

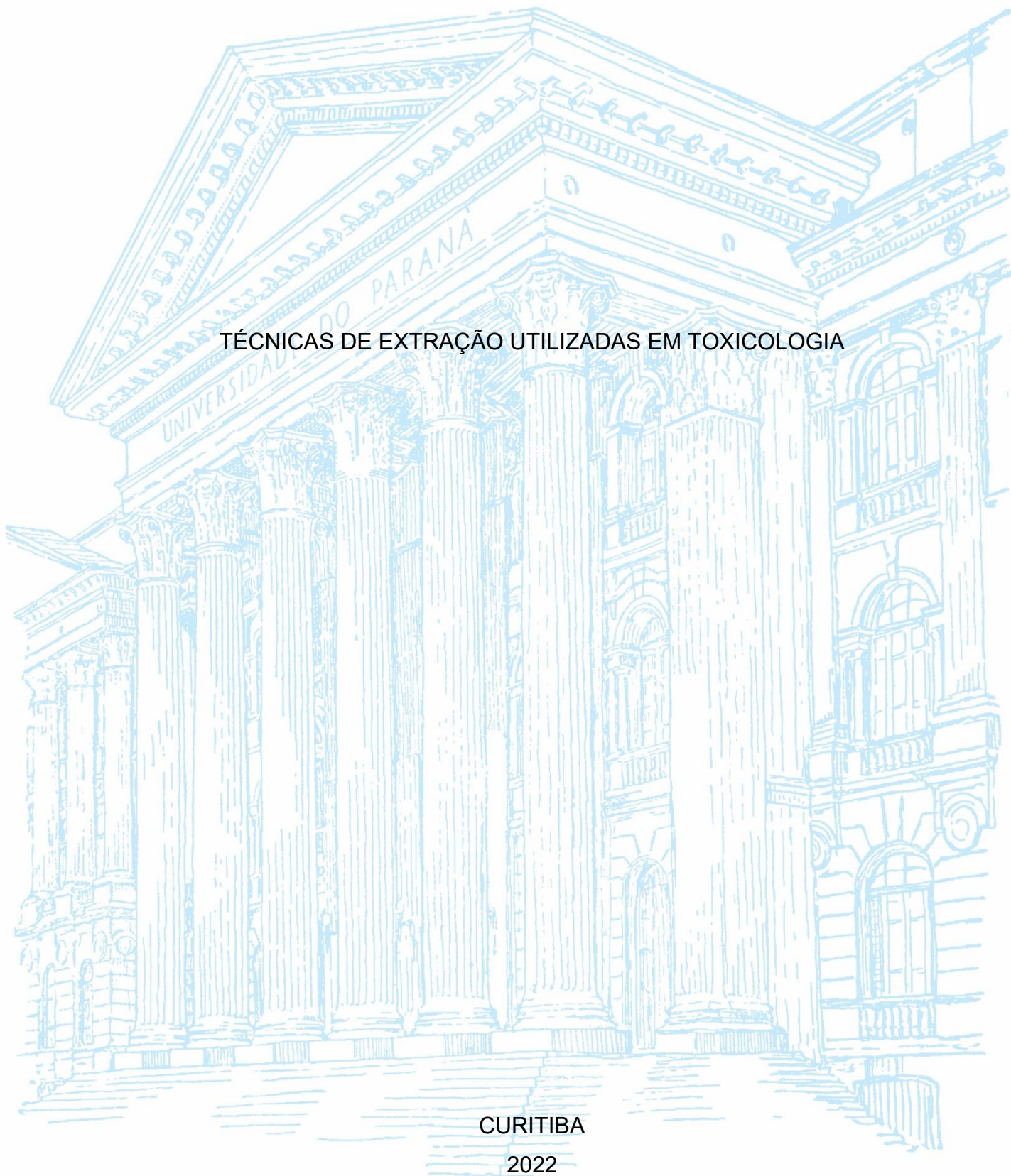
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MAIRA STOEBERL

TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO UTILIZADAS EM TOXICOLOGIA

CURITIBA

2022



MAIRA STOEBERL

TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO UTILIZADAS EM TOXICOLOGIA

Trabalho de conclusão de Curso apresentada ao curso de Graduação em Farmácia, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título Farmacêutico (a).

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Ricardo Wagner

CURITIBA

2022

Dedico à minha mãe, que não está mais presente nesse mundo, mas sempre estará presente no meu coração.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus, por ter me dado a vida, inteligência e persistência para chegar ao fim da graduação.

Agradeço imensamente a minha família, minhas irmãs Marina e Marcília e meu irmão Matheus por todo apoio em todos esses anos, meus avós Mariana e Nelsino que mesmo distantes, não deixaram de prestar apoio nesses anos de graduação.

A PRAE por todos os auxílios: financeiro e psicológico, fornecido em todo o período de minha graduação, que foram extremamente necessários para minha permanência na cidade e na universidade.

Ao meu namorado Diogo, por me ajudar a não desistir e por me mostrar uma nova maneira de levar a vida.

Aos meus sogros, Monica e Jeferson, por terem me acolhido como filha em sua casa na última etapa do curso, me ajudando em tudo o que eu precisasse. A eles não há palavras para expressar minha gratidão.

Ao LAC e a CEUC, que me proporcionaram moradia de qualidade com preço acessível e amizades que levarei pra vida toda.

A todos os meus colegas de curso que me acompanharam durante minha trajetória.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ricardo Wagner pela orientação e dedicação excepcional em todo o processo de escrita desse trabalho. Sou muito grata por toda sua paciência e dedicação.

RESUMO

A toxicologia é a ciência que estuda os efeitos nocivos de substâncias químicas no organismo humano. A toxicologia clínica, ajuda no diagnóstico precoce e no tratamento de doenças causadas pela exposição a essas substâncias químicas. Na investigação da toxicologia clínica, são utilizadas principalmente amostras biológicas, que podem ser coletadas em vida ou no post-mortem, eles são: urina, cabelo, sangue, suor, unhas, mecônio, saliva e humor vítreo. Nas análises toxicológicas, a amostra deve ser escolhida conforme disponibilidade e tipo de análise requerida, e para essa escolha, é imprescindível uma análise de literatura aprofundada. Depois da escolha da amostra, o próximo passo é a preparação, que deve ser baseada também no tipo de analito que se deseja detectar. Em seguida chega o momento da extração. A técnica de extração deve ser fundamentada principalmente no tipo de analito que se deseja detectar. As técnicas de extração podem ser separadas em dois principais grupos: extração em fase sólida e extração líquido-líquido, ambas contam com algumas variações como: micro extração líquido-líquido, micro extração em fase sólida, e suas variações: SBSE e QuEChERS. O presente trabalho faz uma breve análise de todos esses métodos de extração citados exemplificando sua metodologia, vantagens e desvantagens. É importante ressaltar que para a análise toxicológica ser o mais confiável possível, é imprescindível que o profissional toxicologista realize uma pesquisa atenta a literatura, investigando todas as coisas relacionadas a amostra, o melhor método a ser utilizado e todas as informações sobre o analito investigado.

Palavras-chave: Análises toxicológicas. Técnicas de extração. Toxicologia clínica.

ABSTRACT

Toxicology is the Science that studies the harmful effects of chemical substances in the human body. Clinical toxicology helps in the early diagnosis and treatment of diseases caused by exposure to these chemicals. In the investigation of clinical toxicology, biological samples are mainly used, which can be collected during life or in the post-mortem, they are: urine, blood, sweat, nails, meconium, spittle and vitreous humor. In the toxicology analyses, the sample must be chosen according to availability and type of analysis that will be required, and for this choice, is essential make an deepen research in the literature. After choosing the sample, the next step is the preparation which must also be based on the type of analyte to be detected. And then, its time for the extraction. The extraction techniques must be based in the type of analyte to be detected. The extraction can be separated into two main groups: solid phase extraction and liquid-liquid extraction, and both have some variations in the method such as: liquid-liquid micro extraction, solid phase micro extraction and their variations: SBSE and QuEChERS. The present work makes a brief analysis of all these extraction methods mentioned, exemplifying their methodology, advantages and disadvantages. It is important to emphasize that for the toxicological analysis to be reliable as possible, it is essential that the toxicologist performs a careful search of the literature, investigating all the things that relate to the sample, the best method to be used and everything about the analyte under study.

Keywords: Toxicology analysis. Extraction techniques. Clinical toxicology.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- Representação da extração em fase sólida	16
FIGURA 2- Representação dos formatos dos dispositivos de extração sólida	17
FIGURA 3 - Representação do dispositivo fibra de SPME	19
FIGURA 4 - Dispositivo SPME	20
FIGURA 5 - Barra SBSE	20
FIGURA 6 - Representação esquemática do funcionamento da extração.	21
FIGURA 7- Esquematização do método QuEChERS original.....	23

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

AES	- Espectrometria de Emissão Atômica
AV	- Voltametria anódica
BA μ E	- Micro Extração Adsorptiva em Barra
CG	- Cromatografia Gasosa
CLAE	- Cromatografia de Alta Eficiência
CWX	- Carbowax
EC	- Eletroforese Capilar
ELL	- Extração Líquido-Líquido
FAAS	- Espectrometria de Absorção Atômica com Chama
GC- MS/MS	- Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massa
GFAAS	- Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite
HPLC	- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HS-SBSE	- Extração Sortiva em Barra de Agitação
ICP-AES Induzido	- Espectrometria de Emissão Atômica Acoplada a Plasma Induzido
ICP-MS	- Espectrometria de Massas Acoplada a Plasma Induzido
LC- MS/MS	- Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massa
LD	- Dessorção líquida
PA	- Poliacrilato
PDMS	- Polidimetilsiloxano
PTFE	- Politetrafluoretileno
QuEChERS	- Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe
SBSE	- Extração Sortiva em Barra de Agitação
SPE	- Extração em Fase Sólida
SPME	- Micro Extração em Fase Sólida
TD	- Dessorção Térmica
XRF	- Fluorescência de Raios - X

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	OBJETIVOS	10
2.1	OBJETIVO GERAL	10
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	10
3	REVISÃO BIBLIOGRAFICA	11
3.1	TIPOS DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS	12
3.2	EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO	13
3.3	EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA.....	14
3.3.1	Metodologia da extração SPE	16
3.3.2	Fases extratoras na SPE.....	17
3.3.2.1	Fase normal	17
3.3.2.2	Fase reversa	17
3.3.2.3	Troca iônica.....	18
3.3.2.4	Fase extratora mista.....	18
3.4	MICRO EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA.....	18
3.4.1	Técnica SPME.....	19
3.5	EXTRAÇÃO SORTIVA EM BARRA DE AGITAÇÃO (SBSE)	20
3.5.1	Metodologia SBSE	21
3.5.2	Etapa de extração.	21
3.5.3	Etapa de retroextração ou dessorção.....	22
3.6	MÉTODO QUECHERS.....	22
3.7	TÉCNICAS DE PRÉ-TRATAMENTO DE AMOSTRAS	24
3.7.1	Precipitação de proteínas.....	24
3.7.2	Hidrólise de conjugados	26
3.7.3	Digestão da matéria orgânica.....	27
3.7.3.1	Mineralização por via úmida.....	27
3.7.3.2	Mineralização por via seca	29
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	30
	REFERÊNCIAS.....	31

1 INTRODUÇÃO

A toxicologia é o estudo dos eventos nocivos que as substâncias químicas podem ocasionar em organismos vivos. A toxicologia clínica se ocupa com os efeitos que são causados no organismo e como eles ocorrem, e para tanto, é necessário serem realizadas as análises toxicológicas (KLAASSEN; WATKINS, 2013).

Para que sejam realizadas as análises toxicológicas é necessário determinar qual a amostra biológica que será utilizada e a técnica utilizada para extração do analito da amostra. Com o avanço da tecnologia, apareceram novas técnicas de extração e de preparo de amostra visando a melhoria da extração do analito de diversos tipos diferentes de amostra. Os motivos para se preparar previamente a amostra são principalmente, promover a extração e a concentração do analito de interesse presente na amostra, e se possível, realizar a retirada de interferentes para que se tenha uma detecção clara e adequada (SALES; JARDIM, 2010).

A escolha de uma técnica apropriada é fundamental, pois ela possibilita que o resultado seja confiável e exato, o processo é importante para se obter uma amostra enriquecida e livre de nutrientes. Em síntese, esse procedimento tem o objetivo de extrair, isolar e concentrar o analito de interesse a ser analisado em matrizes complexas, além de auxiliar no aumento da seletividade e na melhora da detecção (BORDIN; MONEDDEIRO; CAMPOS, 2015).

As técnicas de extração que são mais utilizadas para que sejam feitas essas análises toxicológicas são, líquido-líquido, extração de fase sólida e suas variações como a micro extração em fase sólida, headspace, extração com fluido supercrítico e extração com membranas sólidas (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001). Tais técnicas de extração tem passado pelo processo de tecnicização para o uso no dia a dia, pois podem auxiliar no processo de automação para esse processo, contribuem para a diminuição de contato de substâncias de risco com o analista, e amplificam a quantidade de análises realizadas por um espaço de tempo (SALES & JARDIM, 2010).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Detalhar as principais técnicas de extração de analitos para posterior análise com fins toxicológicos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Fazer uma breve revisão sobre as amostras biológicas utilizadas em toxicologia;
- Fazer uma revisão bibliográfica sobre as principais técnicas de extração (extração líquido-líquido, extração em fase sólida, microextração em fase sólida e headspace);
- Revisar as técnicas de pré-tratamento de amostra como precipitação de proteínas, hidrólise de conjugados e destruição da matéria orgânica;
- Explorar as principais vantagens e desvantagens de cada método.

3 REVISÃO BIBLIOGRAFICA

Com o desenvolvimento do ser humano e a crescente utilização dos recursos naturais, o homem observou, ao longo do tempo, os efeitos favoráveis e desfavoráveis da alimentação a partir de plantas, insetos e animais. A partir dessas observações, o homem naturalmente passou a usar venenos para caça, ou contra seus inimigos em guerra (MARTINIS *et al.*, 2018).

Um dos registros mais antigos, o Papiro de Ebers, datado de cerca de 1500 a.C. engloba informações de alguns dos venenos mais conhecidos, como a cicuta, acônito, ópio e metais como chumbo, cobre e antimônio. O livro de Jó descreve sobre flechas envenenadas (Jó 6:4) e por fim, Hipócrates, (cerca de 400 a.C.) mostrou alguns princípios de toxicologia clínica relacionados a biodisponibilidade, sobredosagem e descreveu características sobre uma série de venenos (MOREAU, 2015).

Uma personalidade considerável no estudo da ciência, medicina e toxicologia foi o renascentista Philippus Aureolus Theophrastus Bombastus von Hohenheim (1493-1541), conhecido também como Paracelsus. Ele foi primordial para os estudos e desenvolvimento da ciência nos séculos XVII e XVIII. Através destes seus estudos, definiu princípios que permanecem até hoje na estrutura da toxicologia, medicina e farmacologia. Ele propôs o agente tóxico como uma essência química e determinou que: 1- experimentação é fundamental na análise da resposta química, 2- é necessário fazer a diferenciação entre as propriedades terapêuticas e tóxicas de um agente químico, 3- as vezes essas propriedades não são indistinguíveis a salvo pela dose, 4- pode-se verificar a especificidade de agentes químicos e seus efeitos terapêuticos ou tóxicos. (KLAASSEN; WATKINS III, 2012).

A pluralidade da toxicologia vem da capacidade de integrar quase todas as ciências básicas para provar suas possibilidades. Essa realidade tem promovido o estudo da toxicologia e pesquisas desde 1900, que vem tornando a toxicologia excepcional para a história da ciência (KLAASSEN; WATKINS III, 2012).

Na década de 60, com o grave acidente da talidomida, que provocou o nascimento de várias crianças com defeitos congênitos, surgiram incentivos da comunidade no geral para entender os efeitos de agentes químicos sobre embriões, feto e também sobre o meio ambiente. Assim, a toxicologia celular e molecular se

desenvolveu e a avaliação de riscos se tornou a importante finalidade das análises toxicológicas (GREIM; SNYDER, 2019).

Atualmente, o desenvolvimento de novas técnicas, metodologia mais rápidas, replicáveis e sensíveis tem se tornado essenciais, além de ter recebido grande interesse da comunidade científica, para que gradativamente mais essas análises possam ser utilizadas para evitar os possíveis danos das exposições humanas a agentes tóxicos (FIGUEIREDO; BORGES; QUEIROZ, 2015).

A toxicologia clínica utiliza os conceitos de química, farmacologia e medicina para realizar a pesquisa toxicológica e examinar as ações dos agentes tóxicos no nosso organismo. O conhecimento dessas ações nos possibilita diferenciar os indivíduos intoxicados, estabelecer protocolos de prevenção e possivelmente ajudar no tratamento desses indivíduos. E para essa pesquisa é necessária utilização de diversas metodologias para a identificação correta dos agentes tóxicos (DAMIAMI *et al.*, 2021).

O toxicologista tem como objetivo selecionar um procedimento analítico fundamentado e verdadeiro, que seja capaz de detectar o agente tóxico dentro da amostra biológica. Portanto, é primordial que haja uma preparação da amostra antes da análise, além da escolha correta de um procedimento de extração levando em conta o tipo de análise, a amostra e o agente tóxico que se procura. (MOREAU, 2015). Essa escolha também deve ser baseada em algumas propriedades físico-químicas de todos os constituintes da amostra, o que inclui o agente de interesse e os possíveis interferentes. Tais propriedades são: solubilidade, lipofilicidade, estabilidade química, polaridade, coeficiente de partição, entre outros (FIGUEIREDO; BORGES; QUEIROZ, 2015).

As técnicas mais utilizadas na extração dos analitos de interesse da amostra são extração líquido-líquido, microextração líquido-líquido, extração em fase sólida, microextração em fase sólida e headspace (DAMIAMI *et al.*, 2021).

3.1 TIPOS DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS

As amostras biológicas podem ser classificadas em *ante-mortem* e *post-mortem*. No caso das amostras *ante-mortem*, elas são utilizadas para fazer diagnóstico precoce de doenças causadas por intoxicação por substâncias químicas, e para análise de *doping*. Já no caso das amostras *post-mortem*, é realizada a análise

para interesse forense, onde são investigadas as causas da morte (CARVALHO; DUARTE; REMIÃO; MARQUES; SANTOS, 2010).

As amostras mais utilizadas em ante-mortem são: Urina, sangue, conteúdo gástrico, saliva, suor, cabelo, unhas e ar expirado. Já as utilizadas no post-mortem são: humor vítreo, tecidos, órgãos, líquido cefalorraquidiano e bÍlis.

Para que haja uma coleta com sucesso, são necessários cuidados para que não haja alteração na amostra. A escolha da amostra depende da disponibilidade e do analito a ser pesquisado, e o toxicologista deve avaliar qual a amostra que será escolhida e sua devida preparação (LISBOA, 2016).

3.2 EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO

A extração líquido-líquido (ELL) baseia-se na divisão ou partição entre dois líquidos ou duas fases que são imiscíveis entre si, nos quais o composto de interesse (agente tóxico) possui solubilidade distinta entre estas fases. Ao longo da técnica de extração, o composto de interesse pode preferir a fase aquosa ou o solvente orgânico, dependendo de sua polaridade (FIGUEIREDO; BORGES; QUEIROZ, 2015).

A extração líquido-líquido é atualmente uma das mais utilizadas em análises toxicológicas por apresentar diferentes vantagens como: versatilidade, considerável rapidez, fácil execução, repetitividade e baixo custo. Também pode ser utilizada para extração de praguicidas, produtos naturais, drogas ilícitas, poluentes, compostos naturais, fármacos, entre outros (MOREAU, 2015).

Um dos pontos mais importantes dessa extração é a escolha do solvente, que deve ser imiscível na água, ter alto grau de pureza, dissolver a amostra sem decompor os componentes, ter baixa viscosidade e baixo ponto de ebulição, apresentar miscibilidade completa em misturas, ter baixa toxicidade para o toxicologista e para o meio ambiente, e ter um alto espectro no processo extrator (MOREAU, 2015).

Apesar de ser uma extração fácil de ser realizada, ela também pode apresentar complicações, uma delas é a formação de emulsão. Durante a extração, se a emulsão for formada, ainda é possível salvar a prática recorrendo a uma dessas opções:

- Adicionando sal a fase aquosa;
- Filtração;
- Adição de mais uma pequena parte de solvente orgânico;
- Aquecimento ou resfriamento da amostra com o solvente extrator;

- Centrifugação.

A ELL ainda é muito empregada pela sua facilidade e seu baixo custo, mesmo empregando um volume grande de solventes, ela ainda é a extração de menor custo comparado com as técnicas mais atualizadas. Uma das razões pelas quais ela vem sendo substituída é a atualização para utilização de tecnologias que são mais benéficas ao meio ambiente, que diminuem o uso de grande volume de solventes e as técnicas que diminuem o risco ao analisador (MOREAU, 2015).

3.3 EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

A extração em fase sólida é a técnica de extração e/ou concentração mais utilizada da atualidade. Ela possibilita que analitos que estejam em concentrações muito baixas consigam ser identificados por metodologias de identificação como a cromatografia de alta eficiência (CLAE) cromatografia gasosa (CG) e eletroforese capilar (EC). Também possibilita a análise de matrizes complexas como alimentos, água, solo, ou fluidos biológicos, como sangue e seus derivados, urina ou amostras de tecidos (hepático, renal, cerebral, disponíveis em análises toxicológicas *post-mortem*) (MOREAU, 2015).

A extração em fase sólida (SPE) foi desenvolvida no ano de 1976 com o intuito de complementar os malefícios da extração líquido-líquido (ELL), atualmente, é um dos métodos de extração mais utilizados. Os maiores benefícios dessa extração sobre a ELL são: menor uso de solventes que podem ser muitas vezes poluentes para o meio ambiente, facilidade de automação, não formação de emulsões, alta proporção de recuperação do analito desejado, além da disponibilidade de equipamentos próprios e solventes. Já, as grandes desvantagens em comparação a extração líquido-líquido são: elevada duração da análise, altos custos de cartuchos necessários para a extração e ocasionalmente, a dificuldade em encontrar um solvente apropriado para a prática desejada, os cartuchos só podem ser utilizados uma vez, e há baixa reprodutibilidade de cartucho para cartucho (SALES; JARDIM, 2010).

Os mecanismos que envolvem essa extração são: adsorção, partição (fase normal e reversa), troca iônica e exclusão. Tais mecanismos estão relacionados aos processos químicos e físicos que envolvem essa extração. Entre as principais forças químicas que operam entre analito e solvente estão as interações de Van der Waals

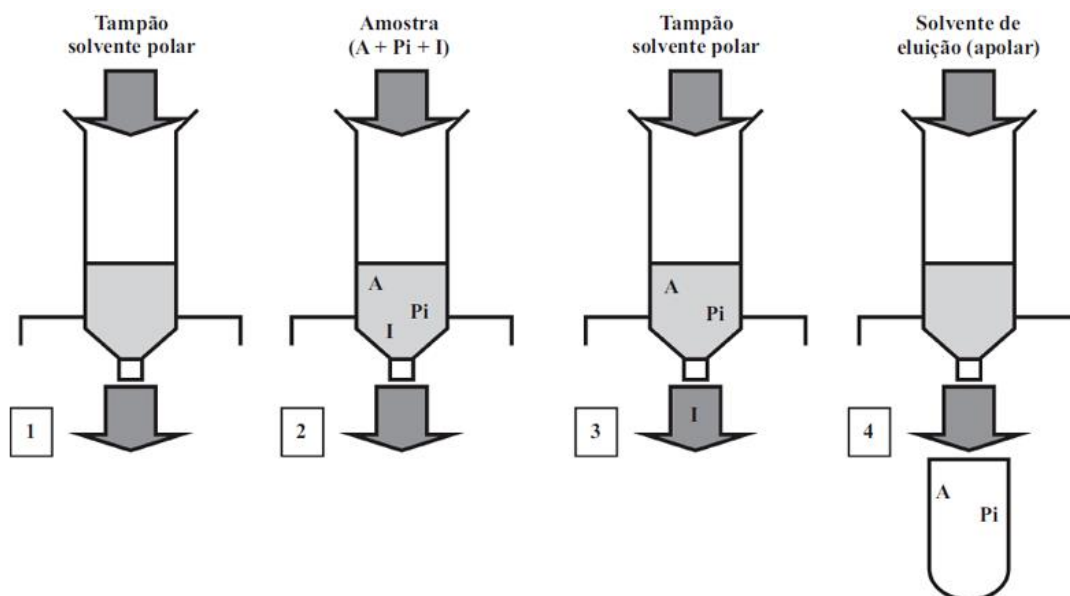
em fase reversa, em fase normal, interações π - π , dipolo-dipolo, dipolo- dipolo induzido e dipolo induzido- dipolo induzido.

A SPE ajuda na realização concomitante dos processos de *clean-up* (purificação), pré-concentração ou enriquecimento do analito, pois proporciona acesso de longa capacidade de amostra por meio da fase extratora que irá agarrar moderadamente os analitos de importância, tornando viável o acesso dos interferentes da matriz, que serão retirados. Após esse processo, os analitos que foram retidos, poderão ser eluidos utilizando uma baixa quantidade de solvente (MOREAU, 2015).

O processo de extração por SPE pode ser resumido em quatro etapas, independentemente qual seja a fase extratora:

- Condicionamento ou ativação da fase extratora, passando o solvente orgânico polar, depois água ou a solução tampão, permitindo que os extratores responsáveis pelas ligações com os analitos estejam disponíveis;
- Aplicação da amostra, passando pela fase sólida numa velocidade apropriada, proporcionando o contato entre os analitos e a fase extratora. A aplicação de um padrão interno na amostra, deve ser feita anteriormente a essa etapa;
- Limpeza da coluna com solventes para remoção de possíveis interferentes, utilizando água, solução tampão, ácidos ou bases diluídas ou até mesmo um solvente orgânico polar;
- Eluição e coleta dos analitos: requer pouca quantidade de solventes orgânicos para deslocar as substâncias, que ainda estão retidas na fase extratora. O solvente utilizado nessa etapa, depende das condições do analito e da fase extratora.

FIGURA 1- Representação da extração em fase sólida



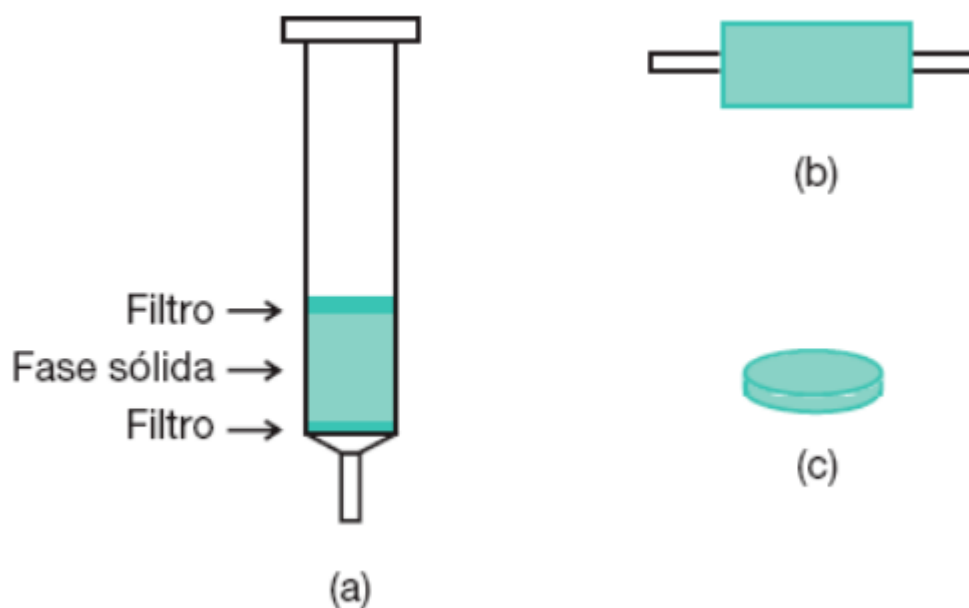
FONTE: Moreau (2015)

Legenda: A: analito, Pi: padrão interno, I: interferentes na matriz

3.3.1 Metodologia da extração SPE

Em praticamente todas as aplicações, os equipamentos de SPE empregados são os cartuchos em formato de seringa ou de barril por conta da sua alta disponibilidade no comércio e baixo custo. Um cartucho em formato de seringa é feito de polipropileno ou vidro, com capacidade de 1mL a 6mL contendo cerca de 50 a 500 mg de fase sólida e 40 a 60 μ m de tamanho da partícula que está fixa no tubo por dois filtros de polietileno, ou de Politetrafluoretileno (PTFE) conhecido também como teflon, com tamanho dos poros de 20 μ m (FIGUEIREDO; BORGES; QUEIROZ, 2015).

FIGURA 2- Representação dos formatos dos dispositivos de extração sólida



FONTE: Figueiredo; Borges; Queiroz (2015).

Legenda: (A) cartucho em forma de seringa; (B) Cartucho em forma de barril; (C) Disco.

3.3.2 Fases extratoras na SPE

A SPE pode ser apresentada de acordo com a característica da fase extratora e com o tipo de interação contida entre o analito e a fase. (FIGUEIREDO; BORGES; QUEIROZ, 2015).

3.3.2.1 Fase normal

Utilizada na extração de compostos polares contidos nas matrizes orgânicas (apolares). Essa fase pode ser de Florisil® (silicato de magnésio), sílica gel ou alumina. A interação nesse tipo de SPE é a formação de ligações de hidrogênio entre a fase extratora e o analito. A eluição é realizada empregando soluções tampão com alta força iônica (FIGUEIREDO; BORGES; QUEIROZ, 2015).

3.3.2.2 Fase reversa

É fundamentada na interação dos analitos orgânicos que estão contidos em um meio aquoso (urina ou sangue) e uma fase extratora apolar. A relação entre o analito apolar (não ionizado) e a fase sólida acontece por meio de ligações de Van der Waals,

e na eluição dos analitos retidos são utilizados solventes orgânicos apolares. As fases extratoras são preparadas a partir de monômeros N-vinilpirrolidona e divinilbenzeno. A fase reversa possibilita que o rendimento final seja melhor e o extrato seja mais limpo, quando comparado com a SPE de fase reversa que utiliza das fases C8 ou C18 (FIGUEIREDO; BORGES; QUEIROZ, 2015).

3.3.2.3 Troca iônica

Fundamentada na troca dipolar de íons com cargas opostas que estão contidos na fase sólida e na amostra. Emprega polímero ou sílica quimicamente ligada a radicais que possuam os grupamentos funcionais: sulfonila, carboxílico ou trimetilamino, para sua fase extratora. A eluição ocorre pela mudança de pH dos solventes que possuam baixas quantidades de ácido ou base (FIGUEIREDO; BORGES; QUEIROZ, 2015).

3.3.2.4 Fase extratora mista

Essa fase extratora pode conter dois ou mais tipos de instrumentos misturados, uma fase de troca iônica e outra, de fase extratora apolar. Aumentando o número de interações entre o analito e a fase estacionária, pode fazer com que os interferentes possam ser retirados com apenas uma coluna extratora (MOREAU, 2015).

3.4 MICRO EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

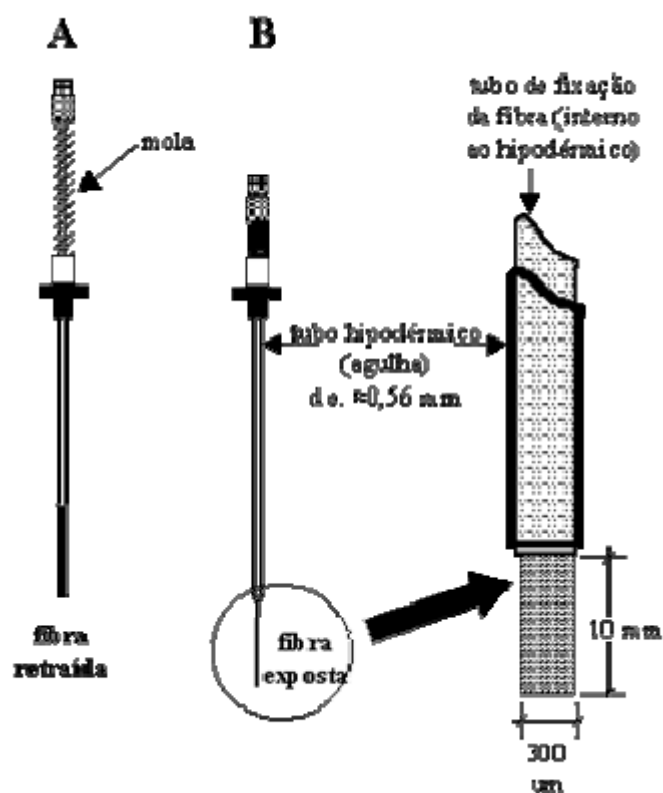
A micro extração em fase sólida (SPME) é a técnica de extração em fase sólida miniaturizada, foi inserida primeiramente por Arthur e Pawlizyn em 1990. O mecanismo básico da SPME é composto de um bastão de fibra ótica de sílica fundida de 100mm de diâmetro com 10 mm de uma extremidade recoberto com um filme fino de um polímero (e.g., polidimetilsiloxano = PDMS, poliacrilato = PA ou Carbowax = Cwx) ou de um sólido adsorvente (VALENTE; AUGUSTO, 2000).

O sistema de extração constitui-se de três fases: aquosa (amostra homogênea), polimérica (fase SPME) e gasosa (headspace). No decorrer da extração, os solutos se deslocam pelas três fases até que seja alcançada o equilíbrio de partição (FIGUEIREDO; BORGES; QUEIROZ, 2015).

3.4.1 Técnica SPME

A técnica se inicia colocando-se a amostra em um frasco com tampa de rosca e septo. O primeiro passo é a perfuração do septo do frasco. Depois, o êmbolo do dispositivo de SPME é movimentado e a fibra SPME é revelada na amostra ou o headspace do frasco. Em seguida, quando o equilíbrio de partição entre o soluto e as fases é atingido, a extração termina, então a fibra é retraída mais uma vez para dentro da agulha do dispositivo SPME (FIGUEIREDO; BORGES; QUEIROZ, 2015).

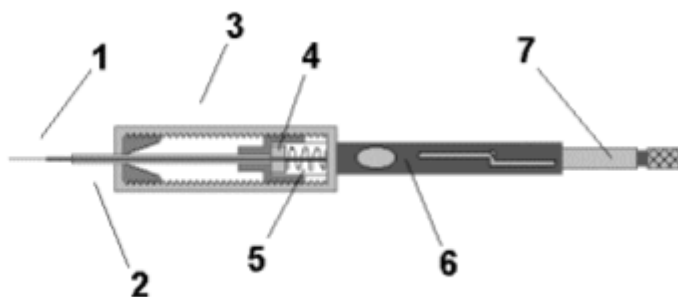
FIGURA 3 - Representação do dispositivo fibra de SPME



FONTE: Valente; Augusto (2000).

Legenda: (a) posição da fibra retraída; (b) posição com fibra exposta.

Figura 4 - Dispositivo SPME



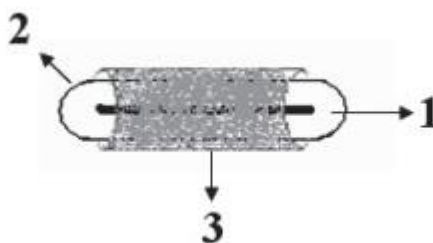
FONTE: Valente; Augusto (2000).

Legenda: 1: Fibra extratora; 2: Agulha de aço; 3: Corpo do aplicador; 4: Septo de silicone; 5: Guia do aplicador; 6: Guia do Êmbolo; 7: Êmbolo.

3.5 EXTRAÇÃO SORTIVA EM BARRA DE AGITAÇÃO (SBSE)

A extração sortiva em barra de agitação (SBSE) foi inserida inicialmente por BATUSSEN *et al.* em 1999. Fundamenta-se no equilíbrio de partição do soluto nas diferentes fases que estão contidas no sistema analítico. Na metodologia da SBSE utiliza-se uma barra de agitação magnética. A pequena barra possui de 10 a 20 mm de comprimento e é formada por um pequeno tubo magnético coberto com vidro, e revestido de 25 a 125 μL de polidimetilsiloxano (PDMS) (FIGUEIREDO; BORGES; QUEIROZ, 2015).

Figura 5 - Barra SBSE



FONTE: Queiroz (2015).

Legenda: 1:Tubo magnético; 2: Revestimento de vidro; 3: Fase PDMS.

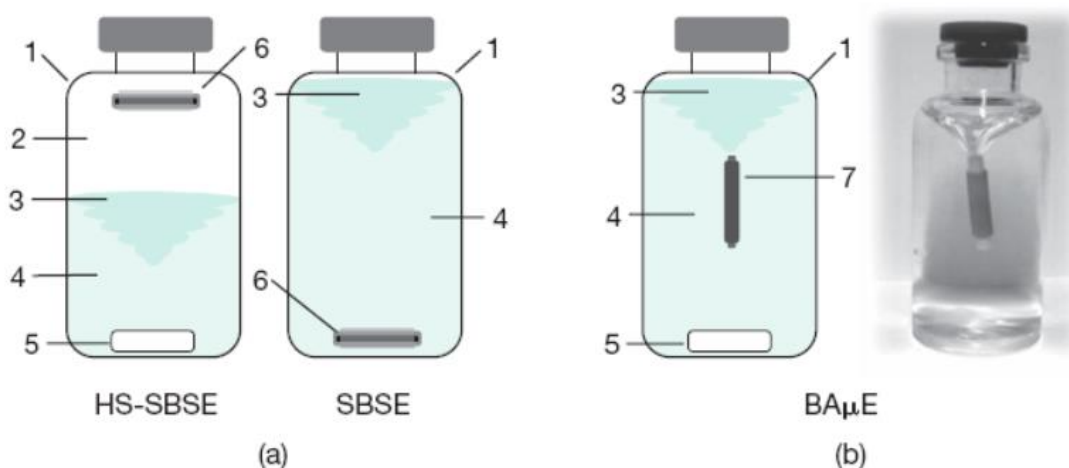
O revestimento de PDMS funciona como fase extratora e a razão pra essa escolha são suas características como: boa estabilidade térmica e difusão. Além de que, se acaso o polímero se fragmentar durante o processo de extração, ele pode ser

facilmente identificado depois pelo uso de detector de massas, pois a massa do silicone é característica (FIGUEIREDO; BORGES; QUEIROZ, 2015).

3.5.1 Metodologia SBSE

A metodologia SBSE tem duas etapas essenciais: a extração ou enriquecimento dos analitos da amostra para o revestimento de PDMS, acompanhada de retroextração ou dessorção dos solutos da primeira fase para o sistema cromatográfico. Enquanto ocorre a extração as barras de agitação podem ser empregadas em meio ao soluto utilizando o modo de amostragem por headspace ou imersão, onde o modo de amostragem por headspace é mais indicado para compostos voláteis (AULAKH, J. S. *et al*, 2005).

Figura 6 - Representação esquemática do funcionamento da extração.



FONTE: Figueiredo; Borges; Queiroz (2015).

LEGENDA: (a) extração por HS e imersão SBSE; (b) extração por flutuação em BAμE; 1: frasco de amostragem, 2: HS, 3: Vórtex, 4: amostra, 5: Barra de agitação magnética em Teflon, 6: Dispositivo de SBSE, 7 Dispositivo de BAμE.

3.5.2 Etapa de extração.

Na HS-SBSE (amostragem por headspace) a extração é realizada sustentando a barra de agitação no topo do frasco, onde o polímero fica e contato com a fase de vapor da amostra sólida ou líquida. Nesse tipo de abordagem há a vantagem de diminuir o contato do polímero com possíveis interferentes contidos na amostra,

prolongado o tempo de vida útil da barra de agitação. O processo de extração, normalmente é realizado com atenção e sob rigorosas condições de equilíbrio, para aumentar a eficiência de todo o processo. Os fatores que mais influenciam o processo são: tempo de equilíbrio, velocidade de agitação, pH, polaridade e força iônica da matriz, volume de amostra, fator de diluição, sendo então estes, levados à risca para se obter o melhor processo de extração possível (NOGUEIRA, 2012).

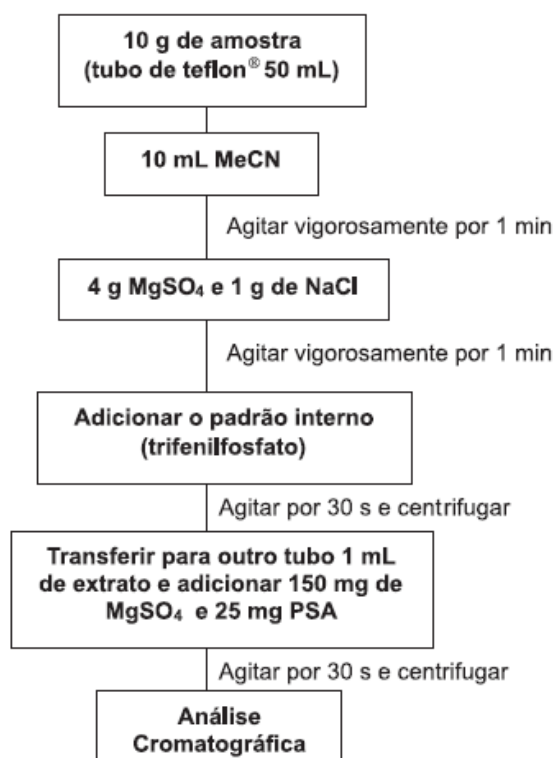
3.5.3 Etapa de retroextração ou dessorção

Logo após a etapa de extração, a barra é retirada do frasco da amostra e lavada com água destilada para retirar possíveis interferentes do polímero como sais, açúcares, proteínas ou outros constituintes não desejáveis da amostra, secas e levadas para a etapa de dessorção por TD (dessorção térmica) ou LD (dessorção líquida). A TD é utilizada para compostos voláteis e semivoláteis, enquanto a LD é indicada para solutos termoestáveis, podendo ser eles semivoláteis a não voláteis. A TD exige que seja acoplada a sistema de GC (cromatografia de gás) enquanto a LD pode ser utilizada com GC, HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência), ou até mesmo EC (eletroforese capilar) (FIGUEIREDO; BORGES; QUEIROZ, 2015).

3.6 MÉTODO QUECHERS

O método QuEChERS (*quick, easy, cheap, effective, rugged, safe*) foi desenvolvido em 2003 por Anastassiades *et al.*, com o objetivo de superar limitações práticas dos métodos multirresíduo de extração disponíveis na época, baseada em três pontos principais: (1) extração com acetonitrila; (2) partição causada pela adição de sais, como por exemplo: sulfato de magnésio ($MgSO_4$) e cloreto de sódio (NaCl) e por fim, (3) limpeza do extrato utilizando a técnica chamada de Extração em Fase Sólida Dispersiva (*dispersive solid phase extraction, d-SPE*) (AMARAL, 2018).

Figura 7- Esquematização do método QuEChERS original.



FONTE: Figueiredo; Borges; Queiroz (2015).

Ao empregar acetonitrila como um solvente, torna possível a extração de uma quantidade menor de interferentes da amostra como cera gordura e pigmentos. Além disso, o uso da acetonitrila possibilita a extração de uma grande faixa de analitos com variadas polaridades e no momento em que é acidificada possibilita recuperações convenientes de alguns analitos que normalmente, apresentam problemas com sua estabilidade. Mais uma vantagem da utilização da acetonitrila é de que ela é mais pertinente para o uso em LC-MS/MS do que acetato de etila e acetona e pode também ser analisada por GC-MS/MS (FIGUEIREDO; BORGES; QUEIROZ, 2015).

A etapa de partição com a adição de sais (NaCl e MgSO₄) possibilita o efeito *salting-out*. Esse efeito proporciona melhores recuperações dependendo do solvente a ser utilizado quando utilizado analitos polares, já a adição de sal diminuía a solubilidade desde compostos na fase aquosa, assim como a quantidade de água na fase orgânica e vice e versa. Com a adição de acetonitrila a junção de sal é conveniente, pois torna a extração rápida, fácil, de baixo custo, não dilui o extrato da amostra e possibilita a separação correta das fases orgânica e aquosa (PERESTRELO; SILVA; PORTO-FIGUEIRA; *et al.*, 2019).

Em resumo, as principais vantagens da metodologia QuEChERS em relação aos outros métodos de extração são: alto percentual de recuperação, podem ser usados para um grande número de compostos de diferentes polaridades e volatilidade, método exato e preciso, permite o preparo de grande número de amostras a serem analisadas em um curto período de tempo, utiliza um volume baixo de solventes, além de não utilizar solventes clorados, não exige a utilização de muitos equipamentos e materiais (PRESTES *et al.*, 2019).

3.7 TÉCNICAS DE PRÉ-TRATAMENTO DE AMOSTRAS

O preparo de amostra é etapa primordial quando se trata de análise toxicológica, e consome grande parte do tempo de análise. A eficiência nessa etapa pode determinar o sucesso da análise, e afeta diretamente a veracidade dos resultados finais (MOREAU, 2015).

3.7.1 Precipitação de proteínas

A técnica para a remoção de proteínas é utilizada em amostras que são ricas nesse componente como: tecidos e plasma, essa técnica é utilizada não somente para eliminar esses compostos que podem afetar a análise da amostra, mas também para liberar as substâncias químicas que estão ligadas às proteínas. Essa técnica de preparo foi uma das primeiras a serem utilizadas para liberar possíveis analitos ligados, e estes ficam na forma livre no sobrenadante (KATAOKA; LORD, 2002).

Essa técnica consiste em desnaturar as proteínas, desfazendo a sua habilidade de se ligar ao analito. Vários solventes, sais e ácidos podem ser utilizados para precipitar essas proteínas que estão contidas na amostra. Porém, mesmo esta sendo uma técnica relativamente fácil e rápida de ser aplicada, pode não apresentar o rendimento necessário para a limpeza da amostra biológica e precisar de coluna-guarda ou então uma segunda extração para conservar a coluna cromatográfica, e conseqüentemente, essa segunda extração pode acarretar na diminuição da recuperação dos analitos (POLSON, 2003).

Além desse principal problema, outros podem se destacar como: precipitação imperfeita das proteínas (e algumas globulinas podem continuar no sobrenadante e

passarem para o processo de detecção); diluição da amostra; formação de picos no CLAE ou interferência na leitura espectrofotométrica por causa do precipitante usado (MOREAU, 2015).

Os solventes orgânicos mais utilizados para essa técnica são: metanol, etanol, acetonitrila, acetona, entre outros, pois eles apresentam vantagens de proporcionar a precipitação das proteínas minimizando os danos de decomposição indesejada.

Os compostos inorgânicos mais usados na precipitação de proteínas são os ácidos tricloracético, perclórico, sulfossalicílico, túngstico, além do hidróxido de zinco, em diferentes concentrações, conforme a matriz e o analito a ser definido.

Flanagan et al. (2006) também fez algumas observações sobre essa técnica:

- No caso de utilização de ácidos fortes, os analitos necessitarão ser estáveis em pH baixos
- Para se certificar de que a remoção de proteínas está sendo completa, geralmente é indispensável adicionar nova quantidade do agente precipitante ao sobrenadante adquirido inicialmente
- A filtração do sobrenadante é usada geralmente para impedir a infiltração de partículas no procedimento CLAE; porém, é imprescindível analisar a perda dos analitos no filtro e a provável contaminação do sobrenadante
- No caso de o sobrenadante for utilizado direto para quantificação dos analitos, a junção de agentes precipitantes aquosos resultará na diluição da amostra seguinte de perda de sensibilidade. Porém, ao utilizar um solvente orgânico volátil, essa perda de sensibilidade não ocorre, podendo o mesmo ser evaporado até redução de volume.
- Sobre os precipitantes que são aquosos, os que aplicam a mistura água:solvente são descomplicados de serem concentrados, utilizando o efeito azeotrópico.

- Quando utilizado solvente orgânico como um agente precipitante, para melhorar a separação da camada orgânica e facilitar a remoção, podem ser adicionados alguns sais, como carbonato de potássio

3.7.2 Hidrólise de conjugados

Grande parte dos compostos orgânicos sofre reações de biotransformação de fase II, como por exemplo a sulfatação de grupamentos hidroxila e amino e a glicuronidação de grupamentos hidroxila, carboxila, sulfidril e amino. Desse modo a hidrólise desses metabólitos pode ser empregada primeiramente no momento de preparo de amostras, tendo o intuito de quebrar as ligações entre a molécula e o cofator endógeno, liberando a substância não conjugada.

Esse processo de hidrólise é classificado em dois tipos principais:

- Hidrólise enzimática ou específica: empregando enzimas como as β -glicuronidases e as aril-sulfatases;
- Hidrólise não específica: hidrólise ácida ou alcalina.

A hidrólise ácida ou alcalina tem a vantagem de ser de baixo custo e de requerer um tempo menor, porém pode afetar a integridade de alguns compostos, já que utiliza de condições extremas de pH e de temperatura, além de possivelmente serem formados produtos que podem interferir na extração e derivatização, ou até mesmo no perfil cromatográfico dos analitos.

A hidrólise enzimática é mais lenta, e menos seletiva, além de não degradar os analitos. Porém, a atividade da enzima pode ser afetada pelos componentes da matriz, e a mesma deve ser analisada periodicamente, através do estudo de sua eficiência na hidrólise (MOREAU, 2015).

A eficiência do processo depende de muitos fatores como: configuração da enzima, fonte da enzima e do substrato, diferentes condições de incubação (pH, tempo e temperatura), quantidade de enzima em cada situação. Para obter-se resultados altamente confiáveis, é essencial o controle e a faixa ideal de pH e temperatura em todos os processos.

Mesmo a hidrólise enzimática sendo um processo demorado, estudos mostram que ela pode ser acelerada com o uso de ultrassom e microondas, que mostram

rendimento satisfatório, possui reprodutibilidade e pode ser usado em análises rotineiras de amostras de urina (GALESIO *et al.*, 2011).

3.7.3 Digestão da matéria orgânica

Para analisar a existência de metais pesados em diversos materiais podem ser usadas diversas técnicas: gravimetria, espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) ou forno de grafite (GFAAS), espectrometria de emissão atômica (AES), fluorescência de raios X (XRF), espectrometria de massas acoplada a plasma induzido (ICP-MS), voltametria anódica (AV), espectrometria de emissão atômica acoplada a plasma induzido (ICP-AES) (MOREAU, 2015).

O tratamento da matriz para realizar alguma dessas técnicas depende da sua dificuldade, mas com alguns propósitos definidos:

- Deteriorar e dissolver os metais presentes na matriz para que possam ser analisados;
- Realizar a extração desses metais da matriz para um solvente adequado;
- Diferenciar analitos que possam interferir na análise;
- Fazer com que os metais presentes na amostra estejam mais concentrados para melhorar a veracidade da análise.

No geral, nas análises de metais, se faz necessário fazer um ou mais tratamentos na amostra para que todos os compostos sejam solubilizados, e esse processo pode ser chamado de digestão, mineralização ou degradação da matéria orgânica (TAVARES, 2010).

Esse tratamento da amostra tem o objetivo de dissolver total ou parcialmente a matéria orgânica, para que o metal seja separado da matriz e possa ser analisado. A matriz estando em forma solúvel a torna adequada para a técnica final utilizada para identificação e quantificação.

A digestão da matéria orgânica pode ser realizada por duas vias principais: via úmida e via seca. Ambas destroem completamente a amostra e são usadas no dia a dia no tratamento de amostras para análise de metais (PARMIGIANI, 1993).

3.7.3.1 Mineralização por via úmida

A mineralização por via úmida acontece envolvendo um ácido forte e outros compostos que possam ajudar na transformação da matéria orgânica.

O que acontece primeiro com a matriz é a quebra da sua estrutura, que é simplificada pela hidrólise ácida, seguida pelo processo de oxidação. Nesse processo realizado por via úmida, podem ser utilizados três tipos de agentes isolados ou em conjunto: solubilizantes, oxidantes e neutralizantes (MOREAU, 2015).

Os reagentes devem ser escolhidos de acordo com seu grau de pureza, além de alguns outros cuidados:

- Evitar a contaminação usando dispensadores, para que não entrem em contato direto com os reagentes;
- O produto do reagente escolhido não deve interagir com os analitos que irão ser analisados;
- O ácido utilizado não deve reagir com o recipiente que será usado na mineralização, importante escolher com cautela qual recipiente será utilizado para que não haja perda da amostra e nem dos reagentes.

Os agentes oxidantes mais utilizados são:

- Ácido nítrico, ácido perclórico, permanganato de potássio e peróxido de hidrogênio.

Já os agentes solubilizantes e neutralizantes mais utilizados são: ácido clorídrico, ácido sulfúrico e amônia (MOREAU, 2015).

Na mineralização por via úmida é comum utilizar uma mistura de ácidos e adjuvantes para uma melhor digestão da amostra, assim, as misturas mais utilizadas são:

- Ácido nítrico/peróxido de hidrogênio: os dois são oxidantes;
- Ácido nítrico/ácido sulfúrico: o ácido nítrico age como agente oxidante e o ácido sulfúrico tem como efeito ser desidratante, além de agir como solubilizante;
- Permanganato de potássio/ácido nítrico/ácido sulfúrico: o permanganato de potássio é usado exclusivamente nas análises de mercúrio;
- Ácido nítrico/ácido sulfúrico/ácido perclórico: utilizada para amostras que contenham grande porcentagem de gordura.

Além dessas misturas, existem outras que podem ser utilizadas, sempre observando o tipo de amostra e o elemento que se deseja analisar (MOREAU, 2015).

3.7.3.2 Mineralização por via seca

De acordo com Moreau (2015), numa mineralização por via seca, é necessário o emprego de altas temperaturas e oxigênio do ar atmosférico como agente oxidante para auxiliar na destruição da matéria orgânica.

Ainda de acordo com a autora, a técnica consiste em secar a amostra em uma fonte de calor alta, até sua carbonização. Em seguida o material é transferido para um recipiente próprio para a mufla que atinge temperatura de 400° a 550°C. A temperatura em média é de 400° a 550° C, mas existem algumas observações: na determinação de chumbo, o controle de temperatura deve ser crítico e não ultrapassar os 550°C, já na análise do mercúrio, deve ser utilizada outra via, pois seus compostos são voláteis a temperaturas menores do que 400°C.

A autora ainda reforça que o controle crítico de diversos fatores minimiza os erros durante o processo, como por exemplo: escolha do recipiente em que a amostra vai ser mineralizada onde podem ser produzidos compostos que interferem no analito, o ar também deve ter livre acesso à amostra, portanto o recipiente não deve ser inteiramente fechado. Em todo processo de análise por via seca ou via úmida, deve-se considerar principalmente a natureza da matriz, o metal a ser analisado e a técnica de identificação a ser utilizada.

Mesmo não existindo uma regra geral, todos os fatores que relacionam o metal a ser analisado, o recipiente, a técnica de identificação, o uso do solvente e uma melhor abrangência de todos os temas, possibilita uma análise mais verídica e com resultado mais confiável o possível.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando as breves pesquisas realizadas de todos os principais procedimentos utilizados para: pré-tratamento de amostra, técnicas de extração e análise das amostras utilizadas em toxicologia, foi possível observar que há diferentes métodos para cada procedimento. Essa abrangência de técnicas, possibilita que o analisador possa decidir qual a mais conveniente para ser realizada no momento da sua análise toxicológica, sempre levando em consideração todas as características físico-químicas tanto da amostra, quanto as características de funcionamento, disponibilidade e abrangência da técnica.

É inegável que todas as análises realizadas por qualquer toxicologista em qualquer laboratório, tenha uma profunda pesquisa sobre a amostra, custo da técnica, analito, matriz, riscos ao analisador entre outros, pois em todas as técnicas existem pontos positivos e negativos. Essa pesquisa permite que a análise seja a mais verídica e confiável possível, evitando resultados falsos negativos.

Sendo assim, é imprescindível que o toxicologista, ao receber a amostra a ser analisada, realize a pesquisa completa passando por todos os pontos principais a serem considerados no momento da análise: custo da técnica, disponibilidade dos materiais, quantidade e tipo de amostra, metodologia da técnica, uso de solventes e equipamentos utilizados. Quanto mais bem executada a prática, mais confiável o resultado se torna, demonstrando um laudo final mais eficaz e completo, que pode ter extrema relevância pra saúde pública e sociedade no geral.

REFERÊNCIAS

- AMARAL, B. do. **Avaliação do método QuEChERS para extração de contaminantes de preocupação emergente em diferentes matrizes ambientais.** 2018. P. 173. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2018. Disponível em: <https://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/55821/R%20-%20T%20-%20BIANCA%20DO%20AMARAL.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em 5 jul. 2022.
- ANASTASSIADES, M. *et al.* Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. **Journal of AOAC INTERNATIONAL**. v. 86, n. 2, p. 412-431, 2003. Disponível em: <https://academic.oup.com/jaoac/article/86/2/412/5656996?login=false>. Acesso em: 5 ago. 2022.
- AULAKH, J. S. *et al.* A Review on Solid Phase Micro Extraction-High Performance Liquid Chromatography (SPME-HPLC) Analysis of Pesticides. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, Londres, v. 35, n. 1, p. 71–85, 2005. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408340590947952>. Acesso em: 29 jul. 2022.
- BALTUSSEN, H. A. *et al.* Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE), a Novel Extraction Technique for Aqueous Samples: Theory and Principles. **Journal of Microcolumn Separations**. v. 11, n. 10, p. 737-747, set. 1999. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/%28SICI%291520-667X%281999%2911%3A10%3C737%3A%3AAID-MCS7%3E3.0.CO%3B2-4>. Acesso em: 29 jul. 2022.
- BORDIN, D. C. M.; MONEDEIRO, F. F. da S. S.; CAMPOS, E. G. de; *et al.* Técnicas de preparo de amostras biológicas com interesse forense. **Scientia Chromatographica**, v. 7, n. 2, p. 125–143, 2015. Disponível em: <http://www.iicweb.org/scientiachromatographica.com/files/v7n2a04.pdf>. Acesso em: 20 jul. 2022.
- CARVALHO, F.; DUARTE, J. A.; REMIÃO, F.; MARQUES, A.; SANTOS, A. **Collection of biological samples in forensic toxicology.** Toxicology Mechanisms and Methods. Universidade do Porto. 2010.
- DAMIANI, R. M.; RUARO, T. C.; TONIAZZO, A. P. *et al.* **Toxicologia.** Porto Alegre: SAGAH EDUCAÇÃO S.A., 2021. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9786556901954/>. Acesso em: 8 jul. 2022.
- FIGUEIREDO, E. C. D.; BORGES, K. B.; QUEIROZ, M. E. C. **Preparo de Amostras para Análise de Compostos Orgânicos.** 1 Edição. Rio de Janeiro: LTC, 2015. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/978-85-216-2870-5/>. Acesso em: 8 jul. 2022.

FLANAGAN, R. J. et al. Microextraction techniques in analytical toxicology: short review. **Biomedical Chromatography**, v. 20, p. 530-538, 2006. Disponível em: <https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bmc.671>. Acesso em: 10 jun. 2022.

GALESIO, M. *et al.* Accelerated sample treatment for screening of banned doping substances by GC-MS: ultrasonication versus microwave energy. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. [S.l.], v. 399, p. 861-875, 2011. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00216-010-4319-y>. Acesso em: 8 jul. 2022.

GREIM, H.; SNYDER, R. **Toxicology and Risk Assessment: A Comprehensive Introduction**. 2nd EDITION. John Wiley & Sons Ltd, 2019.

JARDIM, I. C. S. F. Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas. **Scientia Chromatographica**. Vol.2, N°1, p. 13-25, 2010. Disponível em: <https://www.iicweb.org/scientiachromatographica.com/files/v2n1a2.pdf>. Acesso em 6 ago. 2022.

KATAOKA. H.; LORD, H. L. Sampling and sample preparation for clinical and pharmaceutical analysis. **Comprehensive Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 37, p779-836, 2002. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0166526X02800605?via%3DiDih>. Acesso em 8 jul. 2022.

KLAASSEN, C. D.; WATKINS III., J. B. **Fundamentos em Toxicologia de Casarett e Doull (Lange)**. 2° EDIÇÃO. Porto Alegre: AMGH, 2012. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/reader/books/9788580551327/pageid/1>. Acesso em 5 jul. 2022.

LISBOA, M. P. Matrizes biológicas de interesse forense. Coimbra, 2016. 45 p. **Monografia** (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade de Coimbra. Disponível em: https://eg.uc.pt/bitstream/10316/48554/1/M_Marcia%20Lisboa.pdf. Acesso em 17 ago. 2022.

MARTINIS, B. S. D.; DORTA, D. J.; COSTA, J. L. **Toxicologia forense**. São Paulo: Blucher, 2018. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788521213680/>. Acesso em: 9 jul. 2022.

MOREAU, R. L. de M. **Ciências Farmacêuticas - Toxicologia Analítica**. 2ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015. Disponível em: [https://integrada.minhabiblioteca.com.br/reader/books/978-85-277-2860-7/epubcfi/6/10\[%3Bvnd.vst.idref%3Dcopyright\]!/4](https://integrada.minhabiblioteca.com.br/reader/books/978-85-277-2860-7/epubcfi/6/10[%3Bvnd.vst.idref%3Dcopyright]!/4). Acesso em: 5 jul. 2022.

NOGUEIRA, J. M. F.. Extração Sortiva em Barra de Agitação (SBSE): Uma metodologia inovadora para microextração estática. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 4, p. 259–269, 2012. Disponível em: <https://doi.editoracubo.com.br/10.4322/sc.2012.019>. Acesso em: 5 jul. 2022.

PARMIGIANI, M. P. C. V. D. Comparação de técnicas de mineralização para determinação de chumbo em alimentos destinados à população infantil. São Paulo, 1993. 59 p. **Dissertação** (Mestrado em Análises Toxicológicas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo. Disponível em: https://www.ufpb.br/ppgq/contents/documentos/teses-e-dissertacoes/teses/2010/Tese_Adriano_D_Tavares.pdf. Acesso em: 5 jul. 2022.

PERESTRELO, R.; SILVA, P.; PORTO-FIGUEIRA, P.; *et al.* QuEChERS - Fundamentals, relevant improvements, applications and future trends. **Analytica Chimica Acta**, v. 1070, p. 1–28, set. 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0003267019302259>. Acesso em: 5 jul. 2022.

POLSON, C. *et al.* Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 785, p. 263-275, 2003. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1570023202009145?via%3Dihub>. Acesso em: 20 jul. 2022.

PRESTES, O. D.; FRIGGI, C. A.; ADAIME, M. B.; *et al.* QuEChERS: um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1620–1634, 2009. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/BJq59mTbNC6HhzTcSW5vpTp/?lang=pt>. Acesso em: 10 jul. 2022.

QUEIROZ, C. M. E. Extração sortiva em barra de agitação (SBSE): Fundamentos teóricos e fases seletivas. **Scientia Chromatographica**, Ribeirão Preto, v. 1, n. 1, p. 21-29, 2009. Disponível em: <https://www.iicweb.org/scientiachromatographica.com/files/v1n1a2.pdf>. Acesso em: 10 jul. 2022.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, Campinas – SP, Vol. 24, No. 1, 68-76, 2001. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/GqB7NmLvrNqNYwVdXqj7hjq/?lang=pt>. Acesso em: 5 jul. 2022.

TAVARES, A. D. **Determinação de Cádmi e Chumbo em Alimentos e Bebidas Industrializados por Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica**. p 98. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa – PB, 2010.

VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F. Microextração por fase sólida. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 523–530, 2000. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/RMwM7kMXGtcvdrMPjcvTR4q/?lang=pt>. Acesso em: 10 jul. 2022.