

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Exatas

Departamento de Química

Juliane Soares Moreira

**DETERMINAÇÃO DE COCAÍNA E LIDOCAÍNA EM SALIVA
EMPREGANDO PREPARO DE AMOSTRA ASSISTIDO POR CAMPO
ELÉTRICO ASSOCIADO À CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA-
ESPECTROMETRIA DE MASSAS SEQUENCIAL**

Belo Horizonte

2018

UFMG/ ICEX/ DQ. 1256^a

D. 688^a

Juliane Soares Moreira

Dissertação 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 Mestre em Química – Química Analítica.

Belo Horizonte
2018

M838d Moreira, Juliane Soares
2018 D Determinação de cocaína e lidocaína em saliva
empregando preparo de amostras assistido por campo
elétrico associado à cromatografia líquida-
espectrometria de massas sequencial [manuscrito] /
Juliane Soares Moreira. 2018.
[xiii], 84 f. : il.

Orientador: Ricardo Mathias Orlando.
Coorientadora: Clésia Cristina Nascentes.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Minas Gerais - Departamento de Química.
Inclui bibliografia.

1. Química analítica - Teses 2. Preparação de
amostra (Química) - Teses 3. Cromatografia líquida de
alta eficiência - Teses 4. Drogas - Abuso - Teses 5.
Saliva - Fluidos e humores no organismo - Teses 6.
Extração (Química) - Teses 7. Espectrometria de massa
- Teses I. Orlando, Ricardo Mathias, Orientador II.
Nascentes, Clésia Cristina, Coorientadora III. Título.

CDU 043

"Determinação de Cocaína e Lidocaína em Saliva Empregando Preparo de Amostras Assistido por Campo Elétrico Associado à Cromatografia Líquida-Espectrometria de Massas Sequencial".

Juliane Soares Moreira

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Ricardo Mathias Orlando
Prof. Ricardo Mathias Orlando - Orientador
UFMG

Clésia Cristina Nascentes
Profª. Clésia Cristina Nascentes - Coorientadora
UFMG

Brenda Lee Simas Porto
Profª. Brenda Lee Simas Porto
UFMG

Bruno G. Botelho
Prof. Bruno Gonçalves Botelho
UFMG

Belo Horizonte, 16 de fevereiro de 2018.

“Dificuldades preparam pessoas comuns para destinos extraordinários.”

C.S. Lewis

AGRADECIMENTOS

A Deus que me guia e me permitiu chegar até aqui;

Ao meu pai, Dorival, por sempre me apoiar e incentivar à lutar pelos meus objetivos. À minha mãe, Liderci, pela paciência, atenção e carinho incondicional;

Aos meus irmãos, primos e toda minha família pela torcida;

Ao professor Dr. Ricardo Mathias Orlando pela orientação, ensinamentos e incentivos;

À professora Dra. Clesia Cristina Nascentes pela coorientação e parceria neste trabalho;

Aos amigos Luiz, Victoria, Odilon, Hebert, Julia e Denise pelos momentos de descontração que fizeram essa caminhada ser mais leve;

Aos todos colegas do LAMS pela boa convivência;

À Débora, Carol, Natália, CallAnny e Franciele pela amizade em todos os momentos;

Às meninas da república, Vivian, Junielly e Rayane, pelos bons momentos compartilhados;

Ao professor Dr. Ruben por ceder o uso do equipamento de UPLC-MS-MS (projeto FAPEMIG CEX – APQ-00586-12), CNPq Nanobiotecnologia e rede INCT-Nanobiofar;

À professora Dra. Susanne Rath por disponibilizar o uso do equipamento e ao Caio pela colaboração. Projeto FAPESP, grant #2013/09543-7;

Ao laboratório de bioquímica da Faculdade de Farmácia por disponibilizar o equipamento;

À CAPES pelo auxílio financeiro;

Ao CNPQ e FAPEMIG pelo apoio financeiro a pesquisa;

A todos que fizeram parte de maneira direta ou indireta desta jornada;

Meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

O consumo de drogas é um problema mundial e de saúde pública no Brasil e entre as drogas consumidas a cocaína se destaca pela sua ampla distribuição, utilização e fácil obtenção. Com ela geralmente são encontrados diversos adulterantes para aumentar o volume e diminuir os custos, sendo um deles o fármaco lidocaína. Para atestar o consumo das drogas é preciso determiná-la em algum fluido biológico ou tecido e, portanto, é necessário o desenvolvimento de métodos analíticos cada vez mais sensíveis. Dessa forma, o preparo de amostras se torna uma etapa indispensável para reduzir os interferentes e pré-concentrar os analitos. Neste trabalho foi desenvolvida uma técnica de preparo de amostra inovadora que consiste em uma extração trifásica (líquido-líquido-líquido suportado em sólido) assistida por campos elétricos para extrair cocaína e lidocaína em saliva artificial com posterior determinação por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial. Para a realização de múltiplas extrações simultâneas foi confeccionado um dispositivo simples, barato e eficiente com multipoços que permite a extração de 66 amostras de forma prática e reproduzível. Primeiramente, foram realizados ensaios para uma otimização univariada dos parâmetros de extração, tais como, tipo de solução da fase aceptora, pH da amostra e da fase aceptora e porcentagem de solvente miscível em água adicionado ao filtro orgânico. As melhores condições para esses parâmetros foram solução de ácido acético 400 mmol L⁻¹ no pH 3,0 como fase aceptora e filtro orgânico constituído de 1-octanol:metanol (90:10) v/v. Em seguida foi realizado um planejamento experimental do tipo Doehlert para traçar um superfície de reposta em termos de desejabilidade dos parâmetros de extração potencial elétrico e tempo de extração, onde foram obtidos os valores ótimos de 300 V e 30 min para a extração simultânea de cocaína e lidocaína.

Palavras-chave: eletroextração, LC-MS-MS, drogas, fluidos biológicos, dispositivo multipoços.

ABSTRACT

Drug use is a worldwide problem and public health in Brazil. Among the drugs consumed cocaine stands out for its wide distribution, use and easy to obtain. Usually several adulterants are found with cocaine to increase the volume and to reduce the costs and one of them is the drug lidocaine. In order to attest to the consumption of drugs, it is necessary to determine it in some biological fluid or tissue and therefore, the development of increasingly sensitive analytical methods is necessary. In this way, the sample preparation becomes an indispensable step to reduce the interferences and to preconcentrate the analytes. In this work, a sample preparation technique was developed that consists of a three-phase extraction (liquid-liquid-liquid supported solid) assisted by electric fields to determine cocaine and lidocaine in artificial saliva with subsequent determination by liquid chromatography coupled to sequential mass spectrometry. In order to carry out multiple simultaneous extractions, a simple, inexpensive and efficient device with multi-wells was created, which allows the extraction of 66 samples in a practical and reproducible way. Firstly, a univariate optimization was performed for the extraction parameters as the acceptor phase, the pH of the sample and the acceptor phase, and the percentage of the water miscible solvent added to the organic filter. The best conditions for these parameters were 400 mmol L⁻¹ acetic acid solution at pH 3.0 as the acceptor phase and organic filter consisting of 1-octanol: methanol (90:10) v / v. Then, a Doehlert-type experimental design was performed to draw a response surface in terms of desirability, of the parameters of extraction electric potential and extraction time, where the values of 300 V and 30 min were obtained.

Keywords: electroextraction, LC-MS-MS, drugs, biological fluids, multiwell plate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura da cocaína.....	3
Figura 2. Estrutura da lidocaína.....	4
Figura 3. Ilustração esquemática de uma eletroextração de três fases. <i>Fonte adaptada de Raterink, 2013</i>	10
Figura 4. Poço raso tradicional (esquerda) e poço profundo (direita), eles se diferem em altura e volume dos poços. Desenvolvido pela Cookie Laboratories (EUA) em 1965. <i>Fonte adaptada por Wells, 2003</i>	13
Figura 5. Materiais utilizados para a construção do dispositivo multipoços de eletroextração multifásico empregando cones de papel. (A) proteção contra descargas elétricas constituída de uma caixa plástica de polipropileno; (B) conjunto superior: placa suporte dos cones constituída de metal inerte condutor (aço inoxidável) com perfuração para encaixe dos cones; (C) placa plástica niveladora; (D) barras roscadas; (E) arruelas; (F) porcas; (G) parafusos de metal inerte (aço inoxidável); (H) suporte de amostras; (I) folha ou placa de metal inerte (aço inoxidável); (J) microtubos de polipropileno com capacidade de 2 mL; (K) placa da base (madeira); (L) conectores tipo banana macho e fêmea com cabos.....	15
Figura 6. Microtubo de polipropileno modificado com eletrodo para as extração multifases com aplicação de campos elétricos. (A) parafuso de aço inoxidável (B) selagem com cola vinílica.....	17
Figura 7. Cone odontológico de papel da marca Dentsply e número 50 usada como suporte para a fase acceptora.....	17
Figura 8. (A) Dispositivo multipoços para eletroextração multifases com cones de papel posicionados sobre a placa suporte; (B) dispositivo multipoços dentro da proteção contra descargas elétricas....	18
Figura 9. Sistema de eletroextração completo mostrando o dispositivo multipoços (A) conectado ao multímetro (B), a fonte de eletroforese (C) e ao computador (D) para aplicação do campo elétrico com potencial elétrico ajustado, no modo corrente elétrica contínua.....	19
Figura 10. Representação de um sistema de extração de múltiplas fases com aplicação de campo elétrico desenvolvido por Orlando e colaboradores. <i>Fonte: retirada da patente BR 1020170054713</i>	20
Figura 11. Resultados para a extração das amostras aquosas contendo o corante catiônico violeta genciana com (A) e sem (B) a influência de campos elétricos Condições empregadas para a extração: 300 V (polaridade negativa sobre o cone e positiva sobre a amostra); duração 10 min; amostra aquosa contendo 2 mg L ⁻¹ de violeta genciana em uma solução de acetonitrila e tampão TRIS no pH 7 na proporção de 1:1 (v/v); fase orgânica constituída de 1 mL de 1-octanol; fase acceptora aquosa constituída de 200 mmol L ⁻¹ de ácido acético; cone odontológico de celulose número 50.....	21

Figure 12. Gráfico do perfil da corrente elétrica em função do tempo de aplicação do potencial elétrico durante as extrações simultâneas das amostras contendo o corante catiônico violeta genciana. Condições durante a aplicação do potencial elétrico: solução de 2 mg L⁻¹ de violeta genciana em tampão TRIS no pH 7 (fase doadora); filtro orgânico 1-octanol; fase acceptora ácido acético 200 mmol L⁻¹, potencial elétrico de 300 V e polaridade do eletrodo superior negativa e do inferior positiva... 22

Figura13. Gráfico do perfil da corrente elétrica em função do tempo de aplicação do campo elétrico em diferentes soluções de eletrólitos da fase doadora. Condições durante a aplicação do campo elétrico: soluções de eletrólito (fase doadora) 100 mmol L⁻¹; filtro orgânico 1-octanol; fase acceptora ácido acético 100 mmol L⁻¹ e potencial elétrico de 300 V (eletrodo superior negativo e inferior positivo). Borato = borato de sódio; acetato = ácido acético, citrato = ácido cítrico, fosfato = fosfato de sódio bibásico e tris = tris(hidroximetil)aminometano. Os gráficos estão apresentados em duas escalas para melhor visualização. O gráfico está apresentado em duas escalas para melhor visualização. 37

Figura 14. Sistema representativo das resistências elétrica total R_{total} referentes a soma das resistências individuais das fases doadora (R_1), filtro orgânico (R_2) e a fase acceptora (R_3). 38

Figura 15. Gráfico do perfil da corrente elétrica em função do tempo de aplicação do potencial elétrico. Condições durante a aplicação do potencial elétrico: solução de eletrólito TRIS (fase doadora) 100 mmol L⁻¹; filtro orgânico 1-octanol; fase acceptora ácido acético 100 mmol L⁻¹, potencial elétrico de 300 V e polaridade do eletrodo superior negativa e do inferior positiva. (-) 10 min, (-) 35 min, (-) 60 min. O gráfico está apresentado em duas escalas para melhor visualização. 39

Figura 16.A) Gráfico do perfil da corrente elétrica em função do tempo de aplicação do campo elétrico empregando diferentes porcentagem de metanol na fase doadora. Condições durante a aplicação do campo elétrico: solução de eletrólito tris (fase doadora) 100 mmol L⁻¹ contendo 0, 15 e 30% (v/v) de metanol; filtro orgânico 1-octanol; fase acceptora ácido acético 100 mmol L⁻¹ e. B) Condições durante a aplicação do campo elétrico: solução de eletrólito tris 100 mmol L⁻¹; filtro orgânico 1-octanol; fase acceptora ácido acético 100 mmol L⁻¹ com 0, 5 e 10% (v/v) de metanol. Para ambas as condições potencial elétrico de 300 V com polaridade do eletrodo superior negativa e do inferior positiva. MeOH = metanol. Os gráficos estão apresentados em duas escalas para melhor visualização. 41

Figura 17. Gráfico do perfil da corrente elétrica em função do tempo de aplicação do campo elétrico empregando diferentes porcentagens de metanol no filtro orgânico. Condições durante a aplicação do campo elétrico: solução de eletrólito tris (fase doadora) 100 mmol L⁻¹; filtro orgânico 1-octanol

contendo 0, 5 e 10% (v/v) de metanol; fase aceptora ácido acético 100 mmol L ⁻¹ , potencial elétrico de 300 V e polaridade do eletrodo superior negativa e do inferior positiva.....	42
Figura 18. Gráfico do perfil da corrente elétrica em função do tempo de aplicação do campo elétrico empregando diferentes composições de filtro orgânico. Condições durante a aplicação do campo elétrico: solução de eletrólito tris (fase doadora) 100 mmol L ⁻¹ ; filtro orgânico (-) hexano (-) tolueno (-) acetato de etila (-) 1-octanol; fase aceptora ácido acético 100 mmol L ⁻¹ , potencial elétrico de 300 V e eletrodo superior negativo e inferior positivo.	43
Figura 20. Gráfico da reprodutibilidade da corrente elétrica gerada pela aplicação de um potencial elétrico de 300 V durante 10 minutos. Condições durante a aplicação do potencial elétrico: solução de eletrólito TRIS (fase doadora) 100 mmol L ⁻¹ ; filtro orgânico 1-octanol; fase aceptora ácido acético 100 mmol L ⁻¹ . Polaridade do eletrodo superior negativa e do inferior positiva. n = 6. Os gráficos estão apresentados em duas escalas para melhor visualização.	45
Figura 21. Estudo do efeito do tipo de eletrólito de solução aceptora sobre a capacidade de extração da cocaína e lidocaína em amostras de saliva artificial. Condições empregadas durante a aplicação do campo elétrico: 2 mg L ⁻¹ de lidocaína e cocaína em saliva artificial (fase doadora); 1-octanol (filtro orgânico); ácido acético, fosfato, borato e TRIS 200 mmol L ⁻¹ (fase aceptora); potencial elétrico de 300 V durante 20 minutos; eletrodo superior negativo e inferior positivo. Borato = tetraborato de sódio; acetato = ácido acético, fosfato = fosfato de sódio bibásico e TRIS = tris(hidroximetil)aminometano. Os valores de área foram normalizados a partir da maior área.	56
Figura 22. Estudo do efeito do pH da fase aceptora sobre a capacidade de extração da cocaína (A) e lidocaína (B) em amostras de saliva artificial. Condições empregadas durante a aplicação do campo elétrico: 2 mg L ⁻¹ lidocaína e cocaína em saliva artificial (fase doadora); 1-octanol (filtro orgânico); ácido acético 200 mmol L ⁻¹ nos diferentes pHs: 3, 5, 7 e 9 (fase aceptora); potencial elétrico de 300 V durante 20 minutos; eletrodo superior negativo e inferior positivo.....	57
Figura 23. Estudo do efeito da solução da concentração da fase aceptora sobre a capacidade de extração da cocaína (A) e lidocaína (B) em amostras de saliva artificial. Condições empregadas durante a aplicação do campo elétrico: 2 mg L ⁻¹ lidocaína e cocaína em saliva artificial (fase doadora); 1-octanol (filtro orgânico); ácido acético na concentrações de 50, 100, 200 e 400 mmol L ⁻¹ (fases aceptoras); potencial elétrico de 300 V durante 20 minutos; eletrodo superior negativo e inferior positivo.	59
Figura 24. Estudo do efeito da porcentagem de metanol no filtro orgânico sobre a capacidade de extração das da cocaína (A) e lidocaína (B) em amostras de saliva artificial. Condições empregadas durante a aplicação do campo elétrico: 2 mg L ⁻¹ lidocaína e cocaína em saliva artificial (fase doadora);	

1-octanol com 0 (zero), 5 e 10% v/v de metanol (filtros orgânicos); ácido acético 200 mmol L ⁻¹ (fase aceptora); potencial elétrico de 300 V durante 20 minutos; eletrodo superior negativo e inferior positivo.	60
Figura 25. Estudo do efeito de solução de dessorção sobre a dessorção da cocaína (A) e lidocaína (B) presentes no cone de papel. Condições empregadas durante a aplicação do campo elétrico: 2 mg L ⁻¹ lidocaína e cocaína em saliva artificial (fase doadora); 1-octanol (filtro orgânico); ácido acético 200 mmol L ⁻¹ (fase aceptora); potencial elétrico de 300 V durante 20 minutos; eletrodo superior negativo e inferior positivo. 1 = solução de ACN/ H ₂ O (2:8) v/v; 2 = solução de ACN/H ₂ O/ácido fórmico (2:0,1:7,9) v/v/v; 3 = solução de ACN/ acetato de amônio 25 mmol L ⁻¹ (2:8) v/v.	62
Figura 26. Gráfico de Pareto para COC para efeitos padronizados em p = 0,05. T = tempo; V = diferença de potencial elétrico; (L) = linear; (Q)= quadrático.	68
Figura 27. Superfície de resposta da desejabilidade para cocaína obtida no planejamento Doehlert para os parâmetros tempo e potencial elétrico.	70
Figura 28. Gráfico de Pareto para LID para efeitos padronizados em p = 0,05. T = tempo; V = diferença de potencial elétrico; (L) = linear; (Q)= quadrático.	71
Figura 29. Superfície de resposta da desejabilidade para LID obtida no planejamento Doehlert para os parâmetros tempo e potencial elétrico.	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Trabalhos descritos na literatura empregando diferentes técnicas analíticas e ou de preparo de amostras para amostras biológicas com interesse forense.....	7
Tabela 2. Condutividade dos eletrólitos κ em mS/cm para a concentração em massa percentual.....	28
Figura19. Gráfico do perfil da corrente elétrica em função do tempo de aplicação do campo elétrico em sistema estático (-), agitando no vortex (-) e agitando com barra magnética (-). Condições durante a aplicação do campo elétrico: solução de eletrólito tris (fase doadora) 100 mmol L ⁻¹ ; filtro orgânico 1-octanol; fase acceptora ácido acético 100 mmol L ⁻¹ , potencial elétrico de 300 V e polaridade do eletrodo superior negativa e do inferior positiva.....	44
Tabela 3. Planejamento experimental Doehlert com os valores originais e os valores codificados correspondentes.....	66
Tabela 4. Planejamento experimental Doehlert com os sinais analíticos para COC e LID .	67
Tabela 5. Análise da variância para os dados de COC apresentados na Tabela 3.....	69
Tabela 6. Análise da variância para os dados de LID apresentados na Tabela 3	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
ACN	Acetonitrila
CE	Eletroforese capilar (<i>Capillary Electrophoresis</i>)
COC	Cocaína
DLLME	Microextração líquido-líquido dispersiva (<i>Dispersive Liquid-Liquid Microextraction</i>)
EME	Extração com eletromembrana (<i>Electromembrane Extraction</i>)
EMI	Isolamento por membrana elétrica (<i>Electromembrane Isolation</i>)
ESI	Ionização por eletrospray (<i>Electro Spray Ionization</i>)
GC/MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (<i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i>)
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
LC	Cromatografia Líquida (<i>Liquid Chromatography</i>)
LC/MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (<i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i>)
LD	Limite de detecção
LID	Lidocaína
LLE	Extração líquido-líquido (<i>Liquid-liquid extraction</i>)
LLME	Microextração líquido-líquido (<i>Liquid-liquid Microextraction</i>)
LQ	Limite de quantificação
Pa-EME	Eletroextração em membrana em paralelo (<i>Parallel Electromembrane Extraction</i>)
PLE	Extração por líquido pressurizado (<i>Pressurized Liquid Extraction</i>)
PP	Precipitação por proteínas (<i>Protein Precipitation</i>)
MAE	Irradiação por micro-ondas (<i>Microwave Assisted Extraction</i>)
MS	Espectrometria de massas (<i>Mass Spectrometry</i>)
MS/MS	Espectrometria de massas sequencial
MSR	Metodologias de Superfície de Resposta
SPE	Extração em fase sólida (<i>Solid Phase Extraction</i>)
SPME	Microextração em fase sólida (<i>Solid Phase Microextraction</i>)
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
UNODC	Escritório de Drogas e Crimes da Organização das Nações Unidas (<i>United Nations Office on Drugs and Crime</i>)

SUMÁRIO

CAPÍTULO I - Introdução	1
1.1 Revisão da literatura	3
1.1.1 Cocaína e Lidocaína.....	3
1.1.2 Análise de drogas em matrizes biológicas	4
1.1.3 Técnicas analíticas para detecção de drogas em fluidos biológicos	6
1.1.4 Técnicas de preparo de amostras associadas a aplicação de campo elétrico	8
CAPÍTULO II – Construção de um dispositivo multipoços para preparo de amostra assistido por campo elétrico.	12
2.1 Considerações gerais	12
2.2 Objetivos.....	14
2.3 Materiais e métodos.....	15
2.3.1 Reagentes e solventes	15
2.3.2 Materiais	15
2.3.3 Equipamentos.....	16
2.4 Metodologia.....	16
2.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
2.6 Conclusões.....	22
CAPÍTULO III – Transporte de corrente elétrica em procedimentos de preparo de amostras que empregam campos elétricos.....	24
3.1 Considerações gerais	24
3.2 Objetivos.....	30
3.3 Materiais e métodos.....	30
3.3.1 Reagentes e solventes	30
3.3.2 Material	30
3.3.3 Equipamentos.....	31

3.3.4 Procedimentos.....	31
3.4 Resultados e discussões.....	37
3.5 CONCLUSÕES.....	46
CAPÍTULO IV – Estudo univariado dos parâmetros que influenciam a extração dos analitos em amostras de saliva artificial.....	
4.1.Considerações gerais.....	47
4.2 Objetivo.....	49
4.3 Materiais e métodos.....	49
4.3.1 Reagentes e solventes.....	49
4.3.2 Material.....	50
4.3.3 Equipamentos.....	50
4.3.4 Procedimentos.....	50
a) Preparo da saliva artificial.....	50
b) Preparo das soluções estoque de lidocaína e cocaína.....	50
c) Condições cromatográficas e de espectrometria de massas.....	51
d) Avaliação dos parâmetros que influenciam a capacidade de extração das drogas em amostras de saliva artificial.....	51
4.4 Resultados e discussão.....	55
4.5 Conclusões.....	62
CAPÍTULO V – Estudo multivariado do tempo e potencial elétrico aplicado na extração dos analitos em amostras de saliva artificial.....	
5.1 Planejamento experimental.....	63
5.2Objetivos.....	65
5.3 Materias e métodos.....	65
5.3.1 Reagentes e solventes.....	65
5.3.2 Equipamentos.....	65

5.3.3	Procedimentos	65
a)	Planejamento experimental.....	65
5.5	Resultados.....	66
5. 5. 1	Planejamento experimental.....	66
5.4	Conclusão	73
CAPÍTULO VI - Conclusão.....		74
CAPÍTULO VII – Referências bibliográficas		75

CAPÍTULO I - Introdução

A cocaína é uma droga estimulante que age no sistema nervoso central (SNC) por inibição da receptação de neurotransmissores pelos neurônios, aumentando a concentração dessas substâncias na fenda sináptica. Como resultado do seu uso ela pode causar nos usuários euforia, diminuição do apetite, vasoconstrição, aumento do estado de alerta, taquicardia e hipertermia¹. O efeito de euforia momentânea que a cocaína causa é um dos motivos do desejo de usá-la novamente. Segundo a Lei nº 11.343 de 23 de agosto de 2006 a cocaína é considerada no Brasil como droga que recebe a seguinte definição²:

“Art. 66. Para fins do disposto no parágrafo único do art. 1º desta Lei, até que seja atualizada a terminologia da lista mencionada no preceito, denominam-se drogas substâncias entorpecentes, psicotrópicas, precursoras e outras sob controle especial, da Portaria SVS/MS no 344, de 12 de maio de 1998.”

Uma das apresentações da cocaína traficada é na forma de cloridrato de cocaína, um sal solúvel em água obtido na forma de pó. A administração dessa forma pode ser por aspiração ou via intravenosa e a ela é comum a adição de diversos adulterantes com os objetivos de aumentar o volume e diminuir os custos. Os adulterantes com efeito farmacocinéticos semelhantes mais utilizados são cafeína, benzocaína e lidocaína e os principais diluentes são glicose, manose, sacarose, flúor e ácido bórico. Todos estes adulterantes e diluentes contribuem para os efeitos adversos da droga³.

O consumo de cocaína nas suas diversas apresentações tem aumentado cada vez mais e se tornado um dos principais problemas de saúde pública. De acordo com dados estatísticos da UNODC (United Nations Office on Drugs and Crime) o Brasil é um dos países mais mencionados em apreensões de cocaína. As principais rotas de escoamento para a droga são a Venezuela, Peru, Bolívia, Colômbia e Paraguai⁴.

Diante deste quadro, métodos analíticos para detecção de drogas tornaram-se de grande importância, levando a um avanço significativo nessa área⁵. Eles são de extrema relevância tanto no âmbito clínico e quanto no âmbito forense, contribuindo para esclarecimentos de mortes, contaminações e acidentes.

As drogas geralmente são encontradas nas matrizes biológicas como sangue, suor, cabelo, urina e saliva em baixas concentrações. Portanto, faz-se necessária a combinação de técnicas analíticas sensíveis, como a cromatografia líquida, associada com um preparo de amostra adequado. Nos últimos anos, passou-se a utilizar técnicas de preparo de amostras assistidas por campo elétrico com o objetivo de elevar a cinética de transferência dos analitos da amostra, elevar a seletividade e aumentar a pré-concentração⁶.

O presente trabalho propõe de forma inédita empregar a técnica de preparo de amostras multifásicas assistida por campos elétricos para a determinação de cocaína (COC) e lidocaína (LID) em saliva artificial com a determinação de ambos analitos realizada por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial.

Para facilitar a apresentação e o entendimento do presente trabalho a dissertação foi dividida da seguinte maneira:

Capítulo I – Introdução. Neste capítulo é feita uma abordagem geral sobre o tema deste trabalho, fazendo uma contextualização sobre o cenário da cocaína no Brasil e importância do desenvolvimento de métodos analíticos para a sua detecção.

Capítulo II– Este capítulo apresenta o desenvolvimento de um sistema de preparo de amostras utilizando um dispositivo multipólos para a realização de múltiplas eletroextrações em regime trifásico (líquido-líquido-líquido suportado em sólido) simultâneas.

Capítulo III – Avaliou-se neste capítulo o comportamento da corrente elétrica durante a aplicação de campo elétrico variando-se parâmetros que são determinantes para o transporte de cargas em sistemas eletroforéticos.

Capítulo IV – Neste capítulo foi feita a otimização univariada das condições de preparo de amostra baseado em trabalhos descritos na literatura que empregaram técnicas de preparo de amostras associado à eletroextração.

Capítulo V – Tratou-se neste capítulo de encontrar, através de um planejamento experimental, valores ótimos para os parâmetros de extração potencial elétrico e tempo de aplicação.

Capítulo VI e VII trataram da conclusão e referências bibliográficas, respectivamente.

Os capítulos II, III, IV, V e VI são inicializados com uma breve contextualização teórica do tema estudado.

1.1 Revisão da literatura

1.1.1 Cocaína e Lidocaína

A cocaína (3-benzoiloxi-8-metil-8-azabicyclo, Figura 1) é um composto básico ($pK_a = 8,6$) que é extraído de uma planta exclusiva da América do Sul, a *Erythroxylon coca*. Esse alcalóide é popularmente conhecido como coca derivada da palavra *koka* que significa “a árvore” na língua aimará⁷. Em 1855, um químico alemão, Friedrich Gaedecke, obteve o extrato de coca das folhas secas. Contudo, segundo Ferreira e Martini, apenas em 1898 que sua estrutura química foi elucidada e em 1902 a cocaína foi sintetizada em laboratório pela primeira vez por Willstat⁷.

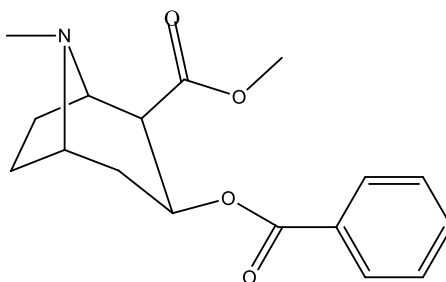


Figura 1. Estrutura da cocaína.

De acordo com Ferreira e Martini, os primeiros relatos da prescrição de COC para uso medicinal foram no tratamento para depressão, como anestésico e no tratamento de dependentes de álcool e morfina, tornando-se conhecida como um fármaco milagroso. Posteriormente, a cocaína passou a ser utilizada com propósitos recreativos. A droga quando inalada chega rapidamente ao cérebro e seus efeitos são presenciados em poucos minutos. Os efeitos a curto prazo são euforia, alívio aparente dos problemas da vida, sensação de leveza e bem estar. Estes efeitos podem ser sentidos em sequência ou aparecer um a cada uso e duram cerca de alguns minutos, sendo o fator principal para reincidência do uso^{1,8}.

Além da apresentação como um pó branco essa droga pode ser encontrada também com um aspecto marrom-amarelado, conhecida popularmente como crack, o qual é fumado em cachimbos improvisados. O seu uso indiscriminado tornou-se um problema de saúde pública e é uma das drogas mais utilizadas no mundo todo⁹. A grande demanda faz com que o preço aumente e, conseqüentemente, induz a adulteração e diluição com compostos que apresentam propriedades farmacocinética, sensorial e físico-química similares. Como citado anteriormente os adulterantes mais comumente encontrados em amostras de cocaína são lidocaína, benzocaína e cafeína, enquanto que os principais diluentes utilizados que conferem peso e volume são glicose, manose, sacarose, flúor e o ácido bórico³. Neste trabalho, a lidocaína foi determinada concomitantemente à cocaína.

A lidocaína (2-(dietilamino)-N-(2,6-dimetilfenil) acetamido, Figura 2) também é um composto básico (pKa = 7,9) utilizado em usos clínicos como um anestésico local e como antiarrítmico¹⁰. Essa droga quando manipulada causa efeito de dormência nas mãos assim como a cocaína.

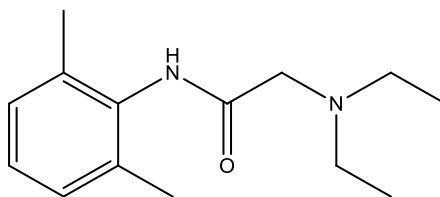


Figura 2. Estrutura da lidocaína.

1.1.2 Análise de drogas em matrizes biológicas

As pesquisas em análises químicas para verificação do uso de drogas de abuso estão sendo cada vez mais requisitadas. Essas análises têm usos diversos, como auxiliar no controle do uso de drogas no ambiente de trabalho, no esporte, em clínicas de recuperação e com finalidades forenses¹¹.

São várias as amostras biológicas utilizadas atualmente uma vez que através das suas análises químico-toxicológicas pode-se obter informações sobre o consumo de diversas drogas. As matrizes mais utilizadas para a detecção deste tipo de substâncias são saliva, sangue, urina, suor e cabelo, apresentando todas elas vantagens e desvantagens. A escolha da matriz depende de uma série de fatores tais como a natureza, integridade da amostra submetida à análise, tipo

de investigação (*antemortem* e *postmortem*), facilidade de coleta, custo do preparo de amostras, concentração da droga na amostra sua estabilidade e características da técnica analítica que será empregada^{12,13}.

A urina é uma matriz biológica comumente escolhida para análises toxicológicas com alvo de investigação de metabólitos, uma vez que é a principal via de eliminação de substâncias. Possui o menor número de interferentes, por ser constituída de 98% de água, a sua coleta é fácil e não invasiva, apresenta alta estabilidade sob congelamento (podendo ser útil em amostras positivas) e, em alguns casos, pode ser coletada em grandes volumes para análise. Entretanto, é uma das amostras de mais fácil adulteração, uma vez que a coleta não é monitorada na maioria das vezes, apesar de ser recomendada. Normalmente é encontrada na urina uma pequena quantidade da droga inalterada, salvo quando em casos de overdose. As concentrações dos metabólitos, por sua vez, se apresentam em níveis mais elevados, contudo apenas o uso recente da droga é capaz de ser detectado, pois elas permanecem presentes na urina por um período de 2 a 5 dias¹⁴⁻¹⁸.

O sangue é um fluido complexo, cuja a constituição é de 80% de água e o restante de proteínas, gorduras e sais. As análises podem ser realizadas na forma de sangue total, plasma ou soro^{11,19}. A sua análise recebeu maior valor em relação à urina nos últimos anos, uma vez que as drogas podem ser detectadas após a ingestão, antes de serem metabolizadas nos rins. Todavia, o sangue é uma amostra que é coletada através de um método invasivo e tem a necessidade de adicionar anticoagulante e conservante. O cabelo também é uma matriz complexa, constituída de queratina, água, lipídios e minerais. É uma matriz de difícil adulteração e a sua coleta é feita por método não invasivo. Apresenta uma ampla janela de detecção (semana, meses e até anos), embora não seja detectado o uso recente de drogas, devido ao processo de incorporação²⁰. Tratamentos cosméticos (tinturas e descoloração) podem afetar a estabilidade e retenção das drogas no cabelo²¹. Além disso, pode ocorrer a contaminação do indivíduo através do contato externo com pó ou fumaça. Em amostras de cabelo geralmente a concentração dos analitos encontrada é baixa, fazendo-se necessário alta sensibilidade dos métodos instrumentais de análise^{22,23}.

A saliva é um fluido aquoso composto por 99% de água, o restante de proteínas (majoritariamente enzimas), glicose, uréia, lipídeos e eletrólitos como sódio, potássio, fosfato e bicarbonato²⁴. É um fluido incolor, segregado na cavidade oral a partir de três glândulas

principais: a glândula parótida, as glândulas sublinguais e as glândulas submandibulares²⁴. Nos últimos anos o interesse clínico, forense e toxicológico pela saliva em alternativa ao sangue e à urina como matriz biológica tem aumentado significativamente²⁵. Na saliva as drogas podem ser detectadas na matriz na forma não-metabolizada, pois são transferidas por ultrafiltração ou difusão passiva. A coleta da saliva não é invasiva e pode ser feita por pessoas não especializadas, evitando então a sua adulteração ou substituição. Alguns dispositivos de coleta são encontrados à venda, como Salivette[®], OraSure[®] e Omni-Sal[®], que são constituídos de um bastão revestido que é esfregado nas regiões da cavidade bucal ou em um algodão que é inserido na boca e absorve a saliva. Como a maioria das substâncias na sua forma livre desaparecem da saliva cerca de 12 a 24 horas após sua administração, a saliva como amostra biológica se mostra muito útil para estudos farmacocinéticos, diagnósticos de doenças, detecção do consumo recente de substâncias em motoristas, vítimas de acidentes e substâncias ilícitas no local de trabalho. Outra vantagem é a de estar menos exposta a interferências causadas pelo metabolismo, assim como ocorre no sangue e na urina^{26,27}.

1.1.3 Técnicas analíticas para detecção de drogas em flúidos biológicos

As técnicas analíticas são de extrema importância para o desenvolvimento das análises toxicológicas forenses. Na Tabela 1 estão listadas algumas delas.

Tabela 1. Trabalhos descritos na literatura empregando diferentes técnicas analíticas e ou de preparo de amostras para amostras biológicas com interesse forense

Técnica Analítica	Amostra	Analito	Preparo de amostra	LD	LQ	Faixa linear	Ref
HPLC-MS/MS	Plasma	Lidocaína	PPE	0,2ppm	0,5ppm	0,2-18 ppm	28
HPLC-MS/MS	Sangue	Cocaína	SPE	0,2 ppb	0,9 ppb	1,9-3,2 ppb	29
HPLC-DAD	Plasma	MDMA	SPE	4,22 ppb	-	4,22-843ppb	30
HPLC-DAD	Plasma	Cocaína	SPE	0,01ppb	-	2-10ppb	31
GC-MS	Leite materno	Cocaína	SPE	1,6 ppb	5ppb	5-180 ppb	32
GC-MS	Sangue	Cafeína	SPE	0,13ppb	0,43ppb	0,5-6ppb	33
Raman	Amostra aquosa	Doxorrubicina	-	0,17 ppm	0,17 ppm	0,20-2ppm	34
CE-MS/MS	Urina	Cocaína	-	1,5ppb	10ppb	5-250ppb	35
CE-MS/MS	Urina	Azatioprina	Diluição	0,05ppb	0,25ppb	0,25-15ppb	36

HPLC-MS/MS – cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas sequencial, DAD – cromatografia líquida de alta eficiência com detector por arranjo de diodo, GC-MS – cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, CE-MS/MS – eletroforese capilar acoplada a espectrometria de massas; LD – limite de detecção; LQ – limite de quantificação; Ref – referência.

Os métodos mais comumente empregados para determinação de drogas em matrizes biológicas são baseados nas técnicas cromatográficas, como a cromatografia líquida de ultra eficiência (CLAE e CLUE, respectivamente ou ainda HPLC, *high performance liquidchromatography*, UHPLC, *ultra-high performance liquidchromatography*) e a cromatografia gasosa (GC, *gaschromatography*)³⁷. Neste trabalho foi utilizada a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial para a determinação dos analitos de interesse. A cromatografia se baseia na separação de compostos de acordo com as interações

dos analitos particionados entre duas fases: a fase móvel (líquida) e a fase estacionária³⁷. Esta técnica é amplamente utilizada pela sua sensibilidade e por separar compostos não voláteis e termicamente instáveis³⁷.

A cromatografia *per se* não é capaz de detectar os compostos separados em função das suas partições e por isso ela, invariavelmente, precisa ser associada a sistemas de detecção. Entre os detectores disponíveis a espectrometria de massas é, sem dúvida, a que melhor combina as qualidades sensibilidade de detecção e seletividade. A espectrometria de massas (MS, *massspectrometry*) seleciona íons livres na fase gasosa em função das relações massa/carga que eles apresentam. Existem várias estratégias para transformar as espécies químicas presentes na fase móvel líquida em íons livres para serem separados pelo espectrômetro de massas. Entre os métodos existentes a ionização por eletronebulização (ESI, *electrospray ionization*) é a mais amplamente empregada, especialmente para compostos de média e alta polaridade. Neste modo de ionização é aplicada uma grande diferença de potencial elétrico sobre a fase móvel líquida que flui por um capilar. Com essa estratégia é formado um elevado campo elétrico que age sobre os íons em solução, deformando o líquido e ejetando gotículas altamente carregadas. Esse fenômeno é chamado de cone de Taylor. Com o auxílio de um gás secante o solvente das gotículas é evaporado elevando a concentração desses íons a tal nível que as forças repulsivas dessas cargas promove uma explosão dos aglomerados de íons na gotícula levando a ejeção de íons livres em um processo chamado de explosão Coulômbica. Após essa etapa os íons livres são direcionado por campos eletromagnéticos e separados em função de suas relações massa/carga³⁸.

1.1.4 Técnicas de preparo de amostras associadas a aplicação de campo elétrico

Matrizes biológicas apresentam uma composição complexa, baixa concentração dos analitos e alta quantidade de interferentes que podem comprometer a seletividade e a sensibilidade da determinação do analito na matriz. Logo, torna-se necessária a utilização de técnicas de preparo de amostras, questão a parte crucial do procedimento analítico.

Dependendo da matriz e da técnica empregada o preparo de amostras pode corresponder a 80% do tempo total da análise e ser a maior fonte de erro no resultado³⁹. Uma variedade de métodos de preparo de amostra está disponível e são amplamente empregados em análise de

drogas e seus metabólitos. Dentre elas estão a extração em fase sólida (SPE); extração líquido-líquido (LLE); precipitação de proteínas (PP); microextração líquido-líquido (LLME); microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME); microextração em fase sólida (SPME); extração sortiva em barra magnética (SBSE); extração em fase sólida dispersiva (MSPD), entre outras¹¹.

Técnicas de separação como LCE eletroforese capilar (CE, *capillary electrophoresis*), apresentam, em geral, eficiência suficiente para separar uma quantidade considerável de componentes, utilizando um pequeno volume da amostra. Entretanto essas técnicas, mesmo quando associadas à detectores extremamente sensíveis, estão limitadas aos baixos teores do analitos de interesse e aos interferentes da matriz especialmente nos casos da análise de fármacos e drogas em matrizes complexas como fluidos biológicos. Para diminuir esses problemas pode ser feita uma etapa de remoção de interferentes (*cleanup*) da amostra combinada com uma pré-concentração dos analitos através da extração líquido-líquido ou uma extração em fase sólida, por exemplo. Contudo, essas técnicas, frequentemente apresentam uma série de limitações como o consumo excessivo de solventes e amostra, além do longo tempo para sua execução.

Uma abordagem alternativa e recente para a obtenção de *cleanup* e pré-concentração adequados é a associação de técnicas de preparo de amostras convencionais com a aplicação de campos elétricos em uma ou mais etapas⁴⁰. Exemplos dessa abordagem são a eletrodialise, a ultrafiltração, eletroextração em membrana (EME, *electromembrane extraction*) e a eletroextração em fase sólida (E-SPE) que fazem o uso da eletromigração seletiva como força de movimento dos compostos carregados⁶. Processos de preparo de amostras baseados na migração eletroforética são bastante promissores⁴¹. Nesta abordagem o objetivo é fazer com que o campo elétrico promova o movimento eletroforético seletivo dos analitos de interesse (espécies eletricamente carregadas) e/ou interferentes auxiliando o processo extrativo e de *cleanup*.

A EME foi introduzida no ano de 2006 como uma nova técnica de pré-tratamento de amostras biológicas e tem se mostrado bastante interessante, devido ao tempo requerido para obtenção de valores significativos de recuperação dos analitos⁴². Desde então ela vem sendo mais empregada do que outras técnicas citadas anteriormente que utilizam campos elétricos para eletromigração dos compostos carregados. A EME emprega fibras ocas porosas embebidas em solventes orgânicos que separa duas fases aquosas (amostra e fase aceptora). Os campos

elétricos são aplicados adicionando-se dois eletrodos metálicos, um na amostra (fase doadora) e outro na fase aceptora. Essa técnica de preparo de amostras está sendo empregada para análise de drogas, metais pesados e peptídeos em matrizes diversas^{43,44}. Como ela proporciona elevados fatores de pré-concentração e um seletivo *cleanup* as soluções podem ser diretamente injetadas em sistemas analíticos de separação.

Uma abordagem mais recente derivada da EME utiliza sistemas trifásicos sem o uso de membranas ocas. Empregando sistemas de filtros orgânicos menos densos que a amostra em um sistema de gota pendente foi demonstrado que o emprego de campos elétricos são capazes de promover a migração dos analitos da fase doadora para a fase aceptora. Em 2013, foi publicado por Raterink e colaboradores um novo método de purificação e enriquecimento de amostras biológicas em uma eletroextração líquido-líquido de três fases sem a utilização de membrana⁴⁵. Neste trabalho a extração foi realizada por uma gota aceptora suspensa em uma ponteira condutora dentro de um filtro de fase orgânica imiscível (Figura 3). Dentro da fase doadora inferior um segundo eletrodo foi posicionado para a aplicação de um campo elétrico entre as fases doadora e aceptora, como ilustrado na Figura 3.

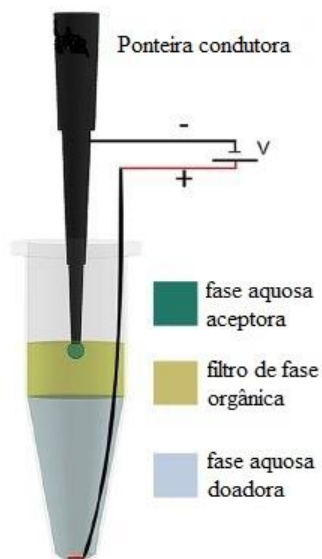


Figura 3. Ilustração esquemática de uma eletroextração de três fases. *Fonte adaptada de Raterink, 2013.*

No trabalho em questão foram extraídas acilcarnitinas fortificadas em plasma humano. A eficiência da extração foi obtida somente quando aplicado campo elétrico, isto é, na ausência das forças provenientes do campo elétrico não houve a migração do analito para a fase aceptora.

Após a extração a gota suspensa na ponteira foi diretamente analisada por espectrometria de massas com ionização por eletronebulização (ESI-MS) em um sistema automatizado. Os resultados obtidos apresentaram-se satisfatórios, com aumento do limite de detecção e livre de sinais de proteínas do plasma na análise por ESI-MS.

Com a combinação da purificação de amostra, enriquecimento seletivo de analitos e a simplicidade da configuração, a eletroextração trifásica assegura a promessa de se tornar um módulo central para a preparação de amostras em bioanálises, completamente automatizadas e com rendimentos superiores a muitas técnicas convencionais. Contudo, algumas limitações ainda devem ser contornadas, como a baixa estabilidade química e física da gota pendente, a qual não suporta potenciais elétricos elevados que, conseqüentemente, influencia na capacidade extrativa do método. A proposta deste trabalho foi contornar essas limitações.

CAPÍTULO II – Construção de um dispositivo multipoços para preparo de amostra assistido por campo elétrico.

2.1 Considerações gerais

Na maioria dos métodos analíticos instrumentais é necessário que haja uma etapa de tratamento prévio da amostra para a remoção de interferentes e/ou para pré-concentração dos analitos. Esses objetivos são desafiadores para os pesquisadores, uma vez que há a necessidade de obter extrações eficientes, consumindo pouco solvente, em um tempo curto, com baixo custo, e redução dos erros associados ao procedimento analítico. O preparo de amostra é uma das várias etapas de uma análise química, geralmente, a mais lenta e trabalhosa e uma das principais fontes de erro^{6,46}. As tendências atuais da pesquisa e desenvolvimento de técnicas de preparo de amostra incluem miniaturização, automação, simplificação, segurança e acoplamento online a instrumentos analíticos⁴⁷.

No início do seu desenvolvimento as técnicas de preparo de amostra como a PP, LLE bem como a SPE utilizavam frascos e cartuchos individuais e eram realizadas uma a uma de forma manual. Contudo, com o objetivo de realizar o preparo de várias amostras simultaneamente e de forma mais rápida, ocorreram avanços que levaram ao desenvolvimento das plataformas de multiextração, chamada de dispositivo multipoços ou *plates* (Figura 4). Hoje há uma grande diversidade de *plates* comerciais associados a procedimentos analíticos⁴⁸⁻⁵⁰.

O desenvolvimento de dispositivos com 96 poços também conhecido como *plate 96 well* foi creditado ao Dr. GyolaTakatsky da Hungria, segundo Noah, criado com o objetivo de atender a demanda de testes serológicos⁵¹. O primeiro dispositivo de acrílico 96 poços começou a ser comercializado em 1965 pela Cook e Laboratories nos Estados Unidos. Em sequência foram confeccionados *plates* de polipropileno com diferentes volumes de poços (Figura 4)⁵².

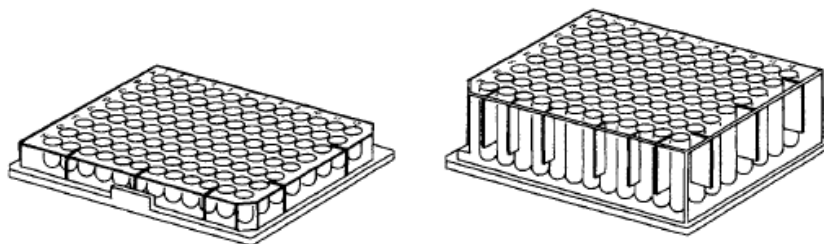


Figura 4. Poço raso tradicional (esquerda) e poço profundo (direita), eles se diferem em altura e volume dos poços. Desenvolvido pela Cookie Laboratories (EUA) em 1965. *Fonte adaptada por Wells, 2003.*

Os sistemas no formato de 96 poços foram desenvolvidos para proporcionar alta qualidade no processamento de ensaios analíticos. Por conseguinte, essas plataformas passaram a ser utilizados em diversas áreas de pesquisa para diferentes aplicações. Para praticamente todas as técnicas de preparo de amostras existem plataformas do tipo 96 *well* ou similares desenvolvidas. Isto pode ser constatado para as técnicas de preparo de amostras clássicas como SPE, LLE e PP; e para as técnicas mais modernas que empregam campos elétricos, tais como eletroextração em membrana (EME) e a eletroextração em fase sólida (E-SPE)⁵³⁻⁵⁶.

Xue e colaboradores determinaram muraglitazar, um fármaco para tratamento de diabetes tipo 2, em plasma humano fazendo-se uso da técnica de precipitação de proteínas combinada com um dispositivo de 96 poços e analisadas por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. O método desenvolvido mostrou-se confiável, apresentando-se uma excelente precisão e veracidade. Os autores afirmaram que a utilização da técnica de precipitação proteica juntamente com o sistema de 96 poços permitiu validar o método de forma prática e rápida⁵⁷.

Em 2014, Eibak e colaboradores combinaram os sistemas de preparo de amostras de multiextrações com instrumentação analíticos de alto desempenho. Neste trabalho a eletroextração em membrana em paralelo (Pa-EME, do inglês *Parallel Electromembrane Extraction*) foi acoplada *off line* com cromatografia de ultra desempenho, a qual permitiu que 96 amostras de água, urina e plasma sanguíneo contendo amitriptilina e fluoxetina fossem tratadas simultaneamente. Com esse sistema os autores obtiveram recuperações de cerca de 81% para fluoxetina e 83% para a amitriptilina⁵⁸.

Mais recentemente foi desenvolvido, por Eichler e colaboradores, um dispositivo que consiste em uma junta de borracha que sela duas placas de 96 poços para melhorar o rendimento da extração líquido-líquido de amostras de soro para medida de um importante marcador de vitamina D. O desenvolvimento deste dispositivo permitiu a extração em um fluxo de trabalho moderado e ensaios confiáveis, mostrando-se promissor para ser utilizado em outras técnicas de preparo de amostras⁵⁹.

Técnicas de preparo de amostra como a microextração em fase sólida (SPME) também fazem uso desse tipo de estratégia. Bagheri e colaboradores construíram um dispositivo com 96 poços para ser utilizado na determinação de multirésíduos de pesticidas, como o atrazino e o lindano, em amostras de água coletadas em rios. As fibras de SPME foram confeccionadas utilizando pedaços de malha de aço inoxidável com dimensões de 1 cm por 3 cm e com tamanho de grade de 297 μm . O método foi desenvolvido e validado utilizando-se o dispositivo confeccionado, o qual permitiu a extração simultânea de 96 amostras e determinada por GC-MS. O curto tempo de extração e dessorção juntamente com a evaporação do solvente resultou na redução do tempo total de análise e das despesas⁶⁰.

Portanto, devido à crescente necessidade de desenvolvimento de sistemas de preparo de amostras para múltiplas extrações simultâneas neste capítulo um novo dispositivo multipoços de eletroextração trifásica líquido-líquido-líquido suportado em sólido é apresentado.

2.2 Objetivos

Neste capítulo o objetivo científico foi desenvolver um dispositivo multipoços para a realização de múltiplas eletroextrações multifásicas simultâneas empregando um material sólido e poroso para suportar a fase aceptora aquosa e também um sistema que pudesse proporcionar ajuste e monitoramento do potencial e da corrente elétrica durante o procedimento de extração.

2.3 Materiais e métodos

2.3.1 Reagentes e solventes

O solvente utilizado acetonitrila (Sigma Aldrich) foi com grau HPLC de pureza. Os demais solventes ácido fórmico (Merck), ácido acético glacial (Vetec), e 1-octanol (Sigma Aldrich) foram todos com grau de pureza analítico ou superior. O sal de violeta genciana (Synth) também com grau de pureza analítico. A cola vinílica empregada foi da marca Brascola.

2.3.2 Materiais

Os materiais utilizados para a construção do dispositivo multipoços de eletroextração estão apresentados na Figura 5.

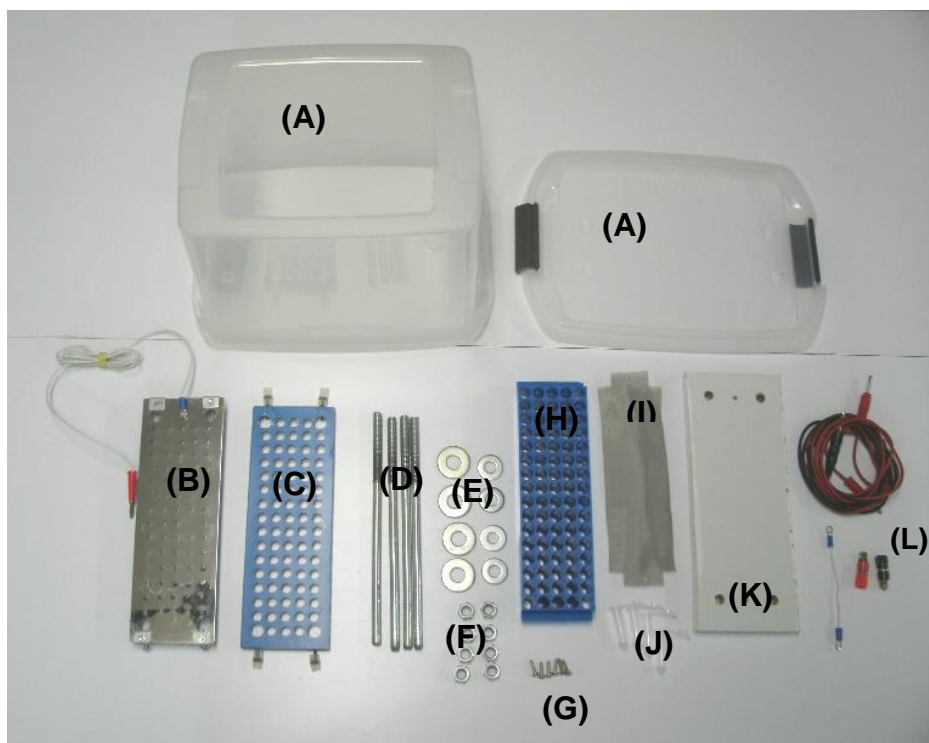


Figura 5. Materiais utilizados para a construção do dispositivo multipoços de eletroextração multifásico empregando cones de papel. (A) proteção contra descargas elétricas constituída de uma caixa plástica de polipropileno; (B) conjunto superior: placa suporte dos cones constituída de metal inerte condutor (aço inoxidável) com perfuração para encaixe dos cones; (C) placa plástica niveladora; (D) barras roscadas; (E) arruelas; (F) porcas; (G) parafusos de metal inerte (aço inoxidável); (H) suporte de amostras; (I) folha ou placa de metal inerte (aço inoxidável); (J) microtubos de polipropileno com capacidade de 2 mL; (K) placa da base (madeira); (L) conectores tipo banana macho e fêmea com cabos.

2.3.3 Equipamentos

Para a montagem do dispositivo multipólos de eletroextração foram empregadas as seguinte ferramentas:

- a) Furadeira de bancada Motomil 245W Mandril 1/2" FBH 130i;
- b) Tesoura para cortar chapas metálicas;
- c) Conjunto de brocas de aço rápido de diversos diâmetros;
- d) Serra de fita do tipo tico-tico;
- e) Chaves tipo fenda, philips e de boca de diversos tamanhos;

Já para a avaliação do dispositivo multipólos de eletroextração foram empregados os seguintes equipamentos:

- a) Fonte de eletroforese (KASVI) modelo K33-300V;
- b) Multímetro (Tekpower) modelo TP4000ZC com um comunicador RS-232 (EUA);
- c) Microcomputador Pentium (Intel) contendo: sistema operacional Microsoft Windows XP, programa de aquisição de dados Multi Meter Interface (versão Build 07.12.05_1339) com uma entrada RS-232.

2.4 Metodologia

a) Montagem dos frascos de amostras

Os tubos de amostras foram montados acoplando-se um componente condutor, não oxidável, aos microtubos de polipropileno para funcionar como eletrodo inferior. Neste caso, o componente utilizado foi parafuso de aço inoxidável, que é de fácil aquisição, limpeza, baixo custo e pode ser reutilizável. Este parafuso de aço inoxidável foi introduzido em um furo previamente confeccionado no microtubo e posteriormente selado com cola vinílica na parte exterior para garantir a total vedação (Figura 6).

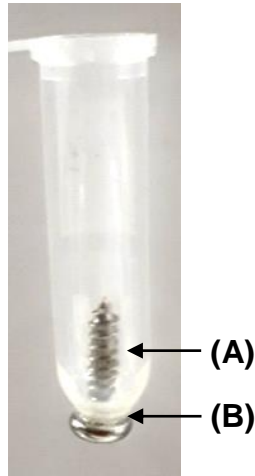


Figura 6. Microtubo de polipropileno modificado com eletrodo para as extração multifases com aplicação de campos elétricos. (A) parafuso de aço inoxidável (B) selagem com cola vinílica.

b) Cones de papel como suporte da fase acceptora

Para suportar a fase acceptora foram empregados cones odontológicos da marca Dentsply. O material de composição do cone, segundo declaração do fabricante é fundamentalmente celulose. O cone empregado foi o de numeração 50 com 30 mm de comprimento, com base de aproximadamente 1 mm de diâmetro e vértice de 0,5 mm de diâmetro. Na Figura 7 é apresentado o cone odontológico com uma régua milimetrada ao lado para comparação.

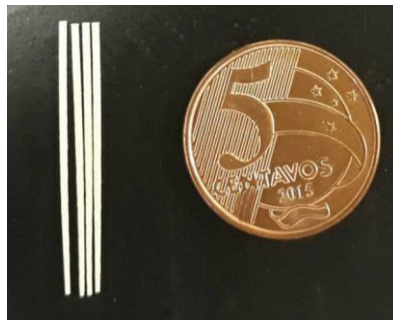


Figura 7. Cone odontológico de papel da marca Dentsply e número 50 usada como suporte para a fase acceptora.

c) Montagem do dispositivo multipóços de eletroextração.

O dispositivo multipóços de eletroextração montado é apresentado nas imagens da Figura 8 a seguir.

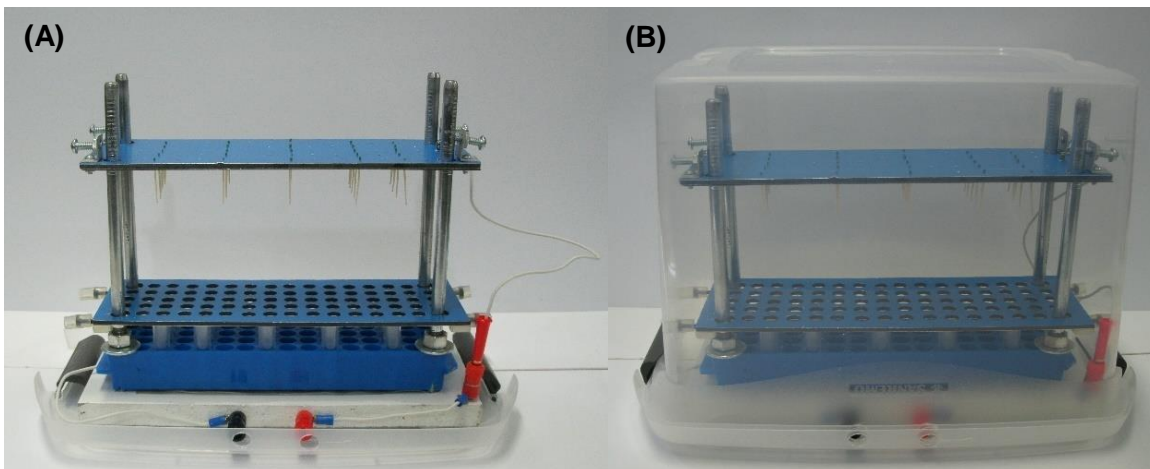


Figura 8. (A) Dispositivo multipóços para eletroextração multifases com cones de papel posicionados sobre a placa suporte; (B) dispositivo multipóços dentro da proteção contra descargas elétricas.

Primeiramente, a placa de madeira (material não condutor) (Figura 5 (K)) foi perfurada com quatro orifícios para afixar acima dela a placa de metal inerte (Figura 5 (I)). Em sequência o suporte de amostras (Figura 5(H)) foi afixado acima da placa de metal inerte. O suporte de amostras (Figura 5(H)) consistiu de um suporte para microtubos de polipropileno de 2 mL de capacidade, o qual teve o fundo de cada poço removido com o auxílio de uma furadeira de bancada para permitir o contato elétrico dos eletrodos inferiores dos microtubos confeccionados para eletroextração (Figura 5). Com a intenção de melhorar o nivelamento dos diversos tubos de eletroextração, uma placa plástica niveladora (Figura 5(C)) foi empregada e posicionada acima deles. Essa placa niveladora é constituída de material não condutor; contém o mesmo número de orifícios do suporte de amostra; esses orifícios estavam alinhados com os orifícios do suporte das amostras e ainda possui um sistema de fixação que permite a movimentação vertical através das hastes (barras roscadas, Figura 5 (D)).

O conjunto superior é formado por uma placa de suporte de cones constituída de material condutor inerte (Figura 5 (A)), a qual apresenta um contato elétrico para conexão com uma fonte de potencial elétrico. Essa placa possui diversos orifícios para o encaixe do material suporte poroso, representado no caso, pelos os cones odontológicos de celulose.

O correto posicionamento dos cones de extração e dos tubos de amostras foi realizado pelo movimento vertical da placa suporte de cones e da placa niveladora, ambas guiadas pelas barras roscadas (Figura 5 (D)). A fixação dessas placas foi realizada por meio de parafusos de fixação estrategicamente posicionados nas placas (Figuras 8 (A)). Para garantir a segurança do operador foi adaptada uma caixa plástica (Figura 5 (A)), a qual era encaixada ao dispositivo de modo que a aplicação do potencial elétrico iniciasse somente após o seu completo fechamento como apresentado na Figura 8 (B).

d) Sistema de aplicação de diferença de potencial, medição e registro de corrente elétrica

Para a aplicação do campo elétrico, o dispositivo multipóços apresentado no tópico anterior foi conectado a uma fonte de diferença de potencial elétrico ajustável com corrente contínua (fonte de eletroforese). Durante a aplicação do campo elétrico a corrente elétrica resultante foi monitorada por meio de um multímetro. Esse dispositivo trabalhou como um amperímetro e uma entrada de comunicação RS-232 foi conectada a um computador que adquiria e armazenava os dados de corrente elétrica provenientes do multímetro. O sistema completo está ilustrado na Figura 9.

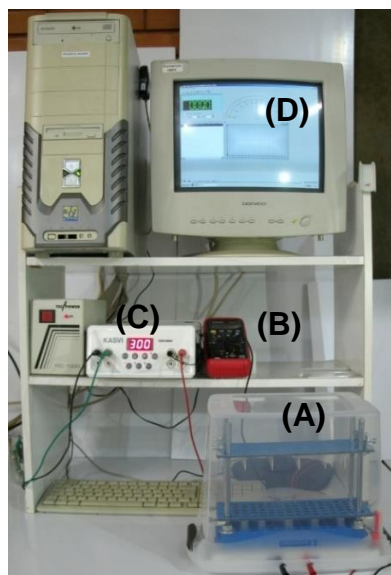


Figura 9. Sistema de eletroextração completo mostrando o dispositivo multipóços (A) conectado ao multímetro (B), a fonte de eletroforese (C) e ao computador (D) para aplicação do campo elétrico com potencial elétrico ajustado, no modo corrente elétrica contínua.

e) Demonstração de funcionalidade do sistema com o corante modelo violeta genciana

Nesta avaliação foram preparadas amostras compostas por 1 mL de solução doadora contendo o corante catiônico violeta genciana na concentração de 2 mg L^{-1} como composto modelo de demonstração. A solução do corante foi preparada em uma solução de acetonitrila e tampão TRIS no pH 7 na proporção de 1:1 (v/v), como filtro orgânico empregou-se 1 mL de 1-octanol e como fase acceptora foi preparada uma solução de ácido acético 200 mmol L^{-1} . O cone utilizado foi da marca Dentsply número 50. O sistema foi avaliado aplicando-se uma diferença de potencial elétrico de 300 V por 10 minutos em 60 amostras, enquanto que para outras 6 amostras o contato elétrico inferior dos microtubos modificados foram isolados com uma fita isolante para anular a influência do campo elétrico (controle). A comparação foi realizada pela inspeção visual dos cones de papel das amostras extraídas com e sem (controle) a influência do campo elétrico.

2.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O sistema de eletroextração trifásico (líquido-líquido-líquido suportado em sólido) que emprega um suporte sólido e poroso para a fase acceptora em substituição da ponteira condutora que comporta uma gota pendente composta pela fase acceptora está apresentado na Figura 10.

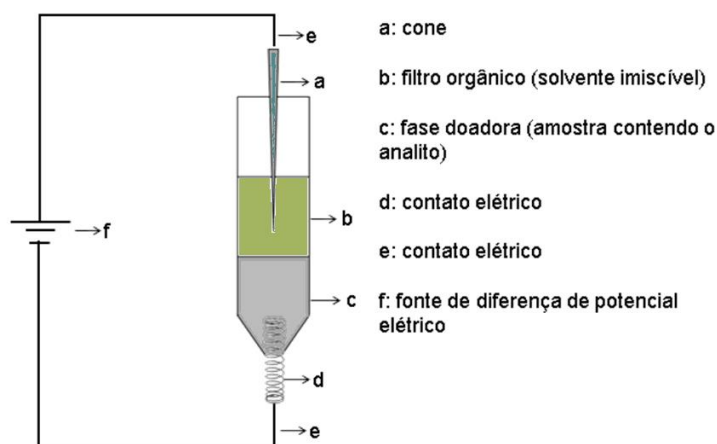


Figure 10. Representação de um sistema de extração de múltiplas fases com aplicação de campo elétrico desenvolvido por Orlando e colaboradores. *Fonte: retirada da patente BR 1020170054713.*

A construção do dispositivo multipoços, assim como a montagem do sistema para aplicação de campos elétricos, controle e monitoramento do potencial e da corrente elétrica utilizaram materiais e equipamentos de baixo custo, fácil aquisição e montagem. Nenhum recurso específico de construção ou de programação foi necessário para sua construção. Com o sistema montado, múltiplas extrações ($n = 66$) foram realizadas simultaneamente em amostras aquosas contendo o corante catiônico violeta genciana como composto modelo. Esse mesmo corante foi empregado pelos autores do sistema de gota pendente para demonstração da prova de conceito do sistema trifásico⁴⁵. Os resultados das extrações com e sem a influência de campos elétricos utilizando o dispositivo construído são apresentadas na Figura 11.

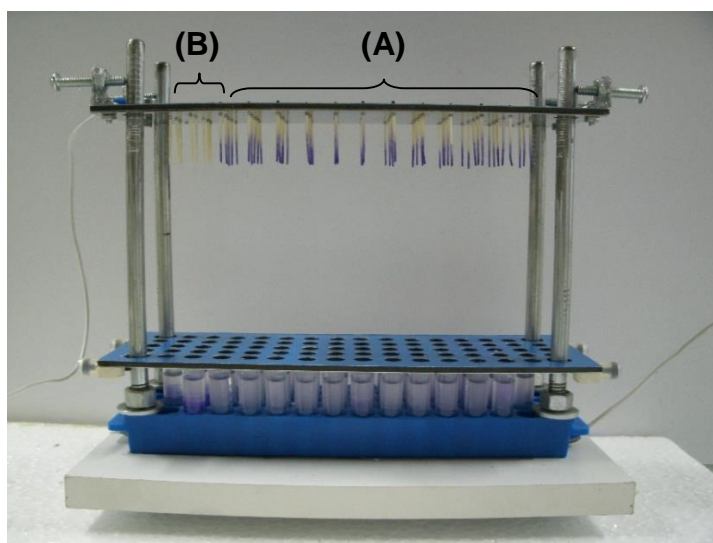


Figura 11. Resultados para a extração das amostras aquosas contendo o corante catiônico violeta genciana com (A) e sem (B) a influência de campos elétricos. Condições empregadas para a extração: 300 V (polaridade negativa sobre o cone e positiva sobre a amostra); duração 10 min; amostra aquosa contendo 2 mg L^{-1} de violeta genciana em uma solução de acetonitrila e tampão TRIS no pH 7 na proporção de 1:1 (v/v); fase orgânica constituída de 1 mL de 1-octanol; fase aceptora aquosa constituída de 200 mmol L^{-1} de ácido acético; cone odontológico de celulose número 50.

Após poucos minutos de aplicação do campo elétrico, pode-se observar a migração do corante para o vértice do cone, o qual começou a colorir-se mais intensamente no vértice em relação a base, evidenciando o efeito de acúmulo de cargas e uma extração mais efetiva nessa região (Figura 10).

Os resultados dessa avaliação demonstram de forma clara a diferença entre as extrações realizadas com e sem a influência de campo elétrico. Além disso, pode-se comprovar a maior

facilidade de manipulação, estabilidade física e química do líquido suportado no cone de celulose e da sua capacidade sortiva são nitidamente visíveis antes, durante e após as extrações quando comparado com o sistema original de gota pendente.

Durante a aplicação do campo elétrico a corrente elétrica total do conjunto de amostras foi monitorada e o resultado é apresentado na Figura 11. Neste experimento pelo perfil estável da corrente pode-se observar que não houve qualquer degradação do sorvente, tampouco a projeção da solução aquosa presente nos poros do cone de celulose durante a aplicação de potencial de 300 V, comprovando a sua estabilidade física e química do sistema.

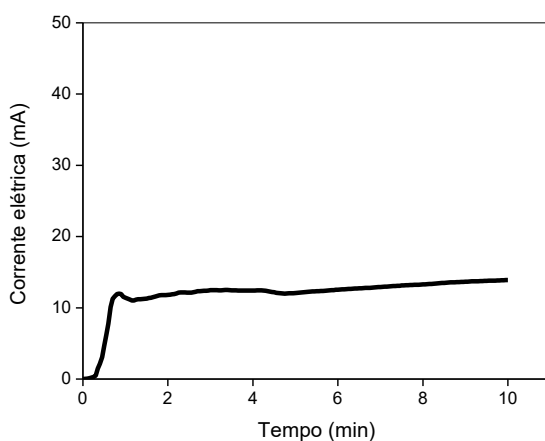


Figure 12. Gráfico do perfil da corrente elétrica em função do tempo de aplicação do potencial elétrico durante as extrações simultâneas das amostras contendo o corante catiônico violeta genciana. Condições durante a aplicação do potencial elétrico: solução de 2 mg L^{-1} de violeta genciana em tampão TRIS no pH 7 (fase doadora); filtro orgânico 1-octanol; fase aceptora ácido acético 200 mmol L^{-1} , potencial elétrico de 300 V e polaridade do eletrodo superior negativa e do inferior positiva.

2.6 Conclusões

Neste capítulo foi apresentado um dispositivo multiposos para eletroextração multifásica acoplado a um sistema de ajuste e monitoramento do potencial e corrente elétrica. Ambos foram construídos e montados empregando recursos de baixo custo e fácil obtenção, permitindo que outros grupos de pesquisa interessados em utilizar essa técnica possam produzir seu próprio aparato de trabalho.

O composto modelo empregado representado pelo corante catiônico violeta genciana extraído de amostras aquosas deixou visualmente evidente a influência do campo elétrico na eficiência de extração e também a elevada reprodutibilidade das extrações das 66 amostras extraídas sob a influência do campo elétrico.

O cone odontológico de papel (suporte da fase acceptora) apresentou-se fisicamente estável na presença de um campo elétrico gerado por um potencial elétrico de 300 V durante 10 minutos e não demonstrou mudanças aparentes em sua superfície. Outro ponto positivo em relação ao formato cônico do suporte da fase acceptora, foi a concentração de cargas no vértice do cone devido ao seu formato, o qual sugere uma maior eficiência da extração quando comparado ao formato da gota do sistema de trifásica com uma gota pendente apresentado no trabalho de Raterink e colaboradores em 2013.

As inovações empregadas e os resultados superiores do cone de papel frente ao dispositivo original de gota pendente motivaram o grupo de pesquisa a depositar um pedido de patente junto ao Instituto Nacional de Propriedade Industrial (BR n° 10 2017 005471 3 em 17 de março de 2017).

CAPÍTULO III – Transporte de corrente elétrica em procedimentos de preparo de amostras que empregam campos elétricos

3.1 Considerações gerais

Uma das possíveis etapas das técnicas de preparo de amostras é a transferência dos analitos da amostra (fase doadora) para outra fase (fase aceptora). A transferência entre essas fases é muitas vezes denominada extração e tem por finalidades principais eliminar interferentes (deixando-os na fase doadora), concentrar o analito (em um volume reduzido de fase aceptora) ou ainda compatibilizá-lo ao transferi-lo para um solvente mais adequado e/ou amigável ao equipamento analítico onde será determinado e/ou quantificado. De forma alternativa, pode-se empregar a extração para transferir (remover) da amostra para a fase aceptora os componentes não desejados (interferentes)⁴⁵. Diversas maneiras podem ser utilizadas para aumentar a eficiência da transferência de massa entre a amostra e a fase aceptora. Uma delas é o aumento da superfície ou da taxa de contato entre a amostra e a fase aceptora, como na microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME, *dispersive liquid-liquid microextraction*), a extração sortiva em barra de agitação (SBSE, *stir bar sortiveextraction*) e a microextração sólido-líquido ou microextração em fase sólida (SPME, *solidphase micro extration*)^{61,62}. Para aumentar a eficiência, a velocidade e, em alguns casos, a seletividade do processo de transferência também é comum utilizar a pressão e/ou o calor como na extração por líquido pressurizado (PLE, *pressurized liquid extraction*)⁶³, na extração por fluido supercrítico (SFE, *supercritical fluid extraction*)⁶⁴, nas extrações com irradiação por micro-ondas (MAE, *microwave assisted extraction*)⁶⁵, infravermelho⁶⁶ ou ainda com ondas ultrassônicas⁶³. Uma outra estratégia que pode ser empregada com o mesmo propósito é o emprego de campos elétricos em processos de extração. Essa abordagem tem ganhado atenção nos últimos anos com diversos trabalhos experimentais, de revisão e patentes sendo publicados e depositados⁶⁷⁻⁷⁰. Uma das vantagens que pode ser explorada com a aplicação de campo elétrico é o aumento da taxa de transferência dos analitos entre as fases em decorrência do transporte de carga. Além disso, a extração das espécies positivas e negativas pode ser controlada pela fácil orientação e mudança de polaridade do campo⁶.

Uma das técnicas pioneiras de eletroextração com finalidade analítica foi a eletrodialise, utilizada principalmente na remoção de íons como cádmio, nitrato, nitrito e flúor de águas residuais, no tratamento de efluentes industriais por ação de um campo elétrico em um sistema de diálise^{71,72}. Em LLE, a utilização de campo elétrico começou a ser empregado nos anos 90¹². Contudo, apenas a partir do ano de 2006 que preparo de amostras assistidos por campos elétricos ganhou impulso, quando Pedersen-Bjergaard e colaboradores propuseram uma técnica denominada isolamento por membrana elétrica (EMI, *electromembraneisolation*). Neste trabalho os autores utilizaram um sistema de microextração em fase líquida suportada em fibras ocas de polipropileno, a qual foi utilizada para extrair drogas básicas como droperidol e clomipramina através de uma membrana líquida artificial composta por 2-nitrofenil octil éter aplicando 300V por 5 minutos. Com essa estratégia foi obtido um fator de enriquecimento de 7-7,9 vezes⁴¹. Desde então, a eletroextração acoplada à outras técnicas analíticas permitiu a determinação de diversos analitos em diferentes matrizes complexas, tais como metais pesados em amostras aquosas, aminoácidos e drogas de abuso em fluidos biológicos^{45,68,74,75}.

Em um trabalho mais recente, Raterink e colaboradores aplicaram campos elétricos em um sistema de múltiplas fases (líquido-líquido-líquido; aquoso-orgânico-aquoso; fase doadora-filtro-fase aceptora), o qual está descrito no Capítulo I (Figura 3). O potencial elétrico foi aplicado nesse sistema de múltiplas fases, entre a fase aceptora e a fase doadora, fazendo com que o analito (composto) migrasse por atração eletrostática da fase doadora (amostra), passando pelo filtro orgânico até chegar à fase aceptora constituída de uma gota suspensa composta por uma solução de metanol 33% v/v⁴⁵. Essa abordagem apresenta uma melhora na cinética de transferência do analito, e aumento na seletividade ao se utilizar o filtro orgânico, portanto, mostra-se promissor para utilização em purificação de amostras em bioanálises, é fácil de ser acoplado à técnicas de separações como a eletroforese capilar (CE) e a LC. Contudo, algumas limitações foram observadas, como baixa estabilidade física e química da gota pendente e baixa capacidade extrativa do método.

Em uma abordagem mais recente pesquisadores do Departamento da Química da Universidade Federal de Minas Gerais desenvolveram e patentearam uma nova configuração do sistema desenvolvido por Raterink. Nesse novo sistema de eletroextração de múltiplas fases os autores empregaram um sistema mais robusto e prático para a constituição da fase aceptora como descrito anteriormente no Capítulo II. Nesse sistema, ao invés de empregar uma gota

suspensa por uma ponteira condutora como fase aceptora, os inventores utilizaram um cone de papel como suporte para a fase aceptora, conforme o esquema da Figura 10.

O princípio fundamental do transporte de cargas no sistema da Figura 3a pode ser descrito de forma simplificada pela lei de Ohm (Eq. 1)⁷⁶:

$$I = \frac{V}{R} \text{ (Eq. 1)}$$

Em que I representa a corrente elétrica (unidade ampère, A), V é a diferença de potencial empregada (unidade volts, V) e R a resistência elétrica do condutor (unidade Ohms). A resistência elétrica (R) de um condutor convencional (Eq. 1) depende do comprimento l (unidade metros), da secção transversal a (unidade metros quadrados, m^2) e da resistividade do condutor ρ (unidade Ohms m^{-1}) (Eq. 2):

$$R = \rho \frac{l}{a} \text{ (Eq. 2)}$$

Porém, em soluções, a resistividade (ρ) é substituída pelo seu recíproco, chamado condutividade elétrica κ (unidade $S \text{ cm}^{-1}$) (Eq. 3). A condutividade elétrica κ representa a capacidade de uma solução em transportar a corrente elétrica e fornece informações importantes sobre as interações íon-íon e íon-solvente⁷⁷.

$$R = \frac{l}{a \kappa} \text{ (Eq. 3)}$$

Logo, a resistência elétrica é inversamente proporcional a condutividade elétrica. A condutância de uma solução é uma propriedade que varia significativamente com a concentração da solução de eletrólito c (unidade mol L^{-1}), portanto deve ser dividida pela sua concentração, e essa divisão chega à condutividade molar λ_m (Eq. 4)⁷⁸. Em soluções de eletrólito forte, κ aumenta significativamente com o aumento da concentração, enquanto que em soluções de eletrólitos fracos, κ aumenta gradualmente, uma vez que a condutividade elétrica está ligada diretamente com a concentração de íons presentes em solução. Em

concentrações elevadas de eletrólito, a condutividade começa a decrescer, devido ao aumento das interações iônicas⁷⁹.

$$\lambda_m = \frac{\kappa}{c} \text{ (Eq. 4)}$$

A capacidade das espécies químicas carregadas se moverem através de um meio no qual estão sendo aceleradas por um campo elétrico, dependem da mobilidade eletroforética, μ , em solução (Eq. 3.5)⁸⁰. A mobilidade eletroforética é reduzida quando os eletrólitos são solvatados por moléculas de solvente (água).

$$\mu = \frac{z e}{f} \text{ (Eq. 5)}$$

Na Eq. 3.5, f é o coeficiente de atrito entre o íon e os demais componentes da solução (solvente e demais íons), e representa a carga elementar e z é o número de cargas elementares dos íons. Para esses sistemas, o tamanho do íon e a viscosidade do eletrólito de suporte influenciam diretamente no coeficiente de atrito. Esse coeficiente de atrito pode ser estimado utilizando a Lei de Stokes para íons esféricos de raio hidrodinâmico r , em um meio com viscosidade η (Eq. 6)⁸¹:

$$f = 6 \pi \eta r \text{ (Eq. 6)}$$

Com base nas equações 3.5 e 3.6, conclui-se que a mobilidade eletroforética μ (Eq. 3.7) depende, portanto, do raio hidrodinâmico da espécie química em questão (Raio de Stokes) (Eq. 7):

$$\mu = \frac{z e}{6 \pi \eta r} \text{ (Eq. 7)}$$

A condutividade molar λ_m depende das cargas dos íons em solução (z), da mobilidade elétrica (μ) e da constante de Faraday (F) (Eq. 8):

$$\lambda_m = z \mu F \text{ (Eq. 8)}$$

Portanto, a condutividade elétrica é expressa em função da concentração da carga e da mobilidade dos íons (Eq. 9).

$$\kappa = c z \mu F \text{ (Eq. 9)}$$

A corrente elétrica (I) que é o objeto de estudo deste capítulo está correlacionada aos fatores acima mencionados, Equação 10:

$$I = \kappa E A = z \mu v c F E A \text{ (Eq. 10)}$$

Sendo E o campo elétrico A a área da seção transversal do condutor e v a velocidade desenvolvida por um determinado íon em solução.

A Tabela 2 apresenta valores a condutividade de alguns solventes comumente empregados em sistemas de extrações de múltiplas fases que empregam campos elétricos.

Tabela 2. Condutividade dos eletrólitos κ em mS/cm para a concentração em massa percentual

Eletrólitos	Condutividade (κ / mS/cm)
1-Octanol	$1,4 \times 10^{-6}$
Acetato de etila	$1,0 \times 10^{-9}$
Hexano	$1,0 \times 10^{-16}$
Tolueno	$8,0 \times 10^{-16}$
Metanol	$2,0 \times 10^1$

Fonte: *CRC Handbook of Organic solvent properties*, Ian M. Smallwood, 1996.

Como pode ser observado na Equação 10, em sistemas que aplicam campos elétricos para promover o transporte de íons, é possível acelerar facilmente a taxa de transporte de carga e, conseqüentemente, dos analitos carregados, aumentando o campo elétrico E aplicado. Contudo, há uma limitação nessa estratégia, e ela está associada ao aquecimento promovido pelo atrito dos íons em movimento, o qual gera calor em um processo conhecido como efeito Joule⁸². A quantidade de calor gerado durante a aplicação do campo elétrico é função do potencial elétrico aplicado (V), da corrente elétrica gerada (I) e do tempo de aplicação (t) conforme apresentado na Equação 11:

$$J = I V t \text{ (Eq. 11)}$$

Quando a taxa de calor gerada é superior à capacidade do sistema de dissipar esse calor nas vizinhanças do sistema (i.e. solvente, parede do frasco, eletrodos, etc), ele irá começar a se aquecer em demasia, podendo levar a degradação dos analitos, precipitação de sais, ebulição do solvente e, conseqüentemente, a ruptura do sistema eletroforético⁸².

Os conceitos básicos de transporte de carga descritos anteriormente não discriminam para os sistemas de preparo de amostras multifases empregando campos elétricos qual será a taxa de transporte dos analitos em relação aos outros íons em solução (eletrólitos). Contudo, alguns artigos descrevem a taxa de fluxo dos analitos da fase doadora para a fase acceptora em sistemas trifásicos. No caso de técnicas livres de campo elétrico, a transferência dos analitos se devem à ação das forças difusivas e convectivas⁸²⁻⁸⁴. Já nos sistemas empregando campos elétricos o modelo empregado é baseado na equação de Nernst-Planck para sistemas iontoforéticos para transporte de fármacos em aplicações cutâneas⁸³, a qual será apresentada e estuda capítulo seguinte.

É de suma importância, em sistemas multifásicos que empregam campos elétricos, a escolha correta do líquido orgânico que irá compor a membrana ou filtro orgânico. Nesses casos, o solvente orgânico deve ter uma resistência elétrica apropriada para conseguir manter a corrente elétrica do sistema suficientemente baixa, porém significativa mesmo quando aplicado altos valores de potencial elétrico. A corrente elétrica baixa, mas significativa irá garantir que haja transporte de cargas, em especial dos analitos, sem ocorrência dos problemas associados ao aquecimento excessivo⁸⁵. O líquido orgânico deverá ser ainda satisfatoriamente imiscível nas demais fases (doadora e acceptora) para que seja seletivo a passagem dos analitos e não dos interferentes. Por último ele deverá também possuir a propriedade de solvatar minimamente os analitos para permitir sua passagem e transferência até a fase acceptora.

Dada a complexidade dos fenômenos envolvidos no transporte de cargas, da seletividade da extração e da estabilidade dos sistemas de extração multifases empregando campos elétricos é de fundamental importância, em técnicas de preparo de amostras que empregam essa abordagem, controlar e avaliar a condutividade elétrica das soluções, tipo e concentração de eletrólitos, tempo e valor do potencial elétrico aplicado, entre outros parâmetros que influenciam o transporte de carga e que serão estudados neste capítulo.

3.2 Objetivos

Este capítulo teve como objetivo avaliar o comportamento da corrente elétrica durante a aplicação do campo elétrico variando-se diferentes parâmetros que são determinantes para transporte de cargas em sistemas eletroforéticos e, em especial, para as técnicas de preparo de amostras baseadas na aplicação de campo elétrico.

Os objetivos específicos foram avaliar os seguintes parâmetros:

- Composição do eletrólito da fase doadora;
- Tempo de aplicação do potencial elétrico;
- Porcentagem de solvente orgânico miscível em água nas fases aceptora, doadora e no filtro orgânico;
- Natureza do solvente formador do filtro orgânico;
- Emprego de diferentes estratégias de convecção do sistema: estático, agitador magnético e agitação por vortex.

3.3 Materiais e métodos

3.3.1 Reagentes e solventes

Os solventes utilizados neste capítulo foram metanol e acetonitrila (Sigma Aldrich) ambos com grau de pureza cromatográfico. Os demais solventes 1-octanol (Sigma Aldrich), acetato de etila (Vetec), hexano (Merck), tolueno (Simpex), ácido acético glacial (Synth) foram com grau de pureza analítico ou superior. Os sais de tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) (Amresco), citrato de sódio (Synth), fosfato de sódio bibásico (Synth), acetato de sódio (Merck), tetraborato de sódio (Synth) também tinham grau de pureza analítico ou superior.

3.3.2 Material

- Tubos de polipropileno com capacidade de 2 mL do tipo eppendorf montados com eletrodos inferiores embutidos conforme descrito na página 17 (Figura 6).

- Cones odontológico de papel número 50 da marca Tanari e Dentsply (Brasil).
- Sistema de múltiplas extrações descrito na página 18 (Figura 8).

3.3.3 Equipamentos

- Fonte estabilizada de corrente contínua para eletroforese, Kasvi, modelo K33-300V (Brasil);
- Balança analítica Mettler, modelo AE 260 Range (Brasil);
- Purificador de água Millipore, modelo Milli-Q Academic (EUA);
- Multímetro da marca Tekpower, modelo TP4000ZC, com saída de comunicação RS-232 (EUA);
- Microcomputador Pentium (Intel, EUA) contendo sistema operacional Microsoft Windows XP (EUA);
- Software de comunicação e armazenamento de dados do multímetro: Multi Meter Interface versão Build 07.12.05_1339 com uma entrada RS-232;
- Agitador do tipo Vortex da marca VELP SCIENTIFICA;
- Agitador magnético com aquecimento da marca CORNING PC-420D.

3.3.4 Procedimentos

a) Avaliação do efeito da composição do eletrólito da fase doadora sobre a corrente elétrica

Neste estudo foram avaliadas as seguintes soluções de eletrólitos da fase doadora acetato de sódio, tetraborato de sódio, ácido cítrico, tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) e fosfato de sódio bibásico; todas elas preparadas na concentração de 100 mmol L⁻¹ com água deionizada.

Adicionou-se 1 mL da solução de eletrólito (fase doadora) ao frasco adaptado com o eletrodo (Figura 6) e em seguida adicionou-se 1 mL de 1-octanol (filtro orgânico). Após o posicionamento do frasco no sistema de múltiplas extrações um cone odontológico de papel número 50, devidamente encaixado na placa de metal inerte do conjunto superior do sistema de múltiplas extrações, foi introduzido dentro do filtro orgânico à aproximadamente 2-3

milímetros de distância da interface fase doadora-filtro orgânico. O cone de papel foi previamente embebido em solução de ácido acético 100 mmol L^{-1} (fase aceptora) antes de introduzi-lo no filme orgânico. Ao conjunto montado de eletrodos (eletrodo inferior e superior) aplicou-se uma diferença de potencial elétrico de 300 V durante 10 minutos. Durante a aplicação do potencial elétrico os valores de corrente elétrica foram adquiridos e armazenados através do sistema de aquisição de dados composto por um multímetro conectado a um microcomputador (Figura 8). As medições de corrente elétrica foram realizadas em triplicada ($n = 3$) para cada condição avaliada.

b) Avaliação do efeito do tempo de aplicação da diferença de potencial elétrico na corrente elétrica

Adicionou-se 1 mL da solução de eletrólito TRIS (100 mmol L^{-1}) (fase doadora) ao frasco adaptado com eletrodos (Figura 6) e, em seguida, adicionou-se 1 mL de 1-octanol (filtro orgânico). Após o posicionamento do frasco no sistema de múltiplas extrações um cone odontológico de papel número 50, devidamente encaixado na placa de metal inerte do conjunto superior do sistema de múltiplas extrações, foi introduzido dentro do filtro orgânico à aproximadamente $2\text{-}3$ milímetros de distância da interface fase doadora-filtro orgânico. O cone de papel foi previamente embebido em solução de ácido acético 100 mmol L^{-1} (fase aceptora) antes de introduzi-lo no filme orgânico. Ao conjunto montado de eletrodos (eletrodo inferior e superior) aplicou-se uma diferença de potencial elétrico de 300 V durante os tempos de 10 , 35 e 60 minutos. Durante a aplicação do potencial elétrico os valores de corrente elétrica foram adquiridos e armazenados através do sistema de aquisição de dados composto por um multímetro conectado a um microcomputador (Figura 8). As medições de corrente elétrica foram realizadas em triplicada ($n = 3$) para cada condição avaliada.

c) Avaliação do efeito da porcentagem de solvente orgânico miscível em água nas fases aceptora, doadora e no filtro orgânico sobre a corrente elétrica

Neste estudo foram avaliadas diferentes porcentagens de solvente orgânico miscível em água em cada uma das fases que compõe o sistema de extração (fase doadora, filtro orgânico e fase aceptora).

c1) Variação da porcentagem de solvente orgânico miscível em água na fase doadora.

Para esta avaliação utilizou-se como amostra 1 mL de solução de eletrólito TRIS 100 mmol L⁻¹ com três diferentes teores de metanol, 0, 15 e 30% (v/v) ao frasco adaptado com eletrodos e posicionado no sistema de múltiplas extrações (Figura 6). Em seguida, adicionou-se 1 mL de 1-octanol ao frasco para que um cone odontológico de papel número 50, devidamente encaixado na placa de metal inerte do conjunto superior do sistema de múltiplas extrações, fosse introduzido dentro do filtro orgânico à aproximadamente 2-3 milímetros de distância da interface fase doadora/filtro orgânico. O cone de papel foi previamente embebido em solução de ácido acético 100 mmol L⁻¹ (fase aceptora) antes de introduzi-lo no filme orgânico. Ao conjunto montado de eletrodos (eletrodo inferior e superior) aplicou-se uma diferença de potencial elétrico de 300 V durante 10 minutos. Durante a aplicação do potencial elétrico os valores de corrente elétrica foram adquiridos e armazenados através do sistema de aquisição de dados composto por um multímetro conectado a um microcomputador como descrito na página (Figura 8). As medições de corrente elétrica foram realizadas em triplicada (n = 3) para cada condição avaliada.

c2) Variação da porcentagem de solvente orgânico miscível em água no filtro orgânico.

Neste estudo adicionou-se inicialmente como amostra 1 mL de solução do eletrólito TRIS 100 mmol L⁻¹ (fase doadora) ao frasco adaptado com eletrodos e posicionado no sistema de múltiplas extrações (Figura 6). Em seguida avaliou-se a adição de três diferentes teores de metanol, 0, 5 e 10% (v/v) em 1-octanol para compor 1 mL de filtro orgânico. Um cone odontológico de papel número 50, embebido em solução de ácido acético 100 mmol L⁻¹ (fase aceptora) e devidamente encaixado na placa de metal inerte do conjunto superior do sistema de múltiplas extrações, foi então introduzido dentro do filtro orgânico à aproximadamente 2-3

milímetros de distância da interface fase doadora/filtro orgânico. Ao conjunto montado de eletrodos (eletrodo inferior e superior) aplicou-se uma diferença de potencial elétrico de 300 V por 10 minutos. Durante a aplicação do potencial elétrico, os valores de corrente elétrica foram adquiridos e armazenados através do sistema de aquisição de dados composto por um multímetro conectado a um microcomputador como descrito na página (Figura 8). As medições de corrente elétrica foram realizadas em triplicada ($n = 3$) para cada condição avaliada.

c3) Variação da porcentagem de solvente orgânico miscível em água na fase aceptora.

Neste estudo empregou-se como amostra 1 mL de solução do eletrólito TRIS 100 mmol L⁻¹ (fase doadora) ao frasco adaptado com eletrodos e posicionado no sistema de múltiplas extrações (Figura 6). Em seguida, adicionou-se 1 mL de 1-octanol (filtro orgânico) ao frasco para que um cone odontológico de papel número 50, devidamente encaixado na placa de metal inerte do conjunto superior do sistema de múltiplas extrações, fosse introduzido dentro do filtro orgânico à aproximadamente 2-3 milímetros de distância da interface fase doadora/filtro orgânico. Para esta avaliação o cone de papel foi previamente embebido em solução de ácido acético 100 mmol L⁻¹ (fase aceptora) contendo três diferentes teores de metanol, 0, 5 e 10 % (v/v) antes da introdução no filme orgânico. Ao conjunto montado de eletrodos (eletrodo inferior e superior) aplicou-se uma diferença de potencial elétrico de 300 V durante 10 minutos. Durante a aplicação do potencial elétrico os valores de corrente elétrica foram adquiridos e armazenados através do sistema de aquisição de dados composto por um multímetro conectado a um microcomputador (Figura 8). As medições de corrente elétrica foram realizadas em triplicada ($n = 3$) para cada condição avaliada.

d) Avaliação do efeito da natureza do solvente orgânico empregado na formação do filtro orgânico

Para este estudo adicionou-se 1 mL de solução do eletrólito TRIS 100 mmol L⁻¹ (fase doadora) ao frasco adaptado com eletrodos e posicionado no sistema de múltiplas extrações (Figura 6). Em seguida, avaliou-se a adição de 1 mL de quatro diferentes solventes orgânicos para a formação do filtro orgânico, hexano, acetato de etila e tolueno. Um cone odontológico de papel número 50, embebido em solução de ácido acético 100 mmol L⁻¹ (fase aceptora) e

devidamente encaixado na placa de metal inerte do conjunto superior do sistema de múltiplas extrações, foi então introduzido dentro do filtro orgânico à aproximadamente 2-3 milímetros de distância da interface fase doadora/filtro orgânico. Ao conjunto montado de eletrodos (eletrodo inferior e superior) aplicou-se uma diferença de potencial elétrico de 300 V por 10 minutos. Durante a aplicação do potencial elétrico os valores de corrente elétrica foram adquiridos e armazenados através do sistema de aquisição de dados composto por um multímetro conectado a um microcomputador (Figura 8). As medições de corrente elétrica foram realizadas em triplicada ($n = 3$) para cada condição avaliada.

e) Avaliação de diferentes estratégias de convecção das fases doadora-filtro orgânicos do conjunto multifases: agitação prévia por vórtex, agitação por barra magnética durante a extração e modo estático

Para essa avaliação buscou-se comparar três diferentes forma de executar o procedimento de extração: sem nenhuma agitação prévia durante a extração (estática), com agitação magnética durante a extração, com agitação prévia à aplicação empregando sistema tipo vortex.

e1) Avaliação de agitação prévia por sistema tipo vortex:

Neste estudo empregou-se como amostra 1 mL de solução do eletrólito TRIS 100 mmol L⁻¹ (fase doadora) ao frasco adaptado com eletrodos e posicionado no sistema de múltiplas extrações (Figura 6). Em seguida, adicionou-se 1 mL de 1-octanol (filtro orgânico) e agitou-se o frasco contendo a amostra e o filtro orgânico em sistema tipo vortex por 30 segundos. Após a agitação o frasco foi levado para centrífuga por 5 minutos em uma velocidade de 4000 rpm e colocado no sistema de múltiplas extrações para que um cone odontológico de papel número 50, previamente embebido em solução de ácido acético 100 mmol L⁻¹ (fase aceptora), fosse introduzido dentro do filtro orgânico à aproximadamente 2-3 milímetros de distância da interface fase doadora/filtro orgânico. Ao conjunto montado de eletrodos (eletrodo inferior e superior) aplicou-se por 10 minutos uma diferença de potencial elétrico de 300 V. Os valores de corrente elétrica durante a aplicação do potencial elétrico foram adquiridos e armazenados através do sistema de aquisição de dados composto por um multímetro conectado a um

microcomputador (Figura 8). As medições de corrente elétrica foram realizadas em triplicada ($n = 3$) para cada condição avaliada.

e2) Avaliação de agitação por barra magnética durante a extração.

Para esse estudo as extrações foram realizadas empregando o sistema de agitação descrito no trabalho de Kubáň em 2011⁸⁶. Empregou-se como amostra 1 mL de solução do eletrólito TRIS 100 mmol L⁻¹ (fase doadora) e 1 mL de 1-octanol como filtro orgânico. A barra de agitação magnética foi colocada dentro do eppendorf modificado, ficando dentro da fase doadora. O agitador magnético foi ajustado para 150 rpm. Com ajuda de uma garra tipo jacaré, foi fixado um cone odontológico de papel número 50 e introduzido no filtro orgânico à aproximadamente 2-3 milímetros de distância da interface fase doadora/filtro orgânico. Este cone de papel foi previamente embebido em solução de ácido acético 100 mmol L⁻¹ (fase aceptora). Ao conjunto montado de eletrodos (eletrodo inferior e superior) aplicou-se uma diferença de potencial elétrico de 300 V durante 10 minutos. Durante a aplicação do potencial elétrico os valores de corrente elétrica foram adquiridos e armazenados através do sistema de aquisição de dados composto por um multímetro conectado a um microcomputador (Figura 8). As medições de corrente elétrica foram realizadas em triplicada ($n = 3$).

e3) Avaliação do modo estático (sem agitação prévia ou durante a extração).

O modo estático foi avaliado empregando as mesmas condições descritas no item e1 anterior com exceção de que não foi empregada nenhuma estratégia de agitação durante a aplicação de potencial elétrico.

f) Avaliação da reprodutibilidade do perfil de corrente elétrica gerada pela aplicação do potencial elétrico

Para esta avaliação foi utilizada as mesmas condições descritas no item b, aplicando um potencial elétrico de 300 V por 10 minutos. As medições de corrente elétrica foram realizadas em sextuplicatas ($n=6$).

3.4 Resultados e discussões

a) Avaliação do efeito da composição do eletrólito da fase doadora sobre a corrente elétrica

Para a avaliação da influência dos tipos de eletrólito no perfil da corrente elétrica, aplicou-se um potencial elétrico de 300 V, utilizando cinco eletrólitos distintos, os quais estavam na mesma concentração de 100 mmol L⁻¹.

Observando os resultados apresentados na Figura 13, pode-se verificar que apesar da diferença de condutividade molar κ dos eletrólitos da fase doadora avaliados, não houve variação expressiva da corrente elétrica medida. A variação da corrente elétrica é diretamente proporcional ao parâmetro κ (Equação 10) e a condutividade, assim como apresentado pela Equação 3, é inversamente proporcional à resistência.

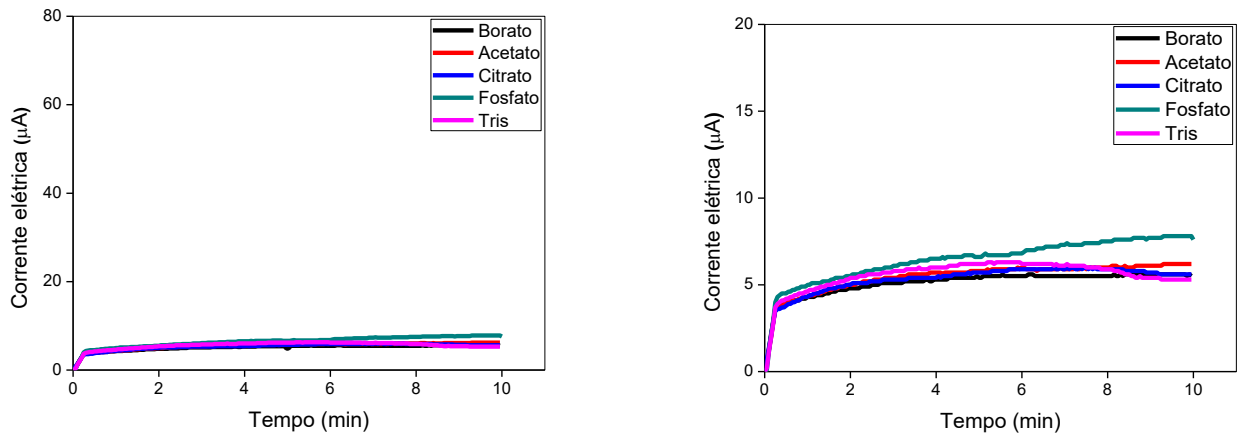


Figura 13. Gráfico do perfil da corrente elétrica em função do tempo de aplicação do campo elétrico em diferentes soluções de eletrólitos da fase doadora. Condições durante a aplicação do campo elétrico: soluções de eletrólito (fase doadora) 100 mmol L⁻¹; filtro orgânico 1-octanol; fase acceptora ácido acético 100 mmol L⁻¹ e potencial elétrico de 300 V (eletrodo superior negativo e inferior positivo). Borato = borato de sódio; acetato = ácido acético, citrato = ácido cítrico, fosfato = fosfato de sódio dibásico e tris = tris(hidroximetil)aminometano. Os gráficos estão apresentados em duas escalas para melhor visualização. O gráfico está apresentado em duas escalas para melhor visualização.

Em sistemas de extração multifases com aplicação de campo elétrico, o condutor elétrico representado pelas n fases por onde a corrente será transportada é formado por uma combinação de n resistores R_i em série, representado por cada fase imiscível. Para cada R_i , tem-se uma condutividade κ associada que, no caso do sistema empregado (Figura 14), possui

um valor limitante representado pelo filtro orgânico do 1-octanol ($\kappa = 10^{-6} \text{ mScm}^{-1}$) que é da ordem de 10^{-6} vezes menos condutor que a fase doadora estudada⁸⁷. Como a resistência total do sistema R_{total} em série é igual a soma dos diferentes R_i resistores a variação da resistência da fase doadora ($R1$) representada na Figura 14 terá pouco ou nenhum efeito sobre a corrente elétrica global, uma vez que ela está sendo praticamente limitada e determinada pela resistência do filtro orgânico ($R2$).

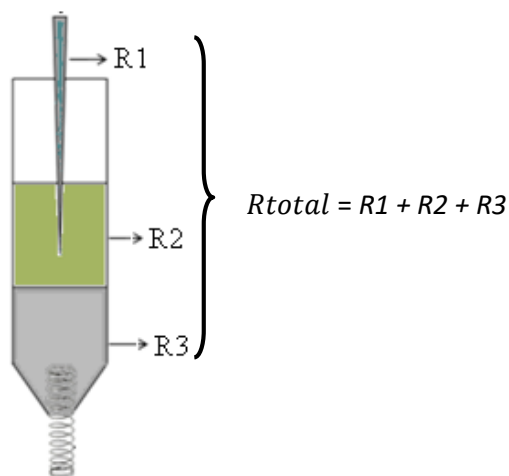


Figura 14. Sistema representativo das resistências elétrica total R_{total} referentes a soma das resistências individuais das fases doadora ($R1$), filtro orgânico ($R2$) e a fase aceptora ($R3$).

Essa característica é conhecida e bem descrita para as extrações multifases empregando filmes orgânicos, em especial, para sistema de eletroextração em membrana⁴². Na região do filme orgânico, sabe-se que a resistência elétrica R é máxima, assim como o campo elétrico e, por esse motivo, após a penetração dos íons nessa porção, o transporte no filme orgânico é feito rapidamente para a fase aceptora.

b) Avaliação do efeito do tempo de aplicação da diferença de potencial elétrico na corrente elétrica

Na avaliação do comportamento da corrente elétrica durante a aplicação do campo elétrico, a corrente elétrica foi monitorada durante um tempo máximo de 60 minutos com a aplicação de uma diferença de potencial de 300 V (Figura 15).

O perfil de corrente elétrica observado na Figura 15, demonstra um discreto aumento dos valores iniciais medidos, mantendo-se por alguns minutos e seguido por um suave decaimento até o final da aplicação do campo elétrico.

Quando o potencial elétrico é aplicado em soluções, os íons livres são atraídos pelos polos de carga contrária, resultando em um aumento inicial da corrente. Após esse aumento inicial, observa-se nas interfaces dos sistemas multifases um acúmulo de cargas que aumenta a resistividade daquela região, dificultando a passagem dos íons e, conseqüentemente, o transporte de corrente elétrica. Esse decaimento de corrente poderia ser evitado aumentando o potencial aplicado, o qual forneceria mais energia aos íons para vencerem essa barreira energética; ou então, reduzir a tensão interfacial dessas regiões para os íons atravessarem mais facilmente a interface (fase doadora-filtro orgânico)⁸⁸. Outro fenômeno relacionado a queda de corrente em sistemas eletroforéticos é o próprio atrito dos íons em movimento.

Outra importante observação deste experimento foi do sistema eletroforético se manter estável enquanto estava sob influência do campo elétrico. Isto é um indicativo que, não houve sobre aquecimento do sistema devido ao efeito Joule, pois a potência dissipada pelo sistema era baixa, aproximadamente, 1,5 mW (miliwatt), uma vez que a corrente média foi de 5 μA com potencial máximo de 300 V. Fato importante, pois a aplicação de campos elétricos altos resulta em um menor tempo de análise com maior eficiência de extração. Já em relação a matrizes complexas como as matrizes biológicas, o aumento de temperatura pode causar a perda da atividade enzimática e proteica, levando à instabilidade e perda de eficiência da extração⁸⁹.

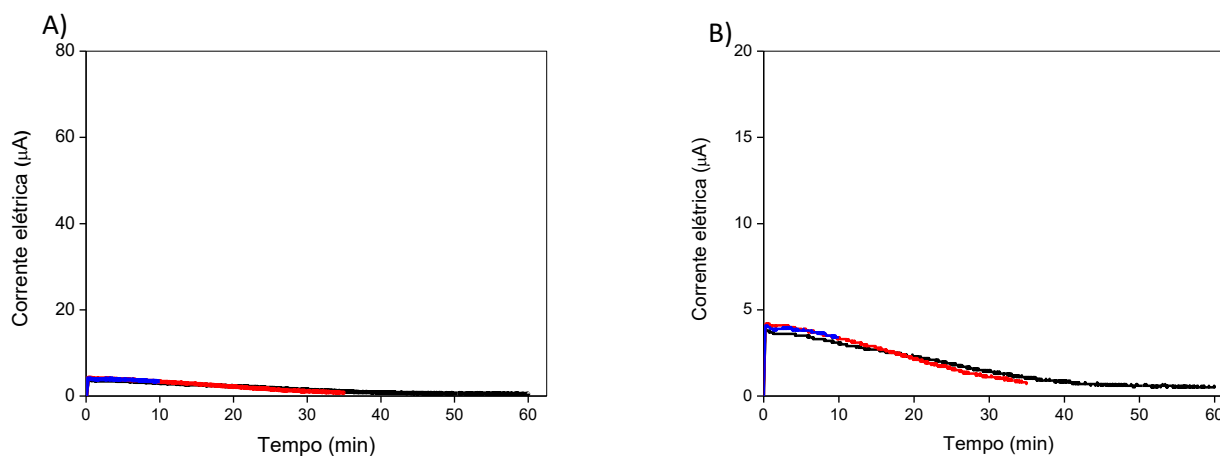


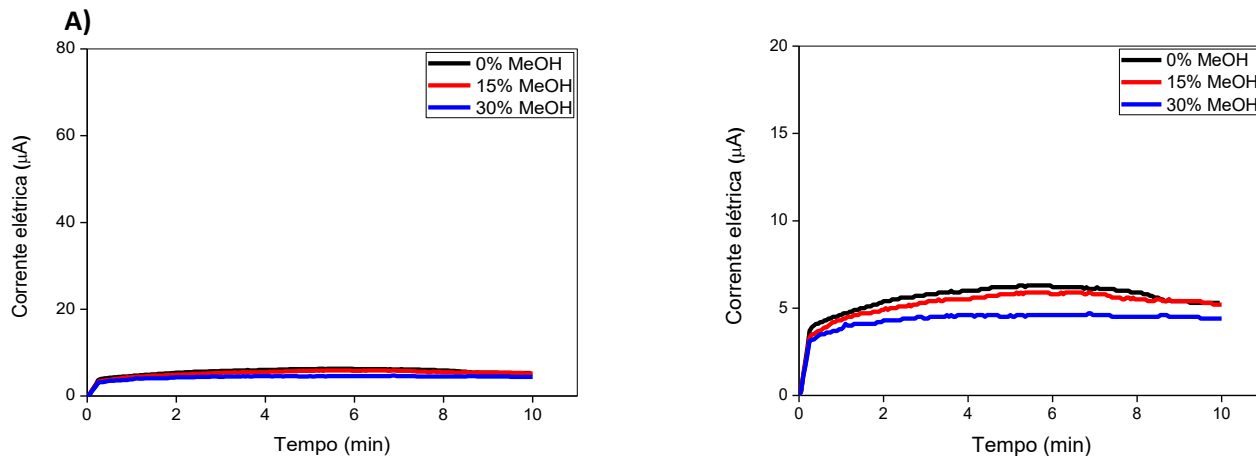
Figura 15. Gráfico do perfil da corrente elétrica em função do tempo de aplicação do potencial elétrico. Condições durante a aplicação do potencial elétrico: solução de eletrólito TRIS (fase doadora) 100 mmol L⁻¹; filtro orgânico 1-octanol; fase aceptora ácido acético 100 mmol L⁻¹, potencial elétrico de 300 V e

polaridade do eletrodo superior negativa e do inferior positiva. (-) 10 min, (-) 35 min, (-) 60 min. O gráfico está apresentado em duas escalas para melhor visualização.

c) Avaliação do efeito da porcentagem de solvente orgânico miscível em água nas fases aceptora, doadora e no filtro orgânico sobre a corrente elétrica

Avaliou-se, de forma univariada, o efeito da adição de três diferentes proporções de solvente orgânico miscível em água em cada uma das três diferentes fases do sistema: amostra (fase doadora), filtro orgânico e fase aceptora. O objetivo da adição de um solvente orgânico miscível em água nessas três fases foi diminuir a tensão interfacial do sistema e permitir uma maior passagem de carga entre elas.

No estudo da variação da composição das fases doadora empregou-se uma solução de eletrólito tris (fase doadora) 100 mmol L^{-1} contendo 0, 15 e 30% (v/v) de metanol. Já para a fase aceptora empregou-se ácido acético 100 mmol L^{-1} com as proporções de 0, 5 e 10% (v/v) de metanol. Os resultados dessas duas primeiras avaliações estão representados nos gráficos A e B da Figura 16.



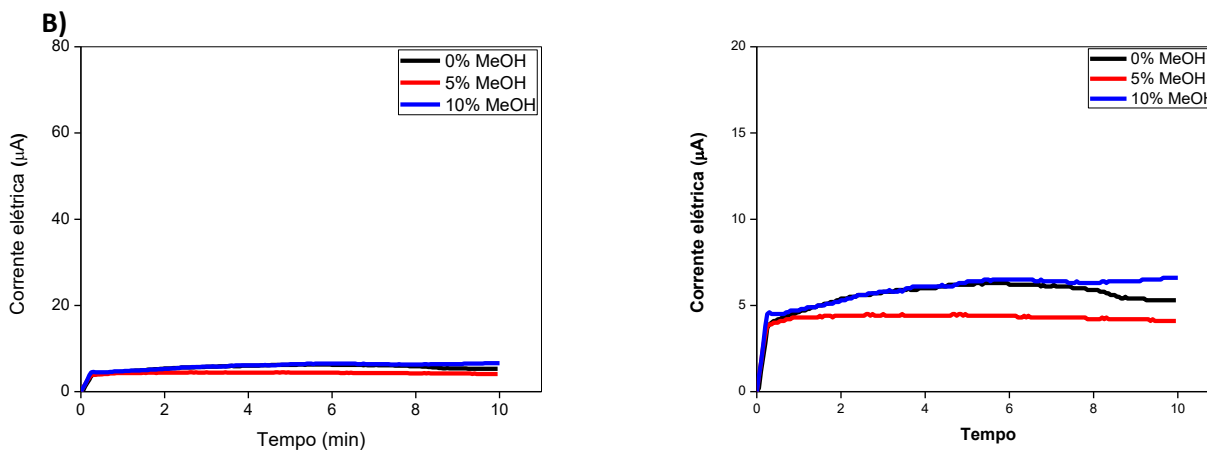


Figura 16.A) Gráfico do perfil da corrente elétrica em função do tempo de aplicação do campo elétrico empregando diferentes porcentagem de metanol na fase doadora. Condições durante a aplicação do campo elétrico: solução de eletrólito tris (fase doadora) 100 mmol L⁻¹ contendo 0, 15 e 30% (v/v) de metanol; filtro orgânico 1-octanol; fase aceptora ácido acético 100 mmol L⁻¹ e. B) Condições durante a aplicação do campo elétrico: solução de eletrólito tris 100 mmol L⁻¹; filtro orgânico 1-octanol; fase aceptora ácido acético 100 mmol L⁻¹ com 0, 5 e 10% (v/v) de metanol. Para ambas as condições potencial elétrico de 300 V com polaridade do eletrodo superior negativa e do inferior positiva. MeOH = metanol. Os gráficos estão apresentados em duas escalas para melhor visualização.

De forma semelhante ao estudo da natureza do eletrólito, a variação da porcentagem de metanol tanto na fase doadora como na fase aceptora (Figura 16) não promoveu grandes variações no perfil e na intensidade da corrente elétrica. Acredita-se que, como no caso da natureza do eletrólito, tanto a fase aceptora quanto a fase doadora tenham um efeito secundário sobre a corrente quando comparado com o filtro orgânico, devido à alta resistência do 1-octanol.

Para o filtro orgânico foram avaliados 0, 5 e 10 % (v/v) de metanol em 1-octanol. Observa-se na Figura 17 que o aumento da quantidade de solvente orgânico, aumentou de forma expressiva a corrente elétrica nos primeiros quatro minutos, em seguida começou a reduzir até se estabilizar próximo dos 8 minutos de aplicação do campo elétrico. Como a condutividade κ do metanol é alta, a resistência (R_2 , Figura 14) do filtro orgânico diminuiu, resultando em um aumento do transporte de íons (corrente elétrica), além da redução da tensão interfacial entre as fases orgânica e doadora.

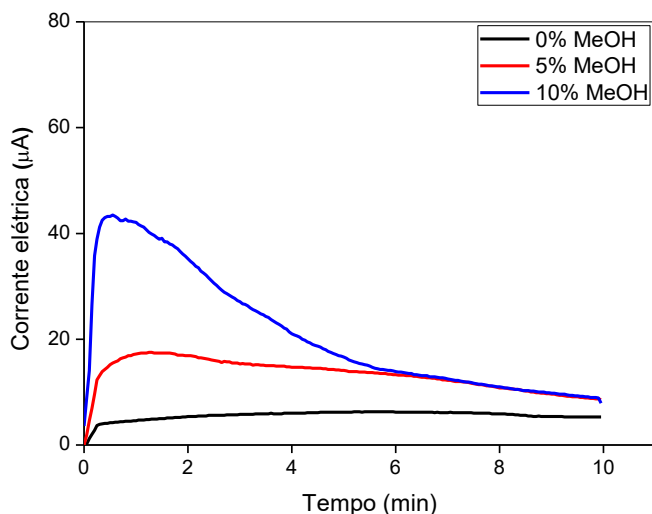


Figura 17. Gráfico do perfil da corrente elétrica em função do tempo de aplicação do campo elétrico empregando diferentes porcentagens de metanol no filtro orgânico. Condições durante a aplicação do campo elétrico: solução de eletrólito tris (fase doadora) 100 mmol L⁻¹; filtro orgânico 1-octanol contendo 0, 5 e 10% (v/v) de metanol; fase acceptora ácido acético 100 mmol L⁻¹, potencial elétrico de 300 V e polaridade do eletrodo superior negativa e do inferior positiva.

d) Avaliação do efeito da natureza do solvente orgânico empregado na formação do filtro orgânico

Para avaliar o efeito do filtro orgânico sobre a corrente elétrica utilizou-se os solventes orgânicos tolueno, hexano, acetato de etila em comparação com o 1-octanol. A partir dos perfis de corrente ilustrados no gráfico da Figura 18, observa-se que utilizando hexano e tolueno como filtro orgânico a corrente elétrica medida ficou próxima de zero. Já com o solvente acetato de etila a corrente elétrica inicial foi de aproximadamente 5 µA com um decaimento característico aproximando-se de zero já nos primeiros 4 minutos de aplicação do campo elétrico. Fazendo o uso do 1-octanol a intensidade da corrente elétrica foi visualmente superior e com um perfil estável durante os 10 minutos de aplicação do potencial elétrico de 300 V.

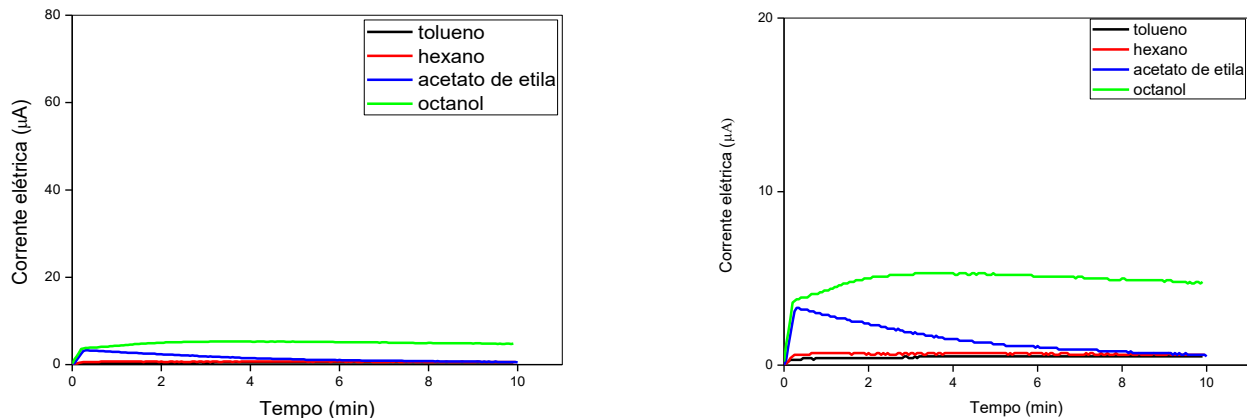


Figura 18. Gráfico do perfil da corrente elétrica em função do tempo de aplicação do campo elétrico empregando diferentes composições de filtro orgânico. Condições durante a aplicação do campo elétrico: solução de eletrólito tris (fase doadora) 100 mmol L^{-1} ; filtro orgânico (-) hexano (-) tolueno (-) acetato de etila (-) 1-octanol; fase aceptora ácido acético 100 mmol L^{-1} , potencial elétrico de 300 V e eletrodo superior negativo e inferior positivo.

Neste experimento observou-se mais uma que a composição do filtro orgânico tem papel fundamental no transporte de íons. Nesta avaliação o 1-octanol, um álcool de cadeia longa, demonstrou ser o solvente mais adequado. Pode ser explicado por apresentar um pequeno, porém melhor poder de hidratação pelo grupo hidróxido terminal, o que confere uma menor tensão interfacial em comparação aos demais solventes avaliados. E uma outra abordagem é em termos de condutividade dos diferentes solventes orgânicos: 1-octanol, acetato de etila, hexano e tolueno, como apresentado na Tabela 1. A condutividade do hexano e do tolueno é da ordem de 10^{-16} , e da acetato de etila 10^{-9} , logo a resistência será ordem de 10^{16} e 10^6 , respectivamente. Sendo assim, a corrente será muito baixa ou próxima de zero, impedindo o transporte de íons da fase doadora para a fase aceptora.

e) Avaliação de diferentes estratégias de convecção das fases doadora-filtro orgânico do conjunto multifases: agitação prévia por vórtex, agitação por barra magnética durante a extração e modo estático

Para a avaliação do efeito de diferentes estratégias de agitação na corrente elétrica empregou-se uma agitação prévia à aplicação de potencial elétrico realizada com a fase doadora e o filtro orgânico em vortex antes da aplicação do campo elétrico (estratégia 1) e agitação com barra magnética durante a aplicação do campo elétrico (estratégia 2). O perfil da corrente

elétrica dessas estratégias comparativamente ao procedimento sem nenhuma agitação é apresentado na Figura 19. Os resultados do gráfico demonstram que o transporte de íons foi mais eficiente quando a amostra foi agitada previamente com a fase aceptora. Quando a agitação foi realizada com barra magnética durante a aplicação de campo elétrico observou-se uma corrente elétrica inicial alta, a qual foi decaindo rapidamente com o passar do tempo. Em contrapartida, a agitação prévia por vortex, além de produzir os maiores valores de corrente elétrica, se mostrou muito mais estável durante toda a aplicação de potencial. Esse comportamento pode ser explicado pelo fato da agitação prévia diminuir a tensão interfacial entre as fases solubilizando parcialmente solvente aquoso no orgânico e vice-versa. Essa queda da tensão interfacial permite que os íons em solução sejam parcialmente transferidos para o filtro orgânico além de permitir que eles atravessem mais facilmente o filtro orgânico evitando que se acumulem na interface com o efeito capacitivo de cargas. O contraponto do uso da agitação para aumento da passagem de cargas é a etapas adicional requerida e é a possível redução da seletividade do sistema e coextração de interferentes e essa hipótese será avaliada posteriormente com as amostras simuladas e as amostras reais de saliva.

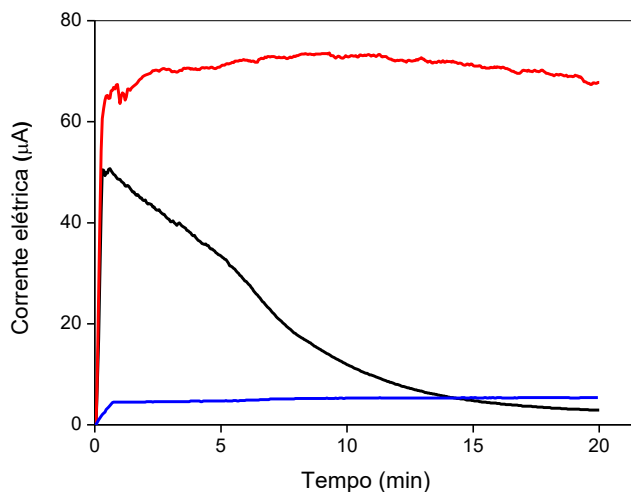


Figura19. Gráfico do perfil da corrente elétrica em função do tempo de aplicação do campo elétrico em sistema estático (-), agitando no vortex (-) e agitando com barra magnética (-). Condições durante a aplicação do campo elétrico: solução de eletrólito tris (fase doadora) 100 mmol L⁻¹; filtro orgânico 1-octanol; fase aceptora ácido acético 100 mmol L⁻¹, potencial elétrico de 300 V e polaridade do eletrodo superior negativa e do inferior positiva.

f) Avaliação da reprodutibilidade do perfil de corrente elétrica gerada pela aplicação de um potencial elétrico

Para avaliar a reprodutibilidade do perfil de corrente elétrica do sistema multifases de eletroextração empregando cones de papel como suporte da fase acceptora, foram feitas seis replicatas nas mesmas condições utilizadas para avaliar a estabilidade da corrente em função do tempo (item 3.4 b).

Os resultados do perfil da corrente elétrica em função do tempo se mostrou bastante reprodutível nas sextuplicatas apresentadas na Figura 20 o que demonstra que o cone de papel pode ser empregado de forma adequada para a realização de múltiplas extrações sequenciais

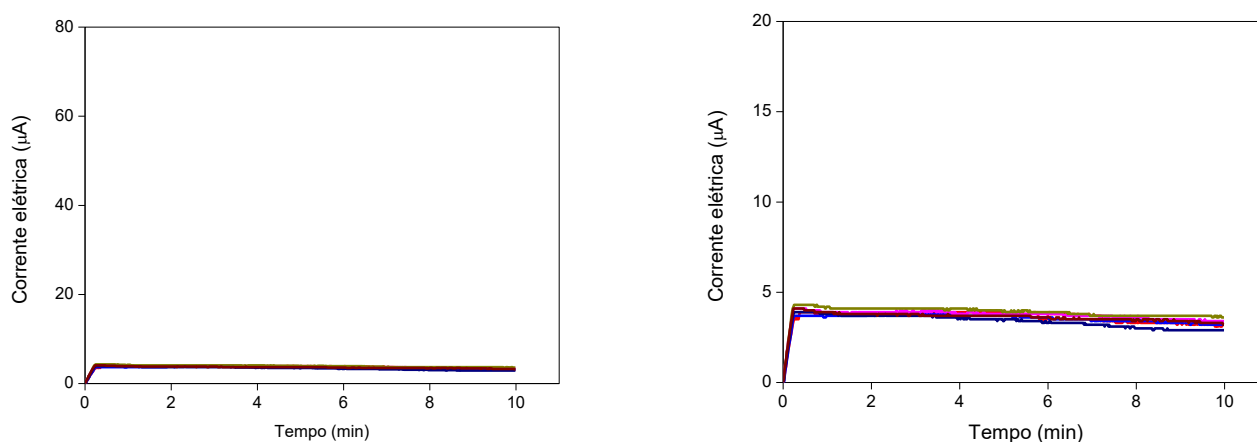


Figura 20. Gráfico da reprodutibilidade da corrente elétrica gerada pela aplicação de um potencial elétrico de 300 V durante 10 minutos. Condições durante a aplicação do potencial elétrico: solução de eletrólito TRIS (fase doadora) 100 mmol L⁻¹; filtro orgânico 1-octanol; fase acceptora ácido acético 100 mmol L⁻¹. Polaridade do eletrodo superior negativa e do inferior positiva. n = 6. Os gráficos estão apresentados em duas escalas para melhor visualização.

3.5 CONCLUSÕES

O estudo do transporte de corrente elétrica foi fundamental para conhecer, desenvolver, aperfeiçoar e avaliar os limites do sistema multifases de extração com aplicação de campo elétrico.

Embora as correntes elétricas para todas as soluções de eletrólitos utilizadas apresentem perfis bastante semelhantes, a solução eletrolítica de tris foi escolhida para os estudos posteriores, uma vez que apresenta pH 7 próximo do observado para as amostras de saliva, matriz biológica utilizada na realização deste trabalho.

A aplicação de potencial elétrico durante 60 minutos permitiu avaliar o perfil de corrente elétrica em uma aplicação típica de longa duração e também verificar que após cerca de 10 minutos a corrente elétrica estabiliza-se indicando que o sistema é estável e o superaquecimento por efeito Joule não é um limitante nas condições avaliadas.

A variação da porcentagem de solvente orgânico nas fases doadora, aceptora e o filtro orgânico permitiu concluir que a condutividade elétrica da fase mais resistiva representada pelo 1-octanol (filtro orgânico) é o fator limitante sobre o transporte de íons nesse sistema. Portanto, para aumentar o transporte de cargas nas extrações é favorável a otimização da composição dessa fase.

A avaliação de diferentes tipos de filtros orgânicos também demonstrou que o transporte de íons é diretamente dependente da sua composição, condutividade elétrica e que solventes que possuem algum grupo hidratável, no caso o 1-octanol, são mais apropriados.

Os diferentes modos de agitação apresentaram diferentes perfis de corrente elétrica, mas ambos apresentaram valores máximos e médios muito superiores ao sistema realizado de forma estática. Entre os dois avaliados a agitação prévia por vortex foi visualmente superior ao modo de agitação por barra magnética.

Todos os efeitos avaliados sobre a corrente elétrica foram indicativos que o sistema é robusto, reprodutível e que a aplicação do campo é efetiva para o transporte de analitos carregados.

CAPÍTULO IV – Estudo univariado dos parâmetros que influenciam a extração dos analitos em amostras de saliva artificial.

4.1.Considerações gerais

Os conceitos de transferência de analito utilizados para sistemas iontoforéticos baseado na equação modificada de Nernst-Planck para transporte de fármacos em aplicações cutâneas, como citado no capítulo anterior⁸³, podem ser aplicados para a eletroextração em membrana (EME) (técnica de eletroextração trifásica líquido-líquido-líquido). Esses conceitos são utilizados para prever a capacidade extrativa em sistemas de extração de três fases utilizando a EME empregando fibras ocas. Nesse sistema apenas foi adicionado ao fluxo de analitos (J_i), um componente relativo à migração eletroforética dos íons (v). Experimentalmente, constatou-se que a Equação 12 poderia ser utilizada para determinar a taxa de fluxo dos analitos (J_i) de uma fase doadora aquosa (amostra), atravessando uma membrana líquida imiscível suportada na parede de uma membrana porosa, até a passagem para uma terceira fase aquosa (fase acceptora)^{83,89}.

$$J_i = -\frac{D_i}{h} \left(1 + \frac{v}{\ln X} \right) \left(\frac{X-1}{X-e^{-v}} \right) (C_i - C_{io} e^{-v}) \quad (Eq. 12)$$

Nesta equação, D_i representa o coeficiente de difusão do íon, h a espessura da membrana, C_i a concentração dos íon transportados na interface fase doadora/membrana líquida suportada, C_{io} a concentração dos íon transportados na interface membrana de líquido suportada/fase acceptora, v é a força motriz (função de potencial elétrico) e X é a relação entre a concentração iônica total entre a solução da amostra e a solução acceptora, que é definida como o balanço iônico.

Em relação à polaridade do campo elétrico e das cargas dos analitos extraídos Gjelstad e Pedersen-Bjergaard demonstraram que o tipo de carga elétrica e polaridade do campo (desde que contrária a da carga do analito) não tem efeito na eficiência da extração dos analitos, portanto, analitos ácidos e básicos podem ser de extraídos de maneira similar⁴¹. Foi utilizado diclofenaco (droga ácida) e nalmefene (droga básica) em pH neutro. O diclofenaco foi extraído para a fase acceptora (NaOH) onde encontrava-se o eletrodo positivo, enquanto que o nalmefene

foi extraído para fase aceptora (HCl) contendo o eletrodo negativo. Ambas as drogas foram extraídas simultaneamente.

Em outra ocasião Seidi e colaboradores concluíram que são obtidos valores de extração mais elevados quando a concentração de íons da fase aceptora é maior do que a concentração de íons na fase doadora e que X é proporcional ao fluxo de analitos. E além dessas relações, os pHs dessas mesmas fases (aceptora e doadora) também afetam a eficiência de extração. Estes estudos foram realizados para a determinação de tebaína em amostras aquosas, urina e drogas como heroína e codeína utilizando eletroextração em membrana. Foi aplicado um potencial elétrico de 300 V durante 15 minutos e agitada a 1500 rpm, obtendo-se recuperação de 45-55%⁸⁴.

A força motriz (v) da migração dos analitos através da membrana líquida é produzida pelo campo elétrico⁸³. Entretanto, a magnitude do campo elétrico e o tempo que o sistema é mantido sobre sua influência, faz com que a temperatura aumente devido ao efeito Joule. A consequência da elevação da temperatura é o aumento do coeficiente de difusão dos analitos na membrana líquida suportada, a qual facilita a partição dos analitos entre as fases aquosas e orgânicas. Em contrapartida, o aumento excessivo na temperatura, pode causar bolhas nas regiões dos eletrodos ou desestabilizar a membrana líquida⁸².

Em outro artigo, Gjestald e colaboradores mostram que quando a membrana líquida está empregnada apenas com 2-nitrofenil octil éter (NPOE), a corrente elétrica tem um aumento inicial (até 200 mA) e diminui com o passar do tempo até 5 mA, contudo quando é adicionado 25% v/v de di-(2-etilhexil) fosfato (DEHP) a corrente se mantém constante em 200 mA durante a aplicação de campo elétrico. Os autores afirmam que o pico inicial é devido a um efeito condensador, o qual protona os analitos da amostra e da fase aceptora, mas que depois a corrente elétrica é devido ao transporte de íons através da membrana⁴². Estas afirmações foram feitas a partir da extração de 20 diferentes drogas básicas, aplicando-se 300 V de potencial elétrico por 5 minutos.

Com base nos diferentes trabalhos descritos para extração trifásica líquido-líquido-líquido observa-se que diversos fatores como a diferença de potencial aplicada ao sistema, o tempo de extração, o pH da fase aceptora e a natureza do solvente utilizado na membrana/filtro orgânico podem afetar o fluxo de íons da fase doadora para a fase aceptora. Logo, alguns desses

parâmetros serão estudados neste capítulo de forma univariada para a extração dos analitos alvo (cocaína e lidocaína) em saliva artificial para um melhor entendimento da sua influência no sistema de extração assim como a distribuição mais clara e didática do conteúdo dessa dissertação.

4.2 Objetivo

Este capítulo destina-se a avaliar de forma univariada os principais parâmetros de eletroextração multifásica com base nos trabalhos já descritos de eletroextração em membrana trifásica (EME; líquido-líquido-líquido).

De forma mais específica pretende-se avaliar, para a eletroextração de drogas (cocaína e lidocaína) em saliva artificial, os seguintes parâmetros de extração:

- Tipo de solução da fase aceptora;
- pH da solução da fase aceptora;
- Concentração da fase aceptora;
- Porcentagem de solvente miscível em água adicionado ao filtro orgânico;
- Tipo de solução de dessorção.

4.3 Materiais e métodos

4.3.1 Reagentes e solventes

Os solventes utilizados neste capítulo foram 1-octanol, metanol e acetonitrila (J.T. Baker) todos com grau de pureza cromatográfico. Os sais cloreto de cálcio dihidratado (Vetec), cloreto de potássio (Vetec), fosfato de potássio monobásico e bibásico (Synth), α -amilase (Sigma Aldrich), carboximetilcelulose sal dissódico (Synth), tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) (Amresco), citrato de sódio (Synth), fosfato de sódio bibásico (Synth), acetato de sódio (Merck), tetraborato de sódio (Synth) todos tinham sal de pureza analítico ou superior. Os padrões de lidocaína e cocaína foram da LGC.

4.3.2 Material

Em todas as extrações realizadas neste capítulo foram utilizados cones odondológicos de papel da marca Dentsply número 50 com 30 mm de comprimento, com base de aproximadamente 1 mm de diâmetro e vértice de 0,5 mm de diâmetro.

4.3.3 Equipamentos

- pHmetro marca JKI modelo JK-PHM-005;
- Agitador do tipo Vortex da marca VELP SCIENTIFICA;
- As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo líquido de ultra Performance UPLC® Aquity H-Class (Waters). O sistema de detecção consistiu de um espectrômetro de massa A Xevo TQD (Waters) do tipo triplo quadrupolo com ionização por eletronebulização.

4.3.4 Procedimentos

a) Preparo da saliva artificial

A saliva artificial utilizada neste estudo foi preparada segundo o trabalho descrito por Arain e colaboradores⁹⁰. Para isto foram utilizados 2,5 unidades mL⁻¹ de α -amilase e dos diferentes sais (g L⁻¹) KCl (0,625), CaCl₂.2H₂O (0,166), K₂HPO₄ (0,804), KH₂PO₄(0,326), e carboximetilcelulose sal dissódico (10,0).

b) Preparo das soluções estoque de lidocaína e cocaína

As soluções estoques de cocaína e lidocaína foram preparadas em uma concentração de 1 mg mL⁻¹ em metanol e mantidas a 4°C.

c) Condições cromatográficas e de espectrometria de massas

A separação cromatográfica foi obtida usando uma coluna de cromatográfica Acquity UPLC® BEH C18 de 50 mm de comprimento, 2,1 mm de tamanho de partícula e diâmetro interno 1,7 μm . A temperatura da coluna foi mantida a 30 ° C e a temperatura da amostra foi mantida a 25 ° C. Um volume de 1 μL de cada amostra extraída foi injetado diretamente para análise. Foi utilizado um gradiente de (A) ácido fórmico 0,1% (v / v) e (B) acetonitrila com ácido fórmico a 0,1% (v / v), com um fluxo de 0,4 mL min⁻¹. O gradiente inicial foi mantido 1% B durante 1,5 min e aumentou para 53,5% B até 3,5 min, durante 1 min o gradiente foi mantido 100% B, voltando para 1% B (tempo total de execução 6,54 min). As condições da fonte do massas foram as seguintes: tensão capilar (positiva), 3300 V; temperatura do gás de dessolvatação, 450 ° C; fluxo de gás de secagem, 40 L / h. Foi utilizado nitrogênio de alta pureza como gás de colisão. As transições (m/z) utilizadas foram: lidocaína (235-58) e cocaína (304-182). Voltagem do cone de 35 V para lidocaína e 17,5 V para cocaína. Energia de colisão 35V para lidocaína e 20 V para a cocaína. As análises dos dados foram realizadas utilizando o software MassLynx 4.1 (Waters).

d) Avaliação dos parâmetros que influenciam a capacidade de extração das drogas em amostras de saliva artificial

i. Avaliação do efeito de diferentes tipos de eletrólito da solução acceptora sobre a capacidade de extração das drogas em amostras de saliva artificial

Para a avaliação dos diferentes tipos de soluções da fase acceptora foram utilizadas soluções de ácido acético, fosfato de sódio bibásico, TRIS e borato em uma concentração de 200 mmol L⁻¹ no pH 7. Como fase doadora foi utilizada a saliva artificial fortificada com 2 mg L⁻¹ de cocaína e 2 mg L⁻¹ de lidocaína. Um mililitro de amostra de saliva artificial fortificada (fase doadora) foi adicionada ao microtubo de polipropileno adaptado e, em seguida, adicionou-se 1 mL de 1-octanol (filtro orgânico). Os cones de papel foram previamente mergulhados nas diferentes soluções de fase acceptora. Ao conjunto montado de eletrodos (eletrodo inferior e superior) aplicou-se uma diferença de potencial elétrico de

300 V durante o tempo de 20 minutos. Após o término da extração os cones de papel contendo os analitos foram colocados em contato com 1 mL de uma solução de acetonitrila/H₂O 2:8 v/v e agitados por 30 segundos com o auxílio de um vortex para dessorção dos analitos presentes no cone. Essa solução então foi transferida para um *vial* e levada para análise por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas empregando as condições descritas no item 4.3.4 a. Todos os experimentos foram realizados em triplicata (n=3) para cada solução de eletrólito da fase acceptora avaliada. O resultado desse estudo foram apresentados como a média das áreas dos picos dos analitos previamente normalizados contra a maior média da faixa avaliada.

ii. Avaliação do efeito do pH da solução da fase acceptora sobre a capacidade de extração das drogas em amostras de saliva artificial

Para a avaliação dos diferentes pH da fase acceptora foram utilizadas soluções de ácido acético 200 mmol L⁻¹ nos diferentes pHs: 3, 5, 7 e 9. O ajuste e controle do pH das soluções da fase acceptora foi realizado pela adição de volumes adequados de solução de ácido fórmico e NaOH 10 % v/v e o monitoramento empregando um pHmetro.

Como fase doadora foi utilizada a saliva artificial fortificada com 2 mg L⁻¹ de cocaína e 2 mg L⁻¹ de lidocaína. Um mL de amostra de saliva artificial fortificada (fase doadora) foi adicionada ao microtubo de polipropileno adaptado e, em seguida, adicionou-se 1 mL de 1-octanol (filtro orgânico). Os cones de papel foram previamente mergulhados nas diferentes soluções de ácido acético (fase acceptora). Ao conjunto montado de eletrodos (eletrodo inferior e superior) aplicou-se uma diferença de potencial elétrico de 300 V durante o tempo de 20 minutos. Após o término da extração os cones de papel contendo os analitos foram colocados em contato com 1 mL de uma solução de acetonitrila/H₂O 2:8 v/v e agitados por 30 segundos com o auxílio de um vortex para dessorção dos analitos presentes no cone. Essa solução então foi transferida para um *vial* e levada para análise por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas empregando as condições descritas no item 4.3.4 a. Todos os experimentos foram realizados em triplicata (n=3) para cada pH da fase acceptora avaliada. Os resultados desse estudo foram apresentados como a média das áreas dos picos dos analitos previamente normalizados contra a maior média da faixa avaliada.

iii. Avaliação da concentração do eletrólito da solução da fase aceptora sobre a capacidade de extração das drogas em amostras de saliva artificial

Neste estudo foram utilizadas como fase aceptora soluções de ácido acético nas concentrações de 50, 100, 200 e 400 mmol L⁻¹. Como fase doadora foi utilizada a saliva artificial fortificada com 2 mg L⁻¹ de cocaína e 2 mg L⁻¹ de lidocaína. Um mL de amostra de saliva artificial fortificada (fase doadora) foi adicionada ao microtubo de polipropileno adaptado e, em seguida, adicionou-se 1 mL de 1-octanol (filtro orgânico). Os cones de papel foram previamente submersos nas soluções de ácido acético em diferentes concentrações (fases aceptoras). Ao conjunto montado de eletrodos (eletrodo inferior e superior) aplicou-se uma diferença de potencial elétrico de 300 V durante o tempo de 20 minutos. Após o término da extração os cones de papel contendo os analitos foram colocados em contato com 1 mL de uma solução de acetonitrila/H₂O 2:8 v/v e agitados por 30 segundos com o auxílio de um vortex para dessorção dos analitos presentes no cone. Essa solução então foi transferida para um *vial* e levada para análise por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas empregando as condições descritas no item 4.3.4 a. Todos os experimentos foram realizados em triplicata (n=3) para cada concentração da fase aceptora avaliada. Os resultados desse estudo foram apresentados como a média das áreas dos picos dos analitos previamente normalizados contra a maior média da faixa avaliada.

iv. Avaliação da porcentagem de metanol no filtro orgânico sobre a capacidade de extração das drogas em amostras de saliva artificial

Na avaliação do efeito da porcentagem de metanol contida no filtro orgânico foram utilizadas como filtro orgânico soluções de 1-octanol contendo 0 (zero), 5 e 10% v/v de metanol. Como fase doadora foi utilizada a saliva artificial fortificada com 2 mg L⁻¹ de cocaína e 2 mg L⁻¹ de lidocaína. Um mL de amostra de saliva artificial fortificada (fase doadora) foi adicionada ao microtubo de polipropileno adaptado e, em seguida, adicionou-se 1 mL do filtro orgânico. Os cones de papel foram previamente submersos na fase aceptora constituída de uma solução de ácido acético na concentração de 200 mmol L⁻¹. Ao conjunto montado de eletrodos (eletrodo inferior e superior) aplicou-se uma diferença de potencial elétrico de 300 V durante o tempo de 20 minutos. Após o término da extração os cones de papel contendo os analitos foram colocados em contato com 1 mL de uma solução de acetonitrila/H₂O 2:8 v/v e agitados por 30 segundos com o auxílio de um vortex para dessorção dos analitos presentes no cone. Essa solução então foi transferida para um *vial* e levada para análise por cromatografia líquida

acoplada a espectrometria de massas empregando as condições descritas no item 4.3.4 a. Todos os experimentos foram realizados em triplicata ($n=3$) para cada diferente solução de filtro orgânico avaliada. Os resultados desse estudo foram apresentados como a média das áreas dos picos dos analitos previamente normalizados contra a maior média da faixa avaliada.

v. *Avaliação de diferentes soluções utilizadas para dessorver as drogas extraídas no cone de papel*

Para determinação da melhor solução de dessorção foi utilizado como fase doadora a saliva artificial fortificada com 2 mg L^{-1} de cocaína e 2 mg L^{-1} de lidocaína. Um mL de amostra de saliva artificial fortificada (fase doadora) foi adicionada ao microtubo de polipropileno adaptado e, em seguida, adicionou-se 1 mL de 1-octanol (filtro orgânico). Os cones de papel foram previamente submersos na fase aceptora constituída de uma solução de ácido acético na concentração de 200 mmol L^{-1} . Ao conjunto montado de eletrodos (eletrodo inferior e superior) aplicou-se uma diferença de potencial elétrico de 300 V durante o tempo de 20 minutos.

Após o término da extração os cones de papel contendo os analitos foram colocados em contato com 1 mL de diferentes soluções e agitados por 30 segundos com o auxílio de um vortex para dessorção dos analitos presentes no cone. Nesta etapa foram avaliadas três diferentes soluções: acetonitrila/ H_2O (2:8) v/v, acetonitrila/ácido fórmico 0,1% v/v (2:8) v/v, acetonitrila/acetato de amônio 25 mmol L^{-1} (2:8) v/v para dessorção dos analitos contidos no cone. Essa solução então foi transferida para um *vial* e levada para análise por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas empregando as condições descritas no item 4.3.4 a. Todos os experimentos foram realizados em triplicata ($n=3$) para cada diferente solução de dessorção avaliada. Os resultados desse estudo foram apresentados como a média das áreas dos picos dos analitos previamente normalizados contra a maior média da faixa avaliada.

4.4 Resultados e discussão

4.4.1 Avaliação dos parâmetros que influenciam a capacidade de extração das drogas em amostras de saliva artificial

i. Avaliação do efeito de diferentes tipos de eletrólitos da solução aceptora sobre a capacidade de extração das drogas em amostras de saliva artificial

Foram utilizadas soluções de ácido acético, tetraborato de sódio, fosfato de sódio bibásico e TRIS como fase aceptora para avaliar o efeito sobre a capacidade de extração da cocaína e lidocaína. Na Figura 21 estão apresentados os resultados do estudo, mostrando que a solução de ácido acético proporcionou valores nitidamente maiores de sinal tanto para cocaína quanto para lidocaína. O ácido acético diferentemente do borato e fosfato é um ácido orgânico o que permite e facilita sua miscibilidade com o 1-octanol do filtro orgânico.

Apesar do TRIS também ser um composto orgânico, ele é base fraca (pK_a 8,1) e, nas condições utilizadas ($pH=7$), ele se encontra fortemente ionizado na amina primária e altamente solvatado nos grupos hidroxilas o que dificulta sua miscibilidade com o filtro orgânico.

Com base nos resultados da Figura 21 conclui-se que o melhor eletrólito para a composição da fase aceptora é o ácido acético.

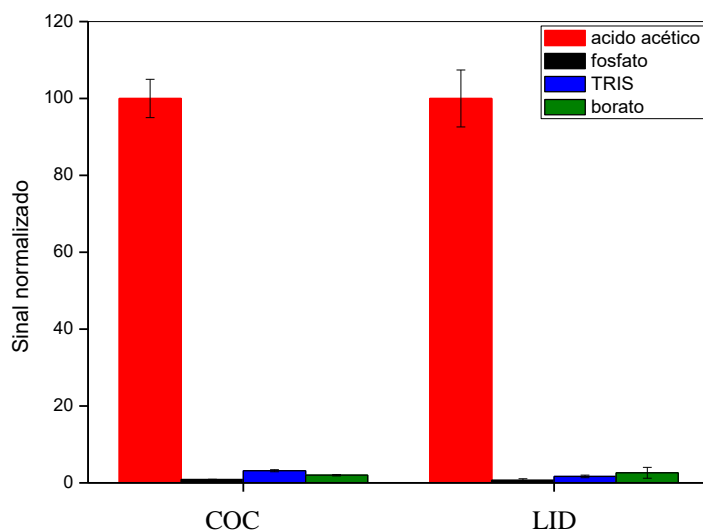


Figura 21. Estudo do efeito do tipo de eletrólito de solução aceptora sobre a capacidade de extração da cocaína e lidocaína em amostras de saliva artificial. Condições empregadas durante a aplicação do campo elétrico: 2 mg L⁻¹ de lidocaína e cocaína em saliva artificial (fase doadora); 1-octanol (filtro orgânico); ácido acético, fosfato, borato e TRIS 200 mmol L⁻¹ (fase aceptora); potencial elétrico de 300 V durante 20 minutos; eletrodo superior negativo e inferior positivo. Borato = tetraborato de sódio; acetato = ácido acético, fosfato = fosfato de sódio bibásico e TRIS = tris(hidroximetil)aminometano. Os valores de área foram normalizados a partir da maior área.

ii. Avaliação do efeito do pH da solução da fase aceptora sobre a capacidade de extração das drogas em amostras de saliva artificial

Para avaliar o efeito do pH da solução da fase aceptora sobre as extrações de cocaína e lidocaína foram estudadas soluções de ácido acético nos pHs 3, 5, 7 e 9. A Figura 22 apresenta os resultados desse estudo onde pode-se observar um comportamento semelhante para cocaína (Figura 22. A) e lidocaína (Figura 22. B), mostrando que em pH igual a 3 as extrações são obtidas em valores máximos, assim como predito pelo modelo (Equação 12) e afirmado por Yamini e colaboradores⁸⁴. Valores maiores de pH da fase aceptora podem aumentar a fração neutra dos analitos ou mesmo, dependendo do pH e das características físico-químicas dos analitos, causar sua desprotonação parcial e promover a difusão contrária, isto é, fazer os analitos migrar de volta para a fase doadora. Com esses resultados optou-se por empregar a solução de ácido acético em pH 3,0 como fase aceptora.

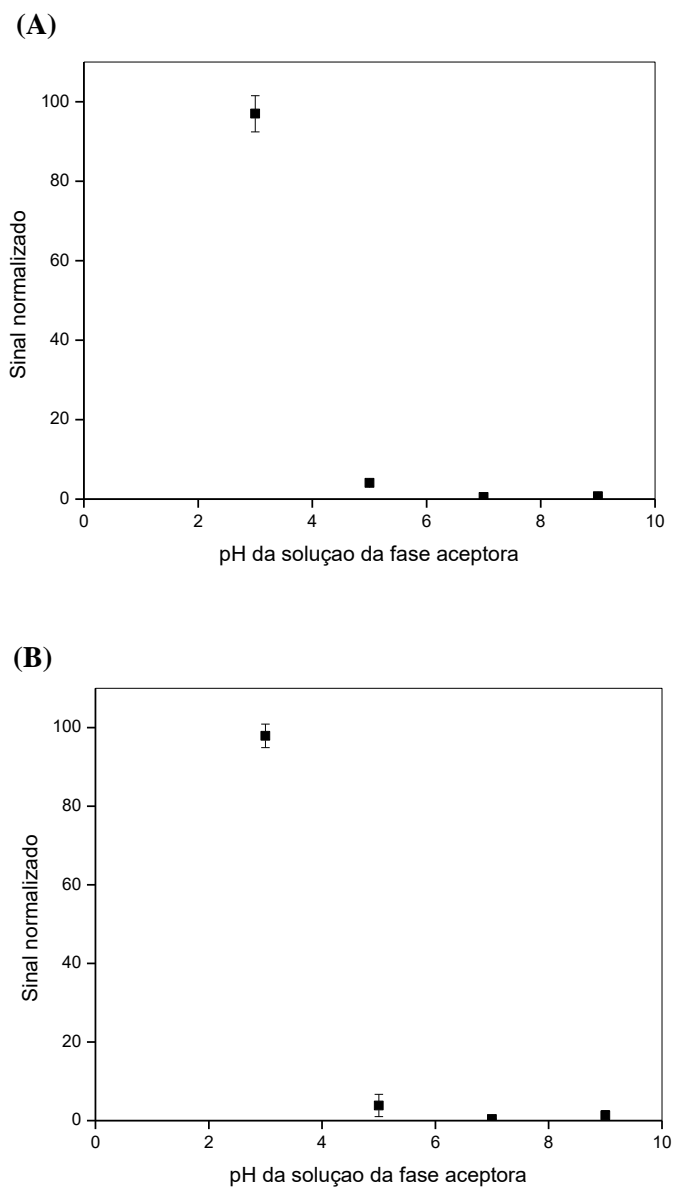
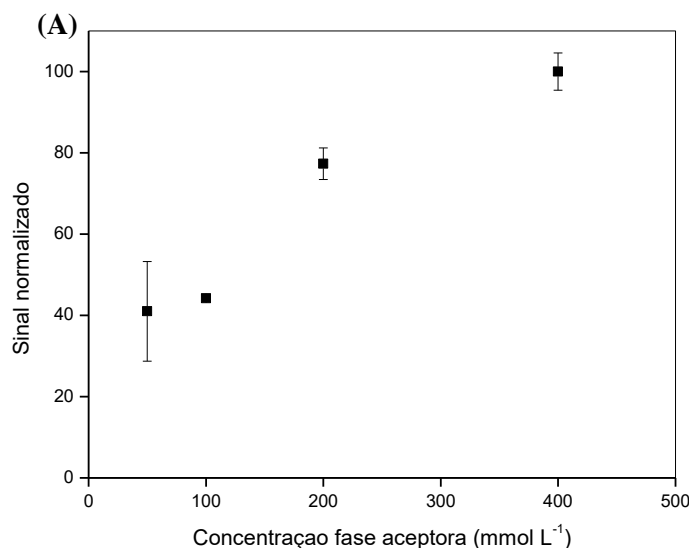


Figura 22. Estudo do efeito do pH da fase aceptora sobre a capacidade de extração da cocaína (A) e lidocaína (B) em amostras de saliva artificial. Condições empregadas durante a aplicação do campo elétrico: 2 mg L⁻¹ lidocaína e cocaína em saliva artificial (fase doadora); 1-octanol (filtro orgânico); ácido acético 200 mmol L⁻¹ nos diferentes pHs: 3, 5, 7 e 9 (fase aceptora); potencial elétrico de 300 V durante 20 minutos; eletrodo superior negativo e inferior positivo.

iii. Avaliação da concentração do eletrólito da solução da fase aceptora sobre a capacidade de extração das drogas em amostras de saliva artificial

No estudo do efeito da concentração do eletrólito da solução da fase aceptora sobre as extrações de cocaína e lidocaína foram avaliados os níveis de 50, 100, 200, 400 mmol L⁻¹ de uma solução de ácido acético. Nos resultados apresentados na Figura 23, a cocaína e a lidocaína foram extraídas em quantidades maiores à medida que a concentração da fase aceptora aumentou. Isso provavelmente se deve a maior troca de cargas (íons hidrônio e acetato) da fase aceptora para a fase doadora, uma vez que a quantidade de íons que sai da fase doadora para a fase aceptora deve ser a mesma para manter a neutralidade do sistema. Logo, o aumento de íons na fase aceptora permite uma maior troca. Nos dois gráficos A e B da Figura 23, pode-se observar que para ambas as drogas houve uma melhora significativa quando compara-se a concentração inicial (50 mmol L⁻¹) com a concentração final (400 mmol L⁻¹). Resultado semelhante ao estudo feito para determinação de tebaina em amostra de urina e drogas por Seidi e colaboradores em 2011, utilizando-se eletroextração em membrana⁸⁴. Sendo assim pode-se dizer que é recomendado utilizar concentrações mais elevadas do eletrólito da fase aceptora.



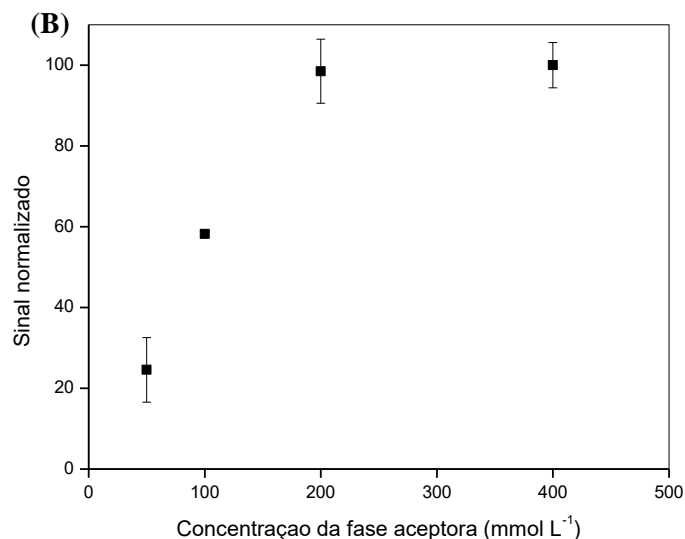


Figura23. Estudo do efeito da solução da concentração da fase aceptora sobre a capacidade de extração da cocaína (A) e lidocaína (B) em amostras de saliva artificial. Condições empregadas durante a aplicação do campo elétrico: 2 mg L⁻¹ lidocaína e cocaína em saliva artificial (fase doadora); 1-octanol (filtro orgânico); ácido acético na concentrações de 50, 100, 200 e 400 mmol L⁻¹ (fases aceptoras); potencial elétrico de 300 V durante 20 minutos; eletrodo superior negativo e inferior positivo.

iv. Avaliação da porcentagem de metanol no filtro orgânico sobre a capacidade de extração das drogas em amostras de saliva artificial

No estudo da influência do metanol do filtro orgânico sobre a capacidade de extração foram estudadas as porcentagem de 0, 5 e 10 de metanol (% v/v) adicionado ao 1-octanol. Para ambas as drogas observou-se que a presença de metanol no filtro orgânico promoveu uma melhora significativa na migração dos analitos da fase doadora para a fase aceptora (Figura 24). Dois fatores podem explicar essa melhora. A adição de metanol ao 1-octanol diminui a tensão interfacial entre a amostra e o filtro orgânico, devido ao seu caráter polar e elevada miscibilidade em água do metanol. Além disso, o metanol diminui a viscosidade do filtro orgânico fazendo com que a condutividade elétrica do filtro orgânico aumente fazendo assim, com que o transporte seja facilitado. Em concentrações mais elevadas de metanol a separação de fase fases (amostra/filtro orgânico) poderia ficar prejudicada e, por esse motivo, optou-se por não avaliar concentrações ainda maiores de metanol.

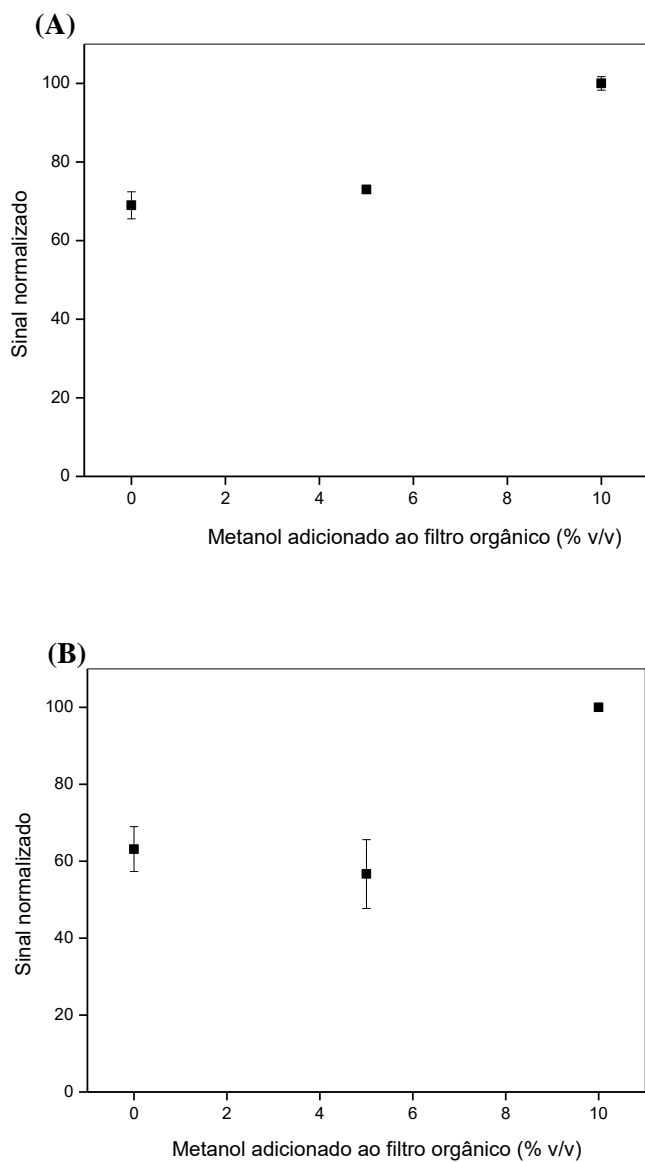
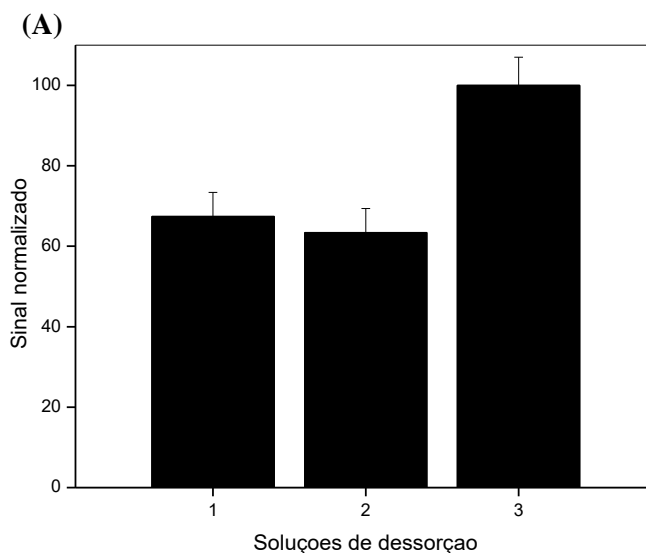


Figura24. Estudo do efeito da porcentagem de metanol no filtro orgânico sobre a capacidade de extração das da cocaína (A) e lidocaína (B) em amostras de saliva artificial. Condições empregadas durante a aplicação do campo elétrico: 2 mg L⁻¹ lidocaína e cocaína em saliva artificial (fase doadora); 1-octanol com 0 (zero), 5 e 10% v/v de metanol (filtros orgânicos); ácido acético 200 mmol L⁻¹ (fase aceptora); potencial elétrico de 300 V durante 20 minutos; eletrodo superior negativo e inferior positivo.

v. *Avaliação de diferentes soluções utilizadas para dessorver as drogas extraídas no cone de papel*

Avaliou-se também a capacidade de dessorção dos analitos do cone com três diferentes soluções compostas de acetonitrila (ACN)/H₂O (2:8) v/v, ACN/H₂O/ácido fórmico (2:0,1:7,9) v/v/v, e ACN/acetato de amônio 25mmol L⁻¹ (2:8) v/v. A Figura 25 mostra os resultados para o sinal da cocaína e lidocaína empregando cada uma das soluções de dessorção avaliadas. Com base nos resultados pode-se notar que a solução de acetonitrila/acetato de amônio apresentou maior capacidade de dessorver os analitos presentes no cone de papel, quando comparado com as demais soluções. A melhor dessorção com essa solução pode ser explicada pela presença do acetato de amônio que a torna mais básica (pH = 7,0) facilitando a competição entre os íons acetato com grupos aniônicos do papel pelas moléculas protonadas dos analitos em um mecanismo semelhante a uma troca iônica. Dessa forma para extrações futuras recomenda-se utilizar a solução de acetonitrila com acetato de amônio.



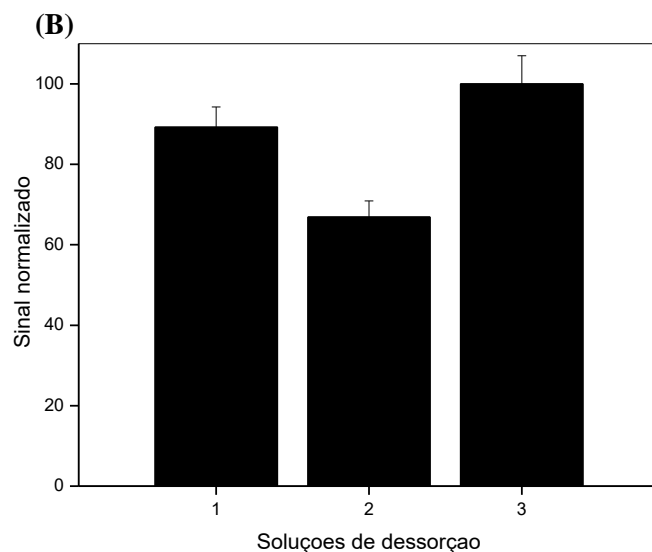


Figura25. Estudo do efeito de solução de dessorção sobre a dessorção da cocaína (A) e lidocaína (B) presentes no cone de papel. Condições empregadas durante a aplicação do campo elétrico: 2 mg L^{-1} lidocaína e cocaína em saliva artificial (fase doadora); 1-octanol (filtro orgânico); ácido acético 200 mmol L^{-1} (fase acceptora); potencial elétrico de 300 V durante 20 minutos; eletrodo superior negativo e inferior positivo. 1 = solução de ACN/ H_2O (2:8) v/v; 2 = solução de ACN/ H_2O /ácido fórmico (2:0,1:7,9) v/v/v; 3 = solução de ACN/ acetato de amônio 25 mmol L^{-1} (2:8) v/v.

4.5 Conclusões

Os parâmetros de eletroextração estudados de maneira univariada foram de suma importância para otimização da extração da cocaína e da lidocaína. Avaliando-se os diferentes tipos de solução para fase acceptora, permitiu-se concluir que a solução de ácido acético proporciona uma melhor extração, uma vez que ele consegue permear mais facilmente no filtro orgânico e transportar carga de forma mais efetiva. No estudo do pH da fase acceptora, observou-se que a diminuição do pH promove uma melhor extração dos analitos e que o aumento da concentração do eletrólito da fase acceptora aumenta simultaneamente a transferência dos analitos para o cone. A variação da porcentagem de solvente orgânico (metanol) aumenta o transporte de cargas, assim como no estudo realizado no Capítulo III, permitindo uma maior extração dos analitos. Na avaliação das diferentes soluções de dessorção conclui-se que a solução de acetonitrila com acetato de amônio é mais eficaz para dessorver os analitos extraídos do cone de papel.

CAPÍTULO V – Estudo multivariado do tempo e potencial elétrico aplicado na extração dos analitos em amostras de saliva artificial.

5.1 Planejamento experimental

O desenvolvimento de ferramentas quimiométricas como os planejamentos experimentais tem tornado a otimização de procedimentos analíticos uma tarefa cada vez mais dinâmica uma vez que é possível demonstrar com ferramentas estatísticas adequadas quando e quanto os parâmetros (variáveis) de um sistema são capazes de influenciar a resposta desejada e, em muitos casos, quando e como esses diferentes parâmetros interagem entre si para modular essa resposta. Uma outra grande virtude dos planejamentos experimentais é que eles permitem de modo muito elegante reduzir o tempo e os custos de otimização dos procedimentos analíticos⁹¹.

Para chegar a um valor, região ou domínio ótimo das variáveis estudadas, pode-se fazer uso das Metodologias de Superfície de Resposta (MSR). A MSR têm sido bastante aplicada devido a sua alta eficiência, capacidade de modelagem e exploração dos sistemas estudados⁹². Ela é a combinação de técnicas de planejamento de experimentos, análise de regressão e métodos de otimização, sendo utilizadas para quantificar e interpretar as relações entre as respostas e os efeitos dos fatores. Dois tipos de variáveis devem ser reconhecidas: variáveis dependentes (as respostas) e as variáveis independentes (os fatores). Muitas vezes há a necessidade de otimizar várias respostas ao mesmo tempo e as superfícies podem ser determinadas separadamente para cada resposta ou simultaneamente. Uma maneira que tem se tornado comum de trabalhar as respostas é utilizando a função de desejabilidade, a qual baseia-se na transformação das respostas em um escala adimensional de desejabilidades individuais que podem assumir valores entre 0 (resposta não aceitável) e 1 (máxima ou melhor resposta desejável). A partir das desejabilidades individuais é possível obter a desejabilidade global para um conjunto de respostas a serem otimizadas⁹³⁻⁹⁵.

Alguns planejamentos experimentais que utilizam MSR e que têm sido amplamente empregados em química analítica são o de Composto Central⁹⁶, Box-Behnken⁹⁷ e Doehlert^{98,99}. O planejamento composto central (CD) faz-se uso da MSR para verificar não perfil da superfície de resposta combinando três partes: planejamento fatorial de dois níveis

fracionário ou completo, planejamento em estrela e o ponto central. Este planejamento foi desenvolvido como uma alternativa aos planejamentos fatoriais de três níveis que demandam muitos experimentos, mesmo para poucos fatores.

O planejamento Box-Behnken foi proposto para selecionar pontos de um planejamento fatorial de três níveis e fazer uma estimativa eficiente e econômica dos coeficientes de primeira e segunda ordem do modelo matemático ajustado. Ele exige que estes fatores sejam estudados em um mínimo de três níveis (-1, 0 e +1). Embora este planejamento necessite menos experimentos que o planejamento CD, ele não testa condições experimentais extremas, por exemplo, as suas combinações de níveis (+1, +1, +1) e (-1, -1, -1). Além disso, o Box-Behnken não pode obter uma matriz para duas variáveis, uma vez que não há como eliminar pontos de um planejamento 3^2 de maneira a obter número suficiente deles para estimar os coeficientes de um modelo quadrático.

O planejamento experimental Doehlert tem se mostrado uma alternativa prática e econômica em relação aos outros planejamentos de segunda ordem. Ele descreve um domínio circular para duas variáveis, esférico para três e hiperesférico para mais de três variáveis. Este planejamento requer menor número de experimentos comparado aos demais, cada variável pode ser estudada em diferentes números de níveis e o deslocamento do planejamento pode ser feito utilizando-se os pontos do planejamento inicial, conferindo grande mobilidade^{97,100}.

Neste trabalho será apresentado o emprego do planejamento experimental Doehlert para avaliar as variáveis tempo de extração e potencial elétrico avaliadas em três níveis (10, 20 e 30 minutos) e cinco níveis (100, 150, 200, 250 e 300 V) respectivamente. A justificativa dessas duas variáveis para otimização foi baseada em trabalhos que empregaram planejamento de experimentos para otimização de preparo de amostras empregando eletroextração em membrana. Nesses trabalhos constatou-se que o transporte de analitos da fase doadora (amostra) para a fase aceptora é fortemente afetado pela magnitude do potencial aplicado e que o tempo de extração também influencia consideravelmente esse processo^{84,85}. O que observou-se é que tanto o tempo quanto o potencial elétrico empregados afetam positivamente as extrações, mas quando são considerados de forma simultânea, o tempo de extração pode limitar a voltagem ou vice-versa em função de efeitos eletroforéticos que serão discutidos a seguir. Desta maneira, eles foram escolhidos para serem estudados no presente capítulo.

5.2 Objetivos

Este capítulo destinou-se a encontrar os valores ótimos de tempo e potencial elétrico para eletroextração multifásica da cocaína e lidocaína em saliva empregando o procedimento de planejamento experimental Doehlert.

5.3 Materias e métodos

5.3.1 Reagentes e solventes

Os reagentes e solventes utilizados neste procedimentos estão todos especificados no Capítulo IV no item 4.3.1.

5.3.2 Equipamentos

Todas as análises estatísticas do planejamento de experimentos Doehlert foram realizadas utilizando o software Statistica 8.0 (Tulsa, OK, USA).

5.3.3 Procedimentos

a) Planejamento experimental

Para realização do planejamento experimental foi utilizada como fase doadora (amostra) saliva artificial fortificada com 2 mg L^{-1} de cocaína (COC) e 2 mg L^{-1} de lidocaína (LID). O filtro orgânico foi composto por 1 mL de 1-octanol. Como fase aceptora foi utilizada uma solução de ácido acético em uma concentração de 400 mmol L^{-1} preparada em pH 3. Um mL de amostra (fase doadora) foi adicionado ao microtubo de polipropileno adaptado com eletrodo (Capítulo 3) e, em seguida, adicionou-se 1 mL de 1-octanol:metanol (90:10) % v/v (filtro orgânico). Os cones odontológicos de papel (Dentsply número 50) foram previamente mergulhados na fase aceptora e inseridos no filtro orgânico. Ao conjunto montado de eletrodos (eletrodo inferior e superior) aplicou-se diferentes valores de potencial elétrico (100, 200 e

300V) e em diferentes tempos (10, 20 e 30 minutos), conforme apresentado na Tabela 3 do planejamento Doehlert.

Após o término da extração, os cones de papel contendo os analitos foram removidos da placa suporte colocados em contato com 1 mL de uma solução de dessorção composta acetoneitrila/acetato de amônio 25 mmol L⁻¹ (2:8) v/v e agitados com o auxílio de vortex por 30 segundos para dessorção dos analitos contidos no cone. A solução de dessorção foi então transferida para um frasco *vial* e levada para análise por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas.

Tabela 3. Planejamento experimental Doehlert com os valores originais e os valores codificados correspondentes

Variáveis independentes		Valores originais e codificados					
		-1	-0,866	-0,5	0	0,5	0,866
Tempo (min)	X ₁		10		20		30
Potencial elétrico (V)	X ₂	100		150	200	250	300

5.5 Resultados

5.5.1 Planejamento experimental

Após a avaliação do pH, concentração e natureza da fase aceptora, natureza do solvente do filtro orgânico, porcentagem de metanol no filtro orgânico e o tipo de solução de dessorção, todos de forma univariada apresentada no Capítulo IV, foram estudados, através de um planejamento experimental Doehlert, os parâmetros tempo de extração e potencial elétrico aplicado (Tabela 4).

Tabela 4. Planejamento experimental Doehlert com os sinais analíticos para COC e LID

Experimentos	Variáveis		Sinal analítico relativo COC (%)*	Sinal analítico relativo LID (%)*
	Voltagem	Tempo		
1	150	10	40	24
2	250	10	34	18
3	300	20	92	84
4	250	30	91	100
5	150	30	100	90
6	100	20	79	37
7	200	20	83	57
8	200	20	83	57
9	200	20	78	57

* O sinal analítico é resultante da área normalizada dos picos cromatográficos da COC e LID.

Esses dois parâmetros são amplamente estudados em trabalhos que utilizam procedimentos de preparo de amostras assistidos por campos elétricos, especialmente em técnicas de eletroextração em membrana. Nesses estudos ficou evidente a influência desses parâmetros sobre fluxo dos analitos^{84,85}. Para o trabalho aqui apresentado foi escolhida a faixa de tempo de 10 a 30 minutos e potenciais elétricos que variaram de 100 a 300 V em um conjunto de 7 diferentes experimentos sendo um deles uma triplicata do ponto central como apresentado na Tabela 3.

As significâncias de cada parâmetro individual e de suas interações podem ser observadas no gráfico de Pareto da Figura 26. Nesta figura é possível observar que somente os coeficientes lineares e quadráticos do parâmetro tempo foram significativos ao nível de confiança de 95%. Neste gráfico observa-se ainda que o coeficiente linear do parâmetro tempo apresentou uma influência positiva, isto é, tempos maiores elevam a quantidade de COC extraída da amostra ao passo que seu coeficiente quadrático influenciou negativamente a quantidade extraída. Já para o parâmetro potencial elétrico os coeficientes quadrático e lineares não apresentaram significância, bem como coeficiente linear da interação tempo *versus* potencial. Uma observação semelhante foi reportada previamente no estudo feito por Seidi e

colaboradores em 2011 que empregou a eletroextração em membrana para a extração de tebaína em amostras de urina. Neste artigo os autores constataram que, com o passar do tempo, a fase aceptora começa a ser saturada com o analito e pode ocorrer o retorno do mesmo para a fase doadora, assim como a mudança do pH da fase aceptora devido a eletrólise na superfície do eletrodo da placa superior onde estão conectados os cones. Outro fenômeno associados aos processos eletroforéticos que pode explicar tanto a contribuição negativa do coeficiente quadrático do tempo como a falta de significância da voltagem é o aquecimento resultante do efeito Joule. Por fim, acredita-se que para a cocaína o potencial elétrico de 100 V seja suficiente para provocar a máxima migração desse composto e que, por isso, não foi observada significância estatística para esse parâmetro em nenhum dos seus coeficientes.

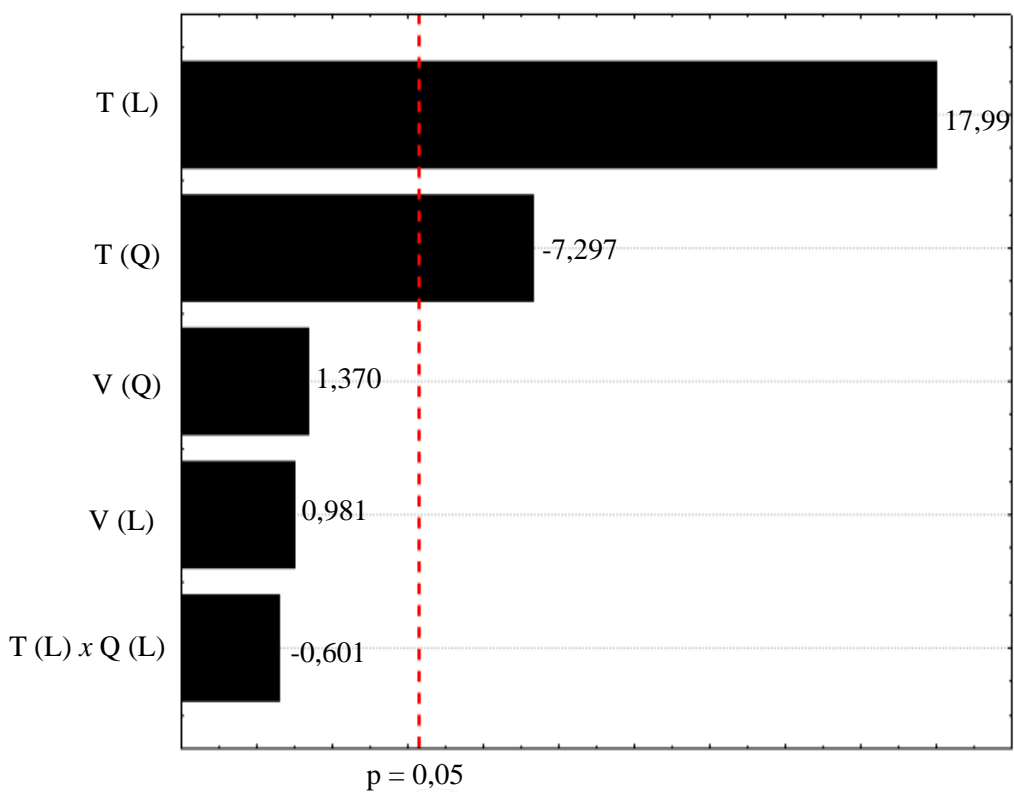


Figura 26. Gráfico de Pareto para COC para efeitos padronizados em $p = 0,05$. T = tempo; V = diferença de potencial elétrico; (L) = linear; (Q) = quadrático.

Os resultados da Análise de Variância (ANOVA) para os valores do sinal analítico normalizados da COC apresentados na Tabela 4 com o modelo quadrático são mostrados na Tabela 5.

Tabela 5. Análise da variância para os dados de COC apresentados na Tabela 3

FV	SQ	nGL	MQ	Fcalc	Ftab
Regressão	5,00E+10	5	1,00E+10	15,98	9,01
Resíduos	2,00E+09	3	6,00E+08		
F. Ajuste	2,00E+09	1	2,00E+09	12,51	18,51
Erro Puro	2,00E+08	2	1,00E+08		
Total	5,00E+10	8			

FV - fonte de variação; SQ – soma quadrática; nGL – número de graus de liberdade; MQ – mínimos quadrados; Fcalc – valor de F calculado; Ftab – valor de F tabelado.

Na Tabela 5 é possível observar que equação ajustada do modelo é estatisticamente significativa ($F = 15,98 > 9,01$) de acordo com o teste baseado na distribuição de Fisher (teste F). A avaliação da falta de ajuste da soma quadrática ($F = 12,51 < 18,51$) indicou uma forte boa concordância entre os valores experimentais e as respostas do modelo previsto para cada variável. A qualidade do ajuste foi medida pelo coeficiente de determinação (R^2) superior a 0,97 demonstrando que uma grande parte da variação total dos dados foi explicada pelo modelo ajustado.

Com o objetivo de definir a condição ótima para extrair os analitos da saliva, as respostas obtidas foram agrupadas a partir do modelo de regressão em uma função de desejabilidade no modelo quadrático⁹². Para a análise da desejabilidade é preciso observar que os valores indesejáveis são próximos de zero e os ideais próximo de um¹⁰¹. A Figura 27 apresenta a superfície de resposta obtida através da função desejabilidade para a cocaína. A faixa de tempo estudado foi de 10 a 30 minutos e a faixa de potencial elétrico foi de 100 a 300V. Na extração da cocaína não houve influência do potencial aplicado dentro da faixa estudada, isto é, não houve aumento da quantidade extraída, quando o potencial elétrico foi aumentado. Portanto, aplicar 100 V ou 300 V não mudaria a eficiência de extração. Em contra partida, o tempo apresenta-se significativo na eficiência das extrações, em tempos mais longos aplicando-se potencial, obtém-se melhores valores de extração.

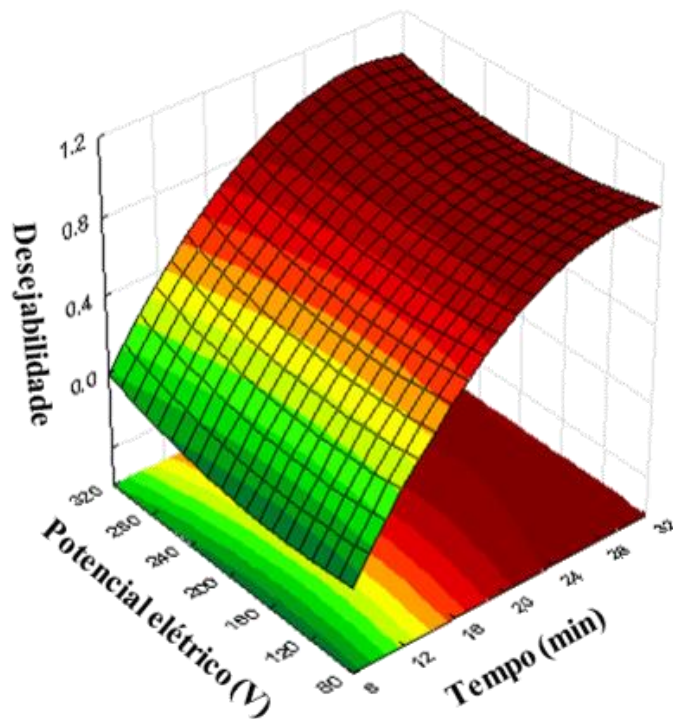


Figura 27. Superfície de resposta da desejabilidade para cocaína obtida no planejamento Doehlert para os parâmetros tempo e potencial elétrico.

Para a lidocaína, através do gráfico de Pareto da Figura 28, observa-se que os coeficientes lineares de tempo e diferença de potencial influenciam de forma positiva as extrações, isto é, para elevar a quantidade de lidocaína extraída é necessário utilizar um potencial elétrico mais elevado durante um período maior de tempo.

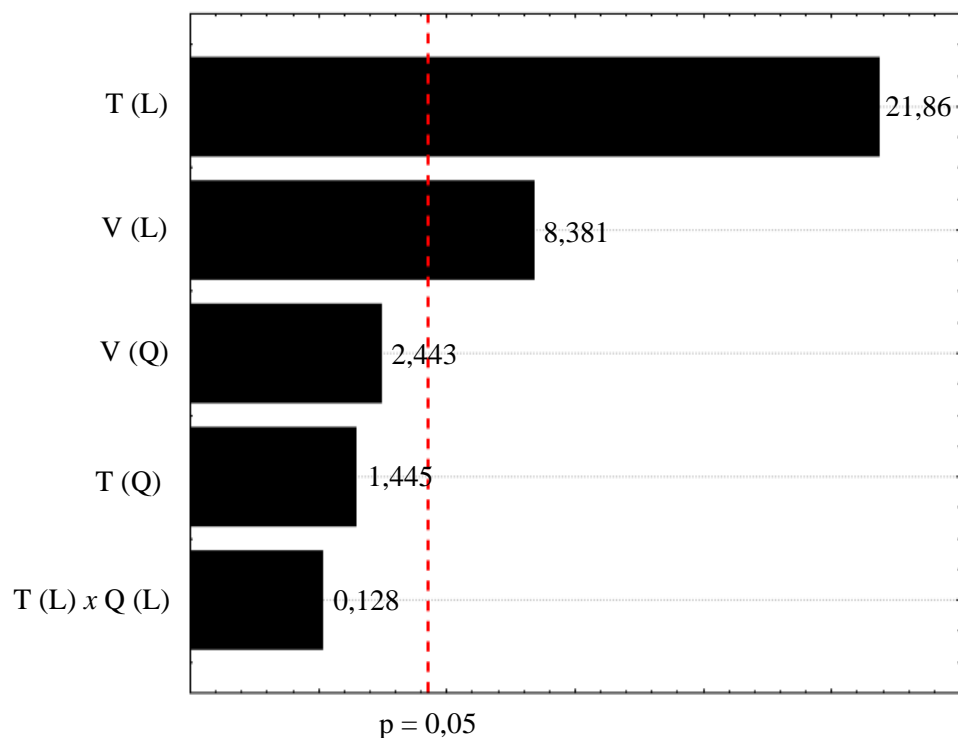


Figura 28. Gráfico de Pareto para LID para efeitos padronizados em $p = 0,05$. T = tempo; V = diferença de potencial elétrico; (L) = linear; (Q) = quadrático.

Os resultados da Análise de Variância (ANOVA) para os valores do sinal analítico normalizados da LID apresentados na Tabela 4 com o modelo quadrático são mostrados na Tabela 6.

Tabela 6. Análise da variância para os dados de LID apresentados na Tabela 3

FV	SQ	nGL	MQ	Fcalc.	Ftab.
Regressão	$5,00 \times 10^{-10}$	5	$1,00 \times 10^{-10}$	19,03	9,01
Resíduos	$2,00 \times 10^{-9}$	3	$6,00 \times 10^{-8}$		
F. Ajuste	$1,00 \times 10^{-9}$	1	$1,00 \times 10^{-9}$	14,37	18,51
ErroPuro	$2,00 \times 10^{-8}$	2	$1,00 \times 10^{-8}$		
Total	$5,00 \times 10^{-10}$	8			

FV - fonte de variação; SQ – soma quadrática; nGL – número de graus de liberdade; MQ – mínimos quadrados; Fcalc – valor de F calculado; Ftab – valor de F tabelado.

De acordo com o teste baseado na distribuição de Fisher (teste F) da Tabela 6, a equação ajustada se mostrou estatisticamente significativa ($F = 19,03 > 9,01$). A análise da falta de ajuste da soma quadrática ($F = 14,37 < 18,51$) indicou uma boa concordância entre as respostas e os

valores experimentais do modelo previsto para cada variável. A qualidade do ajuste foi medida pelo coeficiente de correlação (R^2) que apresentou um valor de 0,97, ou seja, 97% da variação total na atividade residual foi explicada pelo modelo ajustado.

As respostas obtidas para a lidocaína também foram agrupadas a partir do modelo de regressão em uma função de desejabilidade (Figura 29). Assim como apresentado anteriormente pelo gráfico de Pareto (Figura 29), a função desejabilidade apresenta que lidocaína será extraída em seu nível máximo em valores maiores de potencial (300 V) por tempos mais longos (30 minutos).

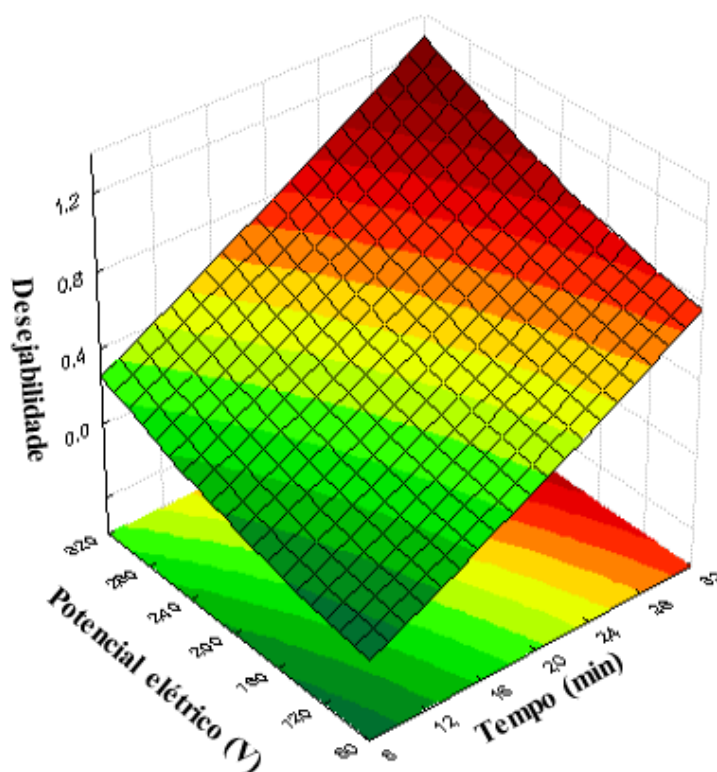


Figura 29. Superfície de resposta da desejabilidade para LID obtida no planejamento Doehlert para os parâmetros tempo e potencial elétrico.

A variável tempo demonstrou influenciar de maneira positiva tanto a cocaína como a lidocaína, enquanto que a variável potencial elétrico, para a faixa estudada, influencia apenas a extração da lidocaína e de forma positiva. O estudo dos dois parâmetros foi feito simultaneamente assim como ambas as drogas foram extraídas em conjunto das mesmas amostras. Essa diferença observada da lidocaína e cocaína para o parâmetro potencial elétrico,

pode ser explicada pela grande diferença da mobilidade eletroforética, descrita na Equação 7, para esses dois compostos. Ambas as drogas possuem coeficientes de distribuição octanol/água semelhantes ($\text{Log}P_{\text{octanol/água}}$ de 2,3 para cocaína e 2,44 para a lidocaína), porém a COC apresenta mobilidade cerca de 70% maior ($\mu = 24 \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$) quando comparada com a LID ($\mu = 14 \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$). Como a mobilidade eletroforética da cocaína é substancialmente maior, o potencial elétrico aplicado necessário para transferir as moléculas da fase doadora para a fase aceptora deve ser significativamente menor.

5.4 Conclusão

A otimização a partir da superfície Doehlert permitiu determinar as melhores condições de extração tanto para cocaína como para lidocaína avaliando simultaneamente os parâmetros tempo e potencial elétrico empregados. As condições otimizadas obtidas de tempo foram semelhantes para os dois compostos sendo estabelecido o maior tempo de extração (30 minutos) uma vez que esse parâmetro influenciou positivamente a extração de ambos os compostos. Já o potencial elétrico aplicado de 300 V ficou em função do aumento da extração da lidocaína, uma vez que para a cocaína esse parâmetro não demonstrou ser significativo para a faixa avaliada.

CAPÍTULO VI - Conclusão

Neste trabalho foi desenvolvido um preparo de amostras inovador, eletroextração trifásica líquido-líquido-líquido suportado em sólido, para análise de COC e LID em saliva por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas.

Para essa técnica de preparo de amostra foi desenvolvido, com materiais de baixo custo e fácil aquisição, um dispositivo multipoços para eletroextração acoplado a um sistema de ajuste e monitoramento da corrente e potencial elétrico. O dispositivo permite a eletroextração simultânea de 66 amostras de forma fácil e prática. Além disso, a utilização do cone odontológico de papel como suporte para a fase aceptora, apresentou-se fisicamente estável aplicando-se potenciais elétricos elevados (300 V).

Para conhecimento e domínio do sistema foi de extrema importância o estudo dos parâmetros que influenciam no transporte de corrente elétrica, demonstrando que se assemelha aos sistemas eletroforéticos. Na avaliação da porcentagem de solvente orgânico nas três fases constituintes do sistema (doadora, filtro orgânico e aceptora), observou-se que a resistência do filtro orgânico é o fator limitante para o transporte de íons entre as fases doadoras e aceptoras. Logo, na escolha de um filtro orgânico correto, deve-se levar em conta a sua condutividade elétrica. Outro fator que influencia significativamente no transporte de íons é a agitação da amostra para evitar o acúmulo de cargas na interface da fase doadora com o filtro orgânico.

De maneira univariada foi feita uma avaliação e otimização do tipo de solução da fase aceptora, da sua concentração, pH, da variação da porcentagem de solvente orgânico no filtro orgânico e do tipo de solução utilizada para dessorver os analitos do cone de papel. Sendo as melhores condições a fase aceptora constituída por uma solução de ácido acético 400 m mol L^{-1} no pH 3,0, o filtro orgânico constituído de 1-octanol:metanol (90:10) v/v, e a solução de dessorção de acetonitrila e acetato de amônio.

Por meio de um planejamento experimental o tipo Doehlert, obteve-se uma superfície de respostas em termos de desejabilidade, onde otimizou-se para a COC e LID os dois principais parâmetros de eletroextração tempo e potencial elétrico, chegando na condição ótima para ambas as drogas de 300V e 30 minutos.

CAPÍTULO VII – Referências bibliográficas

1. Jenkins, A. J. Pharmacokinetics: Basic Concepts and Models. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Abused Drugs (2008).
2. BRASIL. Lei n. 11.343, decreto 23 de ago. de 2006. (2006).
3. Lapachinske, S. F., Okai, G. G., dos Santos, A., de Bairros, A. V. Yonamine, M. Analysis of cocaine and its adulterants in drugs for international trafficking seized by the Brazilian Federal Police. *Forensic Sci. Int.* 247, 48–53 (2015).
4. States, M. World Drug Report 2017. UNODC - United Nations Off. Drugs Crime (2017).
5. Cristiane, D. et al. Preparo De Amostras. *Sci. Chromatogr.* 7, 125–143 (2015).
6. Campos, C. D. M., De Campos, R. P. S., Da Silva, J. A. F., Jesu, D. P. Orlando, R. M. Preparo de amostras assistido por campo elétrico: fundamentos, avanços, aplicações e tendências. *Quim. Nova* 38, 1093–1106 (2015).
7. Ferreira, P. E. M. Martini, R. K. Cocaína: Lendas, história e abuso. *Rev. Bras. Psiquiatr.* 23, 96–99 (2001).
8. CEBRID. Centro Brasileiro sobre drogas psicotrópicas. http://www.cebrid.epm.br/folhetos/cocaina_.htm (2018).
9. Rachid, F. Neurostimulation techniques in the treatment of cocaine dependence: A review of the literature. *Addict. Behav.* 76, 145–155 (2018).
10. Teatino, Barbaro, A. About an unusual case: GC-MS detection of lidocaine. *Forensic Sci. Int.* 146, 93–94 (2004).
11. Bordin, D. C. M. et al. Técnicas de preparo de amostras biológicas com interesse forense. *Sci. Chromatogr.* 7, 125–143 (2015).
12. Gomes, M. S. Contributo da Química Forense na Detecção de Drogas de Abuso. (Universidade de Lisboa, 2013).
13. Magalhães, E. J. Desenvolvimento De Métodos Para Quantificação De Drogas Em Matrizes De Interesse Forense. 152 (2012).

14. Lapointe, J., Musselman, B., O'Neill, T. Shepard, J. R. E. Detection of 'bath Salt' synthetic cathinones and metabolites in urine via dart-ms and solid phase microextraction. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 26, 159–165 (2014).
15. Yonamine, M. Silva, O. A. Confirmation of cocaine exposure by gas chromatography-mass spectrometry of urine extracts after methylation of benzoylecgonine. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 773, 83–87 (2002).
16. Santa, T., Al-Dirbashi, O. Y. Fukushima, T. Determination of cocaine and cocaethylene in urine by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Drug Discov Ther* 1, 108–118 (2007).
17. Pizarro, N. et al. Determination of MDMA and its metabolites in blood and urine by gas chromatography-mass spectrometry and analysis of enantiomers by capillary electrophoresis. *J. Anal. Toxicol.* 26, 157–65 (2002).
18. Skopp, G. Preanalytic aspects in postmortem toxicology. *Forensic Sci. Int.* 142, 75–100 (2004).
19. Jones AW. Holmgren A. Kugelberg FC. Concentrations of scheduled prescription drugs. *Ther. Drug Monit.* 29, 248–260 (2007).
20. Khajuria, H. Nayak, B. P. Hair: A bio-marker for detection of drugs of abuse. *Asian J. Psychiatr.* 30, 208–209 (2017).
21. Yu, H. et al. Role of hair pigmentation in drug incorporation into hair. *Forensic Sci. Int.* 281, 171–175 (2017).
22. Pragst, F. Balikova, M. A. State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse. *Clin. Chim. Acta* 370, 17–49 (2006).
23. Wada, M., Ikeda, R., Kuroda, N. & Nakashima, K. Analytical methods for abused drugs in hair and their applications. *Anal. Bioanal. Chem.* 397, 1039–1067 (2010).
24. de Almeida PDV, Grégio AMT, Machado MÂN, de Lima AAS, A. L. Saliva Composition and Function: A Comprehensive Review. *J. Contemp. Dent. Pract.* 9, 72–80 (2008).
25. Wille, S. M. R., Baumgartner, M. R., Fazio, V. Di, Samyn, N. & Kraemer, T. Trends in

- drug testing in oral fluid and hair as alternative matrices. *Bioanalysis* 6, 2193–209 (2014).
26. Vindenes, V. et al. Detection of drugs of abuse in simultaneously collected oral fluid, urine and blood from Norwegian drug drivers. *Forensic Sci. Int.* 219, 165–171 (2012).
 27. Palmela Pereira, C. A importância médico-legal e criminalística da saliva: Sistematização da sua aplicação nas ciências forenses. *Rev. Port. Estomatol. Med. Dent. e Cir. Maxilofac.* 55, 3–6 (2014).
 28. ter Weijden, E., van den Broek, M. P. H. Ververs, F. F. T. Easy and fast LC-MS/MS determination of lidocaine and MEGX in plasma for therapeutic drug monitoring in neonates with seizures. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 881–882, 111–114 (2012).
 29. Chen, X. et al. A quantitative LC–MS/MS method for simultaneous determination of cocaine and its metabolites in whole blood. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 134, 243–251 (2017).
 30. Kiss, B., Popa, D. S., Bojiță, M. Loghin, F. Development and validation of a HPLC-DAD/FLD method for the determination of MDMA, MDA, methamphetamine, morphine, morphine-glucuronides and 6-monoacetylmorphine in human plasma. *Rev. Roum. Chim.* 54, 833–840 (2009).
 31. Fernández, P., Morales, L., Vázquez, C., Bermejo, A. M. Tabernero, M. J. HPLC-DAD determination of opioids, cocaine and their metabolites in plasma. *Forensic Sci. Int.* 161, 31–35 (2006).
 32. Paiva, N. Efficient extraction method using magnetic carbon nanotubes to analyze cocaine and benzoylecgonine in breast milk by GC / MS. 9, 1655–1666 (2017).
 33. Magni, P. A. et al. Development and validation of a GC-MS method for nicotine detection in *Calliphora vomitoria* (L.) (Diptera: Calliphoridae). *Forensic Sci. Int.* 261, 53–60 (2016).
 34. Lê, L. M. M. et al. Rapid discrimination and quantification analysis of five antineoplastic drugs in aqueous solutions using Raman spectroscopy. *Eur. J. Pharm. Sci.* 111, 158–166

- (2017).
35. Hezinová, V. et al. Simultaneous analysis of cocaine and its metabolites in urine by capillary electrophoresis-electrospray mass spectrometry using a pressurized liquid junction nanoflow interface. *Electrophoresis* 33, 653–660 (2012).
 36. Maráková, K., Piešťanský, J. & Mikuš, P. Determination of Drugs for Crohn's Disease Treatment in Pharmaceuticals by Capillary Electrophoresis Hyphenated with Tandem Mass Spectrometry. *Chromatographia* 80, 537–546 (2017).
 37. Collins, Carol H; Bonato, P. S. *Fundamentos de Cromatografia*. (2009).
 38. Maxwell, E. J.; Chen, D. D. Y. Twenty years of interface development for capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 627, 25–33 (2008).
 39. Gjelstad, A.; Pedersen-Bjergaard, S. Challenges and new directions in analytical sample preparation. *Anal. Bioanal. Chem.* 406, 375–376 (2014).
 40. Yamini, Y., Seidi, S.; Rezazadeh, M. Electrical field-induced extraction and separation techniques: Promising trends in analytical chemistry - A review. *Anal. Chim. Acta* 814, 1–22 (2014).
 41. Gjelstad, A.; Pedersen-Bjergaard, S. Recent developments in electromembrane extraction. *Anal. Methods* 5, 4549–4557 (2013).
 42. Gjelstad, A., Rasmussen, K. E.; Pedersen-Bjergaard, S. Electrokinetic migration across artificial liquid membranes. Tuning the membrane chemistry to different types of drug substances. *J. Chromatogr. A* 1124, 29–34 (2006).
 43. Fakhari, A. R. et al. Metal–organic framework enhanced electromembrane extraction – a conceptual study using basic drugs as model substances. *Anal. Methods* 9, 5646–5652 (2017).
 44. Fuchs, D. et al. Continuous electromembrane extraction coupled with mass spectrometry - Perspectives and challenges. *Anal. Chim. Acta* 999, 1–10 (2017).
 45. Raterink, R. J.; Lindenburg, P. W., Vreeken, R. J.; Hankemeier, T. Three-phase electroextraction: A new (Online) sample purification and enrichment method for

- bioanalysis. *Anal. Chem.* 85, 7762–7768 (2013).
46. Liu, J.-M.; Liu, C.-C.; Fang, G.-Z.; Wang, S. Advanced analytical methods and sample preparation for ion chromatography techniques. *RSC Adv.* 5, 58713–58726 (2015).
 47. Kataoka, H. Technological innovation in micro/nano-sample preparation. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 45, 135 (2013).
 48. Sun, Z. et al. Toward Biomarker Development in Large Clinical Cohorts: An Integrated High-Throughput 96-Well-Plate-Based Sample Preparation Workflow for Versatile Downstream Proteomic Analyses. *Anal. Chem.* 88, 8518–8525 (2016).
 49. Shafaie, S.; Hutter, V., Brown, M. B.; Cook, M. T.; Chau, D. Y. S. Influence of surface geometry on the culture of human cell lines: A comparative study using flat, round-bottom and v-shaped 96 well plates. *PLoS One* 12, 1–15 (2017).
 50. Poorahong, S. et al. A scanner-based colorimetric mercuric ion detection using Tween-20-stabilized AuNPs solution in 96-well plates. *J. Environ. Sci. Heal. Part A* 52, 1082–1088 (2017).
 51. Noah, J. New developments and emerging trends in high-throughput screening methods for lead compound identification. *Int. J. High Throughput Screen.* 141 (2010).
 52. Wells, D. A. *High Throughput Bioanalytical Sample Preparation.* (Elsevier Science, 2003).
 53. Wu, Y.; Wen, J.; Fan, G.; Wu, Y. Development and Validation of a Selective and Robust LC-MS/MS Method, Employing Liquid–Liquid Extraction Based on 96-Well Format Plates, for High-Throughput Quantification of Docetaxel in Small Plasma Samples. *Instrum. Sci. Technol.* 37, 1–22 (2009).
 54. Eichler, M. et al. A novel 96-well multielectrode array based impedimetric monitoring platform for comparative drug efficacy analysis on 2D and 3D brain tumor cultures. *Biosens. Bioelectron.* 67, 582–589 (2015).
 55. Semenistaya, E.; Zvereva, I.; Krotov, G.; Rodchenkov, G. Solid-phase extraction of small biologically active peptides on cartridges and microelution 96-well plates from human urine. *Drug Test. Anal.* 8, 940–949 (2016).

56. Shin, J.; Pauly, D. F.; Johnson, J. A.; Frye, R. F. Simplified method for determination of clarithromycin in human plasma using protein precipitation in a 96-well format and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 871, 130–134 (2008).
57. Xue, Y. J.; Liu, J.; Pursley, J.; Unger, S. A 96-well single-pot protein precipitation, liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) method for the determination of muraglitazar, a novel diabetes drug, in human plasma. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 831, 213–222 (2006).
58. Eibak, L. E. E.; Rasmussen, K. E.; Øiestad, E. L.; Pedersen-Bjergaard, S.; Gjelstad, A. Parallel electromembrane extraction in the 96-well format. *Anal. Chim. Acta* 828, 48–52 (2014).
59. Hoofnagle, A. N.; Laha, T. J.; Donaldson, T. F. A rubber transfer gasket to improve the throughput of liquid-liquid extraction in 96-well plates: Application to vitamin D testing. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 878, 1639–1642 (2010).
60. Bagheri, H.; Es'haghi, A.; Es-haghi, A.; Mohammadkhani, E. High-throughput micro-solid phase extraction on 96-well plate using dodecyl methacrylate-ethylen glycol dimethacrylate monolithic copolymer. *Anal. Chim. Acta* 792, 59–65 (2013).
61. Pérez-Fernández, V., Mainero Rocca, L., Tomai, P., Fanali, S., Gentili, A. Recent advancements and future trends in environmental analysis: Sample preparation, liquid chromatography and mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 983, 9–41 (2017).
62. Wuethrich, A., Haddad, P. R., Quirino, J. P. The electric field - An emerging driver in sample preparation. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 80, 604–611 (2016).
63. Machado, A. P. D. F., Pereira, A. L. D., Barbero, G. F., Martínez, J. Recovery of anthocyanins from residues of *Rubus fruticosus*, *Vaccinium myrtillus* and *Eugenia brasiliensis* by ultrasound assisted extraction, pressurized liquid extraction and their combination. *Food Chem.* 231, 1–10 (2017).
64. Lummaetee, K., Ku, H. M., Wongrat, W., Elkamel, A. Optimization of supercritical fluid extraction of isoflavone from soybean meal. *Can. J. Chem. Eng.* 95, 1141–1149 (2017).

65. Guedes-Alonso, R., Sosa-Ferrera, Z., Santana-Rodríguez, J. J. Determination of steroid hormones in fish tissues by microwave-assisted extraction coupled to ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Chem.* 237, 1012–1020 (2017).
66. Xu, C. et al. Ionic-Liquid-Based Infrared-Assisted Extraction (IL-IRAE) Coupled with HPLC–MS: a Green and Convenient Tool for Determination of TCMs. *Chromatographia* 80, 335–340 (2017).
67. Yan, L.-G., He, L., Xi, J. High intensity pulsed electric field as an innovative technique for extraction of bioactive compounds—A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 57, 2877–2888 (2017).
68. Oedit, A., Ramautar, R., Hankemeier, T., Lindenburg, P. W. Electroextraction and electromembrane extraction: Advances in hyphenation to analytical techniques. *Electrophoresis* 37, 1170–1186 (2016).
69. Raterink, Robert-Jan; Lindenbur, P. H. T. Electroextraction. (2015).
70. Beugnet, M. Method for optimizing the yield of electroextraction of heavy metals in aqueous solution with a high salt concentration with a high salt concentration, and device for the implementation thereof. (2017).
71. Strathmann, H. Electrodialysis, a mature technology with a multitude of new applications. *Desalination* 264, 268–288 (2010).
72. Xu, Tongwen; Huang, C. Electrodialysis-Based Separation Technologies: A Critical Review. *AIChE J.* 54, 3147–3159 (2008).
73. Stichlmair, J., Schmidt, J., Proplesch, R. Electroextraction: A novel separation technique. *Chem. Eng. Sci.* 47, 3015–3022 (1992).
74. 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* 33, 2987–2995 (2012).
75. Bennion, D. N., Newman, J. Electrochemical removal of copper ions from very dilute

- solutions. *J. Appl. Electrochem.* 2, 113–122 (1979).
76. Young, Hugh D.; Freedman, R. A. *Física III - Eletromagnetismo.* (2008).
 77. Shekaari, H., Mehrdad, A., Noorani, N. Effect of some imidazolium based ionic liquids on the electrical conductivity of L(+)-lactic acid in aqueous solutions of poly(ethylene glycol). *Fluid Phase Equilib.* 451, 1–11 (2017).
 78. Semat, H.; Katz, R. *Physics, Chapter 28: Electrical Conduction in Liquids and Solids.* (1958).
 79. Oh, M. H., Kim, N. S., Kang, S. M. Effect of conductivity of the aqueous solution on the size of printable nanoparticle. *J. Nanotechnol.* 2012, (2012).
 80. Bešter-Rogač, M., Fedotova, M. V., Kruchinin, S. E., Klähn, M. Mobility and association of ions in aqueous solutions: the case of imidazolium based ionic liquids. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 18, 28594–28605 (2016).
 81. EAMES, I.; KLETTNER, C. Stokes' and Lamb's viscous drag laws. *Eur. J. Phys.* 38, 1–11 (2017).
 82. Xuan, X., Li, D. Analytical study of Joule heating effects on electrokinetic transportation in capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 1064, 227–237 (2005).
 83. Gjelstad, A., Rasmussen, K. E., Pedersen-Bjergaard, S. Simulation of flux during electro-membrane extraction based on the Nernst-Planck equation. *J. Chromatogr. A* 1174, 104–111 (2007).
 84. Seidi, S. et al. Determination of thebaine in water samples, biological fluids, poppy capsule, and narcotic drugs, using electromembrane extraction followed by high-performance liquid chromatography analysis. *Anal. Chim. Acta* 701, 181–188 (2011).
 85. Middelthon-Bruer, T. M., Gjelstad, A., Rasmussen, K. E., Pedersen-Bjergaard, S. Parameters affecting electro membrane extraction of basic drugs. *J. Sep. Sci.* 31, 753–759 (2008).
 86. Kubáň, P., Strieglerová, L., Gebauer, P., Boček, P. Electromembrane extraction of heavy metal cations followed by capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection. *Electrophoresis* 32, 1025–1032 (2011).

87. Bombard, A. J. F., Dukhin, A. Ionization of a nonpolar liquid with an alcohol. *Langmuir* 30, 4517–4521 (2014).
88. Trawińska, A., Hallmann, E., Mędrzycka, K. The effect of alkyl chain length on synergistic effects in micellization and surface tension reduction in nonionic gemini (S-10) and anionic surfactants mixtures. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 506, 114–126 (2016).
89. Davarani, S. S. H., Pourahadi, A., Nojavan, S., Banitaba, M. H., Nasiri-Aghdam, M. Electro membrane extraction of sodium diclofenac as an acidic compound from wastewater, urine, bovine milk, and plasma samples and quantification by high-performance liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta* 722, 55–62 (2012).
90. Arain, S. S. et al. Preconcentration of toxic elements in artificial saliva extract of different smokeless tobacco products by dual-cloud point extraction. *Microchem. J.* 112, 42–49 (2014).
91. Neto, B. B.; Scarmínio, J. S.; Bruns, R. E. *Como fazer experimentos*. (Editora Unicamp, 2001).
92. Paula, D. et al. Artigo Otimização de Métodos Analíticos Usando Metodologia de Superfícies De Resposta - Parte I: Variáveis de Processo Optimization of Analytical Methods Methodology – Part I: Process Variables Using Otimização de Métodos Analíticos Usando Metodologia d. 9, (2017).
93. Brown, S.D.; Tauler, R.; Walczak, B. *Comprehensive Chemometrics: Chemical and Biochemical Data Analysis*. (Elsevier Science, 2009).
94. Bruns, R.E.; Scarmino, I.S.; Neto, B. B. *Statistical Design - Chemometrics*. (Elsevier Science, 2006).
95. Costa, N. R., Lourenço, J., Pereira, Z. L. Desirability function approach: A review and performance evaluation in adverse conditions. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 107, 234–244 (2011).
96. Breikreitz, M. C., Souza, A. M. de, Poppi, R. J. A didactic chemometrics experiment for design of experiments (DOE): evaluation of experimental conditions in the

- spectrophotometric determination of Iron II with o -phenanthroline. A tutorial, part III. *Quim. Nova* 37, 564–573 (2014).
97. Ferreira, S. L. C. et al. Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Anal. Chim. Acta* 597, 179–186 (2007).
 98. Sena, A. R. de, Valasques Júnior, G. L., Barretto, I. K. S. P., Assis, S. A. Application of Doehlert experimental design in the optimization of experimental variables for the *Pseudozyma* sp. (CCMB 306) and *Pseudozyma* sp. (CCMB 300) cell lysis. *Food Sci. Technol.* 32, 761–767 (2012).
 99. Dos Santos, W. P. C., Gramacho, D. R., Teixeira, A. P., Costa, A. C. S., Korn, M. D. G. A. Use of Doehlert design for optimizing the digestion of beans for multi-element determination by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *J. Braz. Chem. Soc.* 19, 1–10 (2008).
 100. Rushing, H., Karl, A., Wisnowski, J. Design and Analysis of Experiments. *Des. Anal. Exp. by Douglas Montgomery A Suppl. Using JMP* 101–128 (2013). doi:10.1007/b97673
 101. Jancic-Stojanovic, B., Malenovic, A., Ivanovic, D., Rakic, T., Medenica, M. Chemometrical evaluation of ropinirole and its impurity's chromatographic behavior. *J. Chromatogr. A* 1216, 1263–1269 (2009).