



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Anderson Luiz Oenning

**UMA NOVA ABORDAGEM PARA A MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO
HOMOGÊNEA COM SOLVENTE DE HIDROFILICIDADE COMUTÁVEL APLICADA
NA DETERMINAÇÃO DE ANTIDEPRESSIVOS EM URINA HUMANA POR GC-MS**

Florianópolis
2020

Anderson Luiz Oenning

**UMA NOVA ABORDAGEM PARA A MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO
HOMOGÊNEA COM SOLVENTE DE HIDROFILICIDADE COMUTÁVEL APLICADA
NA DETERMINAÇÃO DE ANTIDEPRESSIVOS EM URINA HUMANA POR GC-MS**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Química com especialização em Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Carasek da Rocha
Coorientador: Prof. Dr. Josias de Oliveira Merib

Florianópolis
2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Oenning, Anderson Luiz

UMA NOVA ABORDAGEM PARA A MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO
HOMOGÊNEA COM SOLVENTE DE HIDROFILICIDADE COMUTÁVEL
APLICADA NA DETERMINAÇÃO DE ANTIDEPRESSIVOS EM URINA
HUMANA POR GC-MS / Anderson Luiz Oenning ; orientador,
Eduardo Carasek da Rocha, coorientador, Josias de
Oliveira Merib, 2020.

121 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas,
Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Química. 2. Antidepressivos. 3. Solvente de
hidrofilicidade comutável. 4. Microextração líquido-líquido
homogênea. 5. Toxicologia forense. I. da Rocha, Eduardo
Carasek . II. Merib, Josias de Oliveira. III. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Química. IV. Título.

Anderson Luiz Oenning

**UMA NOVA ABORDAGEM PARA A MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO
HOMOGÊNEA COM SOLVENTE DE HIDROFILICIDADE COMUTÁVEL
APLICADA NA DETERMINAÇÃO DE ANTIDEPRESSIVOS EM URINA HUMANA
POR GC-MS**

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca
examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof^a. Dr^a. Maria Eugênia Costa Queiroz
Universidade de São Paulo (USP)

Prof^a. Dr^a. Alcíbia Helena de Azevedo Maia
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Prof. Dr. Luiz Augusto dos Santos Madureira
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Prof. Dr. Eduardo Sidinei Chaves
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Prof. Dr. Josias Oliveira Merib
Coorientador
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA)

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que
foi julgado adequado para obtenção do título de Doutor em Química com
especialização em Química Analítica.

Prof. Dr. Marcus Mandolesi Sá
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Química

Prof. Dr. Eduardo Carasek da Rocha
Orientador

Florianópolis
2020

*Apenas o sonhador que busca a realização do
seu sonho é protagonista e autor da sua vida.*

Fernando Dolabela

*Dedico esse trabalho à
minha mãe Vanda e ao meu
avô Simão (in memoriam).*

AGRADECIMENTOS

O meu primeiro agradecimento é para minha mãe Vanda Oenning, que é uma mulher guerreira e batalhadora. Ela sempre fez de tudo para que eu pudesse ter a formação que tenho hoje, me apoiando e me incentivando no que chamo de “nossas conquistas”. Muito obrigado, eu te amo mãe!

Ao meu orientador professor Eduardo Carasek, pela oportunidade de poder ter participado de seu excelente grupo de pesquisa durante os últimos seis anos. Foram anos de muitos aprendizados, não só acadêmicos e profissionais, mas também pessoais. Ter sido seu aluno foi um privilégio enorme. Obrigado pela confiança, parceria, orientação, amizade e transmissão de conhecimentos.

Ao meu coorientador professor Josias Merib, pela troca de conhecimentos e ensinamentos durante todo o período que estivemos no mesmo grupo de pesquisa na UFSC e também agradeço a oportunidade de ter desenvolvido meu trabalho de doutorado na UFCSPA. Obrigado pela coorientação, parceria e amizade.

Aos professores Luciano Vitali, Luiz Madureira, Bruno de Souza e Adolfo Júnior pela participação e sugestões no exame de qualificação de doutorado.

Aos professores Maria Eugênia Queiroz, Luiz Madureira, Alcíbia Maia e Eduardo Chaves pela participação e sugestões na banca de defesa da tese do doutorado.

Aos meus amigos e colegas do laboratório CroMaas pelo companheirismo, conselhos, conversas descontraídas e por todos os momentos maravilhosos que vivenciei nesse grupo de pesquisa.

À Maria Fensterseifer, ex-aluna de iniciação científica; e à Eduarda Omena, ex-aluna de mestrado, pela oportunidade de auxiliá-las nessa importante etapa da vida acadêmica de vocês.

Aos meus amigos e colegas do laboratório da UFCSPA pela hospitalidade e troca de conhecimentos durante todo meu período que estive com vocês. Agradecimento especial aos professores Tiago de Oliveira e Sarah de Oliveira por todo o aprendizado que tive com vocês. E também agradeço minha amiga Letícia Birk por toda a parceria no desenvolvimento desse trabalho. Obrigado a todos!

À minha família que sempre me apoiou na minha jornada acadêmica e que sempre entendeu minha ausência nos momentos familiares. Em especial ao meu avô, Simão Oenning, que infelizmente nos deixou esse ano e que sempre esteve me incentivando nos estudos. Agora, com certeza, está contando suas engraçadas histórias de vida aos anjos. Sinto saudades opa, descanse em paz!

Aos meus amigos, colegas e outras pessoas que de alguma forma estiveram envolvidas nessa minha trajetória acadêmica, meu muito obrigado!

A todos os professores que compartilharam seus conhecimentos comigo durante todo o período acadêmico. Saibam que vocês são os pilares fundamentais da sociedade. Muito obrigado!

À UFSC e ao Programa de Pós-Graduação em Química por conceder o espaço físico, materiais didáticos, ensino público e de qualidade para a conclusão dessa minha trajetória acadêmica.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

RESUMO

Os medicamentos antidepressivos são frequentemente prescritos para o tratamento da depressão, um transtorno mental que atinge mais de 264 milhões de pessoas em todo o mundo. Os frequentes problemas associados ao amplo uso dessas substâncias, bem como os múltiplos incidentes de intoxicações e o elevado número de casos de suicídios, têm levado à necessidade de métodos analíticos para a detecção e quantificação desses compostos em amostras biológicas adequadas na toxicologia forense. Nesse trabalho, foi proposta uma nova abordagem para a microextração líquido-líquido homogênea com solvente de hidrofiliabilidade comutável (SHS-HLLME) com a utilização de um novo dispositivo simples e de baixo custo para a coleta do solvente, denominado “ μ -pipeta (μ P)”. A nova técnica μ P-SHS-HLLME foi aplicada na determinação de antidepressivos em urina humana, sendo os antidepressivos estudados nesse trabalho a fluoxetina, nortriptilina, amitriptilina, imipramina, desipramina e a sertralina. A otimização das principais variáveis que podem influenciar na eficiência da extração foi realizada de forma multivariada. As condições ótimas de extração consistiram no uso de *N,N*-dimetilciclohexilamina como solvente de hidrofiliabilidade comutável, 500 μ L de amostra de urina previamente diluída com água ultrapura na proporção de 1:1 (v / v), 200 μ L de uma mistura de SHS:HCl 6 mol L⁻¹ (1:1 v / v), 600 μ L de NaOH 10 mol L⁻¹ e 3 min de tempo de extração. Um volume de 40 μ L de difenilamina na concentração de 500 μ g L⁻¹ (20 ng) foi utilizado como padrão interno. O volume de 1 μ L foi injetado de maneira automatizada em um cromatógrafo gasoso acoplado à espectrometria de massas (GC-MS) em que os analitos foram separados e identificados. Alguns parâmetros de mérito do método desenvolvido foram validados, fornecendo coeficientes de determinação superiores a 0,9954 para todos os analitos, limites de detecção (LOD) de 0,02 a 0,88 μ g L⁻¹, limites de quantificação (LOQ) de 10 μ g L⁻¹, recuperações relativas de 68 a 102%, precisão intra-dia de 0,5 a 15,9%, precisão inter-dia de 4,2 a 19,3%, seletividade e robustez. A metodologia proposta foi aplicada em cinco amostras de urina humana fornecidas pelo Centro de Informações Toxicológicas do Rio Grande do Sul (CIT/RS), na qual foi identificado a presença dos antidepressivos amitriptilina e nortriptilina em concentrações de 207 a 4828 μ g L⁻¹. Os resultados demonstraram que a abordagem introduzida nesse trabalho pela μ P-SHS-HLLME é altamente econômica, rápida, simples, ambientalmente amigável e com desempenho analítico adequado para análises toxicológicas de antidepressivos em amostras de urina humana suspeitas de intoxicação por essas substâncias.

Palavras-chave: Antidepressivos. Solvente de hidrofiliabilidade comutável. Microextração líquido-líquido homogênea. Toxicologia forense. Urina. GC-MS.

ABSTRACT

Antidepressant drugs are often prescribed for the treatment of depression, a mental disorder that affects more than 264 million people worldwide. The frequent problems associated with the wide use of these drugs, as well as the multiple incidents of intoxications and the high number of suicide cases, have led to the necessity of analytical methods for the detection and quantitation of these compounds in biological samples suitable in forensic toxicology. In this work, a new approach for homogeneous liquid-liquid microextraction with switchable hydrophilicity solvent (SHS-HLLME) was proposed with the use of a new, simple and low-cost device for the solvent collection, named “ μ -pipette (μ P)”. The new technique μ P-SHS-HLLME was applied for the determination of antidepressants in human urine including fluoxetine, amitriptyline, nortriptyline, imipramine, desipramine and sertraline. The optimization of the main variables that can influence on the extraction efficiency was performed through multivariate approaches. The optimal extraction conditions consisted of using *N,N*-dimethylcyclohexylamine as switchable hydrophilicity solvent, 500 μ L of urine sample previously diluted with ultrapure water at 1:1 ratio (v/v), 200 μ L of a mixture of SHS:HCl 6 mol L⁻¹ (1:1 v/v), 600 μ L of NaOH 10 mol L⁻¹ and 3 min of extraction time. A volume of 40 μ L of diphenylamine at concentration of 500 μ g L⁻¹ (20 ng) was used as internal standard. A volume of 1 μ L was injected automatically into a gas chromatograph coupled to mass spectrometry (GC-MS) and the analytes were separated and identified. The method developed was in-house validated, providing coefficients of determination higher than 0.9954 for all analytes, limit of detection (LOD) from 0.02 to 0.88 μ g L⁻¹, limit of quantitation (LOQ) of 10 μ g L⁻¹, relative recoveries of 68 to 102%, intra-day precision from 0.5 to 15.9%, inter-day precision from 4.2 to 19.3%, selectivity and robustness. The method proposed was successfully applied in five human urine samples from Toxicological Information Center of Rio Grande do Sul (CIT/RS), the presence of the amitriptyline and nortriptyline in concentrations from 207 to 4828 μ g L⁻¹ was identified. The results demonstrated that the μ P-SHS-HLLME approach is cost-effective, rapid, simple and environmentally-friendly with suitable analytical performance for toxicological analyzes of antidepressants in human urine samples suspected of poisoning by these substances.

Keywords: Antidepressants. Switchable hydrophilicity solvent. Homogeneous liquid-liquid microextraction. Forensic toxicology. Urine samples. GC-MS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Publicações de artigos científicos contendo o termo “ <i>switchable hydrophilicity solvents</i> ” no período de 2010 a 2020.....	24
Figura 2. Biotransformação da amitriptilina e da nortriptilina.	29
Figura 3. Biotransformação da fluoxetina.	30
Figura 4. Principais amostras biológicas utilizadas para análises toxicológicas forenses.	33
Figura 5. Comportamento de um solvente de hidrofiliidade comutável com a adição e remoção de CO ₂ do meio.....	39
Figura 6. Etapas de dissolução de DMCHA em água para formar a fase extratora.	41
Figura 7. Procedimento de extração do primeiro trabalho reportado utilizando SHS.	42
Figura 8. Comportamento de ácidos graxos de cadeia média sob diferentes pHs... ..	43
Figura 9. Dispositivo “ μ -pipeta (μ P)” empregado na técnica proposta μ P-SHS-HLLME.	66
Figura 10. Cromatograma da separação cromatográfica no GC-MS no modo SCAN com a injeção de 1 μ L da mistura de padrões com concentração de 1 mg L ⁻¹	67
Figura 11. Gráfico de Pareto com o resultado da triagem das variáveis de influência na eficiência de extração.....	69
Figura 12. Superfície resposta obtida para a otimização do volume da mistura SHS:HCl e volume da amostra.	72

Figura 13. Superfície resposta obtida para a otimização do volume de NaOH e tempo de extração.	74
Figura 14. Esquema do procedimento de μ P-SHS-HLLME desenvolvido nesse trabalho para a determinação de antidepressivos em amostras de urina.	76
Figura 15. Resultado da avaliação de robustez da metodologia desenvolvida.	82
Figura 16. Cromatogramas de íons totais de (A) amostra de urina isenta dos analitos, (B) amostra de urina com a adição de $250 \mu\text{g L}^{-1}$ dos analitos e (C) amostra de urina humana proveniente do CIT/RS.	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Alguns antidepressivos disponíveis comercialmente no país.	28
Tabela 2. Antidepressivos estudados nesse trabalho com suas respectivas propriedades físico-químicas.	30
Tabela 3. Aplicações do uso de solventes de hidrofiliabilidade comutável em técnicas de microextração reportadas na literatura.	44
Tabela 4. Solventes de hidrofiliabilidade estudados nesse trabalho e suas respectivas propriedades físico-químicas.	51
Tabela 5. Planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} para a triagem das principais variáveis que afetam a eficiência de extração dos antidepressivos em urina utilizando SHS. .	59
Tabela 6. Planejamento <i>Doehlert</i> para a otimização do volume de solvente e volume de amostra.	60
Tabela 7. Planejamento <i>Doehlert</i> para a otimização do volume de NaOH e tempo de extração.	61
Tabela 8. Tempo de retenção e razões massa/carga utilizadas na identificação e quantificação dos analitos e do padrão interno (PI).	68
Tabela 9. Tabela ANOVA do Gráfico de Pareto.	70
Tabela 10. Tabela ANOVA obtida para a otimização do volume da mistura SHS:HCl e volume da amostra.	73
Tabela 11. Tabela ANOVA obtida para a otimização do volume de NaOH e tempo de extração.	75

Tabela 12. Equação da reta, fator de ponderação, faixa linear e coeficiente de determinação para cada analito.	78
Tabela 13. Limites de detecção e de quantificação para cada analito.	79
Tabela 14. Resultados obtidos através de ensaios de recuperação relativa para a avaliação da exatidão e precisão intra e inter-dia do método desenvolvido.	80
Tabela 15. Condições nominais e respectivas variações para o estudo da robustez da metodologia.	81
Tabela 16. Planejamento do estudo da robustez da metodologia.	81
Tabela 17. Resultado da avaliação da integridade de diluição.....	83
Tabela 18. Resultado da análise de cinco amostras de urina humana provenientes do CIT/RS.	84
Tabela 19. Comparação do método desenvolvido com outros reportados na literatura para a determinação de antidepressivos em urina humana.	87

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÔNIMOS

μP-SHS-HLLME	Microextração Líquido-Líquido Homogênea com Solvente de Hidrofilicidade Comutável em μ-Pipeta, do inglês <i>μ-Pipette - Switchable Hydrophilicity Solvent - Homogeneous Liquid-Liquid Microextraction</i>
μS-SHS-HLLME	Microextração Líquido-Líquido Homogênea com Solvente de Hidrofilicidade Comutável em Microseringa, do inglês <i>Micropipette Tip Closed Syringe System - Switchable Hydrophilicity Solvent - Homogeneous Liquid-Liquid Microextraction</i>
AA	Antidepressivos atípicos
AA-SHS-LLME	Microextração Líquido-Líquido com Solvente de Hidrofilicidade Comutável Assistida com Ar, do inglês <i>Air-Assisted - Switchable Hydrophilicity Solvent - Liquid-Liquid Microextraction</i>
ADT	Antidepressivos tricíclicos
AFS	Espectrometria Atômica de Fluorescência, do inglês <i>Atomic Fluorescence Spectrometry</i>
BAμE	Microextração em Barra Adsorptiva, do inglês <i>Bar Adsorptive Microextraction</i>
CHLLME	Microextração Líquido-Líquido Homogênea Contínua, do inglês <i>Continuous Homogeneous Liquid-Liquid Microextraction</i>
CIATox/SC	Centro de Informações e Assistência Toxicológica de Santa Catarina
CIT/RS	Centro de Informações Toxicológicas do Rio Grande do Sul
DLLME	Microextração Líquido-Líquido Dispersiva, do inglês <i>Dispersive Liquid-Liquid Microextraction</i>
DMCHA	<i>N,N</i> -dimetilciclohexilamina
DPA	Dipropilamina
DPV	Voltametria de Pulso Diferencial, do inglês <i>Differential pulse voltammetry</i>
DPX	Extração em Ponteiros Descartáveis, do inglês <i>Disposable Pipette Extraction</i>
EA-SFAM-SFO	Microextração com Ácido Graxo Comutável Assistida por Efervescência Combinada com Solidificação de Gotículas Orgânicas

Flutuantes, do inglês *Effervescence Assisted - Switchable Fatty Acid-Based Microextraction combined with Solidification of a Floating Organic-droplet*

EA-SS-LPME	Microextração em Fase Líquida com Solvente Comutável Assistida por Efervescência, do inglês <i>Effervescence - Assisted Switchable Solvent - Based Liquid Phase Microextraction</i>
ETAAS	Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica, do inglês, <i>Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry</i>
ETA-SHS-ME-SFO	Microextração com Solvente de Hidrofilicidade Comutável Assistida por Comprimido Efervescente e Solidificação de Gotas Orgânicas Flutuantes, do inglês <i>Effervescent Tablet-Assisted Switchable Hydrophilicity Solvent-Based Microextraction with Solidification of Floating Organic Droplets</i>
FAAS	Espectrometria de Absorção Atômica em Chama, do inglês, <i>Flame Atomic Absorption Spectrometry</i>
FA-IT-DLLME	Microextração Líquido-Líquido Dispersiva em Tubo com Ácido Graxo, do inglês <i>Fatty - Acid - Based In-Tube Dispersive Liquid - Liquid Microextraction</i>
GC-FID	Cromatografia Gasosa acoplada ao detector por Ionização em Chama, do inglês <i>Gas Chromatography - Flame Ionization Detector</i>
GC-MS	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas, do inglês <i>Gas Chromatography - Mass Spectrometry</i>
GC-MS/MS	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas Sequencial, do inglês <i>Gas Chromatography - Tandem Mass Spectrometry</i>
GF-AAS	Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite, do inglês <i>Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry</i>
HF-LPME	Microextração em Fase Líquida suportada por Membrana Oca, do inglês <i>Hollow Fiber Liquid Phase Microextraction</i>
HLLME	Microextração Líquido-Líquido Homogênea, do inglês <i>Homogeneous Liquid-Liquid Microextraction</i>
HPA	Hidrocarboneto Policíclico Aromático
HPLC/MS/MS	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas Sequencial, do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry</i>

HPLC-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Detector de Arranjo de Diodos, do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography – Diode Array Detector</i>
HPLC-FLD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Detector de Fluorescência, do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography – Fluorescence detector</i>
HPLC–UV	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Detector de Ultravioleta, do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography – Ultraviolet detector</i>
HPLC-UV/Vis	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Detector de Ultravioleta-Vível, do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography – Ultraviolet-Visible Detector</i>
IMAO	Inibidores da monoamina-oxidase
IP-SHS-HLLME	Microextração Líquido-Líquido Homogênea com Solvente de Hidrofilicidade Comutável e Par Iônico, do inglês <i>Ion-Pair Switchable-Hydrophilicity Solvent-Based Homogeneous Liquid-Liquid Microextraction</i>
ISRS	Inibidores seletivos de recaptação de serotonina
LC-MS/MS	Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas Sequencial, do inglês <i>Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry</i>
LLE	Extração Líquido-Líquido, do inglês <i>Liquid-Liquid Extraction</i>
LOD	Limite de Detecção, do inglês <i>Limit of Detection</i>
LOQ	Limite de Quantificação, do inglês <i>Limit of Quantitation</i>
LPME	Microextração em Fase Líquida, do inglês <i>Liquid Phase Microextraction</i>
ME	Margem de erro, do inglês <i>Margin of Error</i>
META-SHS-LPME	Microextração em Fase Líquida com Solvente de Hidrofilicidade Comutável Assistida por Comprimido Magnético Efervescente, do inglês <i>Magnetic Effervescence Tablet-Assisted Switchable Hydrophilicity Solvent-Based Liquid Phase Microextraction</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
r²	Coeficiente de Determinação
RSD	Desvio Padrão Relativo, do inglês <i>Relative Standard Deviation</i>

SDME	Microextração em Gota Única, do inglês <i>Single-Drop Microextraction</i>
SHDS-LLME	Microextração Líquido-Líquido Dispersiva com Solvente de Hidrofilicidade Comutável, do inglês <i>Switchable Hydrophilicity Dispersive Solvent-Based Liquid-Liquid Microextraction</i>
SHS	Solvente de hidrofilicidade comutável, do inglês <i>Switchable Hydrophilicity Solvent</i>
SHS-BME	Microextração Baseada com Solvente de Hidrofilicidade Comutável, do inglês <i>Switchable Hydrophilicity Solvent-Based Microextraction</i>
SHS-HLLME	Microextração Líquido-Líquido Homogênea com solvente de hidrofilicidade comutável, do inglês <i>Switchable Hydrophilicity Solvent Homogeneous Liquid-Liquid Microextraction</i>
SHS-LLME	Microextração Líquido-Líquido com Solvente de Hidrofilicidade Comutável, do inglês <i>Switchable Hydrophilicity Solvent - Liquid-Liquid Microextraction</i>
SHS-LPME	Microextração em Fase Líquida com Solvente de Hidrofilicidade Comutável, do inglês <i>Switchable Hydrophilicity Solvent – Liquid Phase Microextraction</i>
SHS-ME	Microextração com Solvente de Hidrofilicidade Comutável, do inglês <i>Switchable Hydrophilicity Solvent Microextraction</i>
SHS-MME	Microextração com Membrana e Solvente de Hidrofilicidade Comutável, do inglês <i>Switchable Hydrophilicity Solvent Membrane-Based Microextraction</i>
SHS-SME	Microextração mediada por Surfactante com Solvente de Hidrofilicidade Comutável, do inglês <i>Switchable Hydrophilicity Solvent Surfactant-Mediated Microextraction</i>
SIM	Monitoramento de Íon Seleccionado, do inglês <i>Selected Ion Monitoring</i>
SME	Microextração com Solventes, do inglês <i>Solvent Microextraction</i>
SME	Margem de Erro Simultânea, do inglês <i>Simultaneous Margin of Error</i>
SM-LPME	Microextração em Fase Líquida com Membrana por Agitação, do inglês <i>Stir Membrane – Liquid Phase Microextraction</i>
SPE	Extração em Fase Sólida, do inglês <i>Solid Phase Extraction</i>
SPME	Microextração em Fase Sólida, do inglês <i>Solid Phase Microextraction</i>

SS-HLLME	Microextração Líquido-Líquido Homogênea com Solvente Comutável, do inglês <i>Switchable Solvent - Homogeneous Liquid-Liquid Microextraction</i>
SS-LLME	Microextração Líquido-Líquido com Solvente Comutável, do inglês <i>Switchable Solvent - Liquid-Liquid Microextraction</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
TA-DLLME	Microextração Líquido-Líquido Dispersiva assistida por Temperatura, do inglês <i>Temperature-Assisted Dispersive Liquid-Liquid Microextraction</i>
TSSME	Microextração com solvente comutável com temperatura controlada, do inglês <i>Temperature Controlled Switchable Solvent Based Microextraction</i>
UA-SHS-HLLME	Microextração Líquido-Líquido Homogênea com Solvente de Hidrofilicidade Comutável Assistida com Ultrassom, do inglês <i>Ultrasound-Assisted Switchable Hydrophilicity Solvent Homogeneous Liquid-Liquid Microextraction</i>
UFCSPA	Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre
UV-Vis	Ultravioleta-visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 REVISÃO DA LITERATURA	26
2.1 ANÁLISES TOXICOLÓGICAS FORENSES	26
2.2 ANTIDEPRESSIVOS.....	27
2.3 COMPOSTOS ESTUDADOS NESSE TRABALHO	30
2.4 URINA COMO AMOSTRA BIOLÓGICA EM ANÁLISES TOXICOLÓGICAS...	32
2.5 PREPARO DE AMOSTRA.....	35
2.6 TÉCNICAS DE MICROEXTRAÇÃO EM FASE LÍQUIDA.....	36
2.7 MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO HOMOGÊNEA	37
2.8 SOLVENTES DE HIDROFILICIDADE COMUTÁVEL	39
3 OBJETIVOS	54
3.1 OBJETIVO GERAL.....	54
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	54
4 METODOLOGIA	56
4.1 MATERIAIS, REAGENTES E APARELHOS	56
4.2 AMOSTRAS DE URINA E PRÉ-TRATAMENTO	56
4.3 INSTRUMENTAÇÃO E CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS	57
4.4 PREPARAÇÃO DO SOLVENTE EXTRATOR	57
4.5 OTIMIZAÇÕES DA TÉCNICA DE μ P-SHS-HLLME	58
4.5.1 Triagem das variáveis na etapa de extração.....	58
4.5.2 Otimização do volume da mistura SHS:HCl e volume de amostra.....	59
4.5.3 Otimização do volume de NaOH e tempo de extração	60
4.6 VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DA METODOLOGIA DESENVOLVIDA	61
4.7 ANÁLISE DOS DADOS	63

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
5.1 INTRODUÇÃO DE UM NOVO DISPOSITIVO PARA A TÉCNICA DE SHS-HLLME	65
5.2 OTIMIZAÇÃO CROMATOGRÁFICA	66
5.3 OTIMIZAÇÕES DA TÉCNICA DE μ P-SHS-HLLME.....	68
5.3.1 Triagem das variáveis de extração	68
5.3.2 Otimização do volume da mistura SHS:HCl e volume de amostra	71
5.3.3 Otimização do volume de NaOH e tempo de extração	73
5.4 PROCEDIMENTO DE PREPARO DE AMOSTRA OTIMIZADO COM A μ P-SHS-HLLME	75
5.5 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA DESENVOLVIDA	76
5.5.1 Linearidade	77
5.5.2 Limites de detecção e de quantificação	78
5.5.3 Seletividade, exatidão e precisão	79
5.5.4 Efeito carryover	80
5.5.5 Robustez	80
5.5.6 Integridade de diluição	82
5.6 APLICAÇÃO DA METODOLOGIA DESENVOLVIDA	83
5.7 COMPARAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO COM MÉTODOS DESCRITOS NA LITERATURA.....	85
6 CONCLUSÕES	90
7 PERSPECTIVAS	93
REFERÊNCIAS	95
ANEXOS	108
ANEXO I - DIAGRAMA DE ESPÉCIES DA FLUOXETINA.	108
ANEXO II - DIAGRAMA DE ESPÉCIES DA NORTRIPTILINA.....	109
ANEXO III - DIAGRAMA DE ESPÉCIES DA AMITRIPTILINA.	110

ANEXO IV - DIAGRAMA DE ESPÉCIES DA IMIPRAMINA.....	111
ANEXO V - DIAGRAMA DE ESPÉCIES DA DESIPRAMINA.....	112
ANEXO VI - DIAGRAMA DE ESPÉCIES DA SERTRALINA.....	113
ANEXO VII - DIAGRAMA DE ESPÉCIES DA DIPROPILAMINA.	114
ANEXO VIII - DIAGRAMA DE ESPÉCIES DA <i>N,N</i> -DIMETILCICLOHEXILAMINA.	115
ATIVIDADES REALIZADAS NO PERÍODO DO DOUTORADO (2018 A 2020)....	117

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

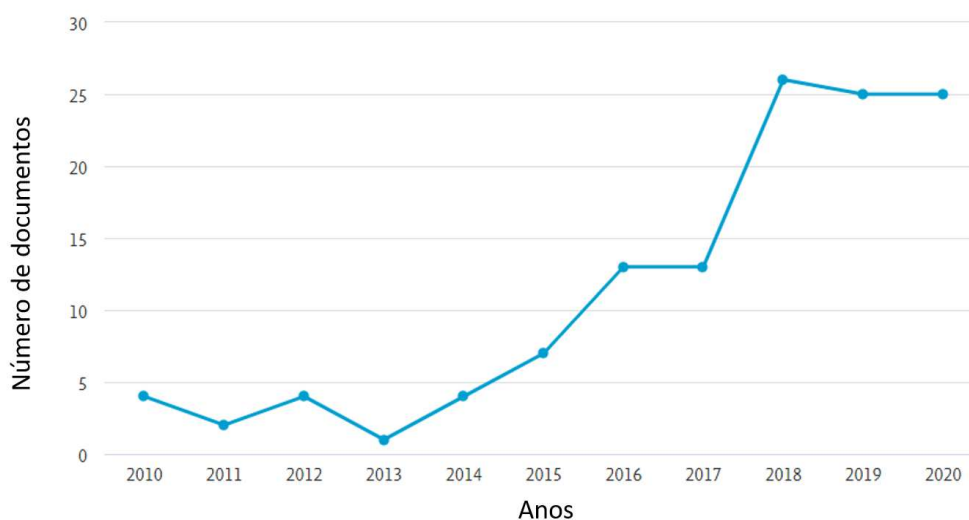
A depressão é um transtorno mental que atinge mais de 264 milhões de pessoas a nível mundial (WHO, 2020). Essa doença tem levado muitas pessoas a cometerem suicídio em situações extremas, resultando em aproximadamente um milhão de mortes por ano no mundo inteiro (DORTA *et al.*, 2018) e no Brasil morrem cerca de dez mil pessoas a cada ano (RODRIGUES; SOUZA; RODRIGUES; KONSTANTYNER, 2019). Medicamentos antidepressivos, tais como inibidores seletivos da recaptação da serotonina e antidepressivos tricíclicos, são frequentemente prescritos para o tratamento dessa doença. Entretanto, problemas associados ao amplo uso dessas substâncias e os múltiplos incidentes de intoxicações têm elevado a necessidade de métodos analíticos para a detecção e quantificação desses compostos em amostras biológicas na toxicologia forense (FENG *et al.*, 2019).

Para a identificação e quantificação dessas substâncias, amostras *ante mortem* ou *post mortem* são utilizadas nas análises, sendo o sangue, urina, plasma e cabelo as principais matrizes biológicas utilizadas (DORTA *et al.*, 2018). Os peritos criminais encarregados na produção dos laudos periciais usufruem dos avanços tecnológicos da instrumentação analítica para a análise desses compostos, mas como são amostras de extrema complexidade, existe geralmente a necessidade de uma etapa prévia chamada de preparo ou pré-tratamento de amostra antes da injeção das mesmas no instrumento analítico (MERIB; CARASEK, 2013).

Técnicas de microextração em fase sólida e em fase líquida têm sido utilizadas nos procedimentos de preparo de amostra para o isolamento e pré-concentração dos analitos antes da análise propriamente dita, geralmente por cromatografia líquida ou gasosa, ambas acopladas à espectrometria de massas (QUEIROZ, 2009; ASENSIO-RAMOS *et al.*, 2011). Dentre as técnicas de microextração em fase sólida frequentemente utilizadas pode-se citar a microextração em fase sólida (SPME), a microextração adsortiva em barra (BA μ E) e a extração em ponteiras descartáveis (DPX). Já as técnicas de microextração em fase líquida suportada por membrana oca (HF-LPME), a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) e a microextração líquido-líquido homogênea (HLLME) se destacam entre as técnicas de microextração em fase líquida.

Diferentes solventes orgânicos podem ser empregados nessas técnicas de microextração, mas nos últimos anos têm surgido solventes alternativos como os líquidos iônicos, solventes eutéticos e os solventes de hidrofiliabilidade comutável (POCHIVALOV *et al.*, 2017). Entre o período de 2010, ano em que os solventes de hidrofiliabilidade comutável foram reportados pela primeira vez na literatura, e 2020, houve um aumento significativo de publicações contendo o termo “*switchable hydrophilicity solvents*”, como mostrado na **Figura 1** (JESSOP *et al.*, 2010). É possível notar que há um crescente interesse da comunidade científica em pesquisas relacionadas com esses solventes, no entanto, o conhecimento do potencial da aplicabilidade desses solventes em técnicas de microextração, principalmente no âmbito forense, ainda é escasso, gerando uma demanda a ser explorada.

Figura 1. Publicações de artigos científicos contendo o termo “*switchable hydrophilicity solvents*” no período de 2010 a 2020.



Fonte: SCOPUS (2020).

Sendo assim, esse trabalho propõe uma nova metodologia analítica para a determinação de antidepressivos em urina humana utilizando solvente de hidrofiliabilidade comutável na técnica de microextração líquido-líquido homogênea. Além disso, para facilitar a coleta de solvente no final do procedimento, um dispositivo simples e de baixo custo foi desenvolvido e aplicado na etapa de extração, apresentando-se como uma nova abordagem para a técnica de microextração líquido-líquido homogênea com solvente de hidrofiliabilidade comutável.

REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ANÁLISES TOXICOLÓGICAS FORENSES

No ordenamento jurídico atual, o Código de Processo Legal, no Art. 158 diz: “Quando a infração deixar vestígios, será indispensável o exame de corpo de delito, direto ou indireto, não podendo supri-lo a confissão do acusado”, e dentre os exames de corpo de delito pode-se citar os exames toxicológicos, que será indispensável para elucidar o fato cometido. Esse tipo de questão em uma investigação criminal exigirá uma análise química toxicológica para identificar qualquer substância nociva ao organismo que possa ter causado algum dano ou ter sido a causa do óbito (BRASIL, 1941; PASSAGLI, 2018).

As análises toxicológicas realizadas em processos criminais com interesse médico-legal a fim de contribuir para o sistema judiciário são denominadas análises toxicológicas forenses, sendo empregadas nas mais diversas ocasiões (DORTA et al, 2018). As análises se classificam em toxicologia *post mortem* e toxicologia *ante mortem*. Na toxicologia *post mortem*, as análises são aplicadas em investigações de crimes com vítimas fatais em que exista a suspeita de que substâncias tóxicas tenham sido utilizadas para causar ou contribuir na morte do indivíduo (NEGRUSZ, COOPER, 2008). Já a toxicologia *ante mortem*, visa a identificação de diferentes substâncias que podem culminar em fatos de interesse forense sem que haja necessariamente um óbito, como por exemplo na verificação das condições psicomotoras de condutores de veículos e na verificação de exposição do trabalhador a substâncias ansiolíticas ou depressoras em casos de acidente de trabalho (DORTA et al., 2018; PASSAGLI, 2018).

Portanto, dentre as mais diversas análises requisitadas nos laboratórios de toxicologia forense, qualquer composto que possa causar ou ter causado um dano ou ter contribuído para o óbito de um ser vivo é considerado uma substância de interesse forense, entre elas, a classe dos antidepressivos (PASSAGLI, 2018).

2.2 ANTIDEPRESSIVOS

A depressão é uma doença que atinge mais de 264 milhões de pessoas em todo o mundo, sendo uma das principais contribuintes para outras doenças segundo a OMS (WHO, 2020). Em situações extremas, esse transtorno pode resultar em suicídio, em que aproximadamente um milhão de mortes ocorrem em decorrência dessa enfermidade por ano, sendo que para cada morte consumada, ocorrem vinte ou mais tentativas sem sucesso, mas que resultam em graves consequências para o indivíduo e também para a sociedade (DORTA *et al.*, 2018).

No Brasil, cerca de dez mil pessoas morrem por suicídio todos os anos (RODRIGUES; SOUZA; RODRIGUES; KONSTANTYNER, 2019), sendo os antidepressivos responsáveis por aproximadamente 20% das tentativas (BERNARDES; TURINI; MATSUO, 2010). No estado de Santa Catarina, segundo as informações publicadas pelo Centro de Informações e Assistência Toxicológica de Santa Catarina (CIATox/SC) referentes ao ano de 2017, ocorreram 4.086 casos de intoxicação por medicamentos, o que representa 27,9% de todos os casos. Os medicamentos são o principal agente causador das intoxicações dentre outras como animais peçonhentos (27,6%), agrotóxicos (4,1%) e drogas de abuso (2,2%). Dos 59 óbitos decorrentes de intoxicação, 17 foram causados por medicamentos (28,8%) e das 17 mortes, 10 foram causadas por tentativas de suicídio. Dentre os medicamentos, os antidepressivos mais envolvidos nos óbitos foram fluoxetina, amitriptilina, venlafaxina, nortriptilina e sertralina (CIATox/SC, 2018).

Já no estado do Rio Grande do Sul, o relatório anual de atendimento do ano de 2018 do Centro de Informação Toxicológica do Rio Grande do Sul (CIT/RS) demonstra que foram atendidos 24.892 casos de intoxicação. Dentre eles, 7.998 casos foram por medicamentos (32,1%), seguido por animais peçonhentos (28,7%). Dentre os casos de exposição a medicamentos, 62,7% foram advindos de tentativas de suicídio. Dos 22 óbitos decorrentes de intoxicação, 8 foram causados por medicamentos (36,4%). Dentre os medicamentos, os antidepressivos foram responsáveis por 2.547 casos de intoxicação, sendo as substâncias fluoxetina, amitriptilina, sertralina e imipramina as principais delas (CIT/RS, 2018).

O primeiro fármaco indicado para o tratamento da depressão, a imipramina, surgiu no ano de 1949 com modificações nos substituintes do iminodibenzil, em que

inicialmente esperavam-se efeitos no tratamento da esquizofrenia, mas como não houve melhoras clínicas no quadro psíquico e sim apresentou alívio na depressão dos pacientes, esse medicamento começou a ser utilizado para o tratamento dessa doença (KUHN, 2006).

Atualmente, novos fármacos foram desenvolvidos para o tratamento da depressão, em que se dividem em quatro grupos principais com estrutura química diferenciada e mecanismos de ações diversos, são eles:

- Antidepressivos tricíclicos (ADT);
- Inibidores da monoaminoxidase (IMAO);
- Inibidores seletivos de recaptção de serotonina (ISRS);
- Antidepressivos atípicos (AA).

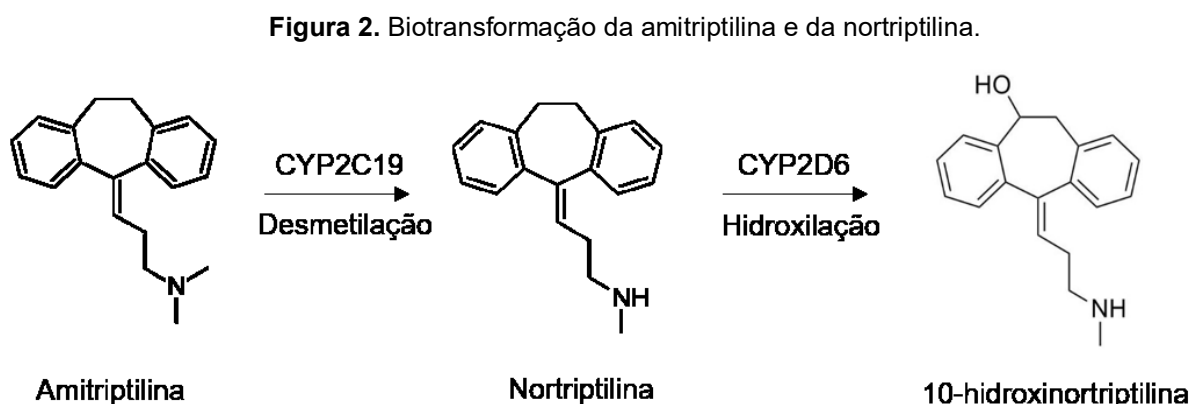
Na **Tabela 1**, estão representados alguns antidepressivos disponíveis comercialmente no Brasil, suas classes e respectivos nomes comerciais (DORTA *et al.*, 2018).

Tabela 1. Alguns antidepressivos disponíveis comercialmente no país.

Nome genérico	Classe	Nome comercial
Amitriptilina	ADT	Tryptanol® Tryptil® Limbitrol®
Imipramina	ADT	Tofranil®
Nortriptilina	ADT	Pamelon®
Desipramina	ADT	Norpramin®
Fluoxetina	ISRS	Prozac® Daforin®
Sertralina	ISRS	Zoloft®
Bupropiona	AA	Zyban®
Clomipramina	ADT	Anafranil®

Fonte: Adaptado de DORTA *et al.*, 2018.

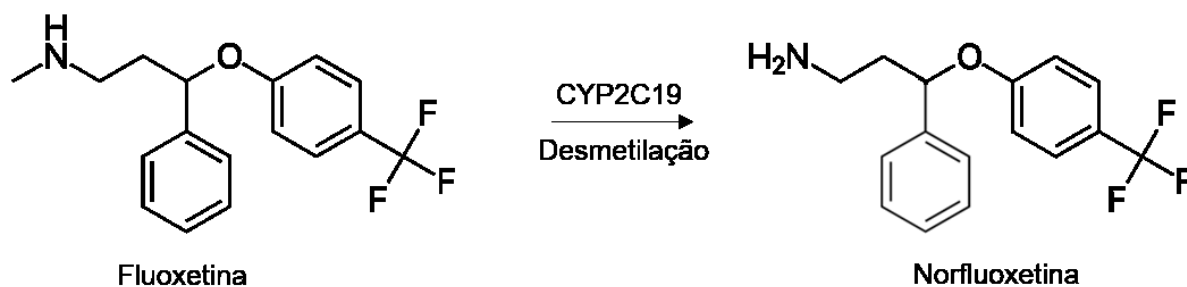
A toxicocinética dos antidepressivos tricíclicos inicia com a absorção do medicamento via oral, em que são rapidamente absorvidos e distribuídos no sangue através de ligações com as proteínas plasmáticas, que chegam a cerca de 75 a 97%. Em seguida, inicia-se a etapa da biotransformação em uma ou mais fases, em que os produtos de biotransformação podem apresentar atividade farmacológica superior ou inferior ao fármaco inalterado ou até mesmo serem inativados. Esse processo ocorre no fígado através de citocromos específicos como o P450, em que antidepressivos tricíclicos com aminas terciárias em suas estruturas são desmetiladas através do CYP2C19, mas não perdem a atividade farmacológica. A inativação é realizada com a hidroxilação catalisada pela CYP2D6 como mostrado na **Figura 2** (SILVA, 2010; MOFFAT, 2011).



Fonte: Adaptado de DORTA *et al.*, 2018.

Por outro lado, os inibidores seletivos de recaptação de serotonina, como a fluoxetina, são bem absorvidos via oral e essa substância é biotransformada por desmetilação no fígado pelas isoenzimas CYP2C9, 2C19 e 2D6 e transformada em seu principal produto de biotransformação, a norfluoxetina, como mostrado na **Figura 3**. O fármaco e seu produto de biotransformação são excretados majoritariamente na urina, mas também pelas fezes e pelo leite materno (EAP; BAUMANN, 1996; CHEER; GOA, 2001).

Figura 3. Biotransformação da fluoxetina.



Fonte: Adaptado de DORTA *et al.*, 2018.

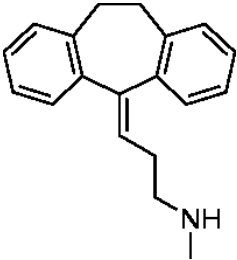
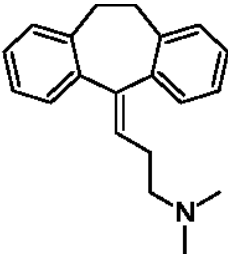
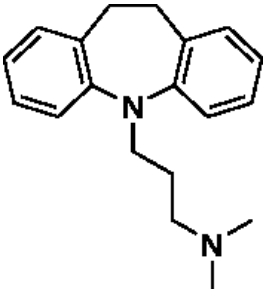
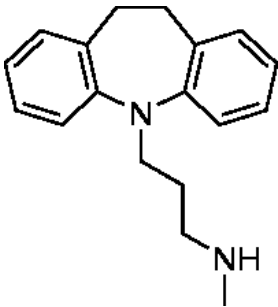
2.3 COMPOSTOS ESTUDADOS NESSE TRABALHO

Considerando a incidências dos antidepressivos em casos de intoxicação nos dois estados brasileiros e por estarem contemplados na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais - RENAME 2020 no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS), foram escolhidos para serem estudados nesse trabalho os compostos listados na **Tabela 2** com suas respectivas estruturas químicas, massas molares, ponto de ebulição e valores de pKa e de logP. Os diagramas das espécies de cada analito em função do pH estão presentes nos Anexos I a VI.

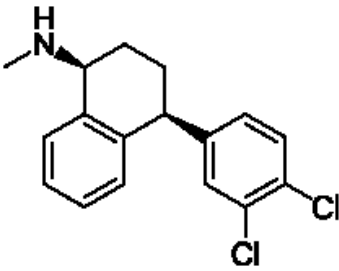
Tabela 2. Antidepressivos estudados nesse trabalho com suas respectivas propriedades físico-químicas.

Analito	Estrutura química	Massa molecular (g mol ⁻¹)	Ponto de ebulição (°C)	pKa	logP
Fluoxetina		309,3	395,0	9,8	4,6

Continuação da Tabela 2.

Analito	Estrutura química	Massa molecular (g mol ⁻¹)	Ponto de ebulição (°C)	pKa	logP
Nortriptilina		263,4	396,6	10,4	4,7
Amitriptilina		277,4	410,3	9,7	4,9
Imipramina		280,4	160,0	9,2	4,8
Desipramina		266,4	172,0	10,0	4,9

Continuação da Tabela 2.

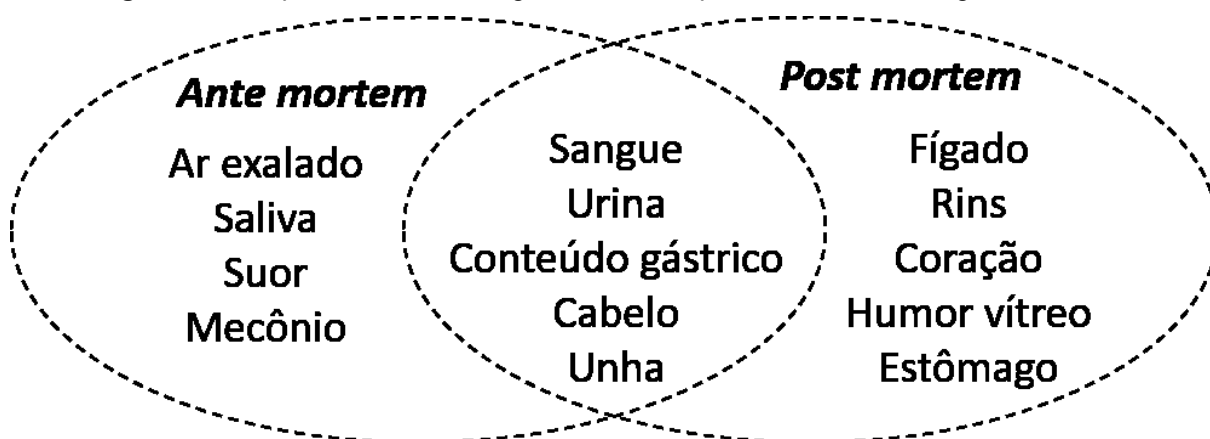
Analito	Estrutura química	Massa molecular (g mol ⁻¹)	Ponto de ebulição (°C)	pKa	logP
Sertralina		306,2	416,0	9,5	4,8

Fonte: CHEMICALIZE e PUBCHEM (2020).

2.4 URINA COMO AMOSTRA BIOLÓGICA EM ANÁLISES TOXICOLÓGICAS

A escolha da matriz utilizada nas análises toxicológicas é um passo crucial no processo, já que uma escolha inadequada pode alterar completamente a interpretação dos resultados obtidos, assim como o desfecho de uma investigação forense, trazendo graves consequências para as partes envolvida (LILLSUNDE, 2008). Nessas análises, as amostras frequentemente utilizadas para auxiliar no esclarecimento de eventos criminais são as amostras biológicas, em que se destacam as matrizes convencionais como urina e sangue, e as matrizes alternativas como o fluido oral, *humor vítreo*, mecônio, suor e cabelo (GRAZIANO *et al.*, 2019). A **Figura 4** demonstra as principais amostras utilizadas na toxicologia forense.

Figura 4. Principais amostras biológicas utilizadas para análises toxicológicas forenses.



Fonte: Adaptado de DORTA *et al.*, 2018.

Dentre as amostras citadas, a urina é a matriz de escolha com uso mais difundido, com grande aplicabilidade em diversos métodos para a análise de diferentes substâncias de interesse forense. A urina é formada continuamente pelos rins em que se apresenta como um ultrafiltrado do sangue contendo várias substâncias químicas (inorgânicas e orgânicas) dissolvidas em água. A substância orgânica mais abundante é a ureia, seguida de creatinina e ácido úrico. Em menores proporções estão presentes hormônios, vitaminas, drogas e medicamentos. Já entre os componentes inorgânicos, estão presentes o cloreto, sódio e o potássio. A constituição da urina varia conforme diferentes fatores como hábitos alimentares, atividade física, metabolismo, função endócrina, entre outros (DORTA *et al.*, 2018).

Essa matriz tem sido indicada para análises forenses por diversos fatores, como por exemplo a coleta não invasiva, disponibilidade em grandes quantidades, maioria das substâncias são excretadas por essa via, possibilidade de associação da substância e seus produtos de biotransformação e a permanência deles por um período de tempo maior quando comparado às amostras de sangue (BORDIN *et al.*, 2015).

Outro fator que favorece as análises toxicológicas em amostras de urina é o fato que as concentrações das substâncias e seus respectivos produtos de biotransformação são mais altas que as usualmente encontradas no sangue. Além disso, as amostras de urina possuem menores quantidades de interferentes como proteínas e lipídeos (DRUMMER, 2008).

A janela de detecção de substâncias químicas na urina pode variar de dias a semanas, podendo variar conforme a dose, tipo de uso (agudo ou crônico), uso concomitante com outras substâncias, metodologia analítica utilizada, diferenças individuais do metabolismo e o pH da urina (VERSTRAETE, 2004).

Para que a análise seja efetivamente útil e bem-sucedida para a investigação criminal, algumas medidas devem ser levadas em consideração, abrangendo desde a etapa de coleta do material até os procedimentos analíticos e a interpretação dos resultados gerados. Na coleta de cada tipo de amostra, algumas particularidades devem ser consideradas, uma vez que podem influenciar nas análises do material e também na interpretação dos resultados (PASSAGLI, 2018).

A coleta de urina pode-se dar em duas situações diferentes, no periciado vivo e no periciado morto. No primeiro caso, a coleta deve ser feita pelo próprio periciado em um recipiente adequado e deve ser assistida para evitar adulterações tais como diluições com água da torneira ou do vaso sanitário, uso de urina de outra pessoa ou adição de outras substâncias. Se não for possível o monitoramento, deve-se evitar que o periciado acesse antes e durante a coleta torneiras, vasos sanitários, detergentes e qualquer outro meio que possa causar qualquer tipo de adulteração. Qualquer irregularidade no momento da coleta, por exemplo, amostras incolores, com sujidades, temperatura do frasco nitidamente abaixo da temperatura do corpo humano, devem ser registradas (DINIS-OLIVEIRA; VIEIRA; MAGALHÃES, 2016).

No caso de coleta de urina de periciados mortos, ela deve ser realizada por punção e aspiração do conteúdo da bexiga com o uso de seringa e agulha. Se não houver presença de urina na bexiga, pode-se lavar as paredes com o uso de água ou solução salina, procedimento que deve ser evidenciado na requisição e identificação da amostra como "lavado vesical" (DINIS-OLIVEIRA; VIEIRA; MAGALHÃES, 2016).

Após realizada a coleta, as amostras devem ser armazenadas sob refrigeração a 4 °C para análise a curto prazo e a - 20 °C para análise a longo prazo. É importante destacar que os analitos presentes nas amostras estão sujeitos à degradação com o tempo, promovendo alterações na concentração desses compostos nas amostras, sendo esse valor muito importante para que se estime o efeito dessa substância no organismo e se houve uma degradação significativa caso a alteração da concentração seja muito pronunciada. Sendo assim, é essencial conhecer a estabilidade das substâncias nas amostras coletadas para que não ocorra falsos negativos oriundos

da degradação total do analito ou degradação parcial até concentrações abaixo do limite de detecção do método de análise (PASSAGLI, 2018).

A maior parte das técnicas analíticas empregadas na toxicologia forense não são compatíveis com a injeção direta da amostra no instrumento analítico, sendo necessário que as mesmas passem por algum tipo de processamento antes da análise propriamente dita, esse procedimento prévio recebe o nome de preparo de amostra (MERIB; CARASEK, 2013).

2.5 PREPARO DE AMOSTRA

A etapa de preparo de amostra é frequentemente considerada a etapa crucial na análise química quantitativa e sua execução é muitas vezes decisiva para a obtenção de resultados confiáveis devido à possibilidade de perdas de analito e de contaminação da amostra, além dos longos tempos que podem chegar a 85% do tempo total envolvido no procedimento (STASHENKO, MARTÍNEZ, 2011; CARASEK, MERIB, 2015; GAMA *et al.* 2019).

Os principais objetivos da etapa de preparo de amostra incluem a redução ou eliminação de possíveis interferências provenientes da matriz, isolamento do analito, aumento da seletividade e a pré-concentração dos analitos da amostra para melhorar a sensibilidade da metodologia de análise (NIU *et al.* 2018). Sendo assim, alguns fatores devem ser considerados na escolha da técnica de preparo de amostra baseados nas características dos componentes da matriz, como por exemplo a polaridade, a solubilidade e a estabilidade química e térmica a fim de promover uma transferência de massa eficiente do analito garantindo um excelente resultado na análise química (BORGES *et al.*, 2015).

Ao longo dos anos, algumas técnicas tradicionais de preparo de amostras foram desenvolvidas, tais como a extração sólido-líquido, conhecido como *Soxhlet*, a extração líquido-líquido (LLE, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*) e a extração em fase sólida (SPE, do inglês *Solid Phase Extraction*). Essas técnicas são muito bem conhecidas internacionalmente e seu uso é reportado em diferentes metodologias. No entanto, análises em matrizes complexas e aplicações *on-site* e *in vivo* não são facilmente executáveis com essas abordagens clássicas. Além disso, elas estão associadas a um maior risco operacional, utilização de solventes orgânicos tóxicos e

grande geração de resíduos, o que são características indesejáveis na etapa de preparo de amostra (CASTRO, PRIEGO-CAPOTE, 2010; BOYACI *et al.*, 2015).

Para contornar essas adversidades, a química analítica moderna tem focado na simplificação, miniaturização e automatização das técnicas e diminuição do consumo de solventes orgânicos e do volume amostral, na qual as técnicas de microextração merecem destaque nesse contexto (QUEIROZ, 2009; ASENSIO-RAMOS *et al.*, 2011).

As técnicas de microextração são divididas em técnicas de microextração em fase sólida, na qual destacam-se a Microextração em Fase Sólida (SPME, do inglês *Solid Phase Microextraction*), Microextração em Barra Adsorptiva (BA μ E, do inglês *Bar Adsorptive Microextraction*) e Extração em Ponteiros Descartáveis (DPX, do inglês *Disposable Pipette Extraction*); e em técnicas de microextração em fase líquida detalhadas a seguir (ARTHUR *et al.*, 1990; NOGUEIRA, 2013; BREWER *et al.*, 2014).

2.6 TÉCNICAS DE MICROEXTRAÇÃO EM FASE LÍQUIDA

As técnicas de microextração em fase líquida (LPME, do inglês *Liquid Phase Microextraction*), também conhecidas como técnicas de microextração com solventes (SME, do inglês *Solvent Microextraction*), são técnicas de preparo de amostra para a extração e concentração dos analitos em amostras líquidas, gasosas e sólidas, utilizando baixos volumes (inferiores a 100 μ L) de solvente orgânico (KOKOSA, 2013). Essas técnicas foram criadas a fim de superar as limitações da técnica clássica LLE, como o elevado consumo de solvente orgânico, muitas vezes tóxico tanto para o analista como para o meio ambiente, a formação de emulsões, longos tempos de extração e a geração significativa de resíduos (KOKOSA, 2013; PINTO, PEDROSO, 2015; KOKOSA, 2019).

As técnicas de LPME possuem diferentes métodos de operação de acordo com a forma em que a fase orgânica extratora se encontra, na qual as seguintes técnicas se destacam:

I) Microextração em Gota Única (SDME, do inglês *Single-Drop Microextraction*): nessa configuração uma única gota do solvente extrator, que é imiscível com a

amostra, é colocada em contato com a amostra ou no *headspace* (JEANNOT, CANTWELL, 1996);

II) Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME, do inglês *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*): um solvente utilizado como fase extratora imiscível com a amostra é disperso em solução aquosa pelo auxílio de um solvente dispersor solúvel na amostra, posteriormente separado e recuperado por um processo de centrifugação (REZAEI *et al.*, 2006).

III) Microextração em Fase Líquida com Membrana de Fibra Oca (HF-LPME, do inglês *Hollow Fiber Liquid Phase Microextraction*): um solvente orgânico imiscível na amostra é imobilizado nos poros de uma membrana de fibra oca porosa e o interior da membrana é preenchido com esse mesmo solvente orgânico (configuração em 2 fases) ou com uma solução aquosa (configuração em 3 fases) (PEDERSEN-BJERGAARD, RASMUSSEN, 1999).

IV) Microextração Líquido-Líquido Homogênea (HLLME, do inglês *Homogeneous Liquid-Liquid Microextraction*): um solvente orgânico solubilizado na amostra é separado com a adição de um agente capaz de diminuir a solubilidade desse solvente na fase aquosa (CHERKASHINA *et al.*, 2019).

A técnica de HLLME foi escolhida para ser utilizada no desenvolvimento desse trabalho e será detalhada a seguir.

2.7 MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO HOMOGÊNEA

Essa técnica de extração e pré-concentração é similarmente baseada nos princípios da DLLME, com exceção de que o solvente orgânico entra em contato com a fase aquosa formando uma única fase sem a adição de qualquer outro agente. Essa técnica é capaz de extrair os analitos de uma solução homogênea em um pequeno volume de solvente formado a partir do fenômeno de separação de fases (ÇABUK; KÖKTÜRK; ATA, 2014).

Na HLLME, não existe uma interface entre a fase aquosa e o solvente orgânico, em outras palavras, a área superficial da interface é infinitamente larga, sendo desnecessária agitação mecânica para a solubilização. Sendo assim, essa técnica apresenta como vantagem a elevada velocidade de extração devido à ausência de obstáculos na superfície de contato entre a fase aquosa e o solvente orgânico durante o processo de extração, além de reduzir o custo, consumo e exposição de solventes orgânicos (EBRAHIMPOUR; YAMINI; ESRAFILI, 2013; YAZDANFAR; YAMINI; GHAMBARIAN, 2013).

O procedimento de extração com essa técnica é bastante simples e requer apenas a adição de um agente que promova a separação de fase, sendo os mais comuns a adição de sal que promove o efeito *salting-out* (FARAJZADEH; SHEYKHIZADEH; KHORRAM, 2013; POCHIVALOV *et al.*, 2017), sistemas com surfactantes perfluorados (GHIASVAND *et al.*, 2005) e formação de par iônico (JAMALI; ASSADI; SHEMIRANI, 2007).

Recentemente, uma nova maneira de promover a separação de fases dependente apenas do pH da solução foi proposta. O solvente selecionado deve possuir solubilidade dependente do pH na fase aquosa, uma boa capacidade de extração do analito e densidade menor que a da água. Por esses motivos, a escolha do solvente torna-se bastante restrita, já que a disponibilidade de solventes que atendam a tais requisitos ainda é baixa (ÇABUK; KÖKTÜRK; ATA, 2014).

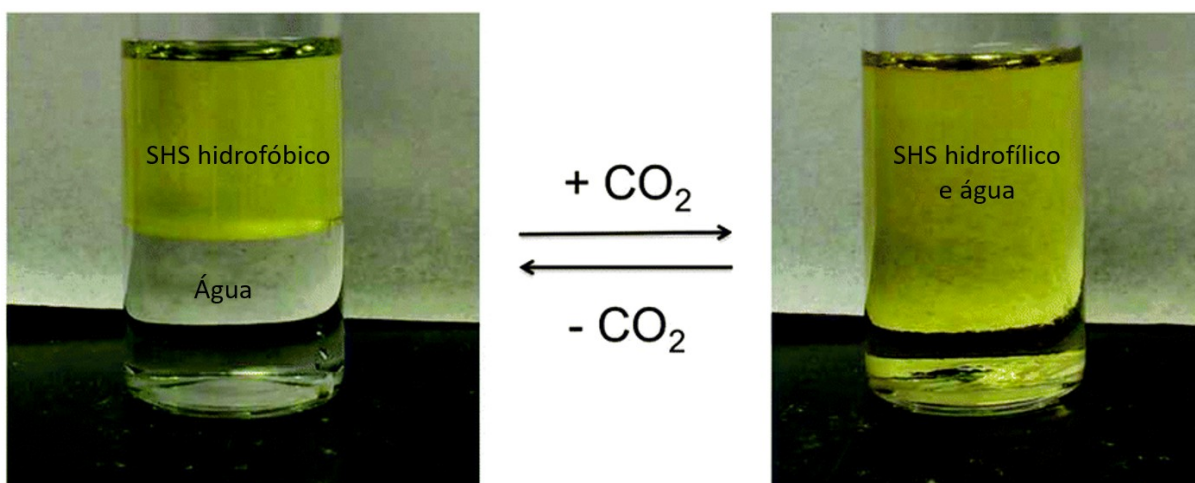
Nos últimos anos, uma nova e promissora classe de solventes foi proposta para atuar como solvente extrator nessa técnica de microextração, denominados de solventes de hidrofiliabilidade comutável (SHSs, do inglês *Switchable Hydrophilicity Solvents*) (POCHIVALOV *et al.*, 2017). Os SHSs são considerados novos solventes de extração para HLLME devido às suas capacidades únicas de alterar a hidrofiliabilidade dependendo do pH do meio. A alternância entre as formas hidrofílicas e hidrofóbicas simplifica a separação de fases e fornece um excelente campo para o desenvolvimento de procedimentos de microextração para diferentes aplicações (CHERKASHINA *et al.*, 2019). Esse foi o tipo de solvente escolhido para ser utilizado na metodologia proposta nesse trabalho e será melhor explorado a seguir.

2.8 SOLVENTES DE HIDROFILICIDADE COMUTÁVEL

Nos processos químicos industriais, muitas vezes é necessário a realização da remoção do solvente após a obtenção do produto final por meio de um processo de destilação, sendo assim, o solvente empregado deve ser obrigatoriamente volátil. A utilização desse tipo de solvente possui algumas desvantagens tais como a alta inflamabilidade, alta toxicidade, formação de *smog* e altos custos com segurança na indústria. Sabe-se que a utilização de solventes não voláteis evita todos esses problemas, entretanto, esses solventes não podem ser destilados. Sendo assim, uma nova rota de separação do solvente do produto final sem necessitar do processo de destilação seria um ótimo avanço e uma alternativa para a redução dos problemas ambientais, de saúde e de segurança causados por esses solventes. Considerando esses fatores, Philip G. Jessop e colaboradores no ano de 2010 introduziram os SHSs (JESSOP *et al.*, 2010).

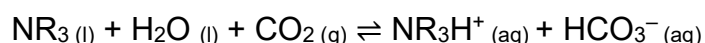
Os SHSs são solventes que podem comutar entre duas formas simplesmente por uma mudança no sistema conforme ilustrado na **Figura 5**. Com a adição de CO_2 , esses solventes se tornam completamente miscíveis em água e com a retirada desse gás por aquecimento e/ou introdução de um gás inerte (N_2 ou Ar) no sistema, eles retornam a ser imiscíveis (JESSOP *et al.*, 2010; JESSOP *et al.*, 2011).

Figura 5. Comportamento de um solvente de hidrofiliidade comutável com a adição e remoção de CO_2 do meio.



Fonte: Adaptado de DURELLE *et al.* (2014).

Esse comportamento ocorre devido à reação ácido-base, na qual a formação de um sal de bicarbonato através da protonação do SHS torna esse solvente miscível em água. O gás carbônico foi escolhido para proporcionar a comutação, pois é um gás não tóxico, de baixo custo e facilmente removível do meio. Os SHSs são geralmente amidinas e aminas secundárias ou terciárias, sendo assim, comportam-se conforme a reação química:



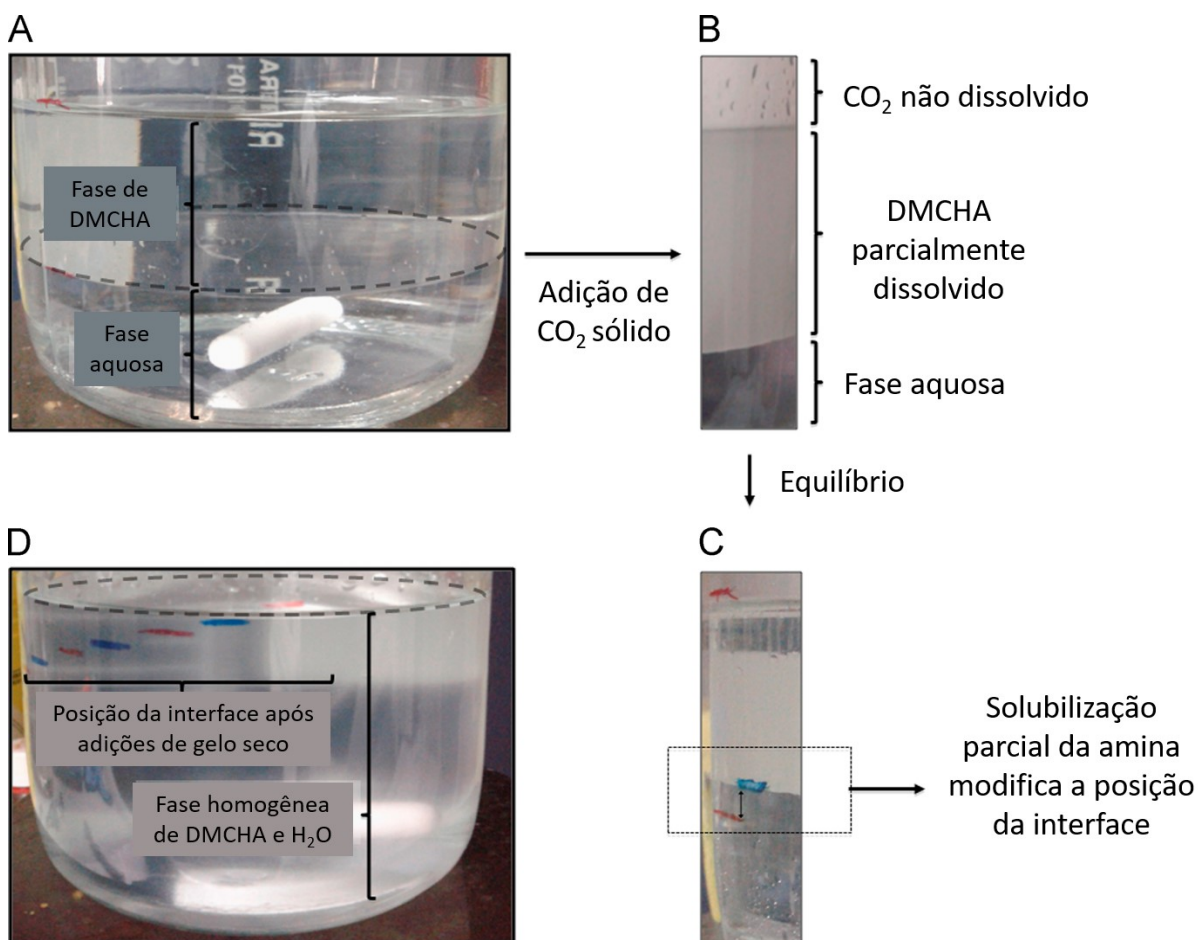
O primeiro SHS reportado por Jessop *et al.* foi a *N,N,N*-tributilpentanamidina, utilizado na extração de óleo proveniente de soja. Esse solvente é uma amidina líquida que não é disponível comercialmente, a reação de síntese é bastante difícil e apresenta elevada instabilidade. Para driblar esses efeitos, esse pesquisador reportou uma série de aminas terciárias que são de fácil preparação e em alguns casos comercialmente disponíveis que podem atuar como SHSs, tais como a trietilamina, dietilbutilamina, *N*-etilpiperidina e *N,N*-dimetilciclohexilamina (JESSOP *et al.*, 2011). Entretanto, alguns desses SHSs apresentam riscos como elevada toxicidade, volatilidade considerada e potencial de inflamabilidade, tornando-os menos desejáveis para o uso industrial.

Sendo assim, Vanderveen *et al.* (2014) reportaram treze novas aminas secundárias e terciárias que podem atuar como SHSs e que são de fácil preparação e disponíveis comercialmente, em que possuem em comum valores de logP entre 1,2 e 2,5 e de pKa acima de 9,5. Além disso, realizaram um estudo de todos os SHSs já citados em relação às propriedades, riscos à saúde e impactos ambientais (VANDERVEEN *et al.*, 2014). Diaminas também foram reportadas recentemente como SHSs, apresentando uma maior solubilidade na fase aquosa com a inserção de CO₂, o que demonstrou uma melhor eficiência de extração ao retornar à fase hidrofóbica, mas um tempo maior é necessário para essa transição, além de formação de espuma (VANDERVEEN *et al.*, 2018).

A primeira vez que um SHS foi reportado como solvente em uma técnica de microextração foi no ano de 2015 na análise de benz[a]antracenos em amostras de água por espectroscopia de fluorescência e de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA's) por cromatografia gasosa. No procedimento experimental,

primeiramente utilizou-se CO_2 sólido (gelo seco) para a solubilização da *N,N*-dimetilciclohexilamina (DMCHA) em água formando uma solução homogênea aquosa estável utilizada como fase extratora na etapa de extração, como mostrado na **Figura 6** (LASARTE-ARAGONÉS *et al.*, 2015).

Figura 6. Etapas de dissolução de DMCHA em água para formar a fase extratora.



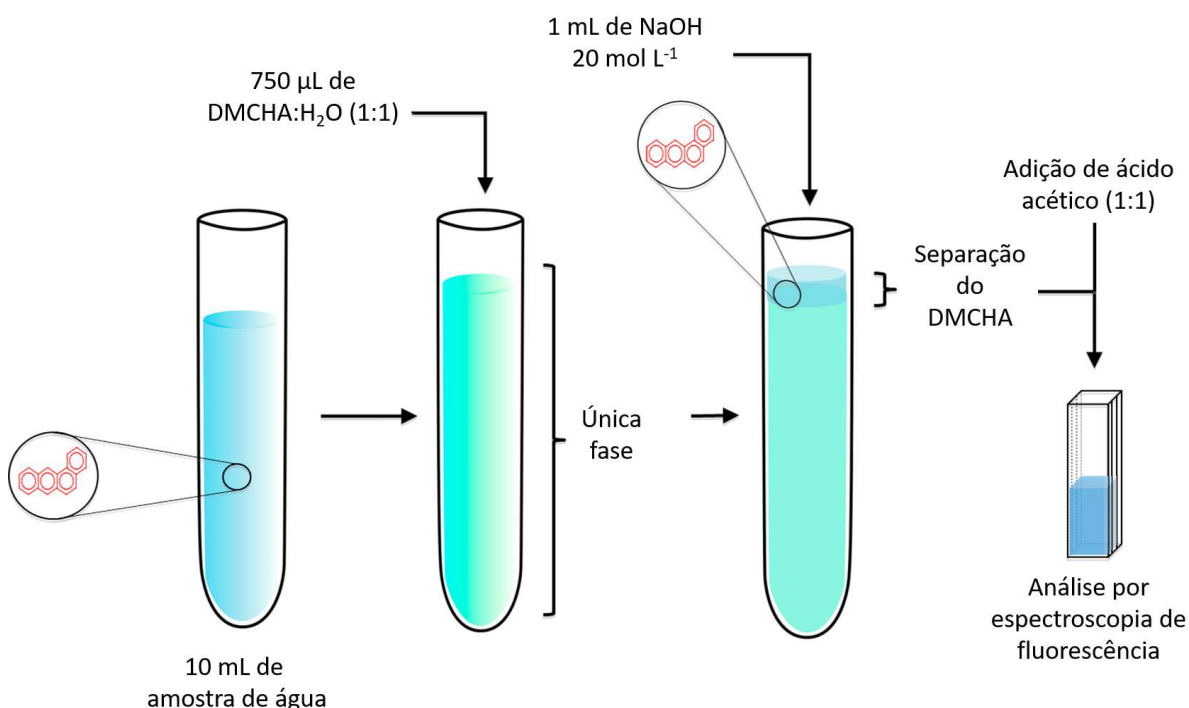
Legenda: (A) estado inicial em que as duas fases imiscíveis são observadas; (B) detalhe da garrafa após a adição de 10 g de gelo seco em que são observadas três fases (duas líquidas e uma gasosa); (C) detalhe da garrafa após a solubilização do CO_2 em que a mudança na posição da interface é mostrada; (D) estado final após as várias adições de gelo seco que mostram uma fase líquida homogênea.

Fonte: Adaptado de LASARTE-ARAGONÉS *et al.*, 2015.

Essa solução foi adicionada à amostra e agitada por determinado tempo, em seguida um certo volume de solução de NaOH 20 mol L^{-1} foi adicionada à amostra e agitada novamente e finalmente deixada em repouso para proporcionar a separação de fases, na qual o sobrenadante foi retirado e diluído com ácido acético na proporção 1:1 e finalmente analisado por fluorescência, como ilustrado na **Figura 7**. Portanto, ao

contrário de retirar o gás carbônico solubilizado para a mudança de miscibilidade do SHS em água, no procedimento de extração foi utilizada uma mudança de pH com a adição de hidróxido de sódio na solução (LASARTE-ARAGONÉS *et al.*, 2015).

Figura 7. Procedimento de extração do primeiro trabalho reportado utilizando SHS.

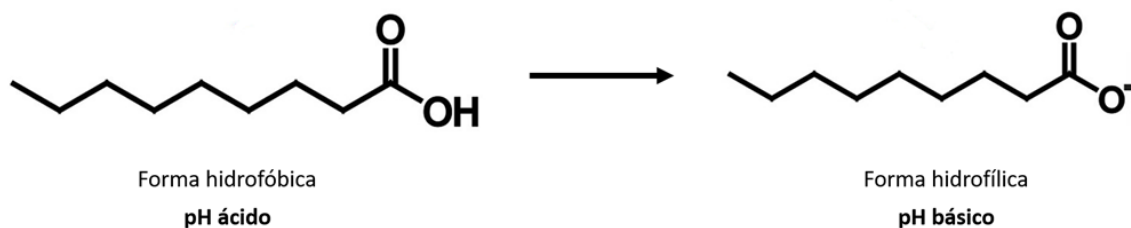


Fonte: Adaptado de LASARTE-ARAGONÉS *et al.*, 2015.

Em um segundo estudo do referido grupo, o mesmo SHS (*N,N*-dimetilciclohexilamina) foi utilizado para a determinação de herbicidas do grupo das triazinas em amostras aquosas. O uso de SHSs na microextração líquido-líquido homogênea foi denominado pelos autores como microextração líquido-líquido homogênea com solvente de hidrofiliabilidade comutável (SHS-HLLME, do inglês *switchable hydrophilicity solvent homogeneous liquid-liquid microextraction*) (LASARTE-ARAGONÉS *et al.*, 2015).

Mais tarde, ácidos graxos de cadeia média foram reportados também como SHSs, pois apresentam as mesmas propriedades comutáveis sob diferentes pHs, sendo utilizados na determinação de alquilfenóis em amostras aquosas (SHIH *et al.*, 2015). A **Figura 8** demonstra o comportamento de ácidos graxos na influência de meios aquoso ácidos e básicos.

Figura 8. Comportamento de ácidos graxos de cadeia média sob diferentes pHs.



Fonte: Adaptado de POCHIVALOV *et al.*, 2017.

Em 2016, um método automatizado utilizando ácidos graxos como SHS foi proposto para a determinação de ofloxacina em amostras de urina, na qual carbonato de sódio foi utilizado como reagente para solubilizar o ácido graxo na amostra aquosa e posteriormente adicionado ácido sulfúrico que formou bolhas propiciando a extração dos analitos e conseqüentemente a separação das fases para posterior análise (VAKH *et al.*, 2016).

Desde a inserção desses solventes em técnicas de microextração no ano de 2015, alguns trabalhos foram reportados na literatura para a determinação de diferentes substâncias e em diversas matrizes como pode ser observado na **Tabela 3**. A aplicabilidade desses solventes foi mais explorada em matrizes aquosas, ambientais e alimentares, sendo as matrizes biológicas muito pouco estudadas até o momento. Os compostos determinados em matrizes biológicas (urina, sangue, plasma e saliva) foram medicamentos (ofloxacina, nitrazepam, diclazepam e drogas anti-inflamatórias não esteroidais), drogas de abuso (metanfetamina, metadona e tramadol) e o praguicida paraquat. As análises dos extratos advindos do preparo de amostra com a utilização desses solventes são realizadas principalmente por cromatografia gasosa e cromatografia líquida, mas também em uma menor proporção por outras técnicas espectrométricas e voltamétricas.

Tabela 3. Aplicações do uso de solventes de hidrofilicidade comutável em técnicas de microextração reportadas na literatura.

SHS	Técnica	Analito (s)	Amostra (s)	Instrumentação analítica	Referência
<i>N,N</i> -dimetilciclohexilamina	Microextração Líquido-Líquido Homogênea com Solvente de Hidrofilicidade Comutável (SHS-HLLME)	Benz[a]antraceno	Água de torneira, de garrafa e de rio	AFS	LASARTE-ARAGONÉS <i>et al.</i> , 2015
<i>N,N</i> -dimetilciclohexilamina	Microextração Líquido-Líquido Homogênea com Solvente de Hidrofilicidade Comutável (SHS-HLLME)	Triazinas	Água	GC-MS	LASARTE-ARAGONÉS <i>et al.</i> , 2015
Ácido hexanóico	Microextração em Fase Líquida com Solvente Comutável Assistida por Efervescência (EA-SS-LPME)	Ofloxacina	Urina	HPLC-FLD	VAKH <i>et al.</i> , 2016
Ácido nonanóico	Microextração com Membrana e Solvente de Hidrofilicidade Comutável (SHS-MME)	Fluoroquinolonas	Camarão	HPLC-FLD	POCHIVALOV <i>et al.</i> , 2017

SHS	Técnica	Analito (s)	Amostra (s)	Instrumentação analítica	Referência
Ácido heptanóico	Microextração Líquido-Líquido Dispersiva em Tubo com Ácido Graxo (FA-IT-DLLME)	Alquilfenóis	Água	HPLC–UV	SHIH <i>et al.</i> , 2015
Ácido nonanóico	Microextração com ácido graxo comutável assistida por efervescência combinada com solidificação de gotículas orgânicas flutuantes (EA-SFAM-SFO)	Fluoroquinolonas e tetraciclinas	Água de mar, sedimentos e frutos do mar	HPLC-UV	GAO <i>et al.</i> , 2018
Trietilamina	Microextração Líquido-Líquido Homogênea com Solvente de Hidrofilicidade Comutável e par iônico (IP-SHS-HLLME)	Paraquat	Urina, plasma, água de rio e suco de maçã	HPLC–UV	KAKAVANDI <i>et al.</i> , 2017
Dipropilamina	Microextração Líquido-Líquido Homogênea com Solvente de Hidrofilicidade Comutável (SHS-HLLME)	Metanfetamina	Urina	GC-MS	SHAHVANDI <i>et al.</i> , 2018

SHS	Técnica	Analito (s)	Amostra (s)	Instrumentação analítica	Referência
Dipropilamina	Microextração Líquido-Líquido Homogênea com Solvente Comutável (SS-HLLME)	Nitrazepam	Urina	DPV	SHAHRAKI <i>et al.</i> , 2018
Ácido decanóico	Microextração Líquido-Líquido Homogênea com Solvente de Hidrofilicidade Comutável em Microseringa (μ S-SHS-HLLME)	Vanádio	Água e alimento	ETAAS	NAEEMULLA H <i>et al.</i> , 2019
Ácido hexanóico	Microextração mediada por Surfactante com Solvente de Hidrofilicidade Comutável (SHS-SME)	Corantes	Alimentos sólidos	HPLC-UV	POCHIVALOV <i>et al.</i> , 2018
<i>N,N</i> -dimetilciclohexilamina	Microextração Líquido-Líquido com Solvente de Hidrofilicidade Comutável (SHS-LLME)	Drogas de abuso	Urina	GC-MS	XU <i>et al.</i> , 2018

Continuação da Tabela 3.

SHS	Técnica	Analito (s)	Amostra (s)	Instrumentação analítica	Referência
Dipropilamina	Microextração Líquido-Líquido Homogênea com Solvente de Hidrofilicidade Comutável (SHS-HLLME)	Metadona e tramadol	Urina	GC-FID	AHMAR <i>et al.</i> , 2018
<i>N,N</i> -dimetilciclohexilamina	Microextração Líquido-Líquido com Solvente de Hidrofilicidade Comutável (SHS-LLME)	Anti-inflamatórios não esteroidais	Urina, saliva e leite	HPLC-DAD	HASSAN <i>et al.</i> , 2019
<i>N,N</i> -dimetilciclohexilamina	Microextração Baseada com Solvente de Hidrofilicidade Comutável (SHS-BME)	Bisfenóis	Leite, suco e energético	HPLC-UV	WANG <i>et al.</i> , 2018
Ácido hexanóico	Microextração Líquido-Líquido Homogênea com Solvente de Hidrofilicidade Comutável (SHS-HLLME)	Sulfonamidas	Carne de frango	HPLC-UV	DI <i>et al.</i> , 2019

Continuação da Tabela 3.

SHS	Técnica	Analito (s)	Amostra (s)	Instrumentação analítica	Referência
Dipropilamina	Microextração com Solvente de Hidrofilicidade Comutável (SHS-ME)	Compostos nitroaromáticos	Água	GC-FID	RAMESHGAR <i>et al.</i> , 2017
Trietilamina	Microextração Líquido-Líquido com Solvente de Hidrofilicidade Comutável Assistida com Ar (AA-SHS-LLME)	Paládio (II)	Água, poeira e conversor catalítico	ETAAS	EZODDIN <i>et al.</i> , 2016
Tetraetilenopentamina	Microextração Líquido-Líquido Dispersiva com Solvente de Hidrofilicidade Comutável (SHDS-LLME)	Anfenicóis	Alimentos	HPLC-UV	LI <i>et al.</i> , 2018
<i>N,N</i> -dimetilciclohexilamina	Microextração Líquido-Líquido com Solvente de Hidrofilicidade Comutável (SHS-LLME)	Diclazepam	Urina	GC-MS	XU <i>et al.</i> , 2018
Trietilamina	Apenas informou que usou Solvente de Hidrofilicidade Comutável na extração	Níquel	Água	UV-Vis	BAZEL' <i>et al.</i> , 2017

Continuação da Tabela 3.

SHS	Técnica	Analito (s)	Amostra (s)	Instrumentação analítica	Referência
<i>N,N</i> -dimetilciclohexilamina	Microextração Líquido-Líquido com Solvente Comutável (SS-LLME)	Paládio (II)	Água do mar e rio, poeira e conversor catalítico	FAAS	RECLO <i>et al.</i> , 2017
Trietilamina	Microextração Líquido-Líquido Homogênea com Solvente de Hidrofilicidade Comutável Assistida com Ultrassom (UA-SHS-HLLME)	Paraquat	Urina, plasma, água e suco	GC-MS	LAMEI <i>et al.</i> , 2018
Trietilamina	Microextração em Fase Líquida com Solvente de Hidrofilicidade Comutável (SHS-LPME)	Chumbo e Cádmio	Água, chá e cabelo	GF-AAS	ZHANG <i>et al.</i> , 2018
Ácido nonanóico	Microextração Líquido-Líquido Homogênea Contínua (CHLLME)	Arsênio e Selênio	Água de rio e fígado bovino	HG-AFS	SHISHOV <i>et al.</i> , 2018
Ácido hexanóico	Microextração em Fase Líquida com membrana por agitação (SM-LPME)	Tetraciclinas	Urina	HPLC-UV	LEBEDINETS <i>et al.</i> , 2020

Continuação da Tabela 3.

SHS	Técnica	Analito (s)	Amostra (s)	Instrumentação analítica	Referência
Dipropilamina	Microextração com solvente comutável com temperatura controlada (TSSME)	Ftalatos	Água	GC-MS	SHAHVANDI <i>et al.</i> , 2020
Ácido octanóico	Microextração em Fase Líquida com Solvente de Hidrofilicidade Comutável Assistida por Comprimido Magnético Efervescente (META-SHS-LPME)	Triazinas	Água	HPLC-DAD	JING <i>et al.</i> , 2020
Ácido octanóico	Microextração com Solvente de Hidrofilicidade Comutável Assistida por Comprimido Efervescente e Solidificação de Gotas Orgânicas Flutuantes (ETA-SHS-ME-SFO)	Desreguladores endócrinos	Cerveja	HPLC-FLD	JING <i>et al.</i> , 2020

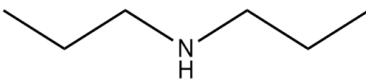
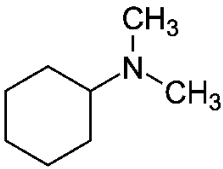
Fonte: Autoria própria (2020).

Nas técnicas de microextração reportadas utilizando os SHSs, algumas variáveis são importantes e influenciam na eficiência de extração dos analitos. Desse modo, os trabalhos científicos têm avaliado as seguintes variáveis: tipo e volume de solvente (aminas e ácidos graxos); tipo, volume e concentração da solução responsável pela mudança de hidrofiliicidade (soluções ácidas e básicas); volume e pH da amostra; adição de sal e tempo de extração.

As principais vantagens demonstradas com a utilização de SHSs na etapa de preparo de amostra em técnicas de microextração são a rapidez, a simplicidade do procedimento, o baixo custo e o reduzido volume de solvente orgânico, que é ambientalmente mais amigável que os solventes clássicos, características que vão ao encontro dos objetivos das técnicas de microextração (VAKH *et al.*, 2016).

Ainda a partir da **Tabela 3**, pode-se observar que para compostos básicos, a dipropilamina (DPA) e a *N,N*-dimetilciclohexilamina (DMCHA) foram os dois solventes mais utilizados como fases extratoras nas técnicas de extração citadas nessa tabela. Portanto, nesse trabalho, esses dois solventes foram selecionados para verificar a aplicabilidade deles na determinação de antidepressivos em urina, cujas propriedades físico-químicas estão listadas na **Tabela 4**. Os diagramas das espécies de cada solvente em função do pH estão demonstrados nos Anexos VII e VIII.

Tabela 4. Solventes de hidrofiliicidade estudados nesse trabalho e suas respectivas propriedades físico-químicas.

Solvente	Estrutura química	Massa molecular (g mol ⁻¹)	Ponto de ebulição (°C)	pKa	logP
Dipropilamina		101,2	109,3	10,7	1,7
<i>N,N</i> -dimetilciclohexilamina		127,2	160,0	10,2	2,0

Fonte: CHEMICALIZE e PUBCHEM (2020).

A DPA e a DMCHA são aminas secundária e terciária, respectivamente, e possuem valores de pKa e logP característicos de aminas com comportamento comutável, como reportados por Vanderveen, *et al.* (2014). Sendo assim, esse trabalho propôs o estudo da aplicabilidade desses dois solventes na técnica de HLLME para a determinação de antidepressivos em urina humana, tendo em vista que aplicações de SHSs em matrizes biológicas foram muito pouco exploradas até o presente momento.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O principal objetivo deste trabalho foi propor um novo dispositivo simples e de baixo custo para a técnica de microextração líquido-líquido homogênea com solvente de hidrofiliabilidade comutável (SHS-HLLME) associado ao estudo da aplicabilidade dessa técnica na toxicologia forense para a determinação de antidepressivos em amostras de urina humana por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar a viabilidade do emprego de solventes de hidrofiliabilidade comutável (DMCHA e DPA) na determinação de antidepressivos em urina humana;
- Otimizar a separação e detecção dos compostos por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS);
- Otimizar as principais variáveis de influência da técnica de preparo de amostra para a extração dos analitos, tais como o tipo de SHS, volume da mistura SHS:HCl, volume de hidróxido de sódio, volume de amostra de urina e tempo de extração;
- Determinar os parâmetros de validação da metodologia desenvolvida;
- Aplicar a metodologia desenvolvida com a nova técnica proposta na análise de amostras de urina humana fornecidas pelo CIT/RS.

METODOLOGIA

4 METODOLOGIA

4.1 MATERIAIS, REAGENTES E APARELHOS

Padrões analíticos ($\geq 99,9\%$) de fluoxetina, amitriptilina, nortriptilina, imipramina, desipramina e sertralina foram adquiridos da Cerilliant Corporation (Round Rock, EUA) na concentração de 1000 mg L^{-1} em metanol. A partir dos padrões analíticos, foram preparadas soluções padrão de concentração 100 mg L^{-1} de cada composto em metanol. Em seguida, foi preparada uma solução de trabalho em metanol contendo a mistura de padrões de todos os analitos na concentração de 10 mg L^{-1} . Padrão analítico sólido da difenilamina ($\geq 99\%$) foi adquirido da Sigma-Aldrich (Milwaukee, EUA) e uma solução de $500 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ foi preparada em metanol. Metanol grau HPLC ($\geq 99,9\%$) foi adquirido na J.T. Baker (Milwaukee, EUA). Os solventes de hidrofilicidade comutável como a dipropilamina (99%) e a *N,N*-dimetilciclohexilamina (99%) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Milwaukee, EUA). Hidróxido de sódio anidro ($\geq 98\%$) e ácido clorídrico PA (37%) foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha) e soluções de concentração 10 e 6 mol L^{-1} foram preparadas, respectivamente. Frascos com septo e tampa, frascos do tipo *ependorf* de diferentes capacidades e pipetas de Pasteur com capacidade de 4 mL da Synth (São Paulo, Brasil) foram utilizados na etapa de extração. Frascos com *insert* de capacidade de 2 mL foram usados para o armazenamento do SHS após a etapa de extração. Uma microseringa de $10 \text{ } \mu\text{L}$ adquirida da Hamilton foi empregada para a injeção do extrato no cromatógrafo. Uma microcentrífuga da marca KASVI e modelo K14-1215 foi utilizada nas centrifugações das amostras de urina. A água ultrapura empregada nos experimentos foi purificada por um aparelho *Mega purity* (Billerica, EUA).

4.2 AMOSTRAS DE URINA E PRÉ-TRATAMENTO

Os ensaios de otimização e de validação da metodologia foram realizados com amostras de urina isentas dos analitos, doadas por integrantes do grupo de pesquisa com idades entre 25 e 27 anos. As amostras de urina foram coletadas em frascos de plástico de 40 mL e estocadas sob refrigeração a $4 \text{ } ^\circ\text{C}$ até o momento da utilização.

Para a aplicação da metodologia desenvolvida, foram analisadas cinco amostras de urina provenientes do CIT/RS, localizado na cidade de Porto Alegre.

Anteriormente à etapa de extração, todas as amostras de urina passaram por um pré-tratamento. O procedimento consistiu na centrifugação das amostras por 5 min a 3.500G e posteriormente diluídas na proporção 1:1 com água ultrapura a fim de diminuir efeitos de matriz.

Nenhum desconforto ou risco foi associado à coleta e análise das amostras, sendo amparado pelo parecer do comitê de ética de número 3.458.776/UFCSPA. Todos os procedimentos foram realizados em temperatura ambiente.

4.3 INSTRUMENTAÇÃO E CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massas modelo GC-MS-QP 2010 Plus (Shimadzu, Quioto, Japão). A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna capilar da Restek (Torrance, Califórnia, EUA) modelo Rtx®-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm de espessura do filme). O gás de arraste utilizado foi hélio ultrapuro em fluxo constante de 1,2 mL/min. A temperatura do injetor foi 250 °C e a temperatura inicial da coluna foi 160 °C mantida por 3 min, seguida de um aumento na taxa de 50 °C/min até 200 °C. Após atingida essa temperatura foi aumentada novamente até 245 °C na taxa de 5 °C/min, totalizando 12,8 min de corrida cromatográfica. O volume de injeção foi de 1 µL no modo *splitless* realizada por um amostrador automático de modelo AOC-20i (Shimadzu, Quioto, Japão). O espectrômetro de massas foi operado no modo de ionização por elétrons em 70 eV, a temperatura da fonte de íons foi fixada em 250 °C e da interface em 280 °C. Os modos SCAN e SIM foram utilizados nas aquisições dos cromatogramas.

4.4 PREPARAÇÃO DO SOLVENTE EXTRATOR

Para o procedimento de extração, o solvente de hidrofiliabilidade comutável foi misturado com a solução de ácido clorídrico 6 mol L⁻¹ na proporção 1:1 (v/v) e deixado em repouso até formar uma solução homogênea. As misturas de SHS:HCl foram

preparadas com dipropilamina e *N,N*-dimetilciclohexilamina, separadamente, para serem utilizadas na etapa de otimização.

4.5 OTIMIZAÇÕES DA TÉCNICA DE μ P-SHS-HLLME

4.5.1 Triagem das variáveis na etapa de extração

Nesse primeiro experimento, realizou-se uma triagem para verificar as variáveis que afetam a eficiência de extração dos antidepressivos da amostra de urina para que em seguida fossem estudadas mais detalhadamente, caso se mostrassem significativas. Para isso, foi realizado um planejamento fatorial fracionário do tipo 2^{5-1} , ou seja, com cinco variáveis e em dois níveis, resultando em 18 experimentos, com duplicata do ponto central (C). As variáveis foram os dois SHSs escolhidos, volume da mistura SHS:HCl, volume de hidróxido de sódio 10 mol L^{-1} , volume de amostra de urina e tempo de extração. Os níveis mínimos (-1) e máximos (+1) foram os seguintes: o solvente utilizado no nível mínimo foi a dipropilamina (A) e no máximo a *N,N*-dimetilciclohexilamina (B), o volume de solvente de 25 e 100 μL , volume de hidróxido de sódio de 500 e 1000 μL , volume de amostra 250 e 1000 μL e o tempo de extração de 1 e 5 min. O planejamento codificado para esse experimento de triagem está demonstrado na **Tabela 5**.

Tabela 5. Planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} para a triagem das principais variáveis que afetam a eficiência de extração dos antidepressivos em urina utilizando SHS.

Experimento	Solvente	Volume de solvente (μL)	Volume de NaOH (μL)	Volume de amostra (μL)	Tempo (min)
1	A	25	500	250	5
2	A	25	500	1000	1
3	A	25	1000	250	1
4	A	25	1000	1000	5
5	A	100	500	250	1
6	A	100	500	1000	5
7	A	100	1000	250	5
8	A	100	1000	1000	1
9	B	25	500	250	1
10	B	25	500	1000	5
11	B	25	1000	250	5
12	B	25	1000	1000	1
13	B	100	500	250	5
14	B	100	500	1000	1
15	B	100	1000	250	1
16	B	100	1000	1000	5
17 (C)	A/B	62,5	750	625	3
18 (C)	A/B	62,5	750	625	3

*Condição de extração: concentração dos analitos de 1 mg L^{-1} .

Legenda: A) dipropilamina; B) *N,N*-dimetilciclohexilamina; A/B) Mistura de dipropilamina e *N,N*-dimetilciclohexilamina 1:1 (v/v); C) ponto central.

Fonte: Autoria própria (2020).

4.5.2 Otimização do volume da mistura SHS:HCl e volume de amostra

Nessa otimização, foram realizados nove experimentos incluindo uma triplicata no ponto central (C) com o planejamento *Doehlert*. O volume da mistura SHS:HCl foi variado em cinco níveis na faixa de 100 a 300 μL e o volume de amostra de urina foi variado em três níveis de 250 a 750 μL , conforme mostrado na **Tabela 6**.

Tabela 6. Planejamento *Doehlert* para a otimização do volume de solvente e volume de amostra.

Experimento	Volume da mistura SHS:HCl (μL)	Volume de amostra (μL)
1	100	500
2	150	250
3	250	250
4	300	500
5	250	750
6	150	750
7 (C)	200	500
8 (C)	200	500
9 (C)	200	500

*Condição de extração: volumes variados de amostra de urina fortificada com $250 \mu\text{g L}^{-1}$ dos analitos, volume de NaOH de 1 mL e tempo de extração de 2 min.

Fonte: Autoria própria (2020).

4.5.3 Otimização do volume de NaOH e tempo de extração

Para essa otimização, foram realizados nove experimentos, incluindo uma triplicata no ponto central (C) com o planejamento *Doehlert*. O volume de NaOH foi variado em três níveis na faixa de 500 a 1000 μL e o tempo de extração foi variado em cinco níveis de 1 a 5 min conforme mostrado na **Tabela 7**. O tempo de extração considerado nesse trabalho é o tempo decorrido após a aspiração da solução para dentro do dispositivo.

Tabela 7. Planejamento *Doehlert* para a otimização do volume de NaOH e tempo de extração.

Experimento	Volume de NaOH (μL)	Tempo de extração (min)
1	750	1
2	500	2
3	500	4
4	750	5
5	1000	4
6	1000	2
7 (C)	750	3
8 (C)	750	3
9 (C)	750	3

*Condição de extração: 500 μL de amostra de urina fortificada com 250 $\mu\text{g L}^{-1}$ dos analitos, 200 μL do volume da mistura SHS:HCl.

Fonte: Autoria própria (2020).

4.6 VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DA METODOLOGIA DESENVOLVIDA

A validação é um procedimento adotado para verificar se a metodologia desenvolvida é adequada para analisar o que se pretende. Sendo assim, após a otimização de todas as variáveis significativas, a metodologia proposta nesse trabalho foi validada de acordo com guias de validação vigentes e recomendações, avaliando-se parâmetros de mérito como linearidade, limites de detecção e quantificação, exatidão, precisão, seletividade, efeito *carryover*, robustez e integridade de diluição (SWGTOX, 2013; ANVISA, 2017; INMETRO, 2018).

A escolha de um modelo de calibração apropriado é necessária para se obter uma quantificação confiável com a metodologia empregada nas análises. Portanto, a relação entre a concentração do analito na amostra e a resposta correspondente deve ser investigada. Para isso, foram obtidas curvas analíticas em matriz isenta dos analitos na qual adicionou-se as substâncias de interesse em cinco diferentes concentrações com padrão interno, realizadas em cinco replicatas. O ensaio foi realizado para verificar se a metodologia era linear com desvios menores ou iguais a 20% entre as replicatas e o coeficiente de determinação (r^2) igual ou superior a 0,99 (ANVISA, 2017). A partir da obtenção das curvas analíticas, observou-se o fenômeno de heterocedasticidade, sendo o mesmo ajustado e corrigido com a aplicação de

fatores de peso por mínimos quadrados ponderados de regressão linear (ANVISA, 2017; INMETRO, 2018).

O limite de detecção (LOD) é a menor concentração do analito em que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. Ele foi determinado pela relação sinal/ruído de 3:1 através da comparação dos sinais medidos dos cromatogramas de menor concentração da curva analítica e dos ruídos dos brancos de amostras (SWGTOX, 2013; ANVISA, 2017; INMETRO, 2018).

O limite de quantificação (LOQ) é a menor concentração do analito em que pode ser determinada quantitativamente com precisão e exatidão adequada. Ele foi determinado como sendo o menor valor de concentração da faixa linear da curva analítica (SWGTOX, 2013; ANVISA, 2017; INMETRO, 2018).

Os ensaios de recuperação foram realizados em três níveis de concentração a fim de avaliar a exatidão do método, que consiste na diferença entre o valor observado e um valor aceito como referência. A exatidão foi avaliada através da recuperação relativa, que deve variar entre 60 a 115% na faixa de concentração utilizada nessa metodologia (INMETRO, 2018).

A precisão é a proximidade dos valores obtidos entre uma série de medições obtidas por amostragens múltiplas de uma mesma amostra. Essa medida é expressa em termos do desvio padrão relativo (RSD, do inglês *relative standard deviation*) e deve ser inferior a 20%. A precisão intra-dia é obtida nas mesmas condições de operação por um curto intervalo de tempo. Já a precisão inter-dia pode ser obtida nas mesmas condições de operação em dias diferentes (SWGTOX, 2013). Sendo assim, a precisão intra-dia e inter-dia, ambas em três níveis de concentração, foram calculadas baseadas nos desvios padrão relativos de três extrações (realizadas no mesmo dia) e de nove extrações (realizadas em três dias distintos), respectivamente.

O efeito *carryover* é a possibilidade de quaisquer efeitos remanescentes de uma condição experimental anterior estarem afetando uma condição experimental atual. Essencialmente, é o efeito memória de uma condição experimental para outra (SWGTOX, 2013). Sendo assim, esse efeito foi avaliado com a injeção de solvente orgânico em sextuplicata após a injeção da extração dos analitos de maior concentração da faixa linear de trabalho

A seletividade é o parâmetro utilizado para verificar a possibilidade de outras substâncias endógenas ou exógenas, também presentes na amostra, de interferir na

identificação e a quantificação dos analitos (SWGTOX, 2013; ANVISA, 2017; INMETRO, 2018). A seletividade da metodologia foi avaliada através da comparação dos tempos de retenção e de cinco razões massa/carga dos analitos e do padrão interno em cinco amostras de diferentes voluntários isentas das substâncias de interesse nos modos SCAN e SIM.

A robustez é uma medida da suscetibilidade de uma metodologia em pequenas alterações que podem ocorrer durante a análise de rotina. A metodologia será robusta se for pouco sensível às alterações submetidas, logo, maior será a confiança relacionada à precisão (ANVISA, 2017; INMETRO, 2018). A robustez foi avaliada através do teste de *Youden*, em que foram realizadas pequenas mudanças nas variáveis que afetam a eficiência de extração já otimizadas.

A integridade de diluição durante a validação assegura que uma amostra com concentração acima do último ponto da faixa linear possa ser diluída, analisada e o valor obtido de quantificação esteja com precisão e exatidão aceitável (SWGTOX, 2013). Portanto, esse parâmetro foi avaliado nas amostras de urina, em que foram preparadas amostras fortificadas em duas concentrações superiores à maior concentração da faixa linear e diluídas nas razões 1:2 e 1:5 (v/v) com água ultrapura. As amostras diluídas foram então analisadas em triplicata e quantificadas por meio das equações lineares obtidas das curvas analíticas.

A aplicação da metodologia proposta foi realizada em cinco diferentes amostras de urina humana fornecidas pelo CIT/RS. As amostras fornecidas já haviam sido analisadas por imunocromatografia, na qual testaram positivo para ADTs; e por GC-MS, em que os antidepressivos amitriptilina e nortriptilina foram identificados.

4.7 ANÁLISE DOS DADOS

Na análise dos resultados gerados nos experimentos de otimização e de validação da metodologia desse trabalho foram utilizados os programas Microsoft Excel[®] 2016, STATISTICA 8 e Action Stat.

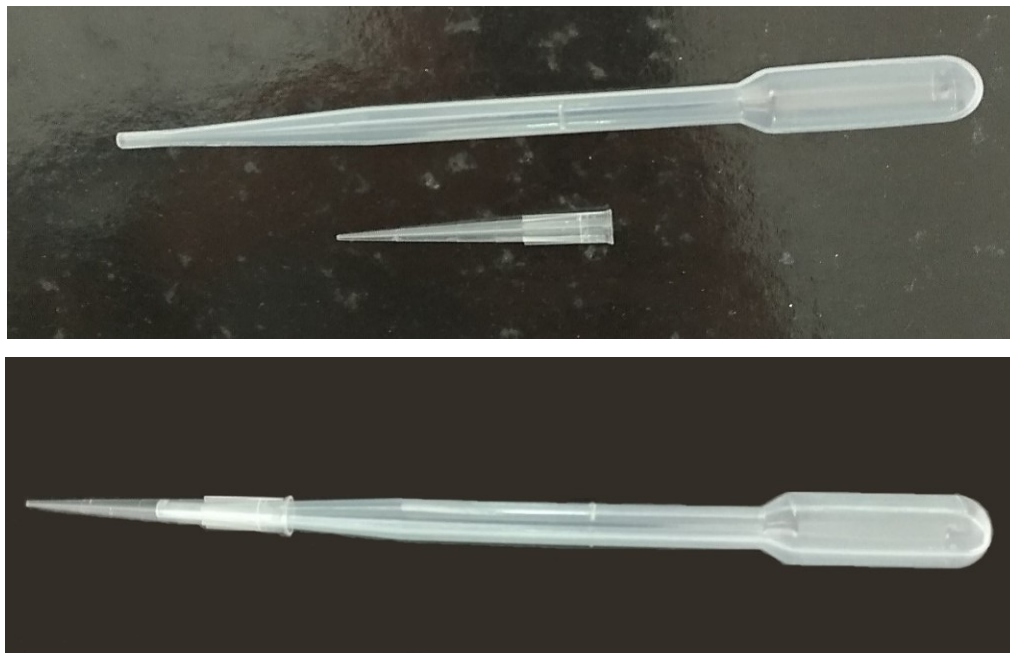
RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 INTRODUÇÃO DE UM NOVO DISPOSITIVO PARA A TÉCNICA DE SHS-HLLME

Como primeiro resultado no desenvolvimento deste trabalho, um novo dispositivo para a coleta do extrato foi sugerido para a etapa de extração utilizando a técnica de SHS-HLLME. Esse dispositivo foi denominado de “ μ -pipeta (μ P)” e consiste no simples acoplamento de uma pipeta de Pasteur de 4 mL de capacidade com uma ponteira de 200 μ L, como mostrado na **Figura 9**. De acordo com os métodos relatados na literatura utilizando essa técnica, a coleta do solvente de hidrofiliabilidade comutável (sobrenadante) é realizada por uma pipeta convencional, apresentando-se como uma tarefa difícil e trabalhosa visto que somente alguns microlitros do solvente são recuperados na etapa final da extração. Portanto, a principal vantagem do uso deste novo dispositivo é a facilidade da coleta do SHS ao final do procedimento de extração bem como o baixo custo de aquisição. Com esse dispositivo, o procedimento de extração consiste na aspiração de todo o conteúdo para dentro do dispositivo e deixa-se repousar até a separação de fases. Em seguida, a parte aquosa é eluída e descartada do dispositivo vagarosamente até que a fase orgânica atinja o final da ponteira, na qual o SHS é coletado em um frasco para a análise. Além disso, volumes menores de solvente podem ser utilizados, o que pode aumentar o fator de pré-concentração, levando a limites mais baixos de detecção e quantificação, contribuindo assim para uma etapa mais ambientalmente correta no preparo de amostra. Essa nova abordagem foi denominada microextração líquido-líquido homogênea com solvente de hidrofiliabilidade comutável em μ -pipeta (μ P-SHS-HLLME, do inglês *μ -Pipette - Switchable Hydrophilicity Solvent Homogeneous Liquid-Liquid Microextraction*) e publicada em revista científica (OENNING *et al.* 2020).

Figura 9. Dispositivo “ μ -pipeta (μ P)” empregado na técnica proposta μ P-SHS-HLLME.

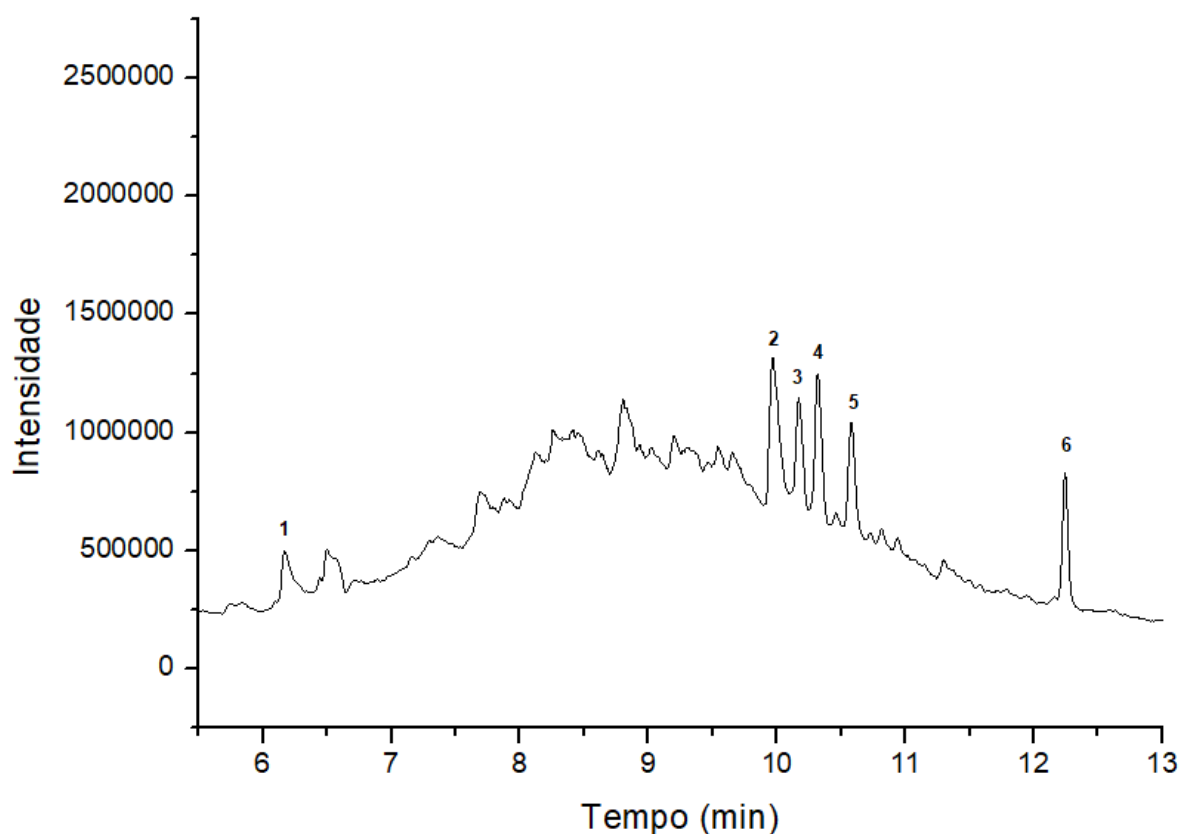


Fonte: Autoria própria (2020).

5.2 OTIMIZAÇÃO CROMATOGRÁFICA

Baseado no artigo científico reportado por TRUTA *et al.* (2016) para a determinação de antidepressivos por GC-MS/MS em sangue, modificações foram realizadas nas condições cromatográficas reportadas a fim de adequar a separação e detecção dos analitos desse trabalho. Os resultados da otimização cromatográfica e que foram utilizados ao longo do desenvolvimento desse trabalho estão descritos na seção 4.3 e o cromatograma da separação no modo SCAN está demonstrado na **Figura 10**.

Figura 10. Cromatograma da separação cromatográfica no GC-MS no modo SCAN com a injeção de 1 μL da mistura de padrões com concentração de 1 mg L^{-1} .



Legenda: 1 – Fluoxetina; 2 – Nortriptilina; 3 – Amitriptilina; 4 – Imipramina; 5 – Desipramina; 6 – Sertralina.

Fonte: Autoria própria (2020).

A identificação dos analitos foi confirmada com a presença dos íons majoritários nos espectros de massas do pico correspondente ao analito e pela semelhança dos espectros de massas obtidos com os da biblioteca NIST. A quantificação dos analitos foi realizada no modo SIM utilizando o íon de maior intensidade (pico base). As informações dos íons monitorados para a identificação e quantificação, bem como os tempos de retenção dos analitos e do padrão interno (PI) estão mostradas na **Tabela 8**.

Tabela 8. Tempo de retenção e razões massa/carga utilizadas na identificação e quantificação dos analitos e do padrão interno (PI).

Analito	Tempo de retenção (min)	Razões massa/carga majoritárias para a identificação (m/z)	Razão massa/carga usada na quantificação (m/z)
Difenilamina (PI)	4,3	169, 168, 167, 51, 87	169
Fluoxetina	6,1	44, 104, 42, 91, 103	44
Amitriptilina	9,9	58, 59, 30, 57, 202	58
Nortriptilina	10,1	44, 202, 203, 215, 189	44
Imipramina	10,3	58, 234, 235, 85, 193	58
Desipramina	10,6	234, 195, 193, 235, 44	234
Sertralina	12,2	274, 276, 159, 262, 278	274

Fonte: Autoria própria (2020).

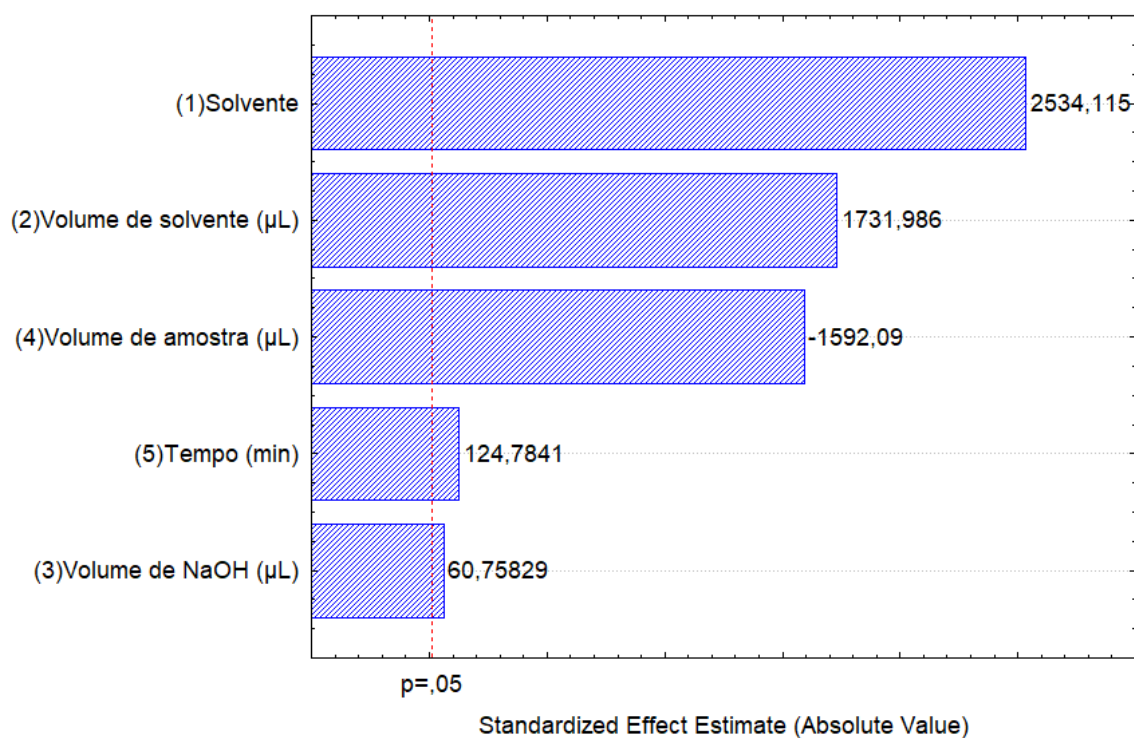
5.3 OTIMIZAÇÕES DA TÉCNICA DE μ P-SHS-HLLME

Visando a maior eficiência de extração das substâncias de interesse nas amostras de urina humana, realizou-se otimizações da técnica de μ P-SHS-HLLME proposta nesse trabalho. Algumas variáveis possuem influência na eficiência de extração utilizando SHSs na técnica de HLLME, como reportado na literatura. Sendo assim, realizou-se a triagem dessas variáveis para identificar quais delas teriam influência na extração dos antidepressivos estudados com a nova técnica proposta.

5.3.1 Triagem das variáveis de extração

Conforme as publicações reportadas na literatura que utilizam SHSs como solvente extrator na etapa de extração, algumas variáveis são significativas e afetam a eficiência de extração dos analitos. Sendo assim, na triagem das variáveis que afetam a eficiência de extração, foi realizado um planejamento fatorial fracionário do tipo 2^{5-1} . A resposta utilizada para a geração do Gráfico de Pareto foi a média geométrica das áreas dos picos cromatográficos dos analitos em cada experimento, resultando no gráfico da **Figura 11**.

Figura 11. Gráfico de Pareto com o resultado da triagem das variáveis de influência na eficiência de extração.



*Condição de extração: concentração dos analitos de 1 mg L⁻¹.

Fonte: Autoria própria (2020).

A tabela ANOVA do Gráfico de Pareto mostrada na **Tabela 9** resultou em um coeficiente de determinação (r^2) de 0,95897, o que demonstra que os resultados obtidos experimentalmente se adequam aos dados preditos pelo modelo estatístico utilizado (MENDENHALL, 2012).

Tabela 9. Tabela ANOVA do Gráfico de Pareto.

ANOVA; Var.:Resposta; $r^2=0,95897$; Adj:0,65128					
2**(5-1) design; MS Erro Puro=103590,8 DV: Resposta					
	SS	df	MS	F	p
(1)Solvente	6,652331E+11	1	6,652331E+11	6421741	0,000251
(2)Volume de solvente (μL)	3,107490E+11	1	3,107490E+11	2999775	0,000368
(3)Volume de NaOH (μL)	3,824126E+08	1	3,824126E+08	3692	0,010477
(4)Volume de amostra (μL)	2,625764E+11	1	2,625764E+11	2534747	0,000400
(5)Tempo (min)	1,613020E+09	1	1,613020E+09	15571	0,005102
1 e 2	1,060159E+10	1	1,060159E+10	102341	0,001990
1 e 3	3,339567E+08	1	3,339567E+08	3224	0,011211
1 e 4	6,123826E+08	1	6,123826E+08	5912	0,008280
1 e 5	7,117070E+09	1	7,117070E+09	68704	0,002429
2 e 3	8,551207E+11	1	8,551207E+11	8254795	0,000222
2 e 4	1,649661E+11	1	1,649661E+11	1592479	0,000504
2 e 5	8,936571E+11	1	8,936571E+11	8626802	0,000217
3 e 4	6,737278E+11	1	6,737278E+11	6503743	0,000250
3 e 5	8,898689E+11	1	8,898689E+11	8590233	0,000217
4 e 5	8,527534E+11	1	8,527534E+11	8231943	0,000222
Falta de Ajuste	2,391157E+11	1	2,391157E+11	2308272	0,000419
Erro Puro	1,035908E+05	1	1,035908E+05		
Total SS	5,828429E+12	17			

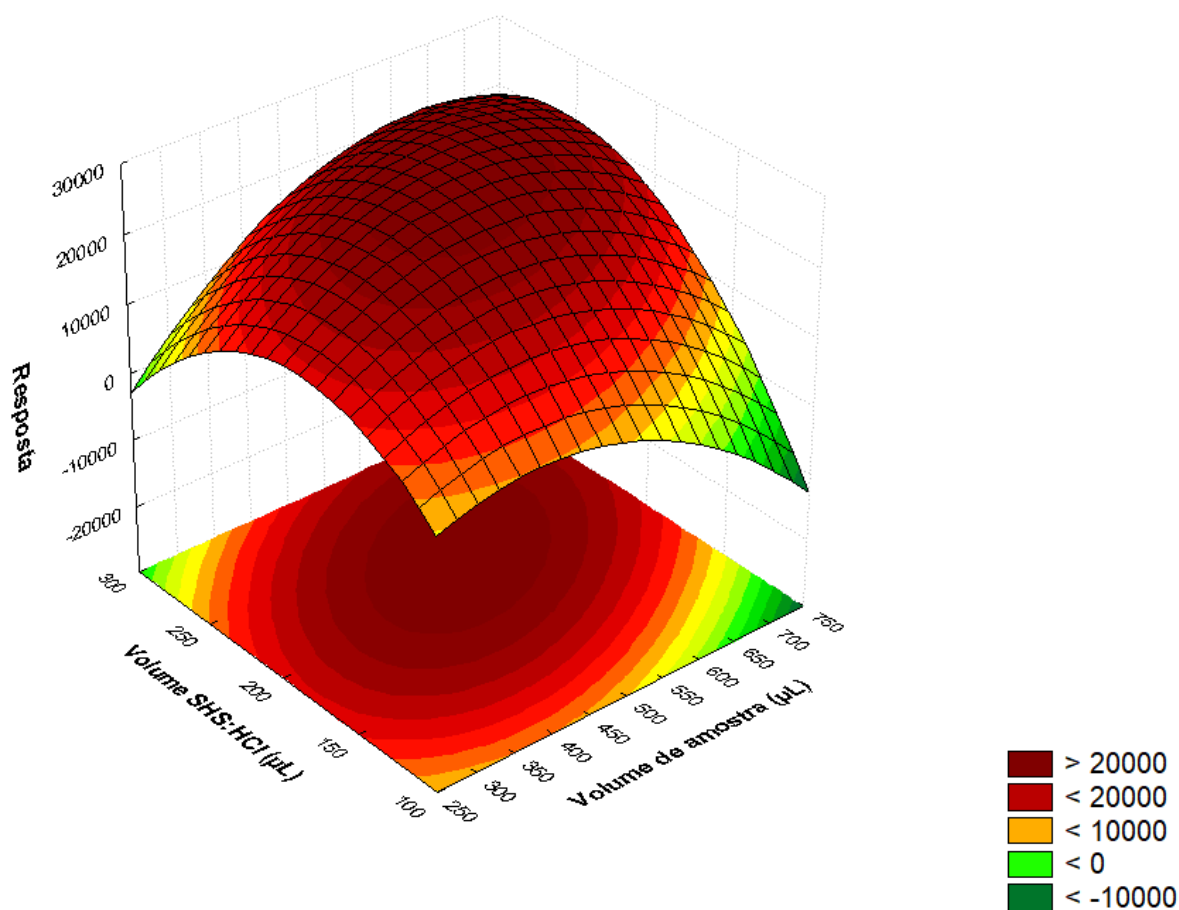
Fonte: Autoria própria (2020).

A partir do resultado mostrado nas **Figura 11** e na **Tabela 9**, é possível afirmar com 95% de confiança que todas as variáveis são significativas e interferem na eficiência de extração, sendo assim, foi necessário realizar a otimização desses fatores de maneira mais detalhada para que a eficiência de extração fosse máxima. Ainda, em relação ao Gráfico de Pareto da **Figura 11**, pode-se perceber que o solvente foi o que demonstrou a influência mais significativa, obtendo respostas maiores quando utiliza-se o solvente do nível máximo, neste caso o solvente DMCHA. Esse resultado pode ser explicado levando em consideração as estruturas e as polaridades dos analitos e do solvente, em que existem maiores interações intermoleculares do tipo dipolo-dipolo e ligações de hidrogênio entre as moléculas dos analitos e o DMCHA do que entre as moléculas dos analitos e o DPA. Portanto, a mistura do DMCHA e ácido clorídrico na proporção 1:1 foi escolhida para as otimizações posteriores.

5.3.2 Otimização do volume da mistura SHS:HCl e volume de amostra

Para se obter um maior fator de pré-concentração, a relação volume de amostra e volume de solvente é bastante crítica, devendo ser otimizada para alcançar o melhor resultado. Sendo assim, um planejamento *Doehlert* foi realizado e o resultado dessa otimização está demonstrado na **Figura 12**. A função quadrática apresentou coeficiente de determinação (r^2) de 0,9992 conforme demonstrado na ANOVA da **Tabela 10**. O resultado obtido foi muito satisfatório para esse tipo de superfície resposta, pois quanto mais próximo de 1, melhor é o ajuste do modelo predito aos resultados obtidos experimentalmente (MENDENHALL, 2012). Pode-se concluir que a combinação de 200 μ L da mistura de SHS:HCl e 500 μ L de amostra atinge os melhores resultados, já que a intersecção dessas duas condições está na região de coloração vermelha mais intensa, na qual indica as condições que se obtém o maior valor de média geométrica de todos os compostos. Sendo assim, essas condições foram escolhidas para o procedimento de extração nesta proposta e utilizadas nas otimizações posteriores.

Figura 12. Superfície resposta obtida para a otimização do volume da mistura SHS:HCl e volume da amostra.



*Condição de extração: volumes variados de amostra de urina fortificada com $250 \mu\text{g L}^{-1}$ dos analitos, volume de NaOH de 1 mL e tempo de extração de 2 min.

Fonte: Autoria própria (2020).

Tabela 10. Tabela ANOVA obtida para a otimização do volume da mistura SHS:HCl e volume da amostra.

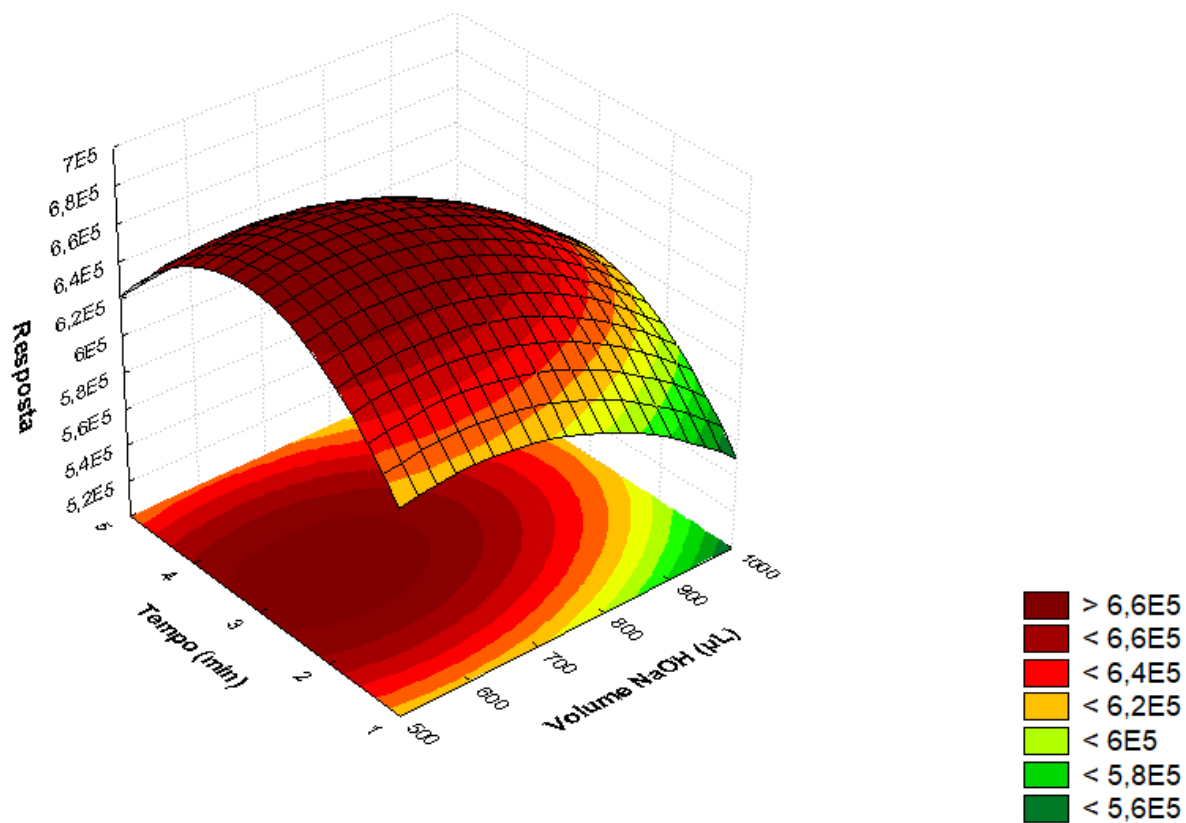
ANOVA; Var.:Resposta; $r^2=0,99923$; Adj:0,99731					
2 fatores, 1 Bloco, 9 Experimentos; MS Erro Puro=178772,5 DV: Resposta					
	SS	df	MS	F	p
(1)Volume de amostra (uL)(L)	27351965	1	27351965	152,999	0,006473
Volume de amostra (uL)(Q)	190379285	1	190379285	1064,925	0,000938
(2)Volume de mistura SHS:HCl (1:1) (uL)(L)	5434711	1	5434711	30,400	0,031356
Volume de mistura SHS:HCl (1:1) (uL)(Q)	85301592	1	85301592	477,152	0,002089
1L e 2L	105954330	1	105954330	592,677	0,001683
Falta de Ajuste	579662	1	579662	3,242	0,213553
Erro Puro	357545	2	178773		
Total SS	465374331	7			

Fonte: Autoria própria (2020).

5.3.3 Otimização do volume de NaOH e tempo de extração

A adição da base tem um papel fundamental na separação de fases e consequentemente na extração dos analitos, sendo o tempo um fator aliado nesse processo. Por isso, para a otimização dessas duas últimas variáveis foi realizado um planejamento *Doehlert* e o resultado dessa otimização está demonstrado na **Figura 13**. A função quadrática apresentou coeficiente de determinação (r^2) de 0,9849, conforme demonstrado na ANOVA da **Tabela 11**. O resultado obtido também foi muito satisfatório para esse tipo de superfície resposta. Analisando a superfície resposta gerada, pode-se concluir que a combinação de 600 μ L de hidróxido de sódio e 3 min de extração atinge os melhores resultados, já que a intersecção dessas duas condições está na região de coloração vermelha mais intensa, na qual indica as condições que se obtém o maior valor de média geométrica para todos os analitos. Sendo assim, essas condições foram escolhidas para o procedimento de extração da metodologia proposta.

Figura 13. Superfície resposta obtida para a otimização do volume de NaOH e tempo de extração.



*Condição de extração: 500 µL de amostra de urina fortificada com 250 µg L⁻¹ dos analitos, 200 µL do volume da mistura SHS:HCl.

Fonte: Autoria própria (2020).

Tabela 11. Tabela ANOVA obtida para a otimização do volume de NaOH e tempo de extração.

ANOVA; Var.:Resposta; $r^2=0,98491$; Adj:0,95975					
2 fatores, 1 Bloco, 9 Experimentos; MS Erro Puro=100490E2 DV: Resposta					
	SS	df	MS	F	p
(1)Volume NaOH (μL)(L)	3,373337E+09	1	3,373337E+09	335,6886	0,002966
Volume NaOH (μL)(Q)	1,364736E+09	1	1,364736E+09	135,8080	0,007283
(2)Tempo (min)(L)	1,293238E+08	1	1,293238E+08	12,8693	0,069680
Tempo (min)(Q)	3,861588E+09	1	3,861588E+09	384,2756	0,002592
1L e 2L	2,891024E+06	1	2,891024E+06	0,2877	0,645378
Falta de Ajuste	1,023945E+08	1	1,023945E+08	10,1895	0,085711
Erro Puro	2,009801E+07	2	1,004901E+07		
Total SS	8,115608E+09	8			

Fonte: Autoria própria (2020).

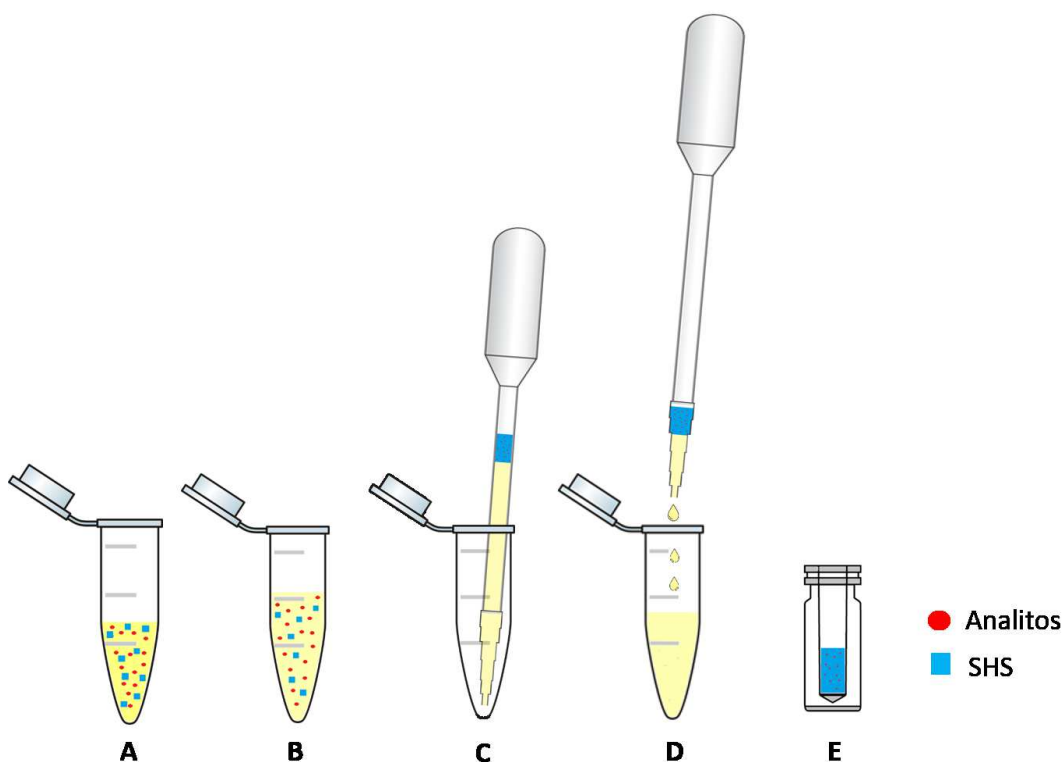
A adição da solução de NaOH promove a separação de fases e consequentemente a extração dos analitos que são carregados juntamente com o SHS para a porção do sobrenadante dentro do dispositivo, já que a solubilidade no meio aquoso desses solventes é dependente do pH. Esse agente promove o aumento do pH da solução, tornando-o superior aos valores de pKa dessas substâncias, sendo assim, ocorre a desprotonação dos analitos e do SHS. Desse modo, os analitos e o SHS se encontram majoritariamente na sua forma molecular segundo os diagramas de espécies que estão nos Anexos I a VIII, propiciando assim o processo de extração através de interações intermoleculares.

5.4 PROCEDIMENTO DE PREPARO DE AMOSTRA OTIMIZADO COM A $\mu\text{P-SHS-HLLME}$

O procedimento de preparo de amostra otimizado utilizando a técnica de $\mu\text{P-SHS-HLLME}$ está demonstrado na **Figura 14**. As extrações foram realizadas utilizando 500 μL de amostra de urina previamente diluída com água ultrapura na proporção 1:1, que foi adicionada em um frasco do tipo *ependorf*. Em seguida, foram adicionados 40 μL de padrão interno de difenilamina de concentração 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ (20 ng) e 200 μL da mistura SHS:HCl seguido de uma leve agitação manual para a total mistura das soluções formando uma solução homogênea (A). Posteriormente, 600 μL de solução de NaOH 10 mol L^{-1} foram adicionados ao frasco (B) e com o auxílio do dispositivo “ μ -pipeta” proposto nesse trabalho, a mistura foi aspirada para seu interior e deixada em repouso por 3 min para que ocorresse a separação de fases e

consequentemente a extração dos analitos (C). Finalmente, a parte aquosa foi eluída e descartada do dispositivo vagarosamente até que a fase orgânica atinja o final da ponteira (D), na qual foi coletada em um frasco com septo para posterior análise por GC-MS (E).

Figura 14. Esquema do procedimento de μ P-SHS-HLLME desenvolvido nesse trabalho para a determinação de antidepressivos em amostras de urina.



Fonte: Autoria própria (2020).

5.5 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA DESENVOLVIDA

Após a otimização das variáveis que têm influência na eficiência de extração da metodologia desenvolvida, o método proposto nesse trabalho foi validado conforme os guias de validação de metodologias analíticas vigentes e recomendações (SWGTOX, 2013; ANVISA, 2017; INMETRO, 2018).

5.5.1 Linearidade

Primeiramente, foram obtidas curvas analíticas em matriz isenta com padrão interno em seis níveis de concentração: 10, 50, 100, 250, 500 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$, realizados em cinco replicatas para cada concentração. Os desvios foram menores que 20% entre as replicatas. Em seguida, verificou-se que as curvas analíticas apresentaram o fenômeno de heterocedasticidade (avaliada através da distribuição F), provavelmente devido à ampla faixa de concentração utilizada no estudo da linearidade. Portanto, os métodos de regressão linear dos mínimos quadrados comuns poderiam resultar em grandes erros no cálculo das concentrações, especialmente em valores menores. Usando os mínimos quadrados ponderados de regressão linear o fator de ponderação utilizado foi de $1/y$ para a fluoxetina e $1/x^2$ para os demais analitos. Obteve-se então as equações de reta considerando esses fatores de ponderação e os desvios padrão entre as replicatas. Os coeficientes de determinação (r^2) obtidos foram maiores que 0,9954. Sendo assim, a metodologia foi considerada linear na faixa de concentração estudada para todos os analitos, estando os parâmetros avaliados de acordo com os critérios de aceitação (ANVISA, 2017; INMETRO, 2018). A **Tabela 12** demonstra a equação da reta, os fatores de ponderação aplicados, a faixa linear e o coeficiente de determinação obtidos para cada composto.

Tabela 12. Equação da reta, fator de ponderação, faixa linear e coeficiente de determinação para cada analito.

Analito	Equação da reta	Fator de ponderação	Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	r^2
Fluoxetina	$y = 0,0438 (\pm 0,0010) x - 1,6412 (\pm 0,4742)$	$1/y$	10 – 1000	0,9978
Nortriptilina	$y = 0,0718 (\pm 0,0019) x - 1,4631 (\pm 0,4324)$	$1/x^2$	10 – 1000	0,9970
Amitriptilina	$y = 0,0958 (\pm 0,0024) x - 1,2315 (\pm 0,1441)$	$1/x^2$	10 – 1000	0,9974
Imipramina	$y = 0,0086 (\pm 0,0003) x - 0,3482 (\pm 0,0381)$	$1/x^2$	10 – 1000	0,9954
Desipramina	$y = 0,0130 (\pm 0,0004) x - 0,2386 (\pm 0,0948)$	$1/x^2$	10 – 1000	0,9958
Sertralina	$y = 0,0136 (\pm 0,0003) x - 0,2778 (\pm 0,0525)$	$1/x^2$	10 – 1000	0,9976

Fonte: Autoria própria (2020).

5.5.2 Limites de detecção e de quantificação

Os LODs para cada substância foram obtidos pela relação sinal/ruído dos cromatogramas de extração com concentração $10 \mu\text{g L}^{-1}$, a menor concentração da faixa linear utilizada na obtenção das curvas analíticas, com os sinais dos ruídos dos brancos de amostras. Para os LODs, a relação sinal/ruído de de 3:1 foi utilizada e os limites alcançados variaram de $0,02 \mu\text{g L}^{-1}$ para a sertralina a $0,88 \mu\text{g L}^{-1}$ para a fluoxetina. Os LOQs para cada substância foram determinados como sendo o menor valor de concentração da faixa linear da curva analítica, sendo assim, $10 \mu\text{g L}^{-1}$. A **Tabela 13** demonstra os resultados obtidos.

Tabela 13. Limites de detecção e de quantificação para cada analito.

Analito	Limite de detecção ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Limite de quantificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Fluoxetina	0,88	10
Nortriptilina	0,05	10
Amitriptilina	0,07	10
Imipramina	0,40	10
Desipramina	0,03	10
Sertralina	0,02	10

Fonte: Autoria própria (2020).

5.5.3 Seletividade, exatidão e precisão

A seletividade da metodologia foi avaliada para verificar a existência de interferentes endógenos e exógenos nos cromatogramas das cinco amostras de urina isentas dos analito e nenhum sinal foi detectado nos tempos de retenção dos analitos e do padrão interno utilizados, confirmando assim a seletividade da metodologia (SWGTOX, 2013; ANVISA, 2017; INMETRO, 2018).

Para a avaliação da exatidão da metodologia proposta, ensaios de recuperação relativa foram realizados em três níveis de concentração ao longo da faixa linear: 10, 400 e 800 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os valores obtidos de recuperação relativa variaram na faixa de 68 a 102% como mostrado na **Tabela 14**. Esses valores estão de acordo com o guia de validação utilizado que determina que a recuperação deve estar entre 60% e 115% na faixa de concentração estudada, demonstrando assim a exatidão do método (INMETRO, 2018).

A precisão intra-dia foi avaliada em relação aos valores de RSD das replicatas da injeção dos extratos do estudo da exatidão, realizadas em um mesmo dia. Os valores variaram entre 0,5 para a desipramina e nortriptilina e 15,9% para a imipramina, estando de acordo com os guias de validação que preconizam valores inferiores a 20%. Já a precisão inter-dia foi avaliada também em relação aos valores de RSD das replicatas de injeções dos extratos de três dias diferentes. Os valores variaram entre 4,2 para a fluoxetina e 19,3% para a imipramina, estando também de acordo com os guias de validação que preconizam valores inferiores a 20% (SWGTOX, 2013). A **Tabela 14** também demonstra os resultados obtidos na avaliação da precisão da metodologia.

Tabela 14. Resultados obtidos através de ensaios de recuperação relativa para a avaliação da exatidão e precisão intra e inter-dia do método desenvolvido.

Analito	Adicionado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação relativa (%) (n=3)	Precisão (RSD, %, n=3 e n=9)	
			Intra-dia	Inter-dia
Fluoxetina	10	98	4,0	7,5
	400	98	6,3	7,5
	800	96	5,8	4,2
Nortriptilina	10	94	1,0	4,4
	400	91	9,0	8,0
	800	88	0,5	4,5
Amitriptilina	10	101	1,2	5,8
	400	91	6,2	8,8
	800	88	1,7	12,4
Imipramina	10	96	11,1	10,2
	400	69	15,9	19,3
	800	68	4,1	12,6
Desipramina	10	102	2,4	6,5
	400	88	8,0	9,3
	800	85	0,5	15,1
Sertralina	10	97	3,5	6,2
	400	91	13,0	11,8
	800	86	1,0	15,0

Fonte: Autoria própria (2020).

5.5.4 Efeito *carryover*

O efeito *carryover* foi avaliado a partir da análise dos cromatogramas da sextuplicata de solvente orgânico após a injeção do extrato de maior concentração da curva analítica. Na análise não foi constatado nenhum pico cromatográfico nos tempos de retenção referentes aos analitos e ao padrão interno, ou seja, a metodologia não apresentou o efeito *carryover*.

5.5.5 Robustez

A robustez foi avaliada através do teste de *Youden*, em que foram realizadas pequenas mudanças nas quatro variáveis que afetam a eficiência de extração já otimizadas. Na **Tabela 15** estão demonstrados os valores nominais (estabelecidos por meio das otimizações) e os valores alterados das variáveis da metodologia ($\leq 8\%$ de variação).

Tabela 15. Condições nominais e respectivas variações para o estudo da robustez da metodologia.

Efeito	Condição nominal	Variação
Volume da mistura SHS:HCl (P1)	200 µL	195 µL
Volume da amostra (P2)	500 µL	490 µL
Volume da base (P3)	600 µL	605 µL
Tempo de extração (P4)	3:00 min	3:15 min

Fonte: Autoria própria (2020).

O teste de robustez consistiu na realização de 8 experimentos, em que diferentes condições são utilizadas como mostrado na **Tabela 16**.

Tabela 16. Planejamento do estudo da robustez da metodologia.

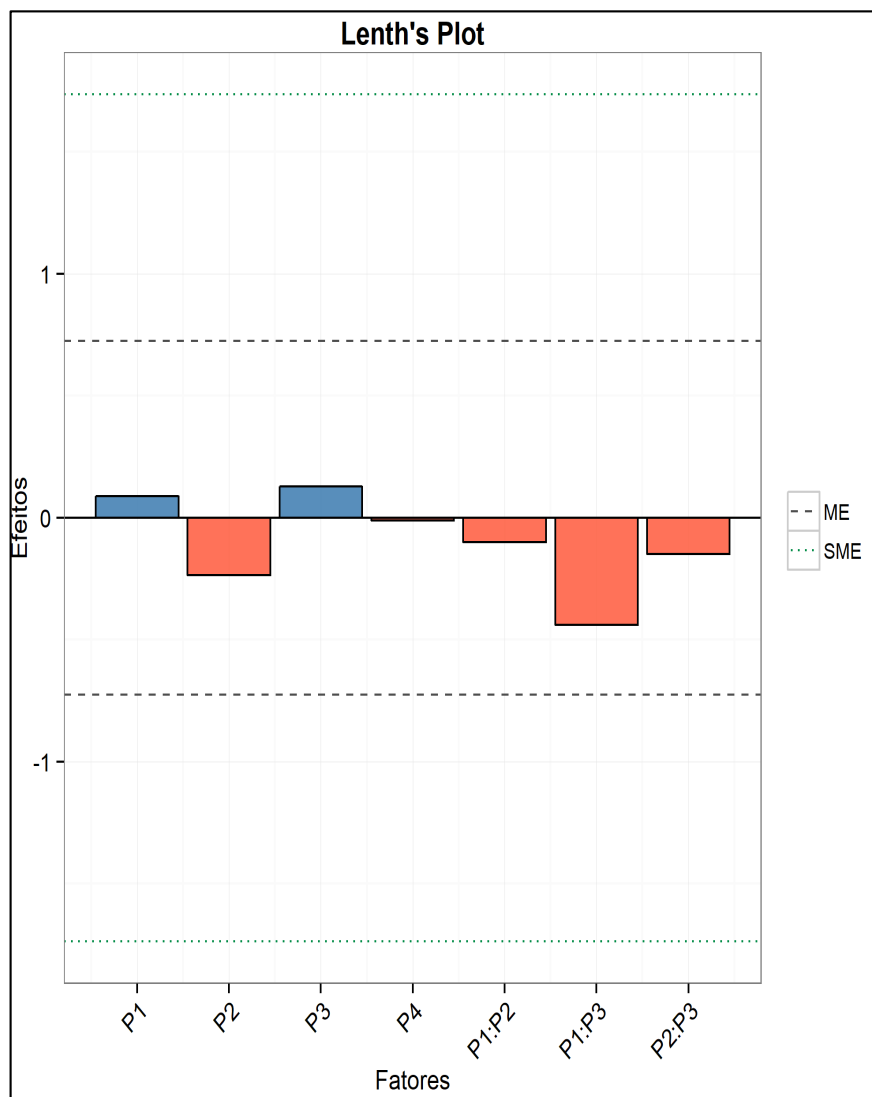
Experimento	P1	P2	P3	P4
1	195 µL	490 µL	600 µL	3:00 min
2	200 µL	500 µL	605 µL	3:15 min
3	195 µL	500 µL	605 µL	3:00 min
4	200 µL	490 µL	605 µL	3:00 min
5	200 µL	490 µL	600 µL	3:15 min
6	200 µL	500 µL	600 µL	3:00 min
7	195 µL	500 µL	600 µL	3:15 min
8	195 µL	490 µL	605 µL	3:15 min

Fonte: Autoria própria (2020).

O resultado da avaliação da robustez está demonstrado na **Figura 15**, em que o gráfico de Lenth é explicado por uma abordagem estatística. Dois critérios são utilizados nesse método: a margem de erro (ME) e margem de erro simultânea (SME). A ME é um critério de validação para significância estatística quando apenas um parâmetro é investigado, e como nesse estudo foram avaliados quatro parâmetros, utilizou-se a SME, que é um limite numérico estabelecido e se algum parâmetro exceder esse limite, esse parâmetro é considerado significativo, ou seja, possui influência caso sofra pequenas variações (HEYDEN *et al.*, 2001). Neste estudo, o valor de SME foi calculado com um nível de confiança de 95% ($\alpha = 0,05$) e o valor obtido foi 1,74. Os valores absolutos obtidos para os parâmetros sob análise estão abaixo do valor de SME, sendo assim, nenhum dos parâmetros apresenta um efeito significativo, logo, a metodologia desenvolvida nesse trabalho é robusta e pequenas alterações das variáveis não prejudicam o resultado final da análise. Portanto, o método desenvolvido nesse trabalho mostrou-se válido e robusto em toda a faixa

linear de trabalho utilizada para todos os analitos estudados (ANVISA, 2017; INMETRO, 2018).

Figura 15. Resultado da avaliação de robustez da metodologia desenvolvida.



Fonte: Autoria própria (2020).

5.5.6 Integridade de diluição

A integridade de diluição também foi avaliada nas amostras de urina, já que as concentrações dos analitos em algumas amostras provenientes do CIT/RS estavam acima da maior concentração da faixa linear da curva analítica. Sendo assim, foram preparadas amostras fortificadas em duas concentrações: 1500 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 4500 $\mu\text{g L}^{-1}$. Em seguida, as amostras de urina foram diluídas nas razões 1:2 e 1:5 (v/v) com água

ultrapura, respectivamente. Para as amostras que sofreram diluição na proporção 1:2 (v/v), a concentração analisada foi de 500 $\mu\text{g L}^{-1}$; e para as amostras diluídas na proporção 1:5 (v/v), a concentração analisada foi de 750 $\mu\text{g L}^{-1}$. As amostras diluídas foram então analisadas em triplicata e quantificadas por meio das equações lineares obtidas das curvas analíticas. Os resultados obtidos estão demonstrados na **Tabela 17** e apresentaram valores aceitáveis de exatidão e de coeficiente de variação ($\leq 20\%$). Para o antidepressivo imipramina, houve um aumento expressivo quando comparado aos valores de recuperação relativa dos níveis de 400 e 800 $\mu\text{g L}^{-1}$ demonstrados na **Tabela 14**. Esse fato pode ser explicado devido ao efeito da matriz que foi menor com os fatores de diluição maiores de 1:2 e 1:5 (v/v). Desse modo, após o estudo de integridade de diluição, conclui-se que amostras analisadas com as diluições nas razões estudadas possuem resultados confiáveis.

Tabela 17. Resultado da avaliação da integridade de diluição.

Analito	Adicionado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Exatidão (%)	RSD (%)
Fluoxetina	500	96,8	6,5
	750	98,5	7,2
Nortriptilina	500	99,4	2,5
	750	100,1	1,2
Amitriptilina	500	98,7	1,6
	750	96,4	2,5
Imipramina	500	98,7	3,8
	750	95,2	3,9
Desipramina	500	99,5	1,4
	750	100,1	7,4
Sertralina	500	97,6	2,4
	750	99,3	2,8

Fonte: Autoria própria (2020).

5.6 APLICAÇÃO DA METODOLOGIA DESENVOLVIDA

Após a validação da metodologia, o método proposto foi aplicado em cinco amostras de urina provenientes do CIT/RS. As amostras 1 a 4 foram diluídas com água ultrapura na proporção 1:2, enquanto a amostra 5 necessitou ser diluída na proporção 1:5. A concentração de cada substância nas amostras foi calculada mediante a equação da curva analítica e dos fatores de diluição previamente apresentados, em triplicata. O resultado das análises dessas amostras está

demonstrado na **Tabela 18**, em que todas as amostras continham a substância amitriptilina e seu principal produto de biotransformação, a nortriptilina. Além disso, pode-se notar que em todas as amostras a concentração de nortriptilina é menor que da amitriptilina, com exceção da amostra 3, o que pode ser justificado pelo fato da amitriptilina já ter passado por um processo de biotransformação mais significativo nessa amostra. Além disso, pode-se avaliar as concentrações que foram determinadas nas amostras segundo as recomendações de Wu *et al.* (2003) para identificar intoxicações causadas por ADTs. Valores em amostras de urina abaixo e em torno de $300 \mu\text{g L}^{-1}$ sugerem concentrações terapêuticas e valores acima de $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ sugerem quadros de intoxicação. Sendo assim, pode-se classificar as cinco amostras em três níveis de concentração: baixo, intermediário e alto. A amostra 3, com níveis mais baixos de concentração, é provavelmente advinda de um indivíduo com doses terapêuticas das substâncias. Já as amostras 2 e 4, com concentrações intermediárias entre 300 e $1000 \mu\text{g L}^{-1}$, são advindas provavelmente de indivíduos com leves sinais de intoxicação. E por fim as amostras 1 e 5, que apresentaram níveis altos de concentração de ADTs, sugere que os indivíduos apresentavam fortes sinais de intoxicação.

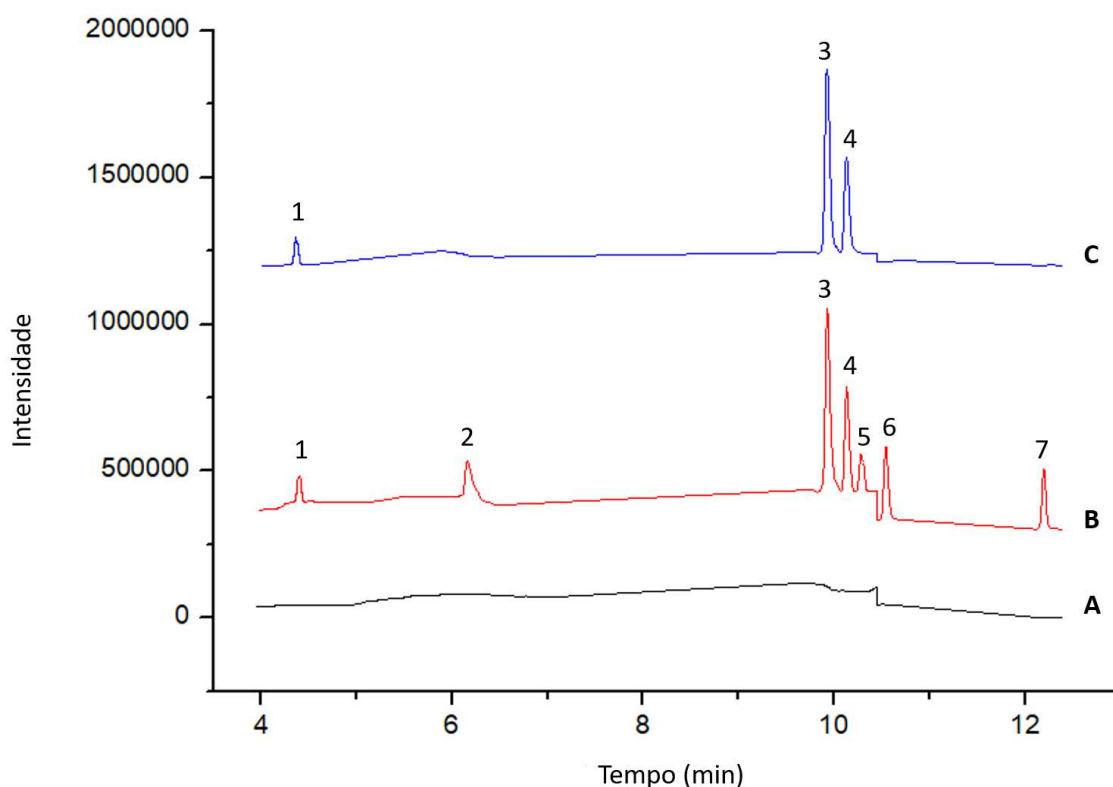
Tabela 18. Resultado da análise de cinco amostras de urina humana provenientes do CIT/RS.

Amostra	Analito	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	RSD (%)
1	Amitriptilina	1795	1,6
	Nortriptilina	544	10,1
2	Amitriptilina	1152	9,4
	Nortriptilina	346	16,0
3	Amitriptilina	207	6,5
	Nortriptilina	326	17,9
4	Amitriptilina	590	0,9
	Nortriptilina	430	3,1
5	Amitriptilina	4828	8,5
	Nortriptilina	3333	9,7

Fonte: Autoria própria (2020).

A **Figura 16** abaixo demonstra os cromatogramas de íons totais (TIC, do inglês *total ion chromatogram*) de uma amostra de urina isenta dos analitos, de uma amostra de urina com a adição de $250 \mu\text{g L}^{-1}$ dos analitos e de uma amostra de urina humana proveniente do CIT/RS na qual foi aplicada a metodologia desenvolvida nesse trabalho.

Figura 16. Cromatogramas de íons totais de (A) amostra de urina isenta dos analitos, (B) amostra de urina com a adição de $250 \mu\text{g L}^{-1}$ dos analitos e (C) amostra de urina humana proveniente do CIT/RS.



Legenda: 1 – Difenilamina (PI); 2 – Fluoxetina; 3 – Nortriptilina; 4 – Amitriptilina; 5 – Imipramina; 6 – Desipramina; 7 – Sertralina.

*Condição de extração: $500 \mu\text{L}$ de amostra de urina, $40 \mu\text{L}$ de padrão interno de difenilamina de concentração $500 \mu\text{g L}^{-1}$, $200 \mu\text{L}$ do volume da mistura SHS:HCl, $600 \mu\text{L}$ de NaOH 10 mol L^{-1} e 3 min de extração.

Fonte: Autoria própria (2020).

5.7 COMPARAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO COM MÉTODOS DESCRITOS NA LITERATURA

O método desenvolvido nesse trabalho também foi comparado com outros métodos reportados na literatura para a determinação de antidepressivos em urina humana. A análise da **Tabela 19** demonstra que além de possuir uma ampla faixa linear, os limites alcançados pela metodologia desenvolvida foram satisfatórios para a determinação desses compostos em urina, sendo iguais ou menores comparados aos outros métodos reportados. Além disso, o método desenvolvido apresenta outras vantagens, principalmente quanto a não utilização de solventes clorados tóxicos como o clorofórmio, diclorometano e tetracloreto de carbono. Outra vantagem é que o uso

de centrifugação, agitação por vortex ou ultrassom, aquecimento ou resfriamento da solução e evaporação de solvente são prescindíveis na metodologia proposta. O tempo total do procedimento de preparo de amostra também é um aspecto positivo da metodologia proposta, já que apenas 3 min são necessários para a etapa de extração, com a possibilidade de atingir até 1 min e 40 s se três diferentes amostras forem preparadas consecutivamente. E por fim, o volume de amostra de 250 μL de urina utilizada nessa metodologia é muito inferior comparada aos outros métodos que chegam a utilizar até 5 mL de amostra.

Tabela 19. Comparação do método desenvolvido com outros reportados na literatura para a determinação de antidepressivos em urina humana.

Método	Volume de amostra (µL)	Faixa linear (µg L ⁻¹)	LOD (µg L ⁻¹)	LOQ (µg L ⁻¹)	Metodologia	Tempo (min)	Referência
µP-SHS-HLLME e GC-MS	250	10 – 1000 ^{a-f}	0,88 ^a 0,05 ^b 0,07 ^c 0,40 ^d 0,03 ^e 0,02 ^f	10 ^{a-f}	Adição de 200 µL de mistura de DMCHA:HCl (1:1), adição de 600 µL de hidróxido de sódio 10 mol L ⁻¹ , extração por 3 min e coleta da fase orgânica.	3	Esse trabalho
LLME e HPLC/MS/MS	1000	25 – 2000 ^{a-e}	25 ^{a-e}	25 ^{a-e}	Adição de 2 mL de hidróxido de sódio 2 mol L ⁻¹ e 2 mL de hexano:acetato de etila (1:1), agitação por 5 min e centrifugação por 10 min. Coleta do sobrenadante, evaporação com gás de nitrogênio a 40°C e reconstituído com 100 µL de fase móvel.	>>15	POKLIS <i>et al.</i> , 2012
Derivatização e GC-MS	2000	0,5 – 80 ^{a, b}	0,04 ^a 0,08 ^b	0,14 ^a 0,25 ^b	Adição de 100 µL de HCl 1 mol L ⁻¹ e adição gota a gota de 50 µL de solução de nitrito de sódio sob agitação por vortex. O tubo é selado e aquecido a 60 ° C durante 5 min para derivatização. Após o resfriamento, adição de 2 mL de diclorometano para extração sob vortex durante 1,5 min e repouso por 5 min. Centrifugação a 15.000 rpm durante 5 min. Coleta de 1,2 mL da fase orgânica e secagem a 50 °C com gás nitrogênio. Reconstituído em 50 µL de diclorometano em banho de gelo para evitar a volatilização.	>>16	FENG <i>et al.</i> , 2019

Continuação da Tabela 19.

DLLME e GC-MS	300	2 – 100 ^{b,c,d} 5 – 100 ^e	0,5 ^{b,c,d} 2 ^e	2 ^{b,c,d} 5 ^e	Adição de solução de metanol (150 µL), tetracloreto de carbono (10 µL) e anidrido acético (5 µL). Agitação suave com formação de solução turva. Centrifugação por 3 min e coleta do tetracloreto de carbono.	>3	ITO <i>et al.</i> , 2011
DLLME e HPLC-UV/Vis	1000	5–100 ^d	0,6 ^d	5 ^d	Adição de 800 µL de acetonitrila e 50 µL de clorofórmio. Agitação suave com formação de solução turva. Centrifugação por 5 min e aplicação de ultrassom para separação de fases. Coleta do clorofórmio e evaporação em câmara a vácuo a 25°C. Reconstituído com 30 µL de acetonitrila.	>>5	SHAMSIPUR <i>et al.</i> , 2014
TA-DLLME e GC-FID	5000	10 – 400 ^b	2 ^b	10 ^b	Aquecimento da amostra em banho maria por 10 min a 70 °C. Adição de 1,5 mL de dimetilformamida contendo 150 µL de anidrido acético e 80 µL de 1,1,2,2-tetracloroetano. Resfriamento até atingir a temperatura ambiente, formação de turbidez e centrifugação por 3 min a 4000 rpm.	>>10	NABIL <i>et al.</i> , 2015

*Legenda: ^a Fluoxetina, ^b Nortriptilina, ^c Amitriptilina, ^d Imipramina, ^e Desipramina, ^f Sertralina.

Fonte: Autoria própria (2020).

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

A nova técnica de μ P-SHS-HLLME proposta nesse trabalho com a utilização de um novo dispositivo simples e de baixo custo denominado “ μ -pipeta (μ P)” mostrou-se eficiente na determinação de antidepressivos em amostras de urina humana. A metodologia foi totalmente otimizada demonstrando várias vantagens em relação aos métodos descritos na literatura para a determinação dessas substâncias, incluindo aspectos ambientalmente amigáveis devido ao uso e geração de volumes menores de solventes orgânicos biodegradáveis, a simplicidade, o custo-benefício, o tempo de extração reduzido, o baixo consumo de volume de amostra e a facilidade de operação. O uso do dispositivo de baixo custo na etapa de extração permitiu simplificar a coleta do SHS após o procedimento em comparação com outras metodologias descritas na literatura que empregam SHSs.

Apesar de ter sido utilizada uma matriz biológica contendo diferentes compostos orgânicos e inorgânicos, os parâmetros de mérito do método desenvolvido apresentaram valores aceitos pelos guias de validação, tais como boa linearidade, coeficientes de determinação superiores a 0,9954 para todos os analitos, LODs de 0,02 a 0,88 $\mu\text{g L}^{-1}$, LOQs de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$, os ensaios de recuperação relativa apresentaram valores na faixa de 68 e 102%, a precisão intra-dia variou de 0,5 a 15,9% e a precisão inter-dia de 4,2 a 19,3%. O método proposto também apresentou seletividade e robustez conforme o teste de *Youden*. A metodologia proposta foi aplicada com sucesso em cinco amostras de urina humana provenientes do CIT/RS, em que as substâncias amitriptilina e nortriptilina foram identificadas e quantificadas em todas as amostras.

De maneira geral, o método desenvolvido pode ser utilizado na identificação e quantificação de antidepressivos em amostras de urina humana suspeitas de intoxicação por essas substâncias, sendo aplicável tanto na toxicologia forense quanto na toxicologia clínica.

Diante dos resultados obtidos, este trabalho se destaca pela grande contribuição na química analítica verde em que proporcionou análises eficientes e com reduzido impacto ambiental, considerando que foi proposta uma nova abordagem para a técnica de microextração líquido-líquido homogênea com solvente de hidrofobicidade comutável com a utilização de um novo dispositivo simples e de baixo custo no procedimento de preparo de amostra. Além disso, a metodologia

desenvolvida nesse trabalho apresenta um grande potencial de aplicabilidade nos órgãos responsáveis pelas análises toxicológicas forenses tanto em âmbito estadual quanto em âmbito federal, já que se apresenta como uma metodologia de baixo-custo, simples e rápida.

PERSPECTIVAS

7 PERSPECTIVAS

A nova técnica μ P-SHS-HLLME introduzida nesse trabalho pode ser explorada em outros contextos para a determinação de diferentes classes de substâncias em amostras de urina ou em outras matrizes biológicas, ambientais e alimentares. Outrossim, a técnica desenvolvida pode ainda ser utilizada em análises de saúde ocupacional para o monitoramento de exposição a certas substâncias tais como drogas de abuso e praguicidas.

Além disso, a técnica de μ P-SHS-HLLME está sendo explorada em três projetos em andamento atualmente:

- Determinação de hexanal e heptanal (bioindicadores de câncer pulmonar) em urina por GC-MS;
- Determinação de drogas de abuso em sangue por LC-MS/MS;
- Determinação de novas substâncias psicoativas em sangue por LC-MS/MS.

Destaca-se que ainda não foram reportadas na literatura o uso de técnicas de microextração com solventes de hidrofiliabilidade comutável em cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas e em análises de amostras de sangue total.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

AHMAR, Hamid *et al.* Switchable Hydrophilicity Solvent-Based Homogenous Liquid–Liquid Microextraction (SHS-HLLME) Combined with GC-FID for the Quantification of Methadone and Tramadol. **Chromatographia**, v. 81, n. 7, p.1063-1070, 3 maio 2018.

ANVISA. Resolução da diretoria colegiada - RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. **Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências.** Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401.

ARTHUR, Catherine L.; PAWLISZYN, Janusz. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. **Analytical Chemistry**, v. 62, n. 19, p. 2145-2148, out. 1990.

ASENSIO-RAMOS, María *et al.* Liquid phase microextraction applications in food analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 42, p.7415-7437, out. 2011.

BAZEL', Y.; RECLO, M.; IANDREJOVÁ, J. Using a switchable-hydrophilicity solvent for the extraction–spectrophotometric determination of nickel. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 72, n. 10, p.1018-1023, 22 set. 2017.

BERNARDES, Sara Santos; TURINI, Conceição Aparecida; MATSUO, Tiemi. Perfil das tentativas de suicídio por sobredose intencional de medicamentos atendidas por um Centro de Controle de Intoxicações do Paraná, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 26, n. 7, p.1366-1372, jul. 2010.

BORDIN, *et al.* Técnicas de preparo de amostras biológicas com interesse forense. **Scientia Chromatographica**, v. 7, n. 2, p. 125-143, 2015.

BORGES K.B.; QUEIROZ, M.E.C; FIGUEIREDO, E.C. **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos**, LTC Editora, 2015.

BOYACI, Ezel *et al.* Sample preparation with solid phase microextraction and exhaustive extraction approaches: Comparison for challenging cases. **Analytica Chimica Acta**, v. 873, p. 14-30, mai. 2015.

BRASIL. Decreto-Lei 3.689, de 03 de outubro de 1941. **Código de Processo Penal**. Diário Oficial da União, Rio de Janeiro, 24 out. 1941.

BREWER, W. Pipette tips for extraction, sample collection and sample cleanup and methods for their use. **Google Patents**, 2014.

ÇABUK, Hasan; KÖKTÜRK, Mustafa; ATA, Şevket. PH-assisted homogeneous liquid-liquid microextraction using dialkylphosphoric acid as an extraction solvent for the determination of chlorophenols in water samples. **Journal of Separation Science**, v. 37, n. 11, p.1343-1351, 10 abr. 2014.

CARASEK, Eduardo; MERIB, Josias. Membrane-based microextraction techniques in analytical chemistry: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 880, p.8-25, jun. 2015.

CASTRO, M.D.; PRIEGO-CAPOTE, F. Soxhlet extraction: Past and present panacea. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2383-2389, abr. 2010.

CHEER, Susan M.; GOA, Karen L. Fluoxetine: a review of its therapeutic potential in the treatment of depression associated with physical illness. **Drugs**, v. 61, n. 1, p. 81-110, 2001.

CHEMICALIZE. **Instant Cheminformatics Solutions**. Disponível em: <https://chemicalize.com/>. Acesso em: 23 jul. 2019.

CHERKASHINA, Ksenia *et al.* Homogeneous liquid-liquid microextraction based on primary amine phase separation: A novel approach for sample pretreatment. **Analytica Chimica Acta**, v. 1074, p.117-122, out. 2019.

CIATox/SC. **Relatório Anual 2017**. Centro de Informações e Assistência Toxicológica de Santa Catarina, Florianópolis, 2018.

CIT/RS. **Relatório Anual 2018 – Dados de Atendimentos**. Centro de Informação Toxicológica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2019.

DI, Xin *et al.* Microwave assisted extraction in combination with solid phase purification and switchable hydrophilicity solvent-based homogeneous liquid-liquid microextraction for the determination of sulfonamides in chicken meat. **Journal of Chromatography B**, v. 1118-1119, p.109-115, jun. 2019.

DINIS-OLIVEIRA, Ricardo Jorge; VIEIRA, Duarte Nuno; MAGALHÃES, Teresa. **Guidelines for Collection of Biological Samples for Clinical and Forensic Toxicological Analysis**. Forensic Sciences Research, v. 1, n. 1, p. 42-51, nov. 2016.

DORTA, D.J., YONAMINE, M., DA COSTA, J.L., DE MARTINS, B.S. **Toxicologia Forense**, Blucher, São Paulo, 2018.

DURELLE, Jeremy; VANDERVEEN, Jesse R.; JESSOP, Philip G. Modelling the behaviour of switchable-hydrophilicity solvents. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, v. 16, n. 11, p.5270-5275, 2014.

EAP, C.B.; BAUMANN, P. Analytical methods for the quantitative determination of selective serotonin reuptake inhibitors for therapeutic drug monitoring purposes in patients. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 686, n. 1, p. 51-63, nov. 1996.

EBRAHIMPOUR, Behnam; YAMINI, Yadollah; ESRAFILI, Ali. Acid-induced homogenous liquid-phase microextraction: Application of medium-chain carboxylic acid as extraction phase. **Journal of Separation Science**, v. 36, n. 8, p.1493-1499, 22 mar. 2013.

EZODDIN, M.; ABDI, K.; LAMEI, N. Development of air assisted liquid phase microextraction based on switchable-hydrophilicity solvent for the determination of palladium in environmental samples. **Talanta**, v. 153, p.247-252, jun. 2016.

FARAJZADEH, Mir Ali; SHEYKHIZADEH, Saheleh; KHORRAM, Parisa. Salting-out homogeneous liquid-liquid extraction in narrow-bore tube: Extraction and preconcentration of phthalate esters from water. **Journal of Separation Science**, v. 36, n. 5, p.939-946, 1 fev. 2013.

FENG, Yanru *et al.* Analysis of four antidepressants in plasma and urine by gas chromatography-mass spectrometry combined with sensitive and selective derivatization. **Journal of Chromatography A**, v. 1600, p.33-40, ago. 2019.

GAMA, M. R. *et al.* An overview of the Brazilian contributions to Green Analytical Chemistry. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, n. 1, p.1-33, abr. 2019.

GAO, Ming *et al.* An effervescence-assisted switchable fatty acid-based microextraction with solidification of floating organic droplet for determination of fluoroquinolones and tetracyclines in seawater, sediment, and seafood. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 410, n. 11, p.2671-2687, 6 mar. 2018.

GHIASVAND, A. *et al.* Homogeneous liquid-liquid extraction method for the selective separation and preconcentration of ultra-trace molybdenum. **Talanta**, v. 66, n. 4, p.912-916, 15 maio 2005.

GRAZIANO *et al.* Screening methods for rapid determination of new psychoactive substances (NPS) in conventional and non-conventional biological matrices. **Journal of Pharmaceutical And Biomedical Analysis**, v. 163, p. 170-179, jan. 2019.

HASSAN, Malek; ALSHANA, Usama. Switchable-hydrophilicity solvent liquid-liquid microextraction of non-steroidal anti-inflammatory drugs from biological fluids prior to HPLC-DAD determination. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 174, p.509-517, set. 2019.

HEYDEN, y Vander *et al.* Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 24, n. 5-6, p.723-753, mar. 2001.

INMETRO. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. Revisão 07 – julho 2018. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_07.pdf. Acesso em: 23 jul. 2019.

ITO, Rie *et al.* Improvement and validation the method using dispersive liquid–liquid microextraction with in situ derivatization followed by gas chromatography–mass spectrometry for determination of tricyclic antidepressants in human urine samples. **Journal of Chromatography B**, v. 879, n. 31, p.3714-3720, dez. 2011.

JAMALI, Mohammad Reza; ASSADI, Yaghoub; SHEMIRANI, Farzaneh. Homogeneous Liquid–Liquid Extraction and Determination of Cobalt, Copper, and Nickel in Water Samples by Flame Atomic Absorption Spectrometry. **Separation Science and Technology**, v. 42, n. 15, p.3503-3515, nov. 2007.

JEANNOT, Michael A.; CANTWELL, Frederick F. Solvent Microextraction into a Single Drop. **Analytical Chemistry**, v. 68, n. 13, p.2236-2240, jan. 1996.

JESSOP, Philip G. *et al.* A solvent having switchable hydrophilicity. **Green Chemistry**, v. 12, n. 5, p. 809-814, 2010.

JESSOP, Philip G. *et al.* Tertiary amine solvents having switchable hydrophilicity. **Green Chemistry**, v. 13, n. 3, p. 619-623, 2011.

JING, Xu *et al.* Effervescent tablet-assisted switchable hydrophilicity solvent-based microextraction with solidification of floating organic droplets for HPLC determination of phenolic endocrine disrupting chemicals in bottled beverages. **Microchemical Journal**, v. 155, p. 104680, jun. 2020.

JING, Xu *et al.* Magnetic effervescence tablet-assisted switchable hydrophilicity solvent-based liquid phase microextraction of triazine herbicides in water samples. **Journal of Molecular Liquids**, v. 306, p. 112934, maio 2020.

KAKAVANDI, Nader Rahimi *et al.* Ion-pair switchable-hydrophilicity solvent-based homogeneous liquid-liquid microextraction for the determination of paraquat in

environmental and biological samples before high-performance liquid chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 40, n. 18, p. 3703-3709, 31 ago. 2017.

KOKOSA, John M. Advances in solvent-microextraction techniques. **Trac Trends in Analytical Chemistry**, v. 43, p.2-13, fev. 2013.

KOKOSA, John M. Selecting an extraction solvent for a greener liquid phase microextraction (LPME) mode-based analytical method. **Trac Trends in Analytical Chemistry**, v. 118, p.238-247, set. 2019.

KUHN, C. **Neuropsychopharmacology – Nature Publishing Group**, v. 31, p. 1096, 2006.

LAMEI, Navid *et al.* Ultrasound-Assisted Switchable Solvent in Determination of Quaternary Ammonium Herbicide Paraquat in Biological, Environmental Water, and Apple Juice Samples Using Chemical Reduction Process Coupled to GC–MS Detection. **Chromatographia**, v. 81, n. 6, p.923-930, 18 abr. 2018.

LASARTE-ARAGONÉS, Guillermo *et al.* Use of switchable hydrophilicity solvents for the homogeneous liquid-liquid microextraction of triazine herbicides from environmental water samples. **Journal of Separation Science**, v. 38, n. 6, p. 990-995, 13 fev. 2015.

LASARTE-ARAGONÉS, Guillermo *et al.* Use of switchable solvents in the microextraction context. **Talanta**, v. 131, p. 645-649, jan. 2015.

LEBEDINETS, S. *et al.* Stir membrane liquid phase microextraction of tetracyclines using switchable hydrophilicity solvents followed by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1615, p. 460743, mar. 2020.

LI, Weixia *et al.* Switchable Hydrophilicity Dispersive Solvent-Based Liquid-Liquid Microextraction Coupling to High-Performance Liquid Chromatography for the

Determination of Amphenicols in Food Products. **Food Analytical Methods**, v. 12, n. 2, p.517-525, 18 out. 2018.

LILLSUNDE, Pirjo. Analytical Techniques for Drug Detection in Oral Fluid. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 30, n. 2, p. 181-187, abr. 2008.

MENDENHALL, William; BEAVER, Robert J.; BEAVER, Barbara M. **Introduction to Probability and Statistics**. 14. ed. Boston: Cengage Learning, 2012. 744 p.

MERIB, Josias; CARASEK, Eduardo. Microextração em fase líquida suportada com fibra oca (HF-LPME): Fundamentos e aplicações recentes. **Scientia Chromatographica**, v. 5, n. 4, p.249-262, 2013.

MOFFAT, A.C. **Clarke's analysis of drugs and poisons: in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material**. 4a edição. London: Pharmaceutical Press, 2011.

NABIL, Ali Akbar Alizadeh; NOURI, Nina; FARAJZADEH, Mir Ali. Determination of three antidepressants in urine using simultaneous derivatization and temperature-assisted dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-flame ionization detection. **Biomedical Chromatography**, v. 29, n. 7, p. 1094-1102, 16 dez. 2014.

NAEEMULLAH; TUZEN, Mustafa. A new portable switchable hydrophilicity microextraction method for determination of vanadium in microsampling micropipette tip syringe system couple with ETAAS. **Talanta**, v. 194, p.991-996, mar. 2019.

NEGRUSZ, Adam; COOPER, Gail. **Clarke's Analytical Forensic Toxicology**. 2ª edição. Londres: Pharmaceutical Press. 2008.

NIU, Zongliang *et al.* Recent advances in biological sample preparation methods coupled with chromatography, spectrometry and electrochemistry analysis techniques. **Trac Trends in Analytical Chemistry**, v. 102, p.123-146, maio 2018.

NOGUEIRA, J. M. F. Microextração adsortiva em barra (BA μ E): Um conceito analítico inovador para microextração estática. **Scientia Chromatographica**, v. 5, n. 4, p. 275-283, 2013.

OENNING, A. L. *et al.* A green and low-cost method employing switchable hydrophilicity solvent for the simultaneous determination of antidepressants in human urine by gas chromatography - mass spectrometry detection. **Journal of Chromatography B**, v. 1143, p. 122069, abr. 2020.

PASSAGLI, M. **Toxicologia Forense: teoria e prática**, Millennium Editora, Campinas, São Paulo, 2018.

PEDERSEN-BJERGAARD, Stig; RASMUSSEN, Knut Einar. Liquid-Liquid-Liquid Microextraction for Sample Preparation of Biological Fluids Prior to Capillary Electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 71, n. 14, p. 2650-2656, jul. 1999.

PINTO, Iohana Pinto de; PEDROSO, Marcio Pozzobon. Microextração em gota única (SDME): fundamentos e aplicações. **Scientia Chromatographica**, v. 7, n. 3, p.183-198, 2015.

POCHIVALOV, Aleksei *et al.* Automated alkaline-induced salting-out homogeneous liquid-liquid extraction coupled with in-line organic-phase detection by an optical probe for the determination of diclofenac. **Talanta**, v. 169, p.156-162, jul. 2017.

POCHIVALOV, Aleksei *et al.* Surfactant-mediated microextraction approach using switchable hydrophilicity solvent: HPLC-UV determination of Sudan dyes in solid food samples. **Journal of Molecular Liquids**, v. 271, p.807-814, dez. 2018.

POCHIVALOV, Aleksei *et al.* Switchable hydrophilicity solvent membrane-based microextraction: HPLC-FLD determination of fluoroquinolones in shrimps. **Analytica Chimica Acta**, v. 976, p. 35-44, jul. 2017.

POKLIS, Justin L. *et al.* Detection and Quantification of Tricyclic Antidepressants and Other Psychoactive Drugs in Urine by HPLC/MS/MS for Pain Management

Compliance Testing. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 26, n. 4, p.286-294, jul. 2012.

PUBCHEM. **Explore Chemistry**. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em: 23 jul. 2019.

QUEIROZ, M.E. Extração sortiva em barra de agitação (SBSE): Fundamentos teóricos e fases seletivas, **Scientia Chromatographica** v. 1, p. 21-29, 2009.

RAMESHGAR, Jamileh *et al.* Switchable-hydrophilicity solvent-based microextraction combined with gas chromatography for the determination of nitroaromatic compounds in water samples. **Journal of Separation Science**, v. 40, n. 15, p.3114-3119, 28 jun. 2017.

RECLO, Michal *et al.* Switchable solvent based liquid phase microextraction of palladium coupled with determination by flame atomic absorption spectrometry. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 97, n. 14-15, p.1315-1327, 8 dez. 2017.

REZAEI, Mohammad *et al.* Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1116, n. 1-2, p.1-9, maio 2006.

RODRIGUES, Cássio D.; SOUZA, Débora S. de; RODRIGUES, Henrique M.; KONSTANTYNER, Thais C.R.O.. Trends in suicide rates in Brazil from 1997 to 2015. **Brazilian Journal of Psychiatry**, v. 41, n. 5, p. 380-388, out. 2019.

SCOPUS. **Document search**. Disponível em: <https://www.scopus.com>. Acesso em: 05 jun. 2019.

SHAHRAKI, Sahar; AHMAR, Hamid; NEJATI-YAZDINEJAD, Massoud. Electrochemical determination of nitrazepam by switchable solvent based liquid-liquid microextraction combined with differential pulse voltammetry. **Microchemical Journal**, v. 142, p.229-235, nov. 2018.

SHAHVANDI, S. K. *et al.* A novel temperature controlled switchable solvent based microextraction method: application for the determination of phthalic acid esters in water samples. **Microchemical Journal**, [s.l.], v. 152, p. 104300, jan. 2020.

SHAHVANDI, Siamak Kiani; BANITABA, Mohammad Hossein; AHMAR, Hamid. Development of a new pH assisted homogeneous liquid-liquid microextraction by a solvent with switchable hydrophilicity: Application for GC-MS determination of methamphetamine. **Talanta**, v. 184, p.103-108, jul. 2018.

SHAMSIPUR, Mojtaba; MIRMOHAMMADI, Mehrosadat. High performance liquid chromatographic determination of ultra traces of two tricyclic antidepressant drugs imipramine and trimipramine in urine samples after their dispersive liquid-liquid microextraction coupled with response surface optimization. **Journal of Pharmaceutical And Biomedical Analysis**, v. 100, p.271-278, nov. 2014.

SHIH, Hou-kuang *et al.* A novel fatty-acid-based in-tube dispersive liquid-liquid microextraction technique for the rapid determination of nonylphenol and 4-tert-octylphenol in aqueous samples using high-performance liquid chromatography-ultraviolet detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 854, p. 70-77, jan. 2015.

SHISHOV, Andrey *et al.* An automated continuous homogeneous microextraction for the determination of selenium and arsenic by hydride generation atomic fluorescence spectrometry. **Talanta**, v. 181, p. 359-365, maio 2018.

SILVA, P. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

STASHENKO, Elena E.; MARTÍNEZ, Jairo René. Preparación de la muestra: un paso crucial para el análisis por GC-MS. **Scientia Chromatographica**, v. 3, n. 1, p.25-49, 2011.

SWGTOX. Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX) Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 37, n. 7, p.452-474, set. 2013.

TRUTA, Liliana *et al.* Antidepressants detection and quantification in whole blood samples by GC–MS/MS, for forensic purposes. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 128, p. 496-503, set. 2016.

VAKH, Christina *et al.* A fully automated effervescence-assisted switchable solvent-based liquid phase microextraction procedure: Liquid chromatographic determination of ofloxacin in human urine samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 907, p. 54-59, fev. 2016.

VANDERVEEN, Jesse R. *et al.* Diamines as switchable-hydrophilicity solvents with improved phase behaviour. **Rsc Advances**, v. 8, n. 48, p.27318-27325, 2018.

VANDERVEEN, Jesse R.; DURELLE, Jeremy; JESSOP, Philip G. Design and evaluation of switchable-hydrophilicity solvents. **Green Chemistry**, v. 16, n. 3, p. 1187-1197, 2014.

VERSTRAETE, Alain G. Detection Times of Drugs of Abuse in Blood, Urine, and Oral Fluid. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 26, n. 2, p. 200-205, abr. 2004.

WADA. **World Anti-Doping Agency**. Disponível em: <https://www.wada-ama.org/en/>. Acesso em: 02 ago. 2019.

WANG, Xuran *et al.* Development of CO₂-Mediated Switchable Hydrophilicity Solvent-Based Microextraction Combined with HPLC-UV for the Determination of Bisphenols in Foods and Drinks. **Food Analytical Methods**, v. 11, n. 8, p.2093-2104, 16 fev. 2018.

WHO. **Depression**. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/depression>. Acesso em: 05 dez. 2020.

XU, Fangmin *et al.* Development of a Liquid–Liquid Microextraction Method Based on a Switchable Hydrophilicity Solvent for the Simultaneous Determination of 11 Drugs in Urine by GC–MS. **Chromatographia**, v. 81, n. 12, p.1695-1703, 30 out. 2018.

XU, Fangmin *et al.* Solvent with switchable hydrophilicity used in liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry for the determination of diclazepam in urine. **Chinese Journal of Chromatography**, v. 36, n. 10, p.1067-1072, 2018.

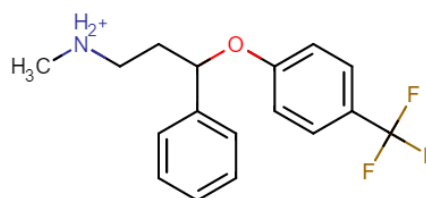
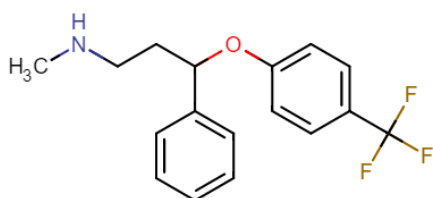
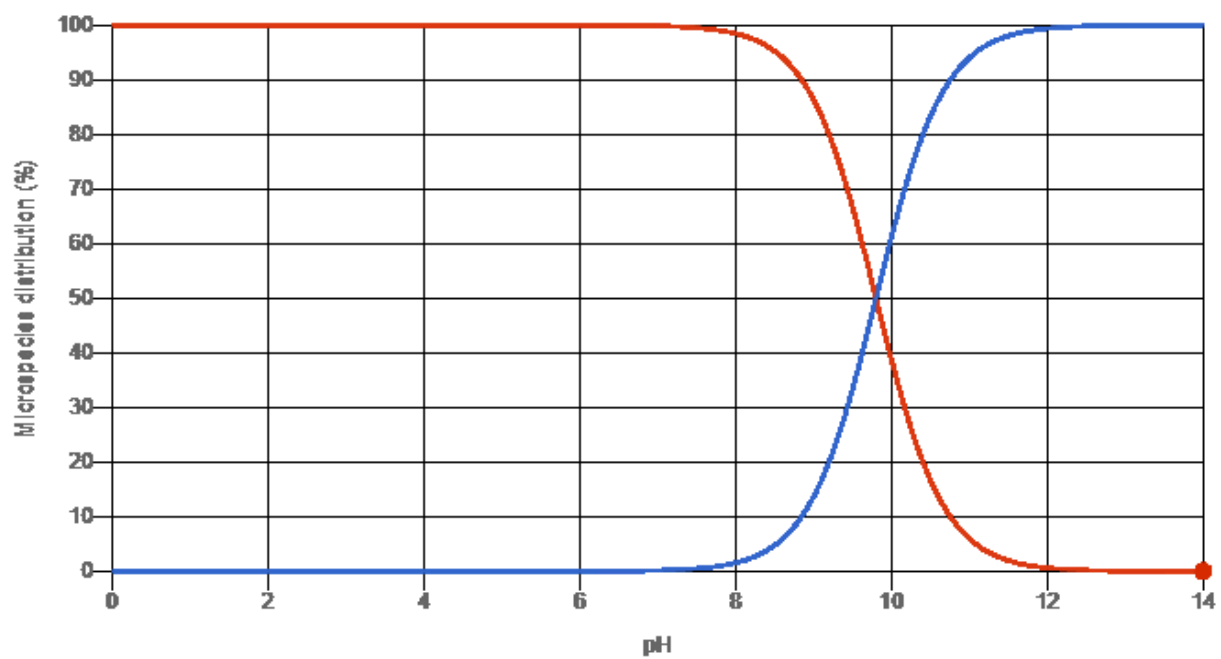
YAZDANFAR, Najmeh; YAMINI, Yadollah; GHAMBARIAN, Mahnaz. Homogeneous Liquid–Liquid Microextraction for Determination of Organochlorine Pesticides in Water and Fruit Samples. **Chromatographia**, v. 77, n. 3-4, p.329-336, 29 nov. 2013.

ZHANG, Si *et al.* Switchable solvent based liquid phase microextraction of trace lead and cadmium from environmental and biological samples prior to graphite furnace atomic absorption spectrometry detection. **Microchemical Journal**, v. 139, p.380-385, jun. 2018.

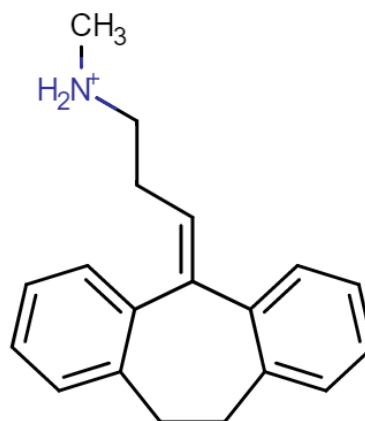
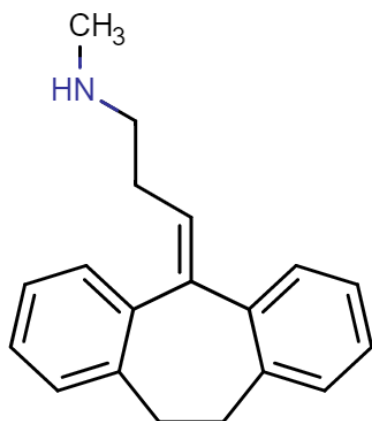
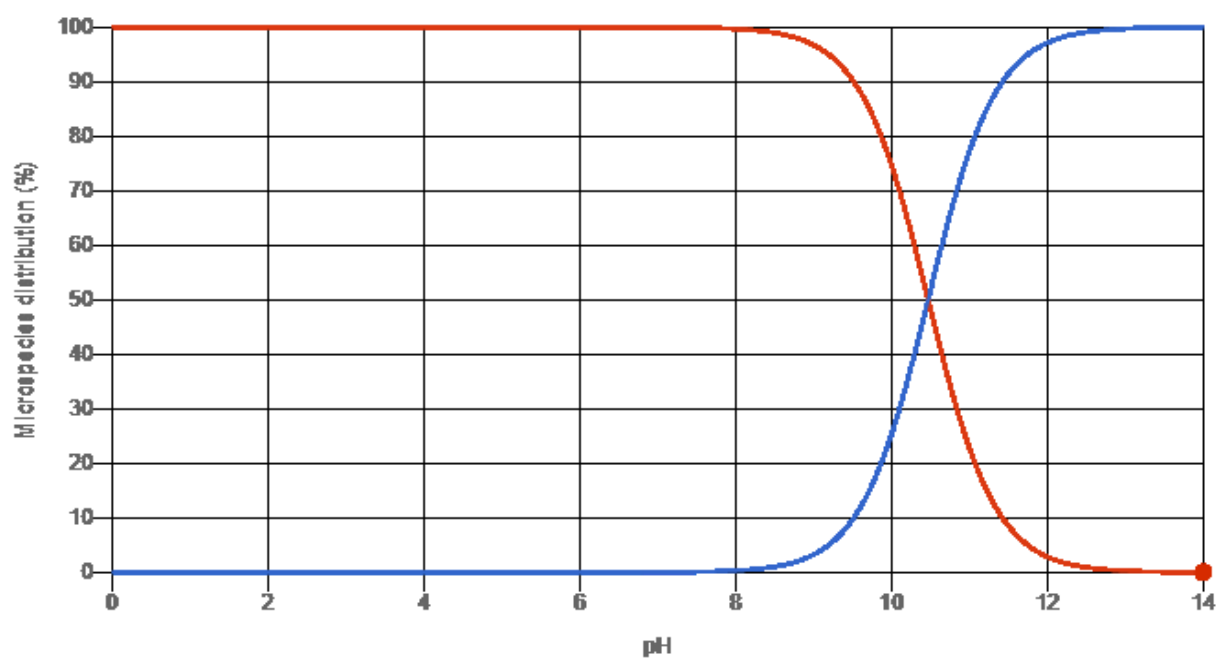
ANEXOS

ANEXOS

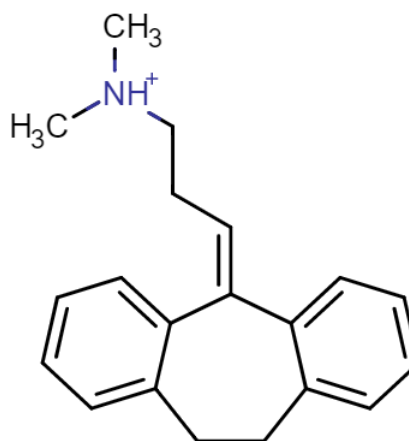
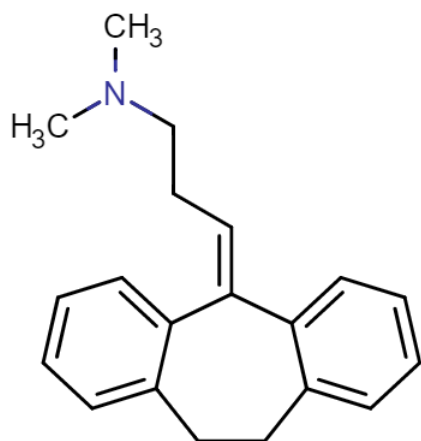
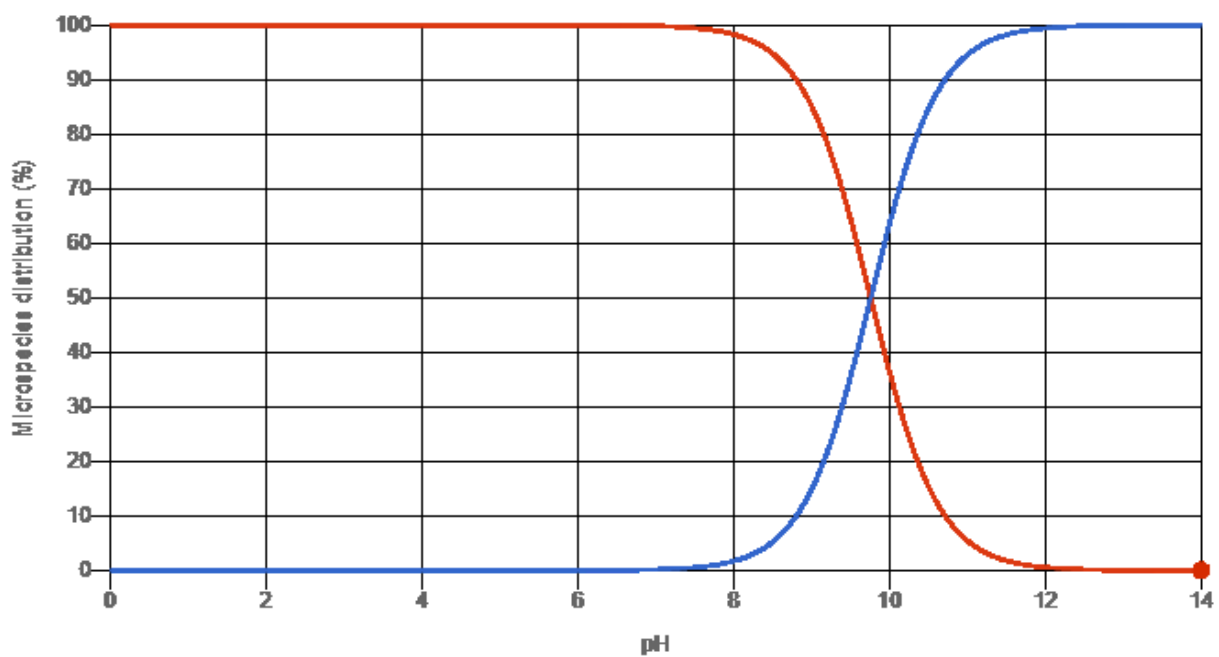
ANEXO I - DIAGRAMA DE ESPÉCIES DA FLUOXETINA.



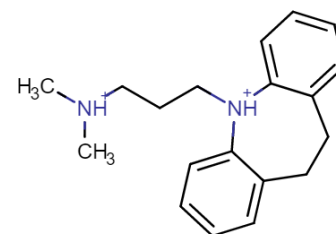
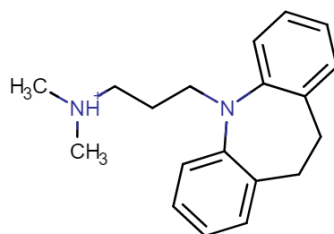
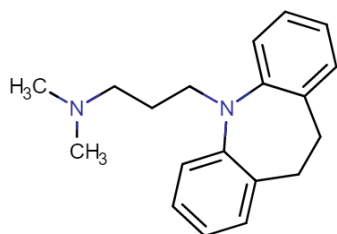
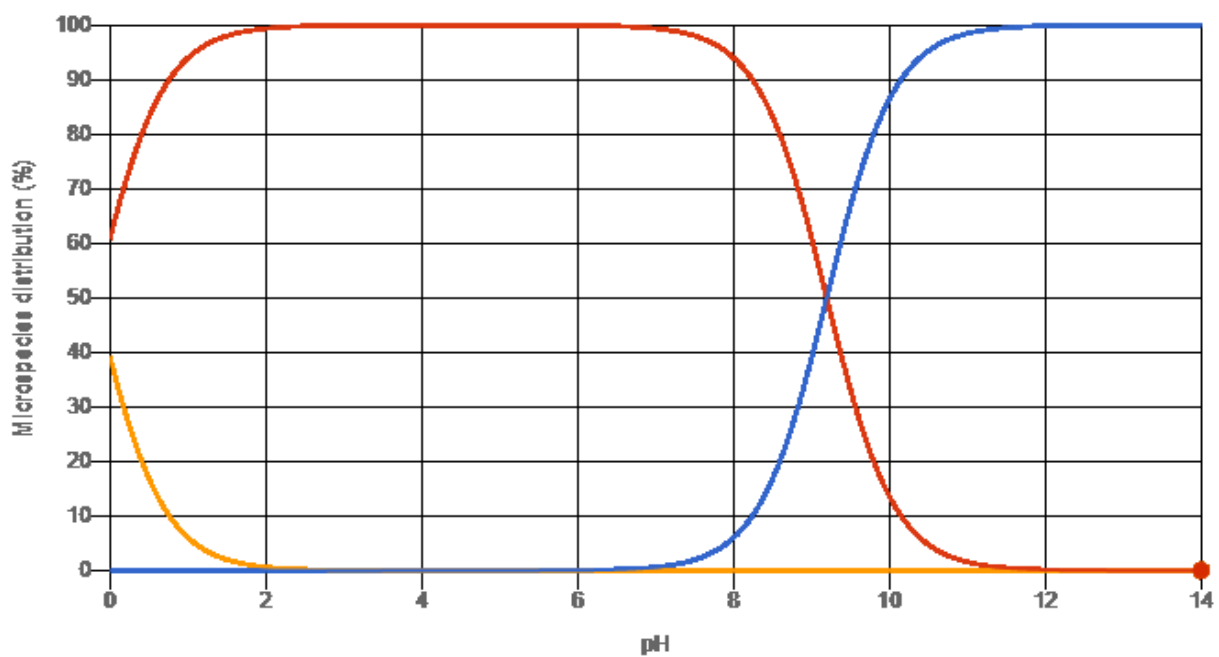
ANEXO II - DIAGRAMA DE ESPÉCIES DA NORTRIPTILINA.



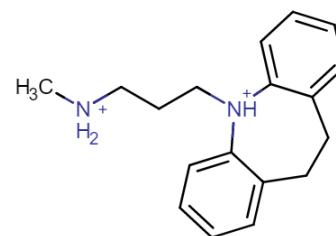
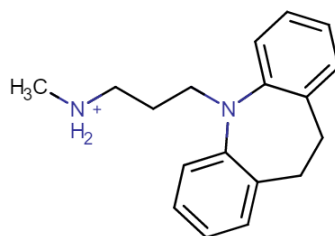
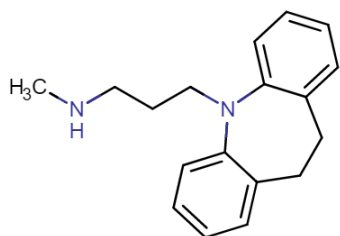
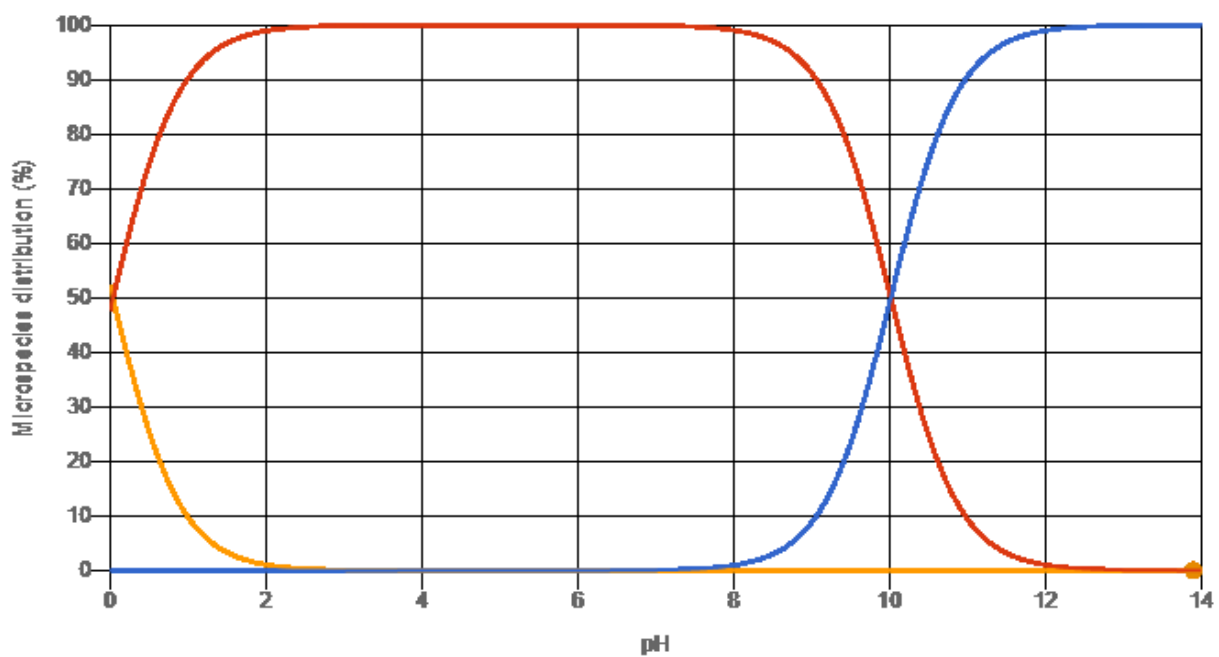
ANEXO III - DIAGRAMA DE ESPÉCIES DA AMITRIPTILINA.



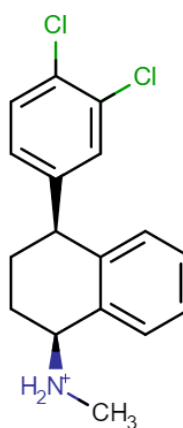
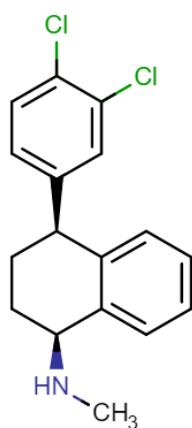
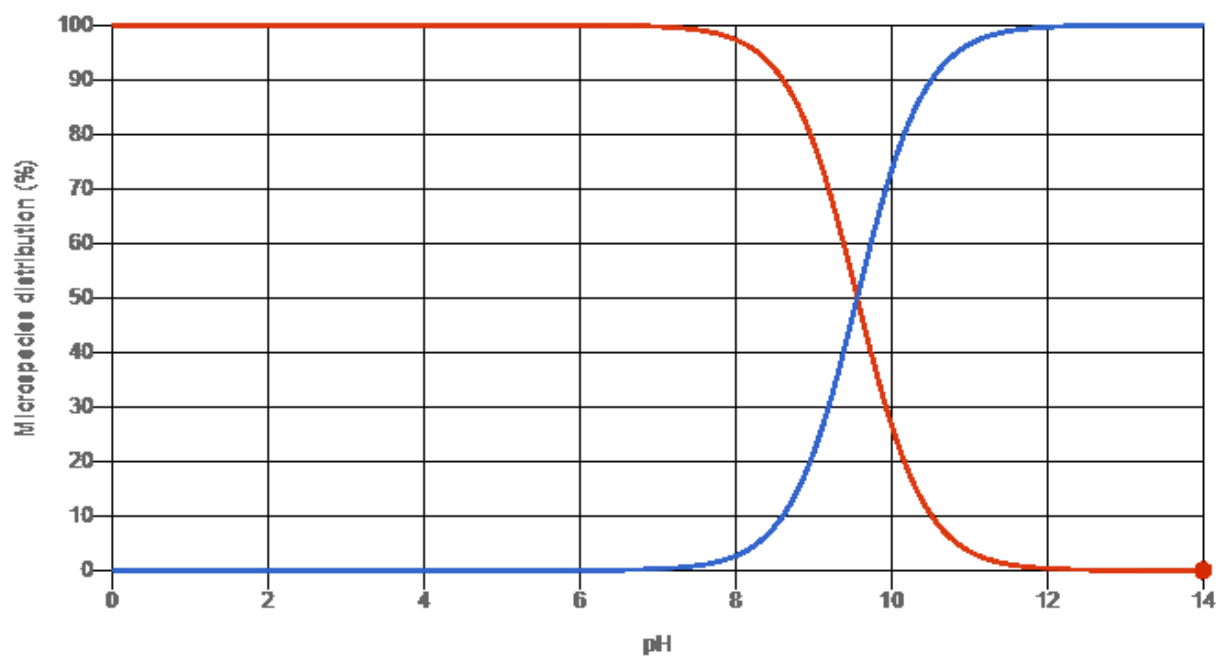
ANEXO IV - DIAGRAMA DE ESPÉCIES DA IMIPRAMINA.



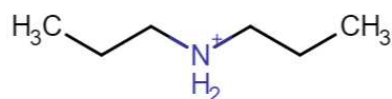
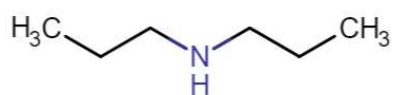
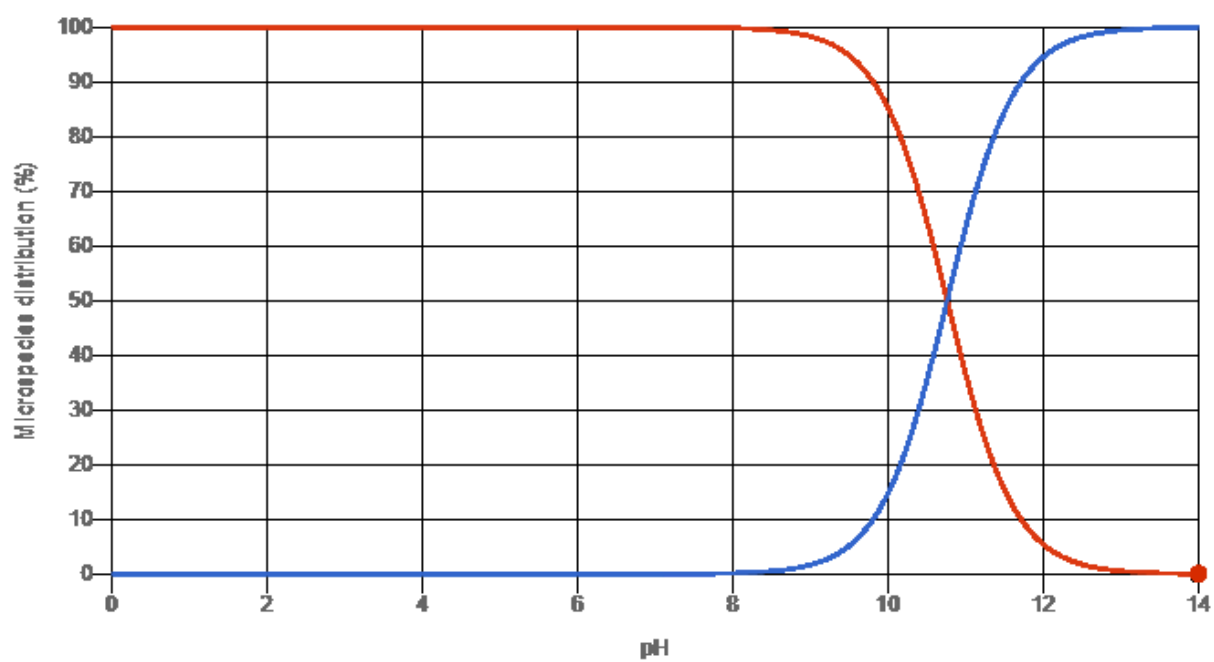
ANEXO V - DIAGRAMA DE ESPÉCIES DA DESIPRAMINA.

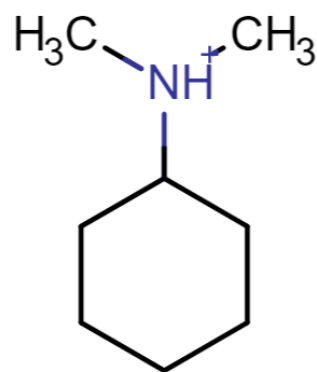
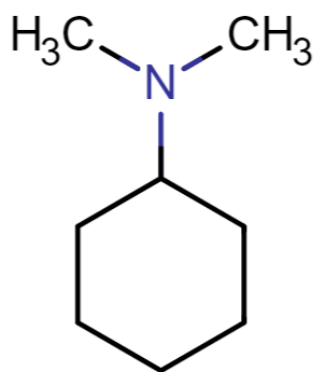
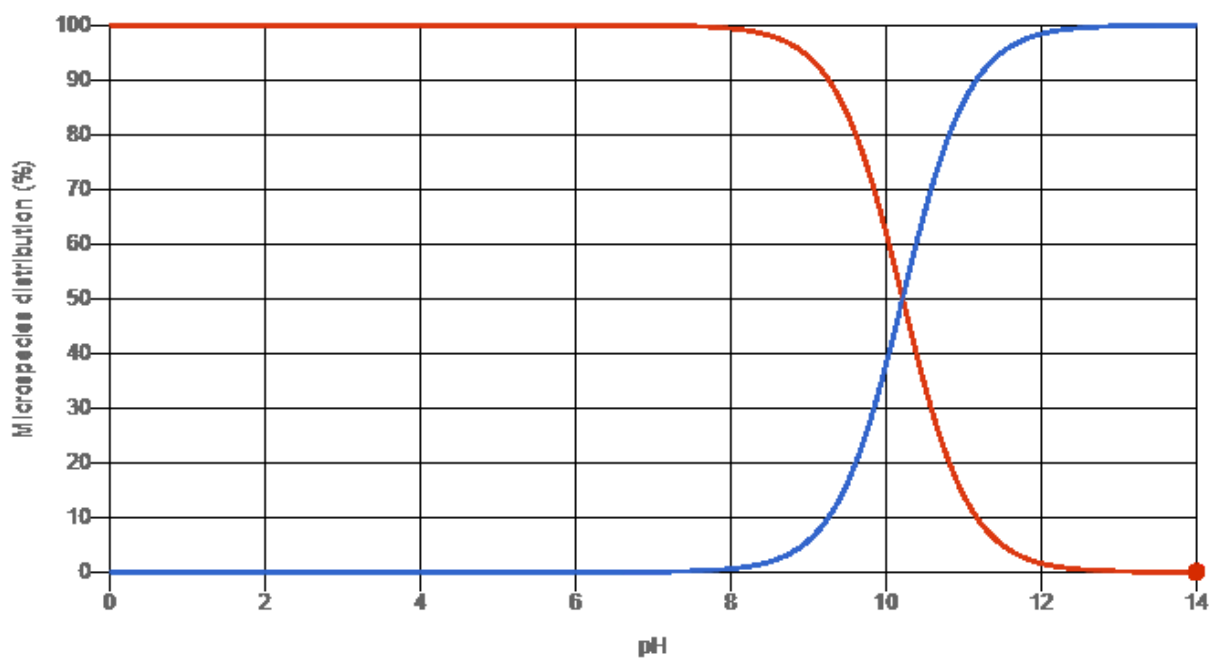


ANEXO VI - DIAGRAMA DE ESPÉCIES DA SERTRALINA.



ANEXO VII - DIAGRAMA DE ESPÉCIES DA DIPROPILAMINA.



ANEXO VIII - DIAGRAMA DE ESPÉCIES DA *N,N*-DIMETILCICLOHEXILAMINA.

APÊNDICE

ATIVIDADES REALIZADAS NO PERÍODO DO DOUTORADO (2018 A 2020)

- **Produção científica**

OENNING, A. L. ; MERIB, J. ; CARASEK, E. An effective and high-throughput analytical methodology for pesticide screening in human urine by disposable pipette extraction and gas chromatography – mass spectrometry. **Journal of Chromatography B - Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 1092, 459-465, 2018.

OMENA, E. ; OENNING, A. L. ; MERIB, J. ; RICHTER, P. ; ROSERO-MOREANO, M. ; CARASEK, E. A green and simple sample preparation method to determine pesticides in rice using a combination of SPME and rotating disk sorption devices. **Analytica Chimica Acta**, v. 1069, 57-65, 2019.

OENNING, A. L. ; BIRK, L. ; ELLER, S. ; OLIVEIRA, T. ; MERIB, J. ; CARASEK, E. A green and low-cost method employing switchable hydrophilicity solvent for the simultaneous determination of antidepressants in human urine by gas chromatography - mass spectrometry detection. **Journal of Chromatography B - Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 1143, 01-11, 2020.

CORAZZA, G. ; OENNING, A. L. ; BERNARDI, G. ; MERIB, J. ; CARASEK, E. Exploring the use of switchable hydrophilicity solvents as extraction phase for the determination of food-packaging contaminants in coconut water samples by gas chromatography - mass spectrometry. **Food Analytical Methods**. (Artigo submetido)

- **Trabalhos completos publicados em anais de congressos**

OMENA, E.; OENNING, A.L.; BERNARDI, G.; MERIB, J.; CARASEK, E. **Determinação de agrotóxicos em arroz utilizando extração sortiva em disco modificada combinada a DI-SPME e GC-MS**. XXI Encontro Nacional e VII Congresso Latino Americano de Analistas de Alimentos, Florianópolis, 2019.

CORAZZA, G.; OENNING, A.L.; MENDES, L.D.; BERNARDI, G.; CARASEK, E. **Use of switchable hydrophilicity solvent (SHS) as extraction phase for**

analysis of contaminants from food-packaging in coco water. COLACRO XVII - Congresso Latino-Americano de Cromatografia e Técnicas Relacionadas e Simpósio Nacional de Cromatografia, Aracaju, 2019.

FENSTERSEIFER, M. J. ; OENNING, A. L. ; CARASEK, E. **Desenvolvimento de metodologia para determinação de agrotóxicos organoclorados em água através de SPEM e GC-MS.** 26º Encontro de Química da Região Sul, Caxias do Sul, 2019.

OENNING, A. L.; BIRK, L. ; ELLER, S. ; OLIVEIRA, T. ; CARASEK, E. ; MERIB, J. O. **Applicability of switchable hydrophilicity solvents for the determination of antidepressants in urine samples by gas chromatography-mass spectrometry.** XXI Brazilian Congress of Toxicology / XV TIAFT Latin-American Regional Meeting, Águas de Lindoia, 2019.

OENNING, A. L.; BIRK, L. ; OLIVEIRA, T. ; ELLER, S. ; MERIB, JOSIAS ; CARASEK, E. . **Uso de solvente de hidrofiliçidade comutável para a determinação de antidepressivos em amostras de urina por GC-MS.** 7º ENQFor - Encontro Nacional de Química Forense e 4º Encontro da Sociedade Brasileira de Ciências Forenses, 2020.

- **Premiações**

Colaborador da **Menção Honrosa de Apresentação Oral.** Applicability of Switchable Hydrophilicity Solvents for the Determination of Antidepressants in Urine Samples by Gas Chromatography-Mass Spectrometry no XV TIAFT Latin-American Regional Meeting, Águas de Lindoia, 2019.

- **Orientação e coorientação de trabalho de conclusão de curso**

MARIA JOHANN FENSTERSEIFER. **Desenvolvimento de metodologia para determinação de agrotóxicos organoclorados em água para consumo humano por meio de SPME e GC-MS.** 2018. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação

em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina. Orientador: Prof. Dr. Eduardo Carasek da Rocha.

JULIANA DANTAS CASTELO BRANCO. **Técnicas de extração empregadas na identificação de novas substâncias psicoativas**. 2020. Trabalho de Conclusão de Curso de Especialização. (Pós-Graduação em Perícia Criminal e Ciências Forenses) - ESB-Instituto de Ensino Superior Brasileiro.

- **Membro de banca de trabalho de conclusão de curso**

OENNING, A.L.; REGINATTO, F.H.; MAIA, A.H.A. Participação em banca de João Pedro Malakovski. **Extração em ponteiras descartáveis para análise de cocaína e canabinoides em matrizes biológicas: uma revisão de escopo**. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Federal de Santa Catarina.

- **Palestras em eventos**

Palestra ministrada para os calouros do curso de Química da UFSC intitulada **“Análises forenses: uma abordagem química e toxicológica”** em maio de 2018 e em setembro de 2019.

Palestra ministrada no evento I Congresso Nacional Online de Química intitulada **“Aplicação de técnicas de microextração no preparo de amostras no âmbito forense”** em agosto de 2019.

Palestra ministrada no evento I Congresso FarmaUDF Online intitulada **“Técnicas modernas de microextração: uma nova abordagem para análises toxicológicas forenses”** em maio de 2020.

Palestra ministrada na Semana de Ciências Forenses da UFMA intitulada **“Perito Criminal: O que é? O que faz? E como se tornar?”** em junho de 2020.

Palestra ministrada na Semana do dia do Químico da UFMA intitulada **“Explorando as técnicas de microextração no preparo de amostra no âmbito forense”** em junho de 2020.

Palestra ministrada para os estudantes de Ensino Médio do IFC – Campus Brusque intitulada **“Perito Criminal: O que é? O que faz? E como se tornar”** em junho de 2020.

Palestra ministrada na Semana de Química da UFSC intitulada **“A importância da Química Forense no contexto judicial”** em novembro de 2020.

- **Participação em eventos**

I Semana da Química na Sociedade - XIV Semana Acadêmica de Química da UFSC - IX Semana da Pós-graduação em Química da UFSC. 2020.

I Congresso Brasileiro de Criminologia e Criminalística. 2020.

IV Congresso Nacional Online de Perícia Criminal. 2020.

II Conferência Online de Perícia Criminal. 2020.

I Congresso FarmaUDF Online. 2020

II Congresso Online Nacional de Química - CONDEQUI. 2020.

I Conferência Online de Perícia Criminal. 2019.

I Congresso Online Nacional de Química - CONDEQUI. 2019

III Congresso de Qualidade em Laboratórios - Online Gratuito. 2019.

III Congresso Nacional Online de Perícia Criminal. 2019.

II QuimTox. 2019.

INTERFORENSICS - Conferência Internacional de Ciências Forenses. 2019.

III Congresso Nacional Online de Perícia Criminal. 2019.

II Congresso Nacional Online de Perícia Criminal. 2018.

VII Semana da Pós-Graduação em Química da UFSC. 2018.

V Seminário Internacional: Ciência, Tecnologia e Inovação em Segurança Pública. 2018.

- **Participação em minicursos**

Toxicologia Forense: Detecção de drogas em matrizes biológicas. IBAP. 2018.

A influência do erro analítico no preparo de amostra. SARTORIUS. 2019.

Análise toxicológica em matrizes alternativas. INTERFORENSICS. 2019.

Boas práticas de pipetagem. SARTORIUS. 2019.

Microscopia de Força Atômica e suas potencialidades além da topografia.

ANALÍTICA. 2020.

GSR: Análise Residuográfica com MEV de Bancada. ANALÍTICA. 2020.