. No banho ultrassônico ocorre o fenômeno de cavitação e a formação de bolhas de ar, as quais transcorrem o sistema e por um processo físico são capazes de promover o desprendimento do analito do material sorvente (Picó, 2013). Portanto, optou-se pela dessorção em ultrassom por 5 min.

Figura 20. Avaliação do procedimento de dessorção da doxorubicina e do padrão interno extraídos (n = 3). Ultra = ultrassom



3.3.3.2. Validação do método

Seletividade

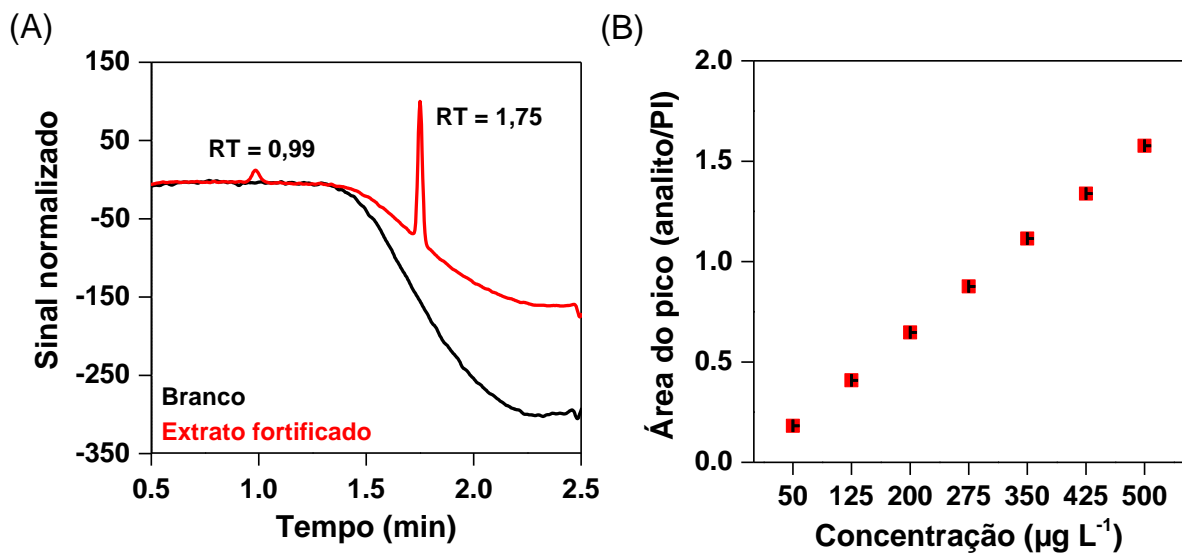
A seletividade do método foi comprovada pelos cromatogramas do extrato do branco e do extrato fortificado ($50 \mu\text{g L}^{-1}$ para DOXO e $300 \mu\text{g L}^{-1}$ para DAUNO), conforme mostrado na **figura 21A**. É possível verificar que não há sinal analítico para o branco nos tempos de retenção do analito (0,99 min) ou do padrão interno (1,75 min), os quais estão presentes no cromatograma do extrato fortificado.

Linearidade

A curva de calibração em saliva real foi plotada a partir das razões entre os sinais do analito e do padrão em função da concentração de doxorubicina, como mostrado na **figura 21B**. Os dados obtidos para a curva de calibração foram tratados e os resíduos padronizados (n = 28) apresentaram normalidade ($R_{\text{calc}} = 0,9628 > R_{\text{crit}} (0,95) = 0,9618$), ausência de correlação ($d_{\text{upper}} (0,95) = 1,47 < d_{\text{calc}} = 2,12 < 4 \cdot d_{\text{upper}} (0,95) = 2,53$) e homocedasticidade

($t_{Lcalc} = 1,82 < t_{Lcrit (0,95; 26)} = 2,06$). Através da ANOVA, foi possível verificar que o modelo apresentou regressão significativa ($F_{calc} = 39204,09 > F_{crit (0,95; 1; 26)} = 4,23$) e não exibiu falta de ajuste ($F_{calc} = 0,29 < F_{crit (0,95; 5; 21)} = 2,68$). A equação da regressão e o coeficiente de determinação são apresentados na **tabela 7**. Sendo assim, é possível afirmar que o método apresentou linearidade na faixa de concentração estudada ($50-500 \mu\text{g L}^{-1}$).

Figura 21. Cromatogramas do extrato do branco e do extrato fortificado, na concentração de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ para a doxorrubicina e $300 \mu\text{g L}^{-1}$ para o padrão interno (A) e a curva de calibração, obtida pelo método de MPEE de doxorrubicina em saliva real e determinação por UHPLC-PAD (B; $n = 5$)



Limite de detecção, limite de quantificação, recuperação e precisão

O LD e o LQ obtidos (**tabela 7**) são adequados para a faixa de trabalho estudada e para o objetivo pretendido. O método também apresentou recuperação e precisão aceitáveis para os 3 níveis de concentração estudados, conforme sugere o guia da AOAC (2016).

Tabela 7. Figuras de mérito para o método de MPEE de doxorubicina em saliva e determinação por UHPLC-PDA

Faixa de trabalho	Equação da regressão	R ²	LD (µg L ⁻¹)	LQ (µg L ⁻¹)
50-500 µg L ⁻¹	y = 0,0031x + 0,0246	0,9993	25	50
	Recuperação (%)		Precisão (CV; %)	
Concentração (µg L ⁻¹)	Intra-ensaio (n = 6)		Inter-ensaio (n = 18)	
	Intra-ensaio (n = 6)	Inter-ensaio (n = 18)	Intra-ensaio (n = 6)	Inter-ensaio (n = 18)
50 (LQ)	95	87	101	94
275	8	4	6	4
500	8	7	10	6
	99	95	89	94
	97	100	94	97
	4	5	4	5

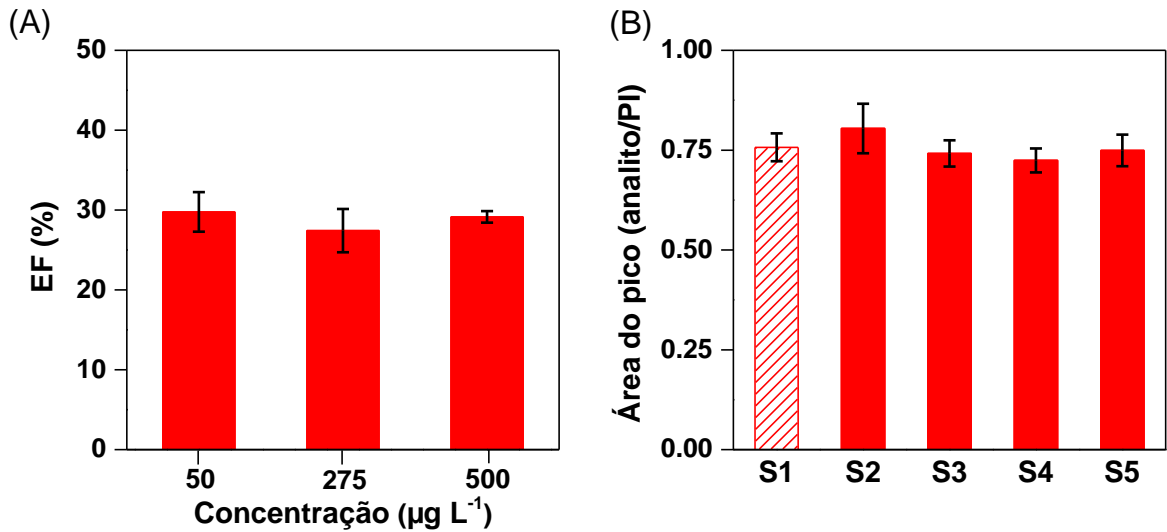
Eficiência de extração

A *EF* é apresentada na **figura 22A** para três níveis de concentração (50, 275 e 500 µg L⁻¹), a qual variou de 27 a 30%, com um *CV* máximo de 10% para a triplicata. Embora a eficiência média não tenha sido elevada (~29%) e não haja uma pré-concentração do analito, o resultado é coerente com o escopo não exaustivo do procedimento de extração, principalmente devido às limitações de volume da fase acceptora e da amostra.

Comparação entre salivas de fontes distintas

O resultado da avaliação da variabilidade da matriz estudada é apresentado na **figura 22B**, sendo possível observar que não há diferença significativa entre os sinais para as diferentes amostras de saliva analisadas. Para confirmar tal suposição, uma ANOVA foi realizada, a qual mostrou que as variâncias e as médias entre os grupos não são estatisticamente diferentes ($F_{cal} = 2,20 < F_{crit(0,95; 4; 17)} = 2,96$). Portanto, sugere-se uma homogeneidade composicional entre as amostras de saliva e/ou uma eficiente separação do analito dos demais componentes da matriz, conferida pelo processo de extração.

Figura 22. Eficiência de extração (EF) para a doxorrubicina em saliva real por MPEE (A; n = 3) e comparação entre extrações de doxorrubicina a partir de 5 amostras de saliva real (A; S1-S5; n = 5), sendo que a S1 foi usada em todo processo de validação



3.3.4. MPEE de doxorrubicina em saliva e determinação por DIA

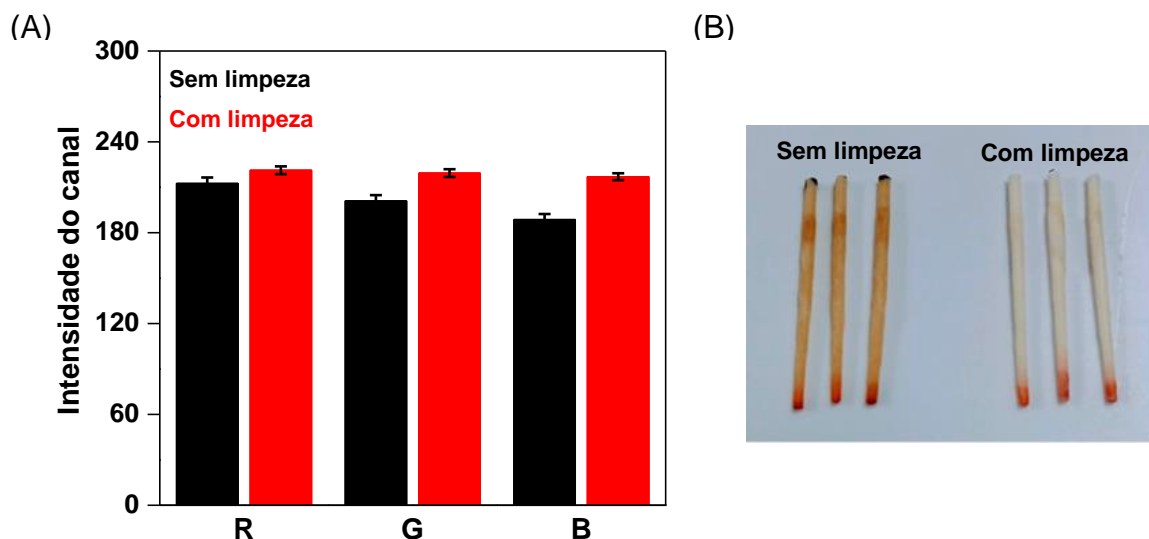
3.3.4.1. Avaliação das condições de extração

Avaliação da limpeza da ponta de papel

O procedimento de limpeza mostrou-se bem eficiente na remoção da coloração amarelada da ponta de papel. Através dos resultados da digitalização (**figura 23A**) é possível notar que há uma diferença de intensidade dos canais RGB para as pontas de papel com e sem limpeza. Esses resultados correspondem aos canais RGB mais intensos. Valores próximos a 255 indicam uma menor absorção de cor e conseqüentemente uma menor interferência causada pelo material suporte na determinação do fármaco. O hipoclorito de sódio é uma substância comumente utilizada no processo de branqueamento da indústria de papel e celulose, e pode ter contribuído para a oxidação dos compostos orgânicos presentes na ponta de papel, os quais conferem cor ao material. Já na **figura 23B** são apresentadas as imagens das pontas de papel com e sem limpeza, as quais foram submetidas à extração de 1 mg L⁻¹ de

doxorrubicina. Através dessa figura é possível distinguir melhor a coloração característica do analito extraído (na parte inferior do material sorvente) da ponta de papel submetida à limpeza. Diante dos resultados obtidos, a ponta de papel “limpa” foi escolhida para as próximas etapas.

Figura 23. Intensidade dos canais RGB para as pontas de papel com e sem limpeza (A; $n = 3$) e imagens das pontas de papel com e sem limpeza após a MPEE de doxorrubicina (1 mg L^{-1}) em saliva artificial (B)



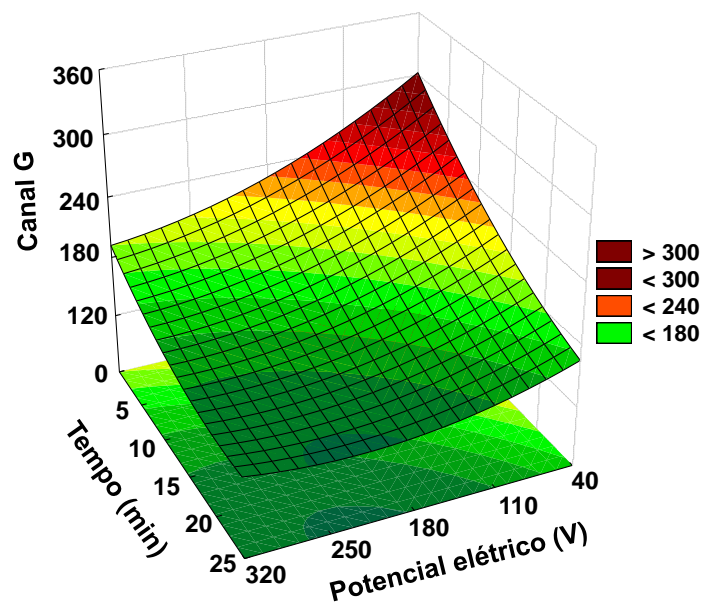
Considerando que verde é a cor complementar da coloração vermelha do analito e que os canais G e B apresentaram melhor desempenho na sua detecção, o canal G foi escolhido para o tratamento dos dados das próximas etapas.

Efeito do potencial elétrico e do tempo de extração

A seguir, têm-se os resultados para o planejamento Doehlert, usado para avaliar as condições de potencial elétrico e tempo de extração. Através da ANOVA foi possível verificar que o modelo explicou 87,17% da variância dos dados ($R^2 = 0,8717$). A regressão foi significativa ($F_{\text{calc}} = 20,38 > F_{\text{crit}}(0,95; 2; 6) = 5,14$) e o modelo não apresentou falta de ajuste ($F_{\text{calc}} = 16,69 < F_{\text{crit}}(0,95; 4; 2) = 19,25$). O efeito dos parâmetros avaliados sobre o processo de extração foi significativo e negativo, já o efeito de interação de

segunda ordem não foi significativo (informações obtidas pelo gráfico de pareto). É válido lembrar que quanto maior a concentração do analito menor é a intensidade do canal G, portanto os valores negativos para os efeitos de primeira ordem indicam que à medida que o potencial elétrico e o tempo se elevam a eficiência de extração aumenta. Esse comportamento é confirmado pela superfície de resposta (**figura 24**). Considerando os resultados apresentados, adotaram-se as condições de 300 V e 20 min.

Figura 24. Superfície de resposta, obtida pelo planejamento Doehlert, para avaliação do potencial elétrico e do tempo aplicados na MPEE de doxorubicina em saliva e determinação por DIA



3.3.4.2. Validação do método

Linearidade

Os valores obtidos para o canal G mais intenso e as respectivas concentrações de doxorubicina foram plotados para a obtenção da curva de calibração em saliva real (**figura 25**). Os dados obtidos foram tratados e os resíduos padronizados (n = 27)

seguem a distribuição normal ($R_{\text{calc}} = 0,9903 > R_{\text{crit}} (0,95) = 0,9607$), são independentes ($d_{\text{upper}} (0,99) = 1,23 < d_{\text{calc}} = 2,55 < 4 \cdot d_{\text{upper}} (0,99) = 2,77$) e homocedásticos ($t_{\text{Lcalc}} = 0,32 < t_{\text{Lcrit}} (0,95; 25) = 2,06$). Por fim, a ANOVA demonstrou que a regressão foi significativa ($F_{\text{calc}} = 1845,39 > F_{\text{crit}} (0,95; 1; 25) = 4,24$) e que o modelo não exibiu falta de ajuste ($F_{\text{calc}} = 0,62 < F_{\text{crit}} (0,95; 5; 20) = 2,71$). A equação da regressão e o coeficiente de determinação são apresentados na **tabela 8**. Os resultados confirmam a linearidade do método na faixa de concentração estudada (50-500 $\mu\text{g L}^{-1}$).

Figura 25. Curva de calibração obtida pela MPEE de doxorrubicina em saliva real e determinação por DIA (n = 5)

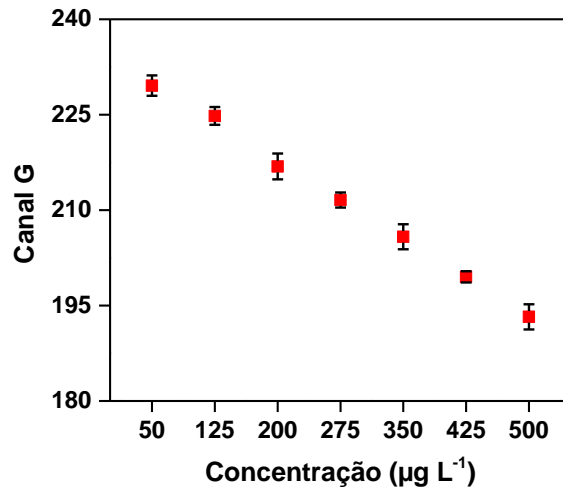


Tabela 8. Figuras de mérito para o método de MPEE de doxorrubicina em saliva e determinação por DIA

Faixa de trabalho	Equação da regressão		R^2	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)			
50-500 $\mu\text{g L}^{-1}$	$y = -0,08x + 234,07$		0,9866	15	50			
	Recuperação (%)				Precisão (CV; %)			
Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Intra-ensaio (n = 6)			Inter-ensaio (n = 18)	Intra-ensaio (n = 6)			Inter-ensaio (n = 18)
50 (LQ)	108	110	109	109	8	8	8	7
275	98	103	102	101	5	6	7	6
500	98	99	92	96	5	3	5	6

Limite de detecção, limite de quantificação, recuperação e precisão

Os valores de *LD* e *LQ* obtidos (**tabela 8**) foram adequados para o objetivo proposto e os resultados de recuperação e precisão, inclusive para o *LQ*, também foram satisfatórios para as concentrações estudadas.

3.4. Conclusões

O presente capítulo expõe uma eficiente aplicação do sistema MPEE para a extração de cocaína e de doxorrubicina em saliva. A ponta de papel utilizada nesse sistema foi devidamente caracterizada e apresentou composição simples, baseada em celulose. A simplicidade composicional da ponta de papel é importante para se evitar interferências durante os processos de extração e dessorção dos compostos de interesse. O grande número de grupos hidroxila presentes na estrutura da celulose favorecem as interações hidrofílicas com analitos-alvo (Pacheco-Fernández *et al.*, 2020; Wu & He, 2019) e, assim, pode-se afirmar que a ponta de papel atua não somente como material suporte para a solução eletrolítica, mas também como sorvente. O sorvente também mostrou hidrofiliabilidade, porosidade, cristalinidade e alta estabilidade térmica. A hidrofiliabilidade permite a molhabilidade e a condutividade, ambas necessárias ao processo de extração assistido por campos elétricos, e a porosidade confere maior capacidade sortiva ao material. Ademais, houve compatibilidade com os solventes utilizados nos processos de extração e dessorção, tão bem como, estabilidade diante da voltagem aplicada no sistema.

O método de MPEE de cocaína em saliva e determinação por UHPLC-MS/MS demonstrou bom desempenho e foi devidamente validado, apresentando adequadas linearidade, recuperação e precisão, além de baixos limites de detecção e de quantificação. Os métodos de MPEE de doxorrubicina em saliva e determinação por UHPLC-PDA e DIA também foram eficientes e as figuras de mérito avaliadas foram satisfatórias, principalmente ao considerar a ampla faixa de concentração estudada. A eficiência de extração, quando analisada, também foi considerada satisfatória, já que não se trata de um sistema de extração exaustivo. Vale ressaltar a operacionalidade da detecção direta do analito pelo método MPEE-DIA, sem a necessidade de uma etapa

adicional de compatibilização da amostra com o sistema de detecção. Além disso, os aparatos para a detecção por imagem são de fácil manipulação, fácil acesso e de baixo custo quando comparados às técnicas tradicionais. Apesar da etapa de dessorção necessária para a análise por UHPLC-PDA, os processos de separação e detecção compensam pelo tempo curto (4 min) e pela seletividade.

A eficiência na eliminação de interferentes oriundos da amostra biológica estudada e a seletividade são pontos relevantes do processo de eletroextração multifásica, possibilitadas pela aplicação de um campo elétrico e pelo uso de uma fase orgânica intermediária. A alta frequência analítica proporcionada pelo sistema MPEE corrobora para o aumento do fluxo de trabalho, menor tempo de análise e diminuição dos custos, conforme é solicitado pelos laboratórios clínicos e forenses. Ademais, o preparo de amostras utilizado mostrou-se bastante funcional e compatível com diferentes sistemas de separação e detecção, o que exalta a sua versatilidade.

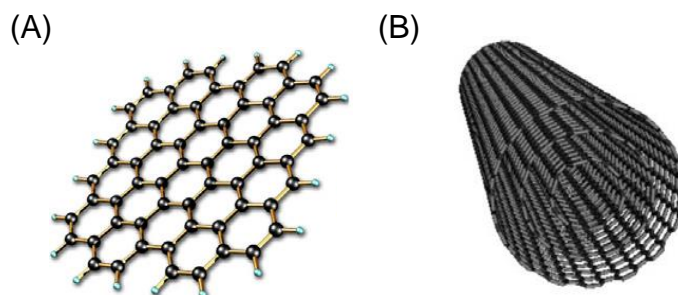
CAPÍTULO IV - PRODUÇÃO DE FILMES NANOESTRUTURADOS POR LAYER-BY-LAYER E APLICAÇÃO NA EXTRAÇÃO DE FÁRMACOS, DROGAS DE ABUSO E INSETICIDAS A PARTIR DE SALIVA E OUTRAS MATRIZES COMPLEXAS

4.1. Considerações gerais

Conforme discutido no Capítulo II, filmes multicamadas são facilmente montados sobre substratos de diferentes formas e tamanhos através da técnica LBL, apresentando elevada resistência e versatilidade. Muitos estudos demonstram a eficiência desses filmes LBL em processos de separação e extração, incluindo aqueles formados por nanopartículas e polímeros. Dentre as nanopartículas empregadas em LBL, destacam-se os materiais baseados em carbono, como os NTC, e as suas versões funcionalizadas (Du *et al.*, 2008, 2012; Liu *et al.*, 2014; Zheng *et al.*, 2019).

Os NTC são estruturas cilíndricas de folhas de grafeno (**Figura 26A**), podendo ser compostos de apenas uma folha, denominados de nanotubos de carbono de parede simples (SWCNT), ou por várias folhas concêntricas, denominados de nanotubos de carbono de parede múltiplas (MWCNT; **Figura 26B**) (Saifuddin & Raziah & Junizah, 2012; Samanidou & Karageorgou, 2012; Zhang *et al.*, 2013). Esses últimos são caracterizados por ter no máximo 15 nm de diâmetro externo (Saifuddin & Raziah & Junizah, 2012).

Figura 26. Representação da folha de grafeno (A) e dos nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT; B)



Fonte: Adaptado de Zhang *et al.* (2013).

Além das dimensões reduzidas e da alta área superficial ($50-1000 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) (Intrchom & Mitra, 2017), os NTC apresentam alta resistência mecânica e térmica, propriedades eletrônicas atraentes, e são capazes de estabelecer diferentes tipos de interação com moléculas orgânicas e espécies inorgânicas. As interações com moléculas orgânicas podem ocorrer por meio de forças não covalentes do tipo interações π - π *stacking*, interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio, forças de Van der Waals e forças eletrostáticas (Samanidou & Karageorgou, 2012; Zhang *et al.*, 2013). Ademais, alterações superficiais pela adição de grupos amina, carbonila, carboxila e hidroxila são facilmente executadas e podem garantir a formação de nanotubos com diferentes polaridades, hidrofobicidade e seletividade (Saifuddin & Raziah & Junizah, 2012; Samanidou & Karageorgou, 2012; Zhang *et al.*, 2013).

Assim, diante das características e vantagens apresentadas acima e na tentativa de tornar a ponta de papel um material mais sortivo e seletivo para o processo de MPEE, um filme nanoestruturado de PDDA e MWCNT foi montado sobre o sorvente através da técnica LBL. Baseando no trabalho de Niu *et al.* (2012), frascos de borossilicato também foram submetidos ao processo LBL. Por fim, os materiais revestidos foram aplicados na extração de fármacos, drogas de abuso e inseticidas a partir de amostras de saliva e outras amostras complexas (urina e água superficial).

A grande variedade de compostos estudados nessa etapa, incluindo aqueles que foram analisados nos capítulos anteriores, visa demonstrar a ampla aplicabilidade do filme (PDDA/MWCNT)₁₀ em processos de extração. A tabela abaixo (**tabela 9**) apresenta algumas propriedades desses compostos (atividade, pKa e log P) relevantes ao trabalho.

Além da importância da investigação de fármacos e drogas de abuso em amostras biológicas, conforme discutido no capítulo II, a determinação de inseticidas (incluindo os neonicotinóides, como o tiametoxam e a imidacloprida) em fluidos biológicos também pode trazer informações relevantes de toxicidade, as quais podem estar relacionadas à exposição de trabalhadores a esses compostos (Han & Tian & Shen, 2018). Ademais, devido à sua acessibilidade ou disponibilidade

nos mercados, alguns neonicotinóides são relacionados a casos de envenenamento intencional e suicidas (Lin *et al.*, 2013; Yeter & Aydın, 2013; Fuke *et al.*, 2014).

Tabela 9. Compostos avaliados na extração pelo filme nanoestruturado LBL e suas respectivas propriedades

Composto	Atividade	pKa	log P
Cocaína (COC)	Estimulante e anestésico local*	8,6*	2,3*
Lidocaína (LID)	Antiarrítmico e anestésico local*	8,0**	2,44**
Cafeína (CAF)	Estimulante**	14,0**	-0,07**
Daunorrubicina (DAUNO)	Antineoplásico e antibiótico*	8,94 e 9,53***	1,83***
Doxorrubicina (DOXO)	Antineoplásico e antibiótico*	8,94 e 9,53***	1,27***
Azitromicina (AZI)	Antibiótico*	8,5*	3,03*
Diclofenaco (DICLOF)	Analgésico, antipirético e anti-inflamatório**	4,15**	4,51**
Ibuprofeno (IBUF)	Analgésico, antipirético e anti-inflamatório**	5,3*	3,97**
Valsartana (VAL)	Anti-hipertensivo**	4,73**	1,49**
Losartana (LOS)	Anti-hipertensivo**	5,5**	1,19**
Clortalidona (CLORT)	Anti-hipertensivo**	8,76**	0,85*
Sinvastatina (SINV)	Redutor de colesterol total, LDL e triglicérides, e indutor de colesterol HDL**	14,91**	4,68**
Montelucaste (MONT)	Anti-inflamatório e broncodilatador*	4,4*	7,9**
Tiametoxam (TIAMET)	Inseticida*	-	-0,13*
Imidacloprida (IMIDA)	Inseticida*	1,56 e 11,12*	0,57*

* <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>; ** <https://go.drugbank.com/>; *** Pashaei & Mehrabi & Shekarchi (2020)
LDL = lipoproteína de baixa densidade; HDL = lipoproteína de alta densidade.

Após o consumo, muitos fármacos e drogas de abuso são excretados pelo organismo na forma metabolizada ou não metabolizada, podendo alcançar águas residuais urbanas. Os inseticidas também podem ser encontrados nesse meio, visto que são persistentes e apresentam alto potencial de lixiviação e escoamento (Morrissey *et al.*, 2015). Se não removidos completamente das águas residuais, esses compostos chegam até as águas superficiais e subterrâneas, o que gera uma

preocupação, em longo prazo, para o meio aquático e para a saúde humana (Varsha & Kumar & Rathi, 2022).

4.2. Parte experimental

4.2.1. Reagentes, amostras e materiais

Peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido sulfúrico (H_2SO_4), ácido clorídrico (HCl), hidróxido de amônio 25% (NH_4OH) e solução aquosa de PDDA 20% p/v (MM ~ 200000-300000) foram adquiridos de Sigma-Aldrich (EUA). O ácido fórmico e o ácido acético foram obtidos de J.T. Baker (EUA). Os sais cloreto de sódio (NaCl) e cloreto de amônio (NH_4Cl) foram obtidos de Synth (Brasil), além de sulfato de sódio (Na_2SO_4), acetato de sódio, urea e creatinina que foram adquiridos de Sigma-Aldrich (USA). A ACN foi obtida de J.T. Baker (EUA) e o 1-octanol de Sigma-Aldrich (Alemanha), ambos grau HPLC. A solução de cocaína e os reagentes cloridrato de doxorrubicina e cloridrato de daunorrubicina utilizados nessa etapa já foram descritos no tópico 3.2.2. Os padrões de cloridrato de lidocaína, azitromicina, diclofenaco de sódio, ibuprofeno, clortalidona, sinvastatina, montelucaste de sódio, tiametoxam, imidacloprida e a solução de cafeína 1000 mg L^{-1} foram obtidos de Sigma-Aldrich (Alemanha), e os padrões de valsartana e losartana foram adquiridos de United States Pharmacopeia (EUA). Já os MWCNT funcionalizados com grupos carboxílicos (razão média covalente de 64%) foram obtidos do Centro de Tecnologia em Nanomateriais e Grafeno (CTNano-UFMG, Brasil), os quais apresentam diâmetro médio de 19 nm e distribuição de comprimento de até 30 μm (comprimento médio de 6 μm por média aritmética e de 12 μm por média ponderada). O procedimento de funcionalização é descrito por Castro *et al.* (2019). Água deionizada (resistividade 18,2 $\text{M}\Omega \text{ cm}$) foi obtida através do sistema de purificação Milli-Q Simplicity 185 (Millipore, EUA).

O preparo da saliva artificial foi descrito no tópico 3.2.2. A urina artificial foi preparada conforme descrito por Laube & Mohr & Hesse (2001), utilizando 25 g L^{-1} de urea, $1,100 \text{ g L}^{-1}$ de creatinina e os diferentes sais $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($1,103 \text{ g L}^{-1}$), NaCl ($2,925 \text{ g L}^{-1}$), Na_2SO_4 ($2,250 \text{ g L}^{-1}$), KH_2PO_4 ($1,400 \text{ g L}^{-1}$), KCl ($1,600 \text{ g L}^{-1}$) e NH_4Cl ($1,000 \text{ g L}^{-1}$). O pH final da urina foi 6,03. Já a água superficial foi coletada em

um córrego na região da Pampulha (Belo Horizonte, MG) e foi mantida sob refrigeração até o uso. O pH da água superficial foi 7,09.

A descrição das pontas de papel utilizadas está no tópico 3.2.2. Os frascos de vidro borossilicato de 20 mL foram adquiridos de Analítica (Brasil), os quais possuem dimensões de 22,5 x 75,3 mm, transparência, lacre magnético de rosca e septo de PTFE/silicone. Os filtros de seringa, com membrana de PVDF, diâmetro de 13 mm e diâmetro do poro de 0,22 μm , também foram obtidos de Analítica (Brasil). Lâminas de quartzo de dimensão 1 x 4 cm também foram utilizadas.

Para o processo de extração, um homogeneizador de soluções HM01 (Kacil; Brasil), com rotação de 360° em torno do eixo horizontal e velocidade variando de 0 a 25 rpm, foi utilizado.

4.2.2. Montagem e caracterização do filme (PDDA/MWCNT)₁₀

4.2.2.1. Preparo dos substratos

Anterior ao processo de deposição das multicamadas, os substratos foram efetivamente limpos e preparados. Os frascos de borossilicato foram preenchidos com solução de $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2$ (3:1 v/v) e deixados sob repouso por 60 min e a temperatura ambiente. Após esse período, a solução de $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2$ foi descartada e os frascos foram enxaguados intensamente com água deionizada (Mesquita & Donnici & Pereira, 2010). Já as pontas de papel foram apenas imersas em água deionizada por 2 min.

Para a etapa de caracterização do filme nanoestruturado, lâminas de quartzo foram utilizadas como substrato e foram limpas seguindo o procedimento: (1) imersão em solução de $\text{NH}_4\text{OH}:\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{O}$ (1:1:5 v/v/v) por 10 min e em estufa a 80°C; (2) enxague com água deionizada, repetidas vezes; (3) imersão em solução de $\text{HCl}:\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{O}$ (1:1:6 v/v/v) por 10 min e em estufa a 80°C; (4) enxague com água deionizada, repetidas vezes (Mesquita & Donnici & Pereira, 2010).

4.2.2.2. Preparo da solução de PDDA e da dispersão de MWCNT

A solução aquosa de PDDA foi preparada para uma concentração final de 0,5% m/v e apresentou pH final de 6,8. Já a dispersão de MWCNT foi preparada usando 0,005 g nanotubos de carbono para 100 mL de água deionizada. Essa suspensão foi submetida ao banho ultrassônico por 1 hora, seguido de um repouso de 24 horas. Após o repouso, o sobrenadante foi coletado e a dispersão foi utilizada para a preparação do filme LBL. A dispersão final apresentou um pH de 8,8.

4.2.2.3. Montagem do filme (PDDA/MWCNT)₁₀

O filme multicamadas foi preparado manualmente pelo processo de deposições alternadas de PDDA e MWCNT. Como os substratos utilizados apresentam densidade de carga negativa, a montagem iniciou pela deposição do polímero carregado positivamente (PDDA).

Para os frascos de borossilicato, o processo foi realizado obedecendo à sequência: (1) preenchimento do frasco com a solução de PDDA por 5 minutos; (2) retirada da solução usada na etapa 1; (3) preenchimento do frasco com água deionizada por 3 e 1 minuto, sequencialmente, para a retirada do excesso do material de revestimento; (4) preenchimento do frasco com a dispersão de MWCNT por 5 minutos; (5) retirada da solução usada na etapa 4; (6) repetição da etapa 3. Uma etapa adicional de secagem, à temperatura ambiente e por 10 minutos, ocorreu após cada ciclo. Essa sequência foi então repetida até a deposição de 10 bicamadas de PDDA/MWCNT, conforme demonstrado na **figura 27**. Para as pontas de papel, o procedimento foi ligeiramente modificado, através da imersão desses materiais em béqueres contendo os materiais de revestimento e de limpeza.

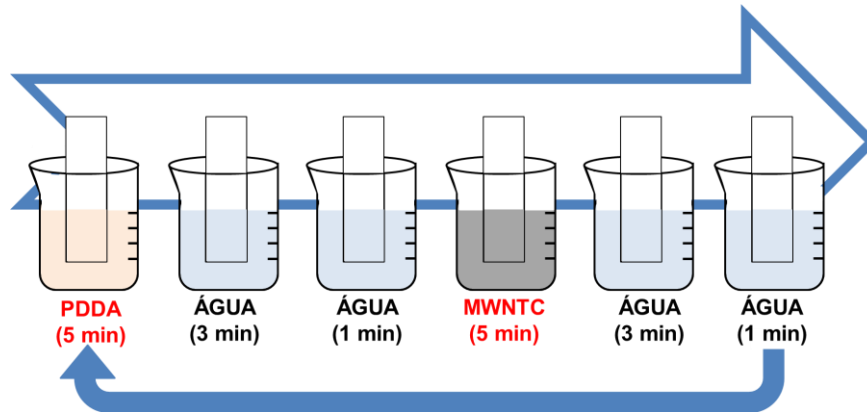
4.2.2.4. Caracterização do filme (PDDA/MWCNT)₁₀

Potencial Zeta

O potencial Zeta da solução aquosa de PDDA (0,5% m/v) e da dispersão de MWCNT (0,005% m/v) foi mensurado através do equipamento ZetaSizer Nano-ZS

(Malvern Instruments, UK) e os valores reportados são uma média de 3 medidas, com 10 leituras cada.

Figura 27. Esquema representativo do processo de formação das multicamadas de PDDA/MWCNT



Espectroscopia UV-Vis

A espectroscopia de absorção molecular na região do ultravioleta-visível foi utilizada para o monitoramento do crescimento do filme (PDDA/MWCNT)₁₀ em lâmina de quartzo. As medições foram realizadas após a deposição de cada bicamada de PDDA/MWCNT sobre o substrato e os espectros foram obtidos na região espectral de 200 a 800 nm, usando um espectrofotômetro Cary 60 (Agilent Technologies, USA). Para essa análise, a lâmina de quartzo foi encaixada no centro do caminho óptico do espectrofotômetro, usando um suporte impresso 3D.

Microscopia eletrônica de varredura

Informações sobre a morfologia superficial do filme (PDDA/MWCNT)₁₀ foram obtidas através de um microscópio eletrônico de varredura FEI Quanta 3D SEM-FIB (Louisiana State University, Louisiana). As análises foram realizadas no filme formado sobre a ponta de papel e sobre o frasco de borossilicato e para isso uma fina camada de carbono (~15 nm) foi depositada sobre esses materiais.

4.2.3. Aplicação da ponta de papel-(PDDA/MWCNT)₁₀ na eletroextração multifásica de fármacos, drogas de abuso e inseticidas a partir de saliva

4.2.3.1. Procedimento de MPEE e de dessorção

A ponta de papel-(PDDA/MWCNT)₁₀ foi submetida ao processo de MPEE, usando o sistema descrito no tópico 3.2.1. As condições de extração foram: FD = 700 µL de saliva artificial fortificada na concentração de 1 mg L⁻¹ para cada analito, acrescida de 500 µL de ACN; FO = 350 µL de 1-octanol; FA = ponta de papel sorvente modificada ou não modificada, embebidas com ácido acético 400 mmol L⁻¹ ou NH₄OH 400 mmol L⁻¹; 300 V e 35 min. O processo de eletroextração foi realizado de duas formas distintas para abranger tanto os compostos de caráter ácido quanto os de caráter básico, ora o eletrodo positivo foi alocado na fase doadora ora em contato com as fases aceptoras. Após a extração, os compostos foram dessorvidos das pontas de papel usando 200 µL da solução H₂O:ACN:MeOH:HAc (30:30:30:10 v/v/v/v) ou da solução H₂O:ACN:MeOH:NH₄OH (30:30:30:10 v/v/v/v), em ultrassom por 5 minutos. À solução de dessorção foram acrescentados 150 µL de água deionizada e a mistura resultante foi então filtrada e analisada pelo sistema UHPLC-MS/MS. Os procedimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos em termos de porcentagem de extração (ou eficiência de extração), dividindo a área do pico do analito extraído pela área do pico no extrato fortificado (2 mg L⁻¹ para cada analito).

4.2.3.2. Determinação dos fármacos, drogas de abuso e inseticidas por UHPLC-MS/MS

A determinação dos compostos foi realizada no sistema cromatográfico Acquity UPLCTM H-Class acoplado ao espectrômetro de massas TQD triplo quadrupolo (Waters Inc., EUA), o qual operou nos modos positivo e negativo. As condições cromatográficas e do sistema MS/MS utilizadas estão descritas na **tabela 10**. O *software* Masslynx 4.1 (Waters Corporation, EUA) foi utilizado para o tratamento de dados.

Tabela 10. Condições cromatográficas e do sistema MS/MS para a determinação dos fármacos, drogas de abuso e inseticidas

CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS			
Coluna	Acquity UPLC BEH C18 (1,7 µm; 2,1mm; 50 mm)		
Temperatura da coluna e do amostrador	35 e 25°C		
Fase móvel	Água (A); ACN (B)		
Gradiente (tempo, %B)	0,00 min, 15% B; 0,20 min, 15% B; 1,00 min, 95% B; 2,00 min, 95% B; 2,01 min, 15% B; 3,00 min, 15% B		
Tempo total de corrida	3 min		
Vazão da fase móvel	0,4 mL min ⁻¹		
Volume de injeção	5 µL		
CONDIÇÕES DO SISTEMA MS/MS			
Modo de operação	MRM (Monitoramento de Reações Múltiplas)		
Composto	Razão m/z (Quantificação; Confirmação)	Voltagem do cone (V)	Energia de colisão (V)
CAF	195>138; 195>110	38; 45	20; 20
COC	304>182; 304>82	13; 13	20; 20
LID	235>86; 235>58	30; 26	18; 35
LOS	423>405; 423>207	35; 35	11; 22
VAL	436>207; 436>235	40; 40	15; 25
CLORT	337>319; 337>190	40; 40	15; 17
DOXO	544>397; 544>130	18; 18	12; 18
DAUNO	528>321	18	12
AZI	749>158	30	40
SINV	419>199; 419>325	35; 20	18; 18
MONT	586>422	40	25
IBUP	205>161	15	5
DICLOF	296>278; 296>215	20; 20	10; 10
TIAMET	292>211; 292>181	20; 20	8; 20
IMIDA	256>209; 256>175	25; 25	21; 12
Fonte ESI+ ou ESI-			
Voltagem do capilar	3300 V	Temperatura da fonte	150°C
Vazão do gás do cone (N₂)	40 L h ⁻¹	Vazão do gás de dessolvatação (N₂)	650 L h ⁻¹
Temperatura de dessolvatação	450°C		

4.2.4. Aplicação do frasco de borossilicato-(PDDA/MWCNT)₁₀ na extração de fármacos, drogas de abuso e inseticidas a partir de saliva, urina e água de córrego

4.2.4.1. Procedimento de extração

Aos frascos de borossilicato revestidos foi adicionada a amostra contendo os diferentes compostos. Os frascos foram submetidos à agitação, em um homogeneizador a 20 rpm, e após esse período a mistura foi descartada. Na sequência, 700 µL da solução de dessorção foi adicionada ao frasco e o sistema foi agitado, também em homogeneizador a 20 rpm, por 15 min. Por fim, a solução de dessorção foi retirada do frasco, filtrada e analisada por UHPLC-MS/MS. O sistema e as condições de análise por UHPLC-MS/MS foram descritos no tópico anterior.

4.2.4.2. Avaliação das condições de extração e de dessorção

As condições de extração e de dessorção foram avaliados utilizando saliva artificial. Para isso, 700 µL de saliva fortificada na concentração de 200 µg L⁻¹ para cada composto e 1300 µL de tampão acetato 40 mmol L⁻¹ foram adicionados ao frasco para a extração. O tampão acetato foi adicionado para facilitar a dispersão da saliva sobre o frasco e maior contato com o filme.

Primeiramente, foram avaliados 4 tempos de extração (30, 60, 120 e 180 min), de forma univariada, utilizando H₂O:ACN (50:50 v/v) como solução de dessorção. Num segundo momento, foram avaliadas 3 composições para a solução de dessorção (H₂O:ACN 50:50 v/v, H₂O:MeOH 50:50 v/v e H₂O:ACN:HAc 45:45:10 v/v/v), utilizando 30 min na etapa de extração. Os procedimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram avaliados em termos de porcentagem de extração, dividindo a área do pico do analito extraído pela área do pico no extrato fortificado (200 µg L⁻¹ para cada analito).

4.2.4.3. Extração de fármacos, drogas de abuso e inseticidas a partir de diferentes matrizes

As condições de extração e de dessorção selecionadas nos tópicos anteriores para a saliva foram estendidas para as outras duas matrizes (urina artificial e água de córrego), respeitando inclusive o volume da amostra (700 μL), a concentração de cada composto (200 $\mu\text{g L}^{-1}$) e a adição de tampão acetato. Os procedimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos em termos de porcentagem de extração.

Considerando que o volume menor de amostra (geralmente $< 1 \text{ mL}$) é limitado apenas para a saliva, também foi realizado um teste utilizando 10 mL das outras duas amostras, mas mantendo a concentração de cada composto (200 $\mu\text{g L}^{-1}$). Nesse momento, a adição de tampão acetato não foi necessária. Aqui, os procedimentos também foram realizados em triplicata e os resultados de área do pico foram comparados.

4.2.4.4. Avaliação da reprodutibilidade dos frascos de borossilicato-(PDDA/MWCNT)₁₀

A reprodutibilidade entre os materiais produzidos foi realizada a partir de 5 frascos de borossilicato-(PDDA/MWCNT)₁₀. As extrações foram realizadas utilizando 700 μL de saliva artificial (acrescida de 1300 μL de tampão acetato), de 10 mL de urina sintética ou de 10 mL de água de córrego, ambas fortificadas na concentração de 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ para cada analito. Os resultados foram expressos em termos de CV (%).

4.2.4.5. Avaliação da reutilização dos frascos de borossilicato-(PDDA/MWCNT)₁₀

Após a extração e a dessorção dos diferentes compostos, os frascos de borossilicato-(PDDA/MWCNT)₁₀, utilizados na avaliação da reprodutibilidade, foram submetidos ao processo de limpeza utilizando 1 mL da própria solução de dessorção ($\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}:\text{HAc}$ 45:45:10 v/v/v). O sistema foi agitado por 7 min, utilizando um

homogeneizador a 20 rpm. Em seguida, a solução de limpeza foi filtrada e analisada por UHPLC-MS/MS para identificar se ainda havia compostos adsorvidos ao filme.

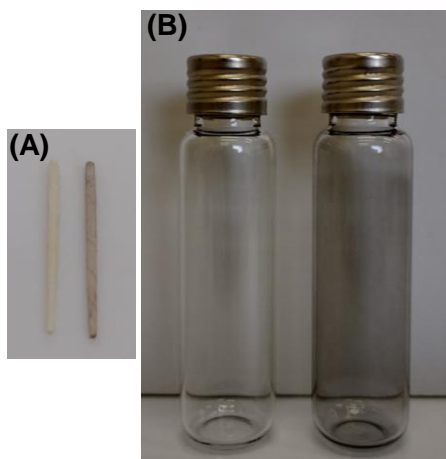
Após a etapa de limpeza, os frascos revestidos foram submetidos a mais 4 processos de extração conforme os procedimentos descritos acima. Ao final de cada processo os compostos foram analisados por UHPLC-MS/MS e a possibilidade de reutilização dos materiais foi avaliada. Nesse momento, foram apresentados apenas os resultados de área do pico para os analitos com histórico de presença em cada tipo de matriz.

4.3. Resultados e discussão

4.3.1. Montagem e caracterização do filme (PDDA/MWCNT)₁₀

Durante a montagem do filme LBL, foi possível observar um escurecimento gradativo dos substratos, indicando a deposição camada a camada dos NTC. Os materiais antes e após o processo de deposição das multicamadas são mostrados na **figura 28**. O frasco de borossilicato mostrou um escurecimento mais homogêneo quando comparado à ponta de papel.

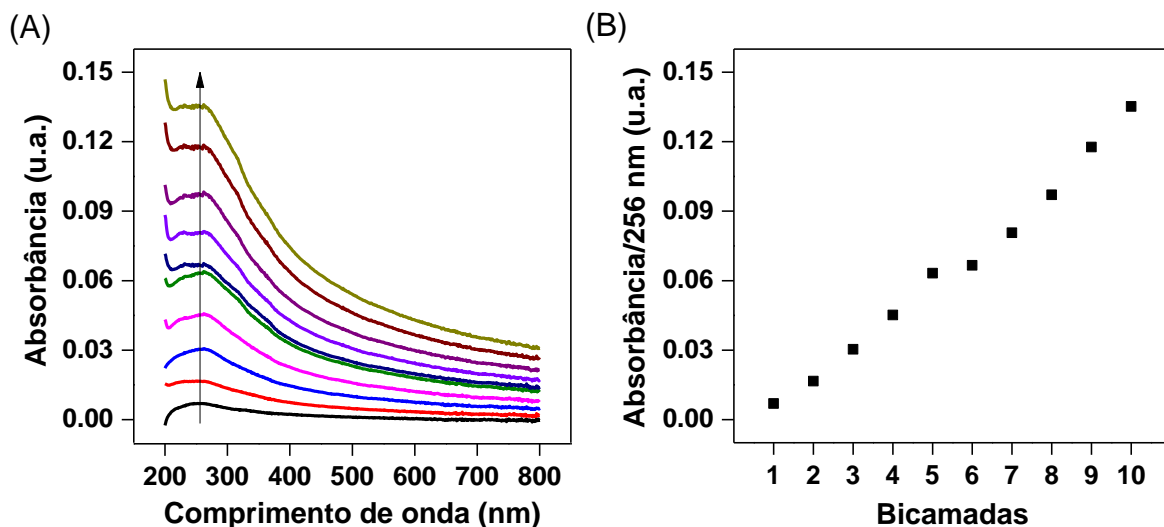
Figura 28. Pontas de papel (A) e frascos de borossilicato (B) antes (material da esquerda) e após (material da direita) a deposição do filme (PDDA/MWCNT)₁₀



No processo de deposição das multicamadas por LBL envolvendo forças eletrostáticas é importante ter conhecimento da densidade de cargas dos materiais de revestimento, as quais podem governar a estabilidade das dispersões e soluções utilizadas, e também o crescimento e as propriedades dos filmes nanoestruturados (Mesquita & Donnici & Pereira, 2010). A dispersão aquosa de MWCNT mostrou-se bastante estável após o preparo e apresentou um potencial $\zeta = - 20,8$ mV, que está associado à presença de grupos carboxílicos na superfície dos nanotubos funcionalizados. Essa estabilidade reflete a diminuição das interações de Van der Waals e a repulsão entre os nanotubos de carbono em meio aquoso, assim como a promoção das interações dipolo-dipolo entre o solvente e os nanomateriais (Castro *et al.*, 2019; Xiao-bo & Xiao-ying, 2010). Em contrapartida, o potencial $\zeta = + 47,5$ mV foi obtido para a solução aquosa de PDDA e é proveniente dos grupos amino desse polímero. A diferença encontrada no potencial Zeta dos materiais de revestimento pode ser explicada pela grande quantidade de grupos amino presentes no polímero (Mesquita & Donnici & Pereira, 2010). Porém, essa diferença não prejudicou a atração eletrostática entre os materiais PDDA e MWCNT, como será discutido posteriormente.

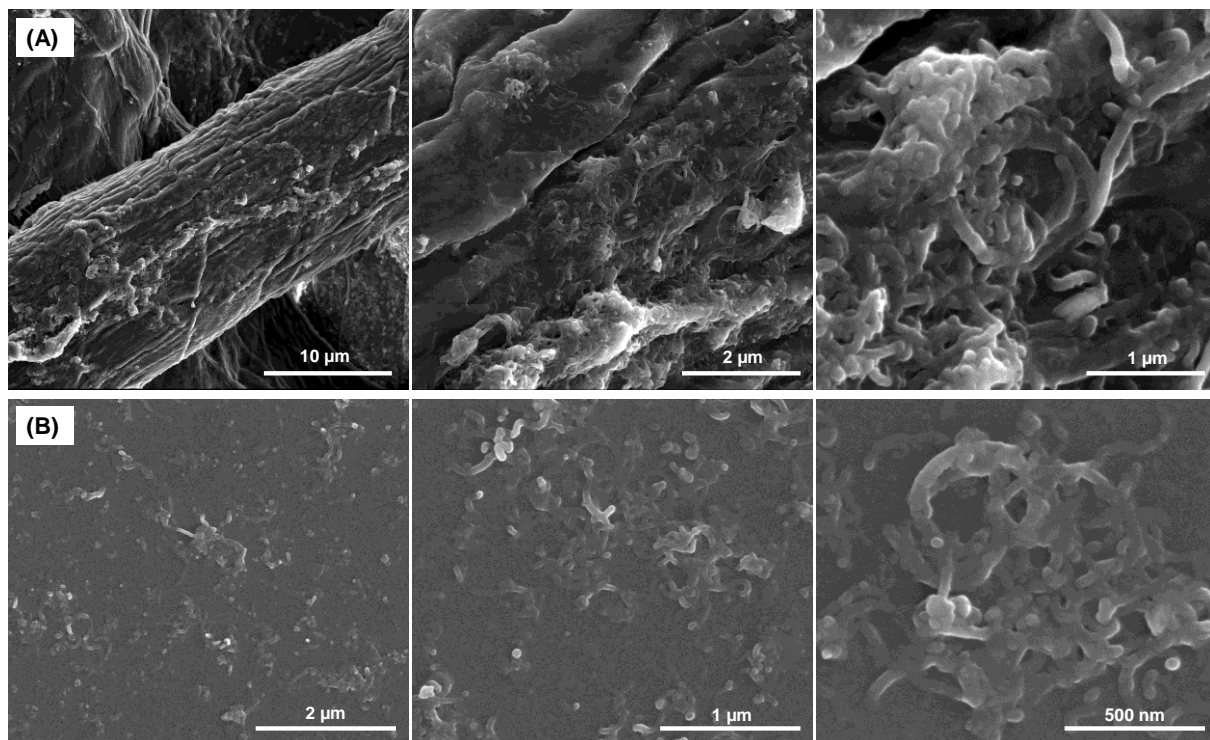
O crescimento do filme (PDDA/MWCNT)₁₀ foi monitorado e os espectros UV-Vis gerados correspondem à deposição de duas bicamadas de PDDA e MWCNT, considerando os dois lados da lâmina de quartzo. Através da **figura 29A** é possível identificar o aumento da absorbância com o aumento do número de bicamadas depositadas, sugerindo o crescimento gradativo do filme. Além disso, foram plotados os valores de absorbância em 256 nm (comprimento de onda característico dos nanotubos de carbono) e os respectivos números de bicamadas, conforme apresentado na **figura 29B**. Há um aumento linear da absorção em 256 nm com o número de bicamadas, o que indica que uma mesma quantidade de material (PDDA + MWCNT) foi depositada em cada ciclo (Mesquita & Donnici & Pereira, 2010).

Figura 29. Espectros UV-Vis obtidos pela deposição de 10 bicamadas PDDA/MWCNT em quartzo (A) e a absorbância em 256 nm em função do número de bicamadas (B)



As imagens do filme (PDDA/MWCNT)₁₀ sobre a ponta de papel e sobre o frasco de borossilicato são mostradas na **figura 30**. Embora seja possível notar a presença dos NTC nos dois filmes, eles estão aglomerados em regiões específicas na ponta de papel, enquanto no frasco de borossilicato, eles estão bem distribuídos na superfície do material, confirmando o que foi observado na análise visual. Esse resultado pode ser explicado pela superfície mais regular do vidro. Ademais, os frascos de borossilicato foram inicialmente tratados com a solução H₂SO₄:H₂O₂, que além de remover a matéria orgânica, hidroxila a superfície do vidro, deixando grupos hidroxila e cargas negativas expostos (Du *et al.*, 2008). Assim, a interação do substrato hidroxilado com a primeira camada do polímero catiônico é bastante efetiva, refletindo nas demais camadas. Uma melhor distribuição dos nanotubos sobre o material é importante para a interação filme-analito e, conseqüentemente, para um maior potencial de extração.

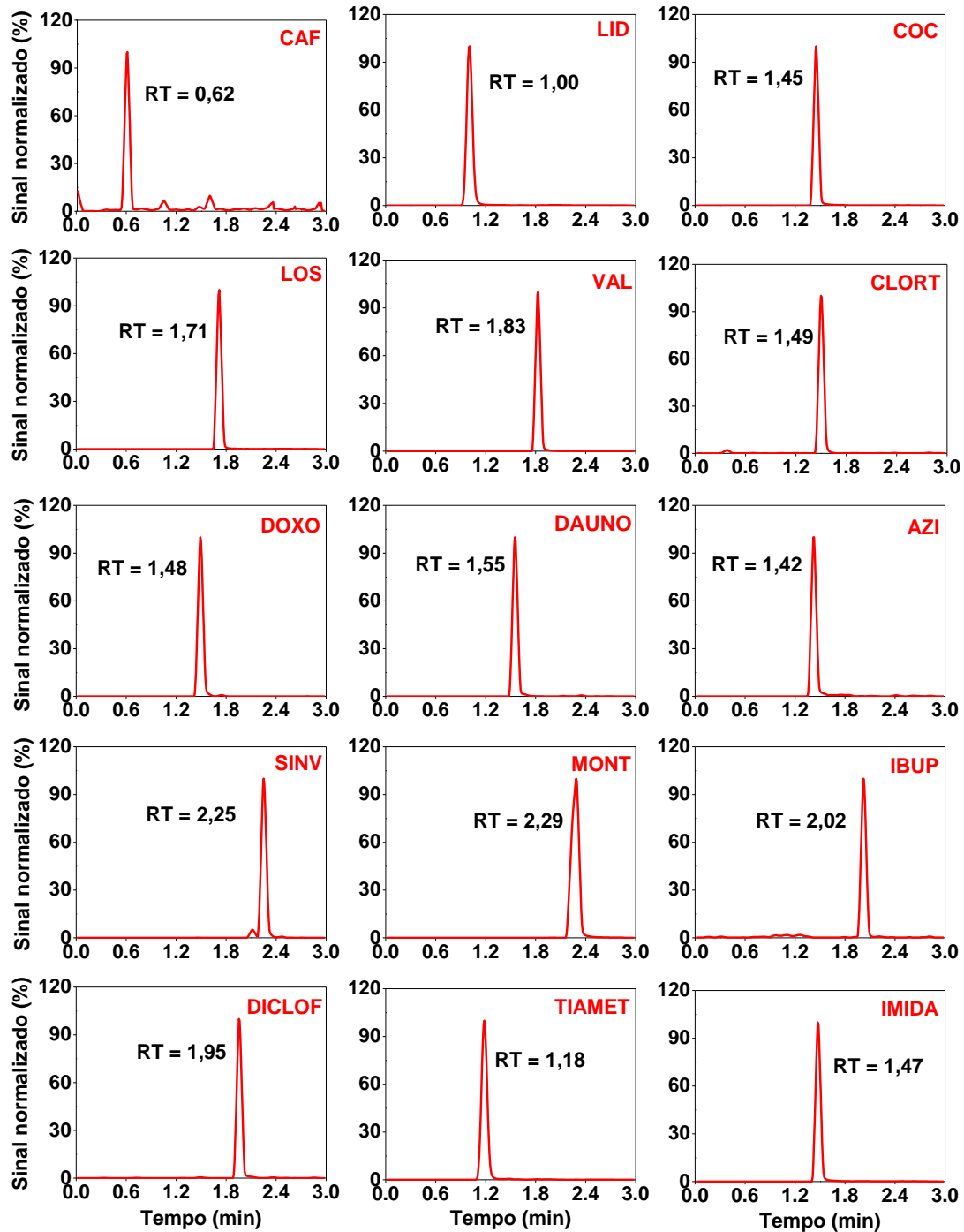
Figura 30. Imagens do filme (PDDA/MWCNT)₁₀ sobre a ponta de papel (A) e sobre o frasco de borossilicato (B), em diferentes magnitudes



4.3.2. Aplicação da ponta de papel-(PDDA/MWCNT)₁₀ na eletroextração multifásica de fármacos, drogas de abuso e inseticidas a partir de saliva

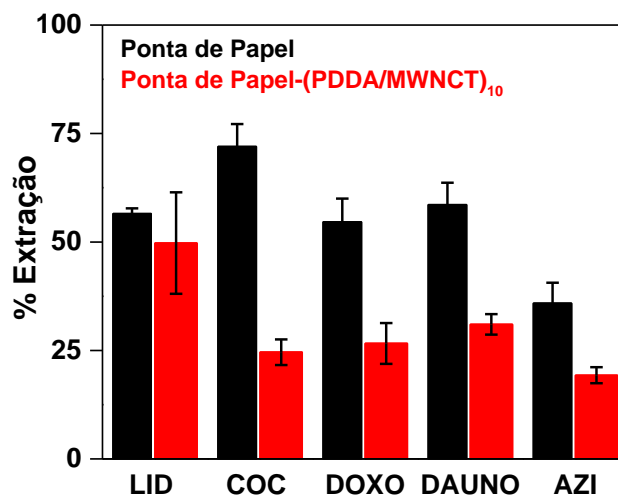
Os compostos analisados nesse capítulo foram devidamente separados e quantificados pelo sistema UPLC-MS/MS. Na **figura 31** são apresentados os cromatogramas dos extratos de saliva artificial fortificados em 200 μg L⁻¹ para os diferentes compostos, seus respectivos picos e tempos de retenção.

Figura 31. Cromatogramas dos extratos de saliva artificial fortificados na concentração de $200 \mu\text{g L}^{-1}$ para os diferentes compostos. Os cromatogramas referem-se à transição de quantificação para cada composto analisado



Os resultados de MPEE usando a ponta de papel revestida e não revestida foram comparados e são mostrados na **figura 32**. Como os compostos analisados apresentam magnitudes de área do pico muito diferentes, os dados foram comparados em termos de porcentagem de extração. Nem todos os compostos foram extraídos e quantificados pelo método desenvolvido. Para os compostos extraídos (LID, COC, DOXO, DAUNO e AZI), os resultados obtidos a partir da ponta de papel foram superiores aos resultados da ponta de papel-(PDDA/MWCNT)₁₀. Através da coloração vermelha da DOXO e da DAUNO, foi possível visualizá-las em ambos os materiais após o procedimento de extração e não mais visualizá-las após o processo de dessorção, indicando assim que os meios utilizados para a dessorção foram eficientes. Além disso, a coloração escurecida na ponta de papel revestida manteve-se após a dessorção, sugerindo que o filme (PDDA/MWCNT)₁₀ é resistente ao processo e à mistura de solventes utilizados nessa etapa. A partir disso, é possível concluir que o filme não acrescentou sortividade à ponta de papel.

Figura 32. Porcentagem de extração de vários compostos por MPEE, usando as pontas de papel revestidas ou não revestidas com o filme (PDDA/MWCNT)₁₀, e determinação por UHPLC-MS/MS, n = 3



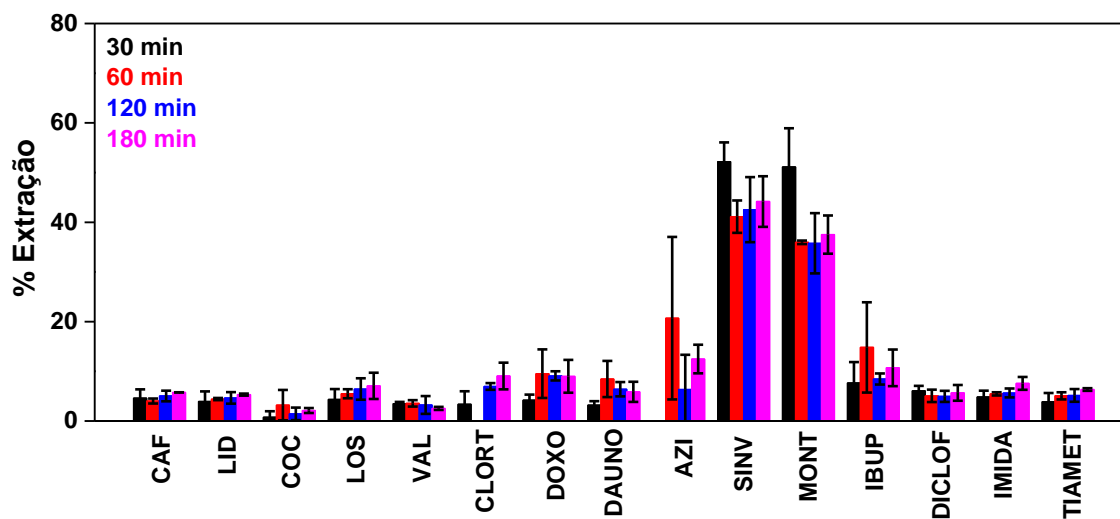
4.3.3. Aplicação do frasco de borossilicato-(PDDA/MWCNT)₁₀ na extração de fármacos, drogas de abuso e inseticidas a partir de saliva, urina e água de córrego

4.3.3.1. Avaliação das condições de extração e de dessorção

Considerando as três matrizes a serem analisadas nessa aplicação, a saliva apresenta um maior desafio, devido a sua elevada viscosidade e a limitação de volume, quando comparada à urina e à água de córrego. Assim, inicialmente, uma avaliação dos processos de extração e de dessorção foi realizada utilizando saliva artificial.

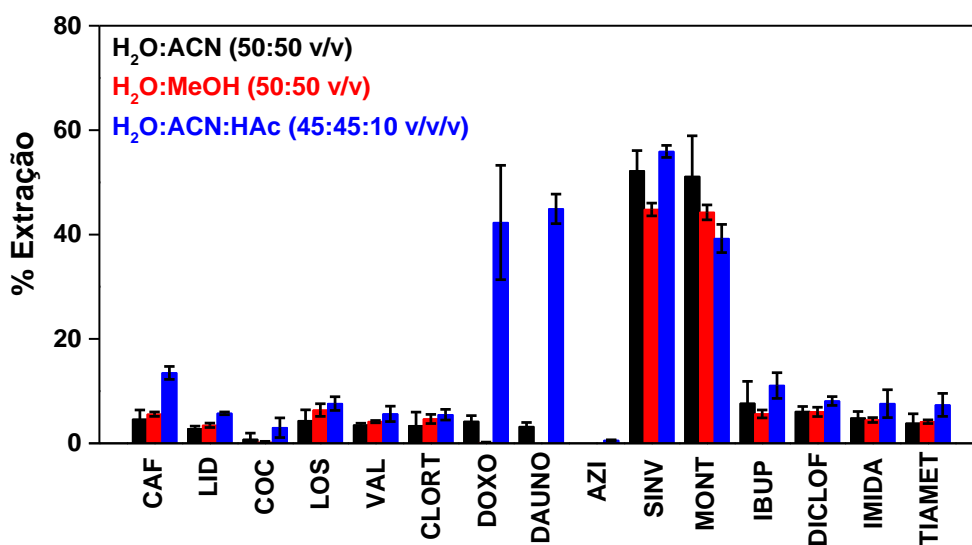
Conforme mostrado na **figura 33**, os diferentes compostos foram extraídos pelo frasco de borossilicato-(PDDA/MWCTN)₁₀, sugerindo interações efetivas entre o polímero e os MWCTN com esses analitos. Para a maioria dos compostos, o aumento do tempo de extração não apresentou uma contribuição significativa na porcentagem de extração, indicando que o equilíbrio de sorção foi alcançado com apenas 30 min. Sendo assim, esse tempo foi escolhido para as próximas etapas.

Figura 33. Efeito do tempo para a extração de vários compostos pelo frasco de borossilicato-(PDDA/MWCNT)₁₀, n = 3



Em relação à avaliação da solução de dessorção, a solução contendo H₂O:ACN:HAc (45:45:10 v/v/v) apresentou melhor desempenho na dessorção dos analitos sorvidos sobre o filme multicamadas, principalmente para DOXO e DAUNO, conforme apresentado na **figura 34**. Considerando a variedade dos compostos analisados, os quais apresentam características ácido/básicas e polaridades diferentes, essa solução tem um poder de dessorção mais abrangente, já que é composta por um solvente polar prótico (água), um solvente polar aprótico (ACN) e um ácido fraco (HAc), este último capaz de deslocar cátions ligados aos nanotubos de carbono. É válido ressaltar, que após a etapa de dessorção, o frasco permaneceu com a superfície interna escurecida, o que indica que o filme apresenta resistência química em relação à mistura de solventes utilizada.

Figura 34. Efeito da composição da solução para a dessorção de vários compostos extraídos pelo frasco de borossilicato-(PDDA/MWCNT)₁₀, n = 3

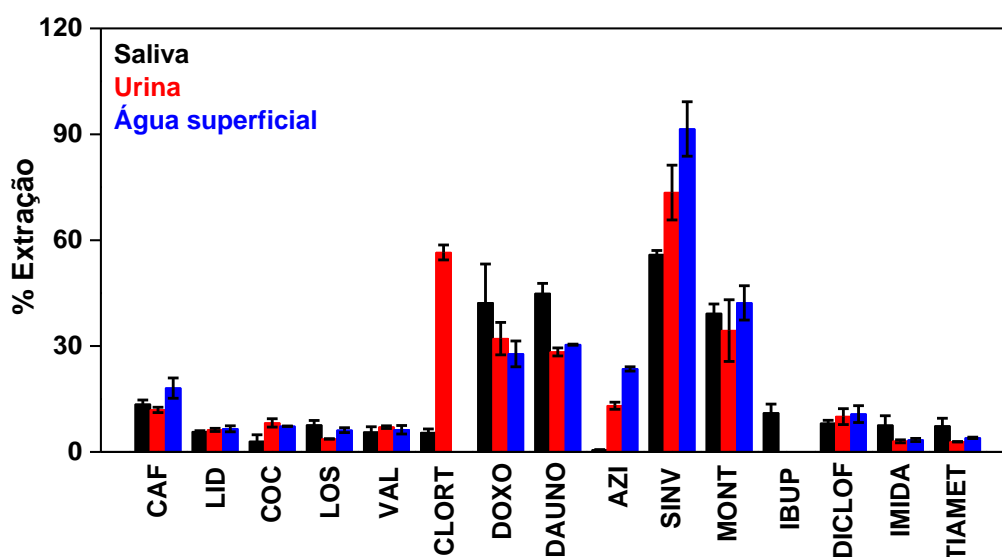


4.3.3.2. Extração de fármacos, drogas de abuso e inseticidas a partir de diferentes matrizes

As condições anteriormente escolhidas, tempo de extração de 30 min e a solução de dessorção H₂O:ACN:HAc 45:45:10 v/v/v, foram utilizadas na extração dos

diferentes compostos em 700 μ L de saliva artificial. Os compostos também foram extraídos a partir de outras duas matrizes (urina artificial e água superficial), demonstrando a versatilidade do material, conforme é apresentado na **figura 35**. Embora a porcentagem de extração tenha sido menor do que 10% para a maioria dos compostos analisados, vale ressaltar que a avaliação dos processos de extração e de dessorção não foi realizada de forma exaustiva. Para os analitos DOXO, DAUNO, SINV e MONT, essa porcentagem foi mais expressiva, indicando o potencial extrativo do material.

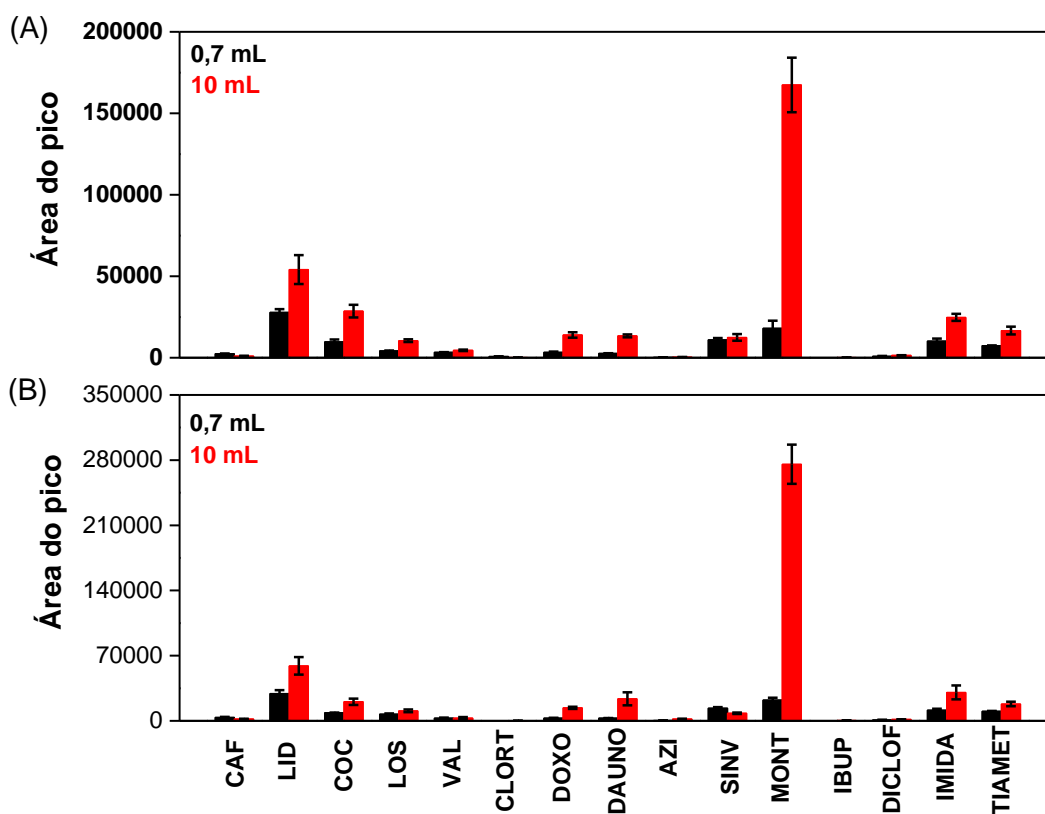
Figura 35. Extração de vários compostos pelo frasco de borossilicato-(PDDA/MWCNT)₁₀ a partir de diferentes matrizes, n = 3



A possibilidade do uso de um volume maior de amostra é interessante nos processos de extração, podendo acarretar em uma maior quantidade de compostos sorvidos ao material extrator ou até mesmo em uma pré-concentração. Ao contrário da saliva, que possui um volume limitado para a coleta, é possível coletar um volume maior de urina e águas ambientais. Assim, foram realizadas extrações usando 10 mL de urina artificial e de água superficial. O resultado está graficamente apresentado na **figura 36**, sendo possível identificar um aumento considerável dos analitos extraídos quando o

volume da amostra passou de 700 μL (ou 0,7 mL) para 10 mL, alcançando valores de área do pico de até 12 vezes maior. Esse resultado é interessante, pois é possível perceber que o frasco de borossilicato-(PDDA/MWCNT)₁₀ apresenta grande capacidade sortiva e que os componentes da matriz não diminuíram essa sortividade.

Figura 36. Comparação entre as áreas do pico de vários compostos extraídos pelo frasco de borossilicato-(PDDA/MWCNT)₁₀ a partir de 700 μL (ou 0,7 mL) e 10 mL de urina artificial (A) e de água superficial (B), n = 3



4.3.3.3. Avaliação da reprodutibilidade dos frascos de borossilicato-(PDDA/MWCNT)₁₀

Na **tabela 11** são apresentados os resultados de reprodutibilidade para 5 diferentes frascos de borossilicato-(PDDA/MWCNT)₁₀. Para a saliva o coeficiente de variação foi de no máximo 25%, enquanto que para a urina e para a água superficial

esse parâmetro variou até 22 e 38%, respectivamente. Embora outros resultados já tenham demonstrado que as extrações pelo filme LBL são efetivas, os dados obtidos aqui sugerem que os processos de produção dos materiais sorventes podem ser melhorados, para torná-los mais reprodutíveis. Uma alternativa seria a automatização desses processos. Ademais, é válido ressaltar que as etapas de extração e de dessorção também não foram exaustivamente avaliadas, podendo agregar erros as análises.

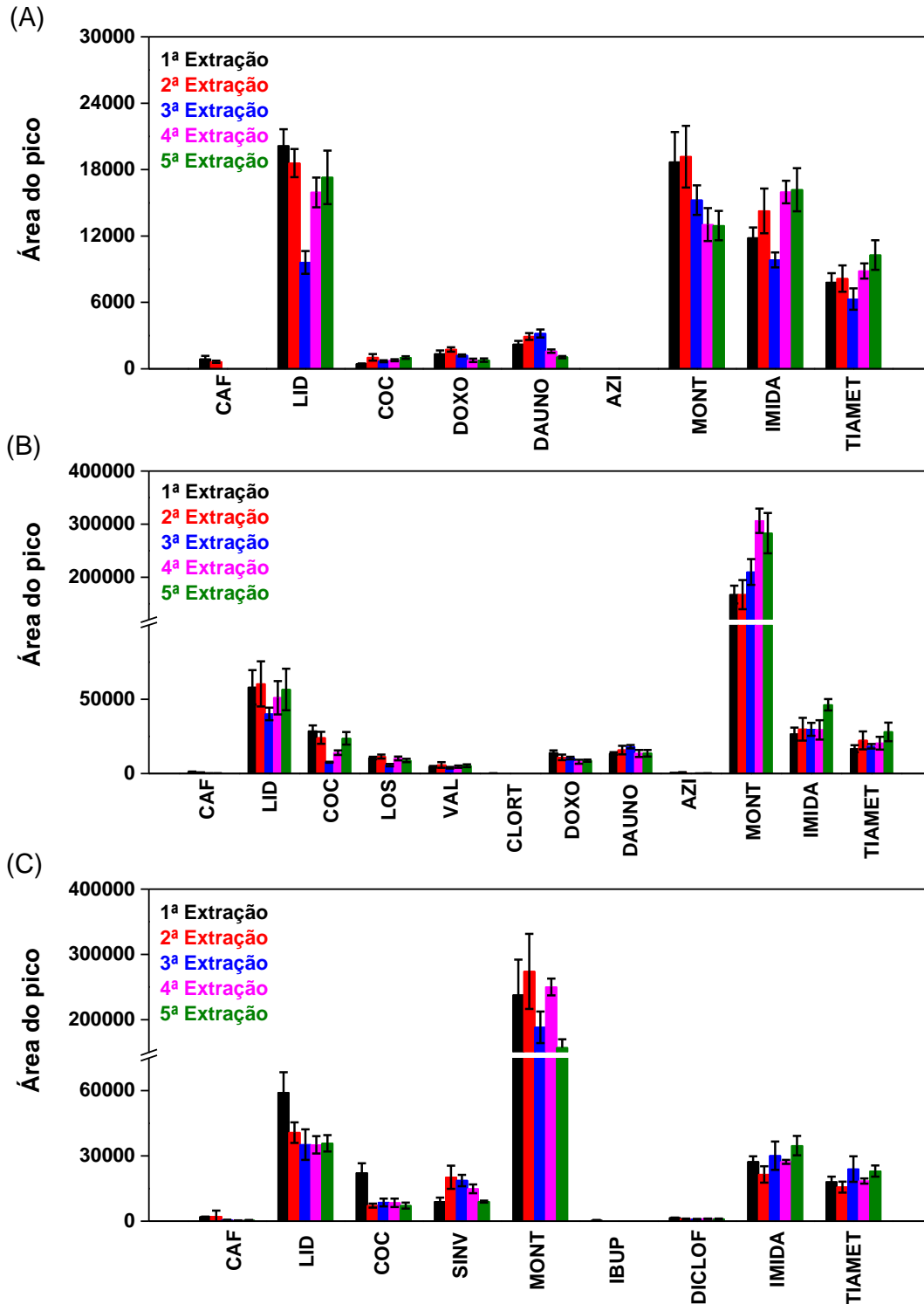
Tabela 11. Avaliação da reprodutibilidade de 5 frascos de borossilicato-(PDDA/MWCNT)₁₀ na extração de vários compostos a partir de amostras de saliva artificial, urina artificial e água superficial

Composto	Reprodutibilidade (CV; %)		
	Saliva	Urina	Água superficial
COC	21	13	20
LID	7	16	16
CAF	21	16	5
DAUNO	20	6	19
DOXO	25	12	8
AZI	19	21	13
DICLOF	22	9	6
IBUP	22	8	38
VAL	22	11	12
LOS	17	8	13
CLORT	19	13	-
SINV	18	22	10
MONT	19	10	23
TIAMET	10	14	13
IMIDA	8	9	9

4.3.3.4. Avaliação da reutilização dos frascos de borossilicato-(PDDA/MWCNT)₁₀

Já o estudo de reutilização mostrou que para alguns analitos a capacidade sortiva do frasco de borossilicato-(PDDA/MWCNT)₁₀ não variou tanto durante as cinco extrações. Os resultados desse estudo são apresentados, em termos de área do pico e para cada tipo de amostra, na **figura 37**. Assim, a reutilização desses materiais é possível, evitando gastos com reagentes e materiais, e tempo com a produção dos filmes.

Figura 37. Estudo de reutilização do frasco de borossilicato-(PDDA/MWCNT)₁₀ na extração de vários compostos a partir de amostras de saliva artificial (A), urina artificial (B) e água superficial (C), n = 5



4.4. Conclusões

Esse capítulo trouxe a possibilidade de obtenção de materiais sorventes para o preparo de amostras através da técnica LBL. A técnica de produção das multicamadas mostrou-se simples e de fácil execução, além de necessitar de poucos aparatos de laboratório. O filme (PDDA/MWCNT)₁₀ foi depositado camada por camada sobre a ponta de papel e sobre o frasco de borossilicato de 20 mL, sendo devidamente caracterizado. O PDDA e os NTC formaram um filme homogêneo e resistente sobre o frasco de borossilicato. Assim, esse substrato mostrou-se mais adequado para a deposição do filme nanoestruturado e para o processo de extração.

Nas condições estudadas, o desempenho da ponta de papel-(PDDA/MWCNT)₁₀ no processo de MPEE foi inferior ao da ponta de papel não revestida. Embora os NTC não tenham depositado de forma homogênea sobre o material, esperava-se uma interação melhor dessas nanopartículas com os compostos eletroextraídos em detrimento apenas das interações com a celulose e da solução eletrolítica. Estudos de recobrimento desse substrato com outros materiais de revestimento podem complementar os resultados obtidos nessa tese.

Já o frasco borossilicato-(PDDA/MWCNT)₁₀ mostrou-se eficiente para a extração de compostos a partir de diferentes amostras complexas, como os fluidos biológicos e uma amostra ambiental. A escolha adequada dos materiais de revestimento possibilitou interações tanto com analitos de caráter básico, como a lidocaína e os antineoplásicos, quanto com analitos de caráter ácido, como o montelucaste, demonstrando assim, a versatilidade do material desenvolvido. As dimensões do frasco permitiram a formação de um filme extenso e, assim, a produção de um material com grande capacidade sortiva. Essa capacidade sortiva foi verificada quando o volume de amostra variou de 0,7 para 10 mL e o sinal analítico dos compostos extraídos aumentou em até 12 vezes. Ademais, o filme apresentou resistência aos processos de extração e dessorção envolvidos, inclusive aos solventes utilizados, podendo ser reutilizado no mínimo em 5 aplicações.

Ainda sobre as vantagens do material nanoestruturado e do método desenvolvido (extração seguida da análise por UHPLC-MS/MS), tem-se a possibilidade

de várias extrações simultâneas e do ganho de seletividade, garantido pela separação cromatográfica e pelo sistema de espectrometria de massas.

Por fim, a automatização pode facilitar o processo de montagem das multicamadas e pode gerar filmes mais homogêneos e reprodutíveis.

CAPÍTULO V - CONCLUSÕES E OBSERVAÇÕES FINAIS

O emprego de campos elétricos e de materiais nanoestruturados por LBL no preparo de amostras foi eficientemente demonstrado neste trabalho através de diferentes aplicações.

A MPEE, utilizando uma ponta de papel comercial, apresentou bom desempenho na extração de cocaína e doxorrubicina a partir de saliva, assim como versatilidade para o uso sequencial de diferentes técnicas de separação e detecção (cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas e à detecção por arranjo de diodos, ou detecção direta por DIA). Esse último aspecto é de extrema importância para a realidade de grande parte dos laboratórios, os quais nem sempre apresentam equipamentos mais seletivos e sensíveis, como os espectrômetros de massas, devido ao elevado custo. Neste contexto, destaca-se a detecção por DIA, pois não é destrutiva, dispensa treinamento especializado, evita o uso e o descarte de reagentes, possibilita a análise em locais diversos do laboratório, porém, necessita que o analito apresente cor ou que seja quimicamente revelado.

O sorvente comercial exibiu uma composição simples, importante para o controle das interações entre o material e os compostos analisados, assim como, resistência ao potencial elétrico aplicado e compatibilidade com os reagentes utilizados nos processos de extração e dessorção. Essa simplicidade também favorece a modificação superficial da ponta de papel e o desenvolvimento de novos materiais mais sortivos. Ademais, a ponta de papel tem baixo custo quando comparada aos materiais usados em técnicas de microextração, como as fibras de SPME.

O desenvolvimento de materiais nanoestruturados por LBL para a extração de fármacos, drogas de abuso e inseticidas em amostras complexas também mostrou sucesso. Filme (PDDA/MWCNT)₁₀ foi depositado pela técnica LBL na superfície da ponta de papel e de frascos de borossilicato. As interações entre PDDA e MWCNT, principalmente eletrostáticas, permitiram a montagem linear das camadas, as quais foram devidamente caracterizadas. O filme mostrou-se homogêneo sobre o frasco de borossilicato, ao contrário do que ocorreu sobre a ponta de papel.

A ponta de papel-(PDDA/MWCNT)₁₀ não apresentou resultado satisfatório na MPEE quando comparada à ponta de papel e, por isso, a tentativa de agrupar as estratégias do uso de campos elétricos e materiais nanoestruturados LBL no preparo de amostras deve ser avaliada e estudada de forma mais abrangente.

Já o frasco de borossilicato-(PDDA/MWCNT)₁₀ foi eficiente na extração de compostos ácidos, básicos e de diferentes polaridades a partir de amostras de saliva, urina e água de córrego. Um aumento do sinal analítico de até 12 vezes foi obtido quando um volume maior das amostras de urina e água de córrego foi utilizado. O filme (PDDA/MWCNT)₁₀ apresentou estabilidade química e física, mantendo a sua capacidade sortiva para alguns compostos em até 5 aplicações e podendo ser reutilizado. Para o preparo de amostras isso é interessante, pois significa redução de custos com a produção de novos materiais e a minimização de resíduos gerados.

As duas abordagens (campos elétricos e os materiais nanoestruturados por LBL) também foram eficientes na eliminação de interferentes da matriz e na extração dos compostos de interesse para uma fase de composição mais simples e passível de análise. Além disso, os sistemas utilizados nessas abordagens permitem várias extrações simultâneas, o que gera uma elevada frequência analítica.

Por fim, os resultados positivos obtidos nesse trabalho mostram que a eletroextração multifásica e os materiais nanoestruturados por LBL são promissores para o preparo de amostras e podem ser empregados para diversas aplicações.

REFERÊNCIAS

- Ahmadi, M., Elmongy, H., Madrakian, T., Abdel-Rehim, M. Nanomaterials as sorbents for sample preparation in bioanalysis: A review. *Analytica Chimica Acta*. 2017, Vol. 958, 1-21.
- Ahmadi, M., Madrakian, T., Afkhami, A. Solid phase extraction of doxorubicin using molecularly imprinted polymer coated magnetite nanospheres prior to its spectrofluorometric determination. *New Journal Chemical*. 2015, Vol. 39, 163-171.
- Al Za'abi, M., Deleu, D., Batchelor, C. Salivary free concentrations of anti-epileptic drugs: an evaluation in a routine clinical setting. *Acta neurologica Belgica*. 2003, Vol. 103, 19-23.
- Almeida, A.M., Castel-Branco, M.M., Falcão, A.C. Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods. *Journal of Chromatography B*. 2002, Vol. 774, 215-222.
- Amador, V.S., Moreira, J.S., Augusti, R., Orlando, R.M., Piccin, E. Direct coupling of paper spray mass spectrometry and four-phase electroextraction sample preparation. *Analyst*. 2021, Vol. 146, 1057-1064.
- AOAC International. Guidelines for Standard Method Performance Requirements (Appendix F). 2016.
- Arain, S.S., Kazi, T.G., Arain, J.B., Afridi, H.I., Brahman, K.D., Naeemullah. Preconcentration of toxic elements in artificial saliva extract of different smokeless tobacco products by dual-cloud point extraction. *Microchemical Journal*. 2014, Vol. 112, 42-49.
- Ariga, K., Hill, J.P., Ji, Q. Layer-by-layer assembly as a versatile bottom-up nanofabrication technique for exploratory research and realistic application. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2007, Vol. 9, 2319-2340.

- Asadi, S., Tabani, H., Nojavan, S. Application of polyacrylamide gel as a new membrane inelectromembrane extraction for the quantification of basic drugs in breast milk and wastewater samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2018, Vol. 151, 178-185.
- Avelar, M.C.F., Nascentes, C.C., Orlando, R.M. Electric field-assisted multiphase extraction to increase selectivity and sensitivity in liquid chromatography-mass spectrometry and paper spray mass spectrometry. *Talanta*. 2021, Vol. 224, 121887.
- Bachur, N.R. Anthracyclines. In: Bertino, J.R. Encyclopedia of Cancer. 2^a Ed., Academic Press. 2002, 2306p.
- Baciu, T., Botello, I., Borrull, F., Calull, M., Aguilar, C. Capillary electrophoresis and related techniques in the determination of drugs of abuse and their metabolites. *Trends in Analytical Chemistry*. 2015, Vol. 74, 89-108.
- Baharfar, M., Yamini, Y., Seidi, S., Arain, M.B. Approach for downscaling of electromembrane extraction as a lab on-a-chip device followed by sensitive Red-Green-Blue detection. *Analytical Chemistry*. 2018, Vol. 90, 8478-8486.
- Bassotti, E., Merone, G.M., D'Urso, A., Savini, F., Locatelli, M., Tartaglia, A., Dossetto, P., D'Ovidio, C., de Grazia, U. A new LC-MS/MS confirmation method for the determination of 17 drugs of abuse in oral fluid and its application to real samples. *Forensic Science International*. 2020, Vol. 312, 110330.
- Battistel, D., Padovani, I., Dallo, F., Barbante, C., Zendri, E., Balliana, E. Evaluation of the volatile organic compound emissions in modern and naturally aged Japanese paper. *Journal of Cultural Heritage*. 2018, Vol. 33, 18-29.
- Boissel, C., Alden, B., Danaceau, J.P., Chambers, E. Rapid analysis of cocaine and metabolites by mixed-mode micro-elution SPE combined with UPLC-MS/MS. *Aplication note, Waters Corporation*. 2016.
- Bordin, D.C.M., Monedeiro, F.F.S.S., Campos, E.G., Alves, M.N.R., Bueno, L.H.P., de Martinis, B.S. Técnicas de preparo de amostras biológicas com interesse forense. *Scientia Chromatographica*. 2015, Vol. 7, 125-143.

- Borges, J., Mano, J.F. Molecular interactions driving the layer-by-layer assembly of multilayers. *Chemical Reviews*. 2014, Vol. 114, 8883-8942.
- Borges, K.B., de Figueiredo, E.C., Queiroz, M.E.C. Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos. 1ª Ed., Rio de Janeiro: LTC. 2015, 288p.
- Bosker, W.M., Huestis, M.A. Oral fluid testing for drugs of abuse. *Clinical Chemistry*. 2009, Vol. 55, 1910-1931.
- Bressolle, F., Jacquet, J-M., Galtier, M., Jourdan, J., Donadio, D., Rossi, J-F. Doxorubicin and doxorubicinol plasma concentrations and excretion in parotid saliva. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1992, Vol. 30, 215-218.
- Campos, C.D.M., Campos, R.P.S., Silva, J.A.F., Jesus, D.P., Orlando, R.M. Preparo de amostras assistido por campo elétrico: Fundamentos, avanços, aplicações e tendências. *Química Nova*. 2015, Vol. 38, 1093-1106.
- Cass, Q.B., Cassiano, N. Cromatografia líquida - Novas tendências e aplicações. 1ª Ed., Rio de Janeiro: Elsevier. 2015, 392p.
- Castro, V.G., Costa, I.B., Medeiros, F.S., Siqueira, E.J., Kasama, A.H., Figueiredo, K.C.S., Lavall, R.L., Silva, G.G. Improved functionalization of multiwalled carbon nanotubes in ultra-low acid volume: effect of solid/liquid interface. *Journal Brazilian Chemical Society*. 2019, Vol. 30, 2477-2487.
- Celio, L.A., Di Gregorio, G.J., Ruch, E., Pace, J., Piraino, A.J. Doxorubicin and 5-Fluorouracil plasma concentrations and detectability in parotid saliva. *Europe Journal Clinical Pharmacology*. 1983, Vol. 24, 261-266.
- Choi, J., Rubner, M.F. Influence of the degree of ionization on weak polyelectrolyte multilayer assembly. *Macromolecules*. 2005, Vol. 38, 116-124.
- Choo, R.E., Huestis, M.A. Oral fluid as a diagnostic tool. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2004, Vol. 42(11), 1273-1287.
- Collins, C.H., Braga, G.L., Bonato, P.S. Fundamentos de cromatografia. 1ª Ed., Campinas, São Paulo: Unicamp. 2006, 456p.

- Collins, C.J., Arrigan, D.W.M. A review of recent advances in electrochemically modulated extraction methods. *Analytical Bioanalysis Chemistry*. 2009, Vol. 393, 835-845.
- Costa, L.D.S., Fonsêca, A.F., Pereira, F.V., Druzian, J.I. Extraction and characterization of cellulose nanocrystals from corn stover. *Cellulose Chemistry and Technology*. 2015, Vol. 49, 127-133.
- Da Silva, J.A.F., Coltro, W.K.T., Carrilho, E., Tavares, M.F.M. Terminologia para as técnicas analíticas de eletromigração em capilares. *Química Nova*. 2007, Vol. 30, 740-744.
- Danaceau, J.P., Haynes, K., Chambers, E.E. A comprehensive comparison a solid phase extraction (SPE) vs. solis liquid extraction (SLE) vs. liquid-liquid extraction (LLE) sample preparation tecniques in bioanalysis and forensic toxycologic analyses. *Aplication note, Waters Corporation*. 2017.
- Dasgupta, A. Alcohol, Drugs, Genes and the Clinical Laboratory. 1^a Ed., Academic Press. 2017, 236p.
- Decher, G. Fuzzy nanoassemblies: toward layered polymeric multicomposites. *Science*. 1997, Vol. 227, 1232-1237.
- Diniz, P.H.G.D. Chemometrics-assisted color histogram-based analytical systems. *Journal of Chemometrics*. 2020, Vol. 34(12), 1-27.
- Drouin, N., Kubáň, P., Rudaz, S., Pedersen-Bjergaard, S., Schappler, J. Electromembrane extraction: overview of the last decade. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2019, Vol. 113, 357-363.
- Drouin, N., Mandscheff, J-F., Rudaz, S., Schappler, J. Development of a new extraction device based on parallel - Electromembrane extraction. *Analytical Chemistry*. 2017, Vol. 89, 6346-6350.
- Drummer, O.H. Postmortem toxicology of drugs of abuse. *Forensic Science International*. 2004, Vol. 142, 101-113.

- Du, Z., Zhang, S., Zhou, C., Liu, M., Li., G. Dynamic layer-by-layer self-assembly of multi-walled carbon nanotubes on quartz wool for on-line separation of lysozyme in egg white. *Talanta*. 2012, Vol. 94, 104-110.
- Du, Z., Yu, Y-L., Yan, X-R., Wang, J-H. Isolation and pre-concentration of basic proteins in aqueous mixture via solid-phase extraction with multi-walled carbon nanotubes assembled on a silica surface. Isolation and pre-concentration of basic proteins in aqueous mixture via solid-phase extraction with multi-walled carbon nanotubes assembled on a silica surface. *Analyst*. 2008, Vol. 133(10), 1373-1379.
- Eibak, L.E.E., Rasmussen, K.E., Øiestad, E.L., Pedersen-Bjergaard, S., Gjelst, A. Parallel electromembrane extraction in the 96-well format. *Analytica Chimica Acta*. 2014, Vol. 828, 46-52.
- Fernandes, G.M., Silva, W.R., Barreto, D.N., Lamarca, R.S., Gomes, P.C.F.L., Petrucci, J.F.S., Batista, A.D. Novel approaches for colorimetric measurements in analytical chemistry - A review. *Analytica Chimica Acta*. 2020, Vol. 1135, 187-203.
- Fiorentin, T.R., D'Avilaa, F.B., Comiran, E., Zamboni, A., Scherer, J.N., Pechansky, F., Borges, P.E.M., Fröhlich, P.E., Limberger, R.P. Simultaneous determination of cocaine/crack and its metabolites in oral fluid, urine and plasma by liquid chromatography-mass spectrometry and its application in drug users. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 2017, Vol. 86, 60-66.
- Fuchs, D., Gabel-Jensen, C., Jensen, H., Rand, K.D., Pedersen-Bjergaard, S., Hansen, S.H., Petersen, N.J. Direct coupling of a flowflow electromembrane extraction probe to LC-MS. *Analytica Chimica Acta*. 2016, Vol. 905, 93-99.
- Fuke, C., Nagai, T., Ninomiya, K., Fukasawa, M., Ihama, Y., Miyazaki T. Detection of imidacloprid in biological fluids in a case of fatal insecticide intoxication. *Legal Medicine*. 2014, Vol. 16(1), 40-43.
- Goldstein, R.A., DesLauriers, C., Burda, A., Johnson-Arbor, K. Cocaine: history, social implications, and toxicity: a review. *Seminars in Diagnostic Pathology*. 2009, Vol. 26, 10-17.

- Haghshenas, E., Madrakian, T., Afkhami, A. Electrochemically oxidized multiwalled carbon nanotube/glassy carbon electrode as a probe for simultaneous determination of dopamine and doxorubicin in biological samples. *Analytical Bioanalytical Chemistry*. 2016, Vol. 408, 2577-2586.
- Han, W., Tian, Y., Shen, X. Human exposure to neonicotinoid insecticides and the evaluation of their potential toxicity: An overview. *Chemosphere*. 2018, Vol. 192, 59-65.
- Hansen, F.A., Sticker, D., Kutter, J.P., Petersen, N.J., Pedersen-Bjergaard, S. Nanoliter-scale electromembrane extraction and enrichment in a microfluidic chip. *Analytical Chemistry*. 2018, Vol. 90, 9322-9329.
- Hatamluyi, B., Es'haghi, Z. A layer-by-layer sensing architecture based on dendrimer and ionic liquid supported reduced graphene oxide for simultaneous hollow-fiber solid phase microextraction and electrochemical determination of anti-cancer drug imatinib in biological samples. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 2017, Vol. 801, 439-449.
- He, L., Cui, W., Wang, Y., Zhao, W., Xiang, G., Jiang, X., Mao, P., He, J., Zhang, S. Polymeric ionic liquid based on magnetic materials fabricated through layer-by-layer assembly as adsorbents for extraction of pesticides. *Journal of Chromatography A*. 2017, Vol. 1522, 9-15.
- He, Y., Miggiels, P, Wouters, B., Drouin, N., Gule, F., Hankemeier, T., Lindenburg, P.W. A high-throughput, ultrafast, and online three-phase electroextraction method for analysis of trace level pharmaceuticals. *Analytica Chimica Acta*. 2021, Vol. 1149, 338204.
- Huang, C., Eibak, L.E.E., Gjelstad, A., Shen, R., Trones, X., Jensen, H., Pedersen-Bjergaard, S. Development of a flat membrane based device for electromembraneextraction: A new approach for exhaustive extraction of basic drugsfrom human plasma. *Journal of Chromatography A*. 2014, Vol. 1326, 7-12.

- Huang, C., Jensen, H., Seip, K.F., Gjelstad, A., Pedersen-Bjergaard, S. Mass transfer in electromembrane extraction -The link between theory and experiments. *Journal Separation Science*. 2016, Vol. 39, 188-197.
- Iler, R. Multilayers of colloidal particles. *Journal of Colloid and Interface Science*. 1966, Vol. 21, 569-594.
- Intrchom, W., Mitra, S. Analytical sample preparation, preconcentration and chromatographic separation on carbon nanotubes. *Current Opinion in Chemical Engineering*. 2017, Vol. 16, 102-114.
- Jiang, D., Li, X., Jia, Q. Multilayer Cucurbit[6]uril-based magnetic nanoparticles prepared by host-guest interaction: Remarkable adsorbent for low density lipoprotein removal from plasma. *Chemistry Europe Journal*. 2018, 24, 2242-2248.
- Jiang, D., Li, Z., Jia, Q. A sensitive and selective phosphopeptide enrichment strategy by combining polyoxometalates and cysteamine hydrochloride-modified chitosan through layer-by-layer assembly. *Analytica Chimica Acta*. 2019, Vol. 1066, 58-68.
- Joseph, N., Ahmadiannamini, P., Hoogenboom, R., Vankelecom, I.F.J. Layer-by-layer preparation of polyelectrolyte multilayer membranes for separation. *Polymer Chemistry*. 2014, Vol. 5, 1817-1831.
- Karami, M., Yamini, Y. On-disc electromembrane extraction-dispersive liquid-liquid microextraction: A fast and effective method for extraction and determination of ionic target analytes from complex biofluids by GC/MS. *Analytica Chimica Acta*. 2020, Vol. 1105, 95-104.
- Kouadri, A., Satha, H. Extraction and characterization of cellulose and cellulose nanofibers from *Citrullus colocynthis* seeds. *Industrial Crops & Products*. 2018, Vol. 124, 787-796.
- Lachâtre, F., Marquet, P., Ragot, S., Gaulier, J.M., Cardot, P., Dupuy, J.L. Simultaneous determination of four anthracyclines and three metabolites in human serum by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 2000, Vol. 738, 281-291.

- Laube, N., Mohr, B., Hesse, A. Laser-probe-based investigation of the evolution of particle size distributions of calcium oxalate particles formed in artificial urines. *Journal of Crystal Growth*. 2001, Vol. 233, 367-374.
- Lin, P-C., Lin, H-J., Liao, Y-Y., Guo, H-R., Chen, K-T. Acute Poisoning with Neonicotinoid Insecticides: A Case Report and Literature Review. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 2013, Vol. 112, 282-286.
- Lindenburg, P.W., Seitzinger, R., Tempels, F.W.A., Tjaden, U.R., van der Greef, J., Hankemeier, T. Online capillary liquid-liquid electroextraction of peptides as fast pre-preconcentration. *Electrophoresis*. 2010, Vol. 31, 3903-3912.
- Lindenburg, P.W., Tempels, F.W.A., Tjaden, U.R., Van der Greef, J., Hankemeier, T. On-line large-volume electroextraction coupled to liquid chromatography-mass spectrometry to improve detection of peptides. *Journal of Chromatography A*. 2012a, Vol. 1249, 17-24.
- Lindenburg, P.W., Tjaden, U.R., Van der Greef, J., Hankemeier, T. Feasibility of electroextraction as versatile sample preconcentration for fast and sensitive analysis of urine metabolites, demonstrated on acylcarnitines. *Electrophoresis*. 2012b, Vol. 33, 2987-2995.
- Liu, L., Son, M., Park, H., Celik, E., Bhattacharjee, C., Choi, H. Efficacy of CNT-bound polyelectrolyte membrane by spray-assisted layer-by-layer (LbL) technique on water purification. *RSC Advances*. 2014, Vol. 4, 32858-32865.
- Liu, Y., Zhang, X., Guo, L., Zhang, Y., Li, Z., Wang, Z., Huang, M., Yang, C., Ye, J., Chu, Q. Electromembrane extraction of salivary polyamines followed by capillary zone electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection. *Talanta*. 2014, Vol. 128, 386-392.
- Lødøen, C.P., Eibak, L.E.E., Rasmussen, K.E., Pedersen-Bjergaard, S., Andersen, T., Gjelstad, A. Storage of oral fluid as dried spots on alginate and chitosan foam - a new concept for oral fluid collection. *Bioanalysis*. 2013, Vol. 5(3), 317-325.

- Luo, S., Li, X., Chen, L., Chen, J., Wan, Y., Liu, C. Layer-by-layer strategy for adsorption capacity fattening of endophytic bacterial biomass for highly effective removal of heavy metals. *Chemical Engineering Journal*. 2014, Vol. 239, 312-321.
- Lv, Y-K., He, Y-D., Xiong, X., Wang, J-Z., Wang, H-Y., Han, Y-M. Layer-by-layer fabrication of restricted access media-molecularly imprinted magnetic microspheres for magnetic dispersion microextraction of bisphenol A from milk samples. *New Journal of Chemistry*. 2015, Vol. 39(3), 1792-1799.
- Majors, R.E. Electrical potential as a driving force in sample preparation. *LCGC North America*. 2014, Vol. 27, 3742-3745.
- Malaca, S., Busardò, F.P., Gottardi, M., Pichini, S., Marchei, Emilia. Dilute and shoot ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) analysis of psychoactive drugs in oral fluid. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2019, Vol. 170, 63-67.
- Maliszewska, O., Plenis, A., Olędzka, I., Kowalski, P., Miękus, N., Bień, E., Krawczyk, M.A., Adamkiewicz-Drożynska, E., Bączek, T. Optimization of LC method for the quantification of doxorubicin in plasma and urine samples in view of pharmacokinetic, biomedical and drug monitoring therapy studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2018, Vol. 158, 376-385.
- Maoz, R., Netzer, L., Gun, J., Sagiv, J. Self-Assembling monolayers in the construction of planned supramolecular structures and as modifiers of surface properties. *Journal de Chimie Physique*. 1988, Vol. 85, 1059-1065.
- Maudens, K.E., Stove, C.P., Cocquyt, V.F.J., Denys, H., Lambert, W.E. Development and validation of a liquid chromatographic method for the simultaneous determination of four anthracyclines and their respective 13-S-dihydro metabolites in plasma and saliva. *Journal of Chromatography B*. 2009, Vol. 877, 3907-3915.
- Maudens, K.E., Stove, C.P., Lambert, W.E. Quantitative liquid chromatographic analysis of anthracyclines in biological fluids. *Journal of Chromatography B*. 2011, Vol. 879, 2471-2486.

- Mazzucchelli, S., Ravelli, A., Gigli, F., Minoli, M., Corsi, F., Ciuffreda, P., Ottria, R. LC-MS/MS method development for quantification of doxorubicin and its metabolite 13-hydroxy doxorubicin in mice biological matrices: Application to a pharmaco-delivery study. *Biomedical Chromatography*. 2017, Vol. 31(4), 1-10.
- Millan-Santiago, J., García-Valverde, M.T., Lucena, R., Cardenas, S. Polyamide-coated wooden tips coupled to direct infusion mass spectrometry, a high throughput alternative for the determination of methadone, cocaine and methamphetamine in oral fluid. *Microchemical Journal*. 2021, Vol. 162, 105843.
- Moreira, J.S. Determinação de cocaína e lidocaína em saliva empregando preparo de amostra assistido por campo elétrico associado à cromatografia líquida-espectrometria de massas sequencial. *Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte*. 2018.
- Nazario, C., Fumes, B., da Silva, M.R., Lanças, F.M. New materials for sample preparation techniques in bioanalysis. *Journal of Chromatography B*. 2017, Vol. 1043, 81-95.
- Niu, Z., Zhang, W., Yu, C., Zhang J., Wen, Y. Recent advances in biological sample preparation methods coupled with chromatography, spectrometry and electrochemistry analysis techniques. *Trends in Analytical Chemistry*. 2018, Vol. 102, 123-146.
- Niu, H., Wang, S., Zeng, T., Wang, Y., Zhang, X., Meng, Z., Cai, Y. Preparation and characterization of layer-by-layer assembly of thiols/Ag nanoparticles/polydopamine on PET bottles for the enrichment of organic pollutants from water samples. *Journal of Materials Chemistry*. 2012, Vol. 22, 15644-15653.
- Nojavan, S., Shaghghi, H., Rahmani, T., Shokri, A., Nasiri-Aghdam, M. Combination of electromembrane extraction and electro-assisted liquid-liquid microextraction: A tandem sample preparation method. *Journal of Chromatography A*. 2018, Vol. 1563, 20-27.

- Oedit, A., Duivelshof, B., Lindenburg, P.W., Hankemeier, T. Integration of three-phase microelectroextraction sample preparation into capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. 2020, Vol.1610, 460570.
- Oedit, A., Hankemeier, P.W., Lindenburg, T. On-line coupling of two-phase microelectroextraction to capillary electrophoresis - Mass spectrometry for metabolomics analyses. *Microchemical Journal*. 2021, Vol. 162, 105741.
- Orlando, R.M., Nascentes, C.C., Botelho, B.G., Moreira, J.S., Costa, K.A., Boratto, V.H.M. *Analytical Chemistry*. 2019, Vol. 91, 6471-6478.
- Pacheco-Fernandez, I., Allgaier-Díaz, D.W., Mastellone, G., Cagliero, C., Díaz, D.D., Pino, V. Biopolymers in sorbent-based microextraction methods. *Trends in Analytical Chemistry*. 2020, Vol. 125, 115839.
- Pashaei, Y., Mehrabi, M., Shekarchi, M. A review on various analytical methods for determination of anthracyclines and their metabolites as anti-cancer chemotherapy drugs in different matrices over the last four decades. *Trends in Analytical Chemistry*. 2020, Vol. 130, 115991.
- Passos, M.L.C., Saraiva, M.L.M.F.S. Detection in UV-visible spectrophotometry: Detectors, detection systems, and detection strategies. *Measurement*. 2019, Vol. 135, 896-904.
- Picó, Y. Ultrasound-assisted extraction for food and environmental samples. *Trends in Analytical Chemistry*. 2013, Vol. 43, 84-99.
- Pedersen-Bjergaard, S., Huang, C., Gjelstad, A. Electromembrane extraction-Recent trends and where to go. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2017, Vol. 7, 141-147.
- Pedersen-Bjergaard, S. Electromembrane extraction-looking into the future. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2019, Vol. 411, 1687-1693.
- Pedersen-Bjergaard, S., Rasmussen, K.E. Electrokinetic migration across artificial liquid membranes. New concept for rapid sample preparation of biological fluids. *Journal of Chromatography A*. 2006, Vol. 1109, 183-190.

- Petersen, N.J., Foss, S.T., Jensen, H., Hansen, S.H., Skonberg, C., Snakenborg, D., Kutter, J.P., Pedersen-Bjergaard, S. On-Chip electro membrane extraction with online ultraviolet and mass spectrometric detection. *Analytical Chemistry*. 2011, Vol. 83, 44-51.
- Petersen, N.J., Pedersen, J.S., Poulsen, N.N., Jensen, H., Skonberg, C., Hansen, S.H., Pedersen-Bjergaard, S. On-chip electromembrane extraction for monitoring drug metabolism in real time by electrospray ionization mass spectrometry. *Analyst*. 2012, Vol. 137, 3321-3327.
- Piskackova, H.B., Øiestad, E.L., Vanova, N., Lengvarska, J., Sterbova-Kovaríkova, P., Pedersen-Bjergaard, S. Electromembrane extraction of anthracyclines from plasma: Comparison with conventional extraction techniques. *Talanta*. 2021, Vol. 223, 121748.
- Rahimi, A., Nojavan S., Maghsoudi, M. Analysis of basic drugs in biological samples using dynamic single-interface hollow fiber liquid-phase microextraction combined with fast electromembrane extraction. *Microchemical Journal*. 2020, Vol. 157, 105001.
- Rahimi, A., Nojavan, S., Tabani, H. Inside gel electromembrane extraction: A novel green methodology for the extraction of morphine and codeine from human biological fluids. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2020, Vol. 184, 113175.
- Raterink, R.J., Lindenburg, P.W., Vreeken, R.J., Hankemeier, T. Three-phase electroextraction: a new (online) sample purification and enrichment method for bioanalysis. *Analytical Chemistry*. 2013, Vol. 85, 7762-7768.
- Richardson, J.J., Björnmalm, M., Caruso, F. Technology-driven layer-by-layer assembly of nanofilms. *Science*. 2015, Vol. 348, 411-424.
- Richardson, J.J., Cui, J., Björnmalm, M., Braunger, J.A., Ejima, H., Caruso, F. Innovation in layer-by-layer assembly. *Chemical Reviews*. 2016, Vol. 116, 14828-14867.

- Saar-Reisma, P., Brill, C-A., Leiman, K., Kaljurand, M., Vaher, M., Kulp, M., Mazina-Šinkar, J. Use of a newly-developed portable capillary electrophoresis analyser to detect drugs of abuse in oral fluid: A case study. *Talanta*. 2020, Vol. 211, 120662.
- Saifuddin, N., Raziah, A.Z., Junizah, A.R. Carbon nanotubes: A review on structure and their interaction with proteins. *Journal of Chemistry*. 2012. Vol. 2013, 1-18.
- Samanidou, V.F., Karageorgou, E.G. Carbon nanotubes in sample preparation. *Current Organic Chemistry*. 2012, Vol. 16, 1645-1669.
- Schepens, E., Inman, S., McCullough, B.J., Hopley, Chris. Rapid confirmation and quantitation of drugs-of-abuse in oral fluid using a low cost, small footprint mass spectrometer. *Forensic Chemistry*. 2017, Vol. 4, 75-81.
- Scherer, J.N., Schuch, J.B., Rabelo-da-Ponte, F.D., Silvestrin, R., Ornella, R., Sousa, T., Limberger, R.P., Pechansky, F. Analytical reliability of four oral fluid point-of-collection testing devices for drug detection in drivers. *Forensic Science International*. 2020, Vol. 315, 110434.
- Schoonen, J-W., Duinen, V.V., Oedit, A., Vulto, P., Hankemeier, T., P.W. Lindenburg. *Analytical Chemistry*. 2014, Vol. 86, 8048-8056.
- Schoonen, J-W., Van Duinen, V., Oedit, A., Vulto, P., Hankemeier, T., Lindenburg, P.W. Continuous-flow micro-electroextraction for enrichment of low abundant compounds. *Analytical Chemistry*. 2014, Vol. 86, 8048-8056.
- See, H.H., Ali, N.A. Electrophoresis: Principles of Capillary Electrophoresis. *Encyclopedia of Analytical Science*, 3^a Ed. 2019, 328-333.
- Seidi, S., Yamini, Y., Rezazadeh, M. Electrically enhanced microextraction for highly selective transport of three-blocker drugs. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2011, Vol. 56, 859-866.
- Seidi, S., Yamini, Y., Rezazadeh, M., Esrafil, A. Low-voltage electrically-enhanced microextraction as a novel technique for simultaneous extraction of acidic and basic drugs from biological fluids. *Journal of Chromatography A*. 2012, Vol. 1243, 6-13.

- Seidi, S., Yamini, Y., Saleh, A., Moradi, M. Electromembrane extraction of levamisole from human biological fluids. *Journal of Separation Science*. 2011, Vol. 34, 585-593.
- Seip, K.F., Gjelstad, A., Pedersen-Bjergaard, S. The potential of electromembrane extraction for bioanalytical applications. *Bioanalysis*. 2015, Vol. 7(4), 463-480.
- Shiratori, S.S., Rubner, M.F. pH-Dependent thickness behavior of sequentially adsorbed layers of weak polyelectrolytes. *Macromolecules*. 2000, Vol. 33, 4213-4219.
- Skoog, D.A., West, Donald, M.W., Holler, F.J.; R, Crouch S. Fundamentos de química analítica. 9^a Ed., São Paulo: Cengage Learning. 2018, 1088p.
- Slampova, A., Kuban, P. Two-phase micro-electromembrane extraction across free liquid membrane for determination of acidic drugs in complex samples. *Analytica Chimica Acta*. 2019, Vol. 1048, 58-65.
- Smallwood, I.M. Handbook of organic solvent properties. Butterworth-Heinemann. 1996, 326 p.
- Soriano, M.L., Carrillo-Carrion, C., Ruiz-Palomero. C., Valcárcel, M. Cyclodextrin-modified nanodiamond for the sensitive fluorometric determination of doxorubicin in urine based on its differential affinity towards β/γ -cyclodextrins. *Microchimica Acta*. 2018, Vol. 185(2), 1-8.
- Sorribes-Soriano, A., Valencia, A., Esteve-Turrillas, F.A., Armenta, S., Herrero-Martínez, J.M. Development of pipette tip-based poly(methacrylic acid-co-ethylene glycoldimethacrylate) monolith for the extraction of drugs of abuse from oral fluid samples. *Talanta*. 2019, Vol. 205, 120158.
- Sorribes-Soriano, A., Herrero-Martínez, J.M., Esteve-Turrillas, F.A., Armenta, S. *Journal of Chromatography A*. 2020, Vol. 1633, 461629.
- Souza, D.R.S., Caminhas, L.D., Mesquita, J.P., Pereira, F.V. Luminescent carbon dots obtained from cellulose. *Materials Chemistry and Physics*. 2018, Vol. 203, 148-155.
- Souza, S.V.C., Junqueira, R.G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. *Analytica Chimica Acta*. 2005, Vol. 552, 25-35.

- Stichlmair, J., Schmidt, J., Proplesch, R. Electroextraction: a novel separation technique. *Chemical Engineering Science*. 1992, Vol. 47, 3015-3022.
- Stratigou, I-C., Tsiasioti, A., Tzanavaras, P.D., Markopoulou, C.K., Fytianos, K., Zacharisa, C.K. Homogeneous liquid liquid extraction using salt as mass separating agent for the ultra-high pressure liquid chromatographic determination of doxorubicin in human urine. *Microchemical Journal*. 2020, Vol. 158, 105260.
- Tamama, K. Advances in drugs of abuse testing. *Clinica Chimica Acta*. 2021, Vol. 514, 40-47.
- Tan, T.Y., Basheer, C., Ang, M.J.Y., Lee, H.K. Electroenhanced solid-phase microextraction of methamphetamine with commercial fibers. *Journal of Chromatography A*. 2013, Vol. 1297, 12-16.
- Tang, S., Zhang, H. Lee, H.K. Advances in sample extraction. *Analytical Chemistry*. 2016, Vol. 88, 228-249.
- Teófilo, R.F., Ferreira, M.M.C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. *Química Nova*. 2006, Vol. 29, 338-350.
- UNODC (United Nations Office on Drugs and Crime). Guidelines for testing drugs under International control in hair, sweat and oral fluid, laboratory and scientific section. Vienna: s.n., 2014.
- Vajdle, O., Zbiljić, J., Tasić, B., Jović, D., Guzsvány, V., Djordjevic, A. Voltammetric behavior of doxorubicin at a renewable silver-amalgam film electrode and its determination in human urine. *Electrochimica Acta*. 2014, Vol. 132, 49-57.
- Vardal, L., Øiestad, E.L., Gjelstad, A., Pedersen-Bjergaard, S. Electromembrane extraction of substances with weakly basic properties: a fundamental study with benzodiazepines. *Bioanalysis*. 2019, Vol. 10(10), 769-781.
- Vardal, L., Øiestad, E.L., Gjelstad, A., Jensen, H., Pedersen-Bjergaard, S. Electromembrane extraction of substances with weakly basic properties: a fundamental study with benzodiazepines. *Bioanalysis*. 2019, Vol.11(8), 755-771.

- Varsha, M., Kumar, P.S., Rathi, B.S. A review on recent trends in the removal of emerging contaminants from aquatic environment using low-cost adsorbents. *Chemosphere*. 2022, Vol. 287, 132270.
- Vessecchi, R., Lopes, N.P., Gozzo, F.C., Dörr, F.A., Murgu, M., Lebre, D.T., Abreu, R., Bustillos, O.V., Riveros, J.M. Nomenclaturas de espectrometria de massas em língua portuguesa. *Química Nova*. 2011, Vol. 34, 1875-1887.
- Xiao-bo, L., Xiao-ying, J. Electrostatic layer-by-layer assembled multilayer films of chitosan and carbon nanotubes. *New Carbon Materials*. 2010, Vol. 25(3), 237-240.
- Xie, Y., Shao, N., Jin, Y., Zhang, L., Jiang, H., Xiong, N., Su, F., Xu, H. Determination of non-liposomal and liposomal doxorubicin in plasma by LC-MS/MS coupled with an effective solid phase extraction: In comparison with ultrafiltration technique and application to a pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography B*. 2018, Vol. 1072, 149-160.
- Xiong, Z., Qin, H., Wan, H., Huang, G., Zhang, Z., Dong, J., Zhang, L., Zhang, W., Zou, H. Layer-by-layer assembly of multilayer polysaccharide coated magnetic nanoparticles for the selective enrichment of glycopeptides. *Chemical Communication*. 2013, Vol. 49, 9284-9286.
- Xu, L., Qi, X., Li, X., Bai, Y., Liu, H. Recent advances in applications of nanomaterials for sample preparation. *Talanta*. 2016, Vol. 146, 714-726.
- Zhang, B-T., Zheng, X., Li, H-F., Lin, J-M. Application of carbon-based nanomaterials in sample preparation: A review. *Analytica Chimica Acta*. 2013, Vol. 784, 1-17.
- Zhang, S., Du, Z., Li, G. Layer-by-Layer fabrication of chemical-bonded graphene coating for solid-phase microextraction. *Analytical Chemistry*. 2011, Vol. 83, 7531-7541.
- Zhang, X., Xu, Y., Zhang, X., Wu, H., Shen, J., Chen, R., Xiong, Y., Li, J., Guo, S. Progress on the layer-by-layer assembly of multilayered polymer composites: Strategy, structural control and applications. *Progress in Polymer Science*. 2019, Vol. 89, 76-107.

- Zheng, L., Su, X., Lai, X., Chen, W., Li, H., Zeng, X. Conductive superhydrophobic cotton fabrics via layer-by-layer assembly of carbon nanotubes for oil-water separation and human motion detection. *Materials Letters*. 2019, Vol. 253, 230-233.
- Yamini, Y., Seidi, S., Rezazadeh, M. Electrical field-induced extraction and separation techniques: Promising trends in analytical chemistry - A review. *Analytica Chimica Acta*. 2014, Vol. 814, 1-22.
- Yeter, O., Aydın, A. Determination of acetamiprid and IM-1-2 in postmortem human blood, liver, stomach contents by HPLC-DAD. *Journal Forensic Science*. 2014, Vol. 59(1), 287-292.
- Wang, Z., Yao, Zh., Zhou, Ji., He, M., Jiang, Q., Li, S., Ma, Y., Liu, M., Luo, S. Isolation and characterization of cellulose nanocrystals from pueraria root residue. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019, Vol. 129, 1081-1089.
- Wu, J-H., He, C-Y. Advances in cellulose-based sorbents for extraction of pollutants in environmental samples. *Chromatographia*. 2019, Vol. 82, 1151-1169.
- Wuethrich, A., Haddad, P.R., Quirino, J.P. The electric field - an emerging driver in sample preparation. *Trends in Analytical Chemistry*. 2016, Vol. 80, 604-611.

APÊNDICE

Tabela A1. Matriz Doehlert com os valores reais e respectivos valores codificados (níveis) para a avaliação do potencial elétrico e do tempo aplicados na MPEE de cocaína e determinação por UHPLC-MS/MS

Experimento	Níveis		Fatores	
	X ₁	X ₂	Potencial elétrico (V; X ₁)	Tempo (min; X ₂)
1	-0,5	-0,87	100	5
2	0,5	-0,87	300	5
3	1	0	400	20
4	0,5	0,86	300	35
5	-0,5	0,86	100	35
6	-1	0	0	20
7	0	0	200	20
8	0	0	200	20
9	0	0	200	20

Tabela A2. Matriz Doehlert com os valores reais e respectivos valores codificados (níveis) para a avaliação do potencial elétrico e do tempo aplicados na MPEE de doxorubicina e determinação por UHPLC-PDA

Experimento	Níveis		Fatores	
	X ₁	X ₂	Potencial elétrico (V; X ₁)	Tempo (min; X ₂)
1	1	0	300	20
2	0.5	0.866	238	35
3	-1	0	50	20
4	-0.5	-0.866	113	5
5	0.5	-0.866	238	5
6	-0.5	0.866	113	35
7	0	0	175	20
8	0	0	175	20
9	0	0	175	20

Tabela A3. Configuração do planejamento de misturas Centróide-Simplex de 3 componentes utilizado na avaliação da solução de dessorção para a doxorubicina

Experimento	Níveis		
	Água	Metanol	ACN
1	1	0	0
2	0	1	0
3	0	0	1
4	0,50	0,50	0
5	0,50	0	0,50
6	0	0,50	0,50
7	0,33	0,33	0,33
8	0,33	0,33	0,33
9	0,33	0,33	0,33

Tabela A4. Matriz Doehlert com os valores reais e respectivos valores codificados (níveis) para a avaliação do potencial elétrico e do tempo aplicados na MPEE de doxorrubicina e determinação por DIA

Experimento	Níveis		Fatores	
	X ₁	X ₂	Potencial elétrico (V; X ₁)	Tempo (min; X ₂)
1	1	0	300	11
2	0.5	0.866	238	20
3	-1	0	50	11
4	-0.5	-0.866	113	2
5	0.5	-0.866	238	2
6	-0.5	0.866	113	20
7	0	0	175	11
8	0	0	175	11
9	0	0	175	11