

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS**

Débora Coelho de Andrade

**Desenvolvimento de metodologia
analítica baseada em microextração
em fase líquida com solventes
eutéticos profundos para a
determinação de hormônios
esteroides em urina**

**Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre**

**Porto Alegre
2023**

Débora Coelho de Andrade

**Desenvolvimento de metodologia
analítica baseada em microextração
em fase líquida com solventes
eutéticos profundos para a
determinação de hormônios
esteroides em urina**

Dissertação submetida ao Programa
de Pós-Graduação em Biociências
da Fundação Universidade Federal
de Ciências da Saúde de Porto
Alegre, como requisito para a
obtenção do grau de Mestre

Orientador(a): Dr. Josias de Oliveira Merib

**Porto Alegre
2023**

Catálogo na Publicação

Coelho de Andrade, Débora

Desenvolvimento de metodologia analítica baseada em microextração em fase líquida com solventes eutéticos profundos para a determinação de hormônios esteroides em urina / Débora Coelho de Andrade. -- 2023.

79 f. : il., graf., tab. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em BioCiências, 2023.

Orientador(a): Josias de Oliveira Merib.

1. Solvente eutético profundo. 2. Microextração em fase líquida. 3. Hormônios esteroides. 4. Urina. I. Título.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor Dr. Josias de Oliveira Merib, pela orientação e por todos os ensinamentos fundamentais para o andamento da pesquisa. Agradeço pelas oportunidades oferecidas e pelo acolhimento, todos os momentos vivenciados foram de crescimento pessoal e profissional.

Aos meus colegas do grupo de pesquisa GEPAC, Grupo de Estudos em Preparo de Amostras e Cromatografia. Nossas reuniões e conversas sempre foram muito produtivas.

Ao professor Tiago Espinosa de Oliveira, pelo conhecimento compartilhado nas simulações computacionais no final da minha pesquisa, mas que irão ajudar muito nos próximos passos e experimentos.

A minha família, meus pais Elaine e Leonardo e minhas irmãs Bruna e Bárbara, por todo amor e apoio de sempre. Vocês me motivam e me dão suporte para continuar independentemente da situação. Sou imensamente grata a vocês. Ao Matheus, meu companheiro de anos, sempre ao meu lado e me apoiando em todos os momentos, obrigada!

Agradeço especialmente a minha irmã gêmea Bruna, sem ti eu não teria iniciado essa trajetória. Muito obrigada!

A Universidade e ao PPG Biociências, por toda a estrutura e oportunidades de desenvolver pesquisa para a sociedade. Agradeço ao CNPq e UFCSPA, novamente, com auxílio financeiro prestado ao longo desses anos de pesquisa.

Muito obrigada!

INSTITUIÇÃO E FONTES FINANCIADORAS

O presente trabalho foi desenvolvido na Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), nos laboratórios da Central Analítica, situada no Prédio 1. Contou com recursos financeiros do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.

RESUMO

Amostras biológicas, como urina, constituem-se como matrizes complexas que podem ser utilizadas para a determinação de um significativo número de compostos de interesse clínico, toxicológico e forense. Dentre esses compostos estão os biomarcadores, ferramentas importantes para a detecção precoce de certas doenças. Devido à complexidade, as matrizes biológicas geralmente necessitam de um preparo antes da sua análise em instrumentos analíticos. Com esse intuito, técnicas como a extração líquido-líquido (LLE) e a extração em fase sólida (SPE) são empregadas no preparo dessas amostras. Porém, estas técnicas apresentam algumas desvantagens, principalmente em relação ao alto volume de solventes tóxicos utilizados. Desta forma, este trabalho abordou o desenvolvimento de um método analítico alternativo, baseado em microextração em fase líquida (LPME) e emprego de solventes eutéticos profundos (DES). Para isso, o DES foi preparado a partir de mentol e ácido decanóico, caracterizado através de espectroscopia no infravermelho, e utilizado em amostras de urina para a extração de hormônios esteroides, através da técnica de microextração líquido-líquido assistida por ultrassom (UALLME). Os parâmetros experimentais foram otimizados utilizando ferramentas multivariadas e univariadas, sendo que a melhor condição de extração consistiu em tempo de extração de 3 minutos em ultrassom, 150 µL de solvente extrator, DES contendo mentol:ácido decanóico na proporção 1:1 de razão molar e volume de amostra de 3 mL. As amostras de urina diluídas foram fortificadas com padrões analíticos dos analitos e extraídas com as condições otimizadas. O método apresentou limites de detecção (LOD) de 8 e 23 µg L⁻¹, 97 a 119% em termos de recuperação e 5 a 14% em termos de desvio-padrão relativo. Com isso, observa-se que a metodologia analítica proposta e executada apresenta potencial para utilização em matriz biológica como a urina para a determinação dos hormônios estriol, 17-β-estradiol e estrona que podem ser utilizados como ferramenta auxiliar para detectar câncer. Com base em predições de dinâmica molecular, o trabalho tem como perspectiva o desenvolvimento de solventes com diferentes proporções visando maiores interações entre o solvente extrator e os hormônios, obtendo resultados com limites analíticos de detecção menores em amostras de urina.

ABSTRACT

Biological samples, such as urine, consist of complex matrices that can be used for the determination of a significant number of clinical, toxicological, and forensic relevant compounds. Among these compounds biomarkers consists of important tools for the early detection of certain diseases. Due to their complexity, biological matrices generally require a suitable sample preparation step before the instrumental analysis. With this purpose, techniques such as liquid-liquid extraction (LLE) and solid-phase extraction (SPE) are typically employed this step. However, these techniques have some disadvantages, mainly regarding the high volume of toxic solvents used. Thus, this work involved the development of an alternative analytical methodology based on liquid-phase microextraction (LPME) and the use of deep eutectic solvents (DES). Particularly, the DES was prepared from a mixture of menthol and decanoic acid, characterized by Fourier-transform infrared spectroscopy, and used in urine samples for the extraction of some steroid hormones, through ultrasound-assisted liquid-liquid microextraction (UALLME). The experimental parameters were optimized using univariate and multivariate strategies with the best condition comprised of 3 minutes extraction time in ultrasound, 150 μL of extracting solvent, DES containing menthol:decanoic acid in 1:1 molar ratio, 3 mL sample volume. The diluted urine samples were spiked with analytical standards of the target analytes and extracted under the optimized conditions. The method presented detection limits (LOD) of 8 and 23 $\mu\text{g L}^{-1}$, recoveries ranging from 97 to 119%, and relative standard deviations ranging from 5 to 14%. Thus, it can be observed that the proposed analytical methodology has the potential to be used in biological matrices such as urine for the determination of the hormones estriol, 17- β -estradiol, and estrone that can be used as auxiliary tools for the detection of breast. Based on molecular dynamics predictions, this work has the perspective of developing solvents with different ratios to achieve greater interactions between the extracting solvent and the hormones, obtaining results with lower analytical limits of detection in urine samples.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação das técnicas de microextração em fase líquida (LPME): (A) microextração líquido-líquido (LLME); (B) microextração em gota única; (C) microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME); e (D) microextração em fase líquida de fibra oca (HF-LPME) (Fonte: adaptado de Soares da Silva Burato et al. 2020 (25)).	17
Figura 2. Ponto de congelamento de misturas de cloreto de colina/ureia em função da composição (39).	20
Figura 3. Estrutura química de alguns componentes usados como HBA e HBD	21
Figura 4. Procedimento de preparo dos DES	27
Figura 5. Representação da microextração líquido-líquido com a utilização de ultrassom - UALLME	29
Figura 6. Imagem de um dos DES produzidos neste estudo. Mistura de Mentol:Ácido Decanóico	32
Figura 7. Espectro de infravermelho do DES mentol:ácido decanóico, onde (a) Mentol, (b) Ácido Decanóico e (c) DES produzido.	34
Figura 8. Espectro de infravermelho do DES mentol:ácido octanóico, onde (a) Mentol, (b) Ácido Octanóico e (c) DES produzido.	35
Figura 9. Cromatograma dos analitos, onde (a) Estriol com pico em aproximadamente 2,5 minutos, (b) Estradiol com pico em aproximadamente 4,6 minutos e (c) Estrona com pico aproximadamente 6,1 minutos.	37
Figura 10. Cromatograma com a mistura dos três analitos em solução, na seguinte ordem de eluição: Estriol, Estradiol e Estrona.	38
Figura 11. Cromatograma do DES formado por mentol:ácido decanóico no equipamento instrumental HPLC-DAD, nas condições otimizadas de separação cromatográfica.	38
Figura 12. Teste de solubilidade do DES em (a) urina e (b) ACN	39
Figura 13. Gráfico de Pareto com as variáveis utilizadas na otimização	40
Figura 14. Gráfico de barras da otimização do volume de DES utilizado na extração. Relacionando as médias geométricas das áreas cromatográficas dos analitos e o volume de solvente utilizado na extração	41
Figura 15. Perfil de densidade dos componentes do sistema ao longo do eixo-z.	43

Figura 16. Representação do sistema com a migração do analito para o solvente e separação das fases com a água.	43
Figura 17. Distribuição radial para os diferentes componentes da mistura DES:água e o analito estradiol	44
Figura 18. PMF entre os diferentes componentes da mistura DES:água e o analito estradiol.	45
Figura 19. Distribuição radial para os diferentes componentes da mistura DES:água e o analito estriol	45
Figura 20. PMF entre os diferentes componentes da mistura DES:água e o analito estriol.	46
Figura 21. Distribuição radial para os diferentes componentes da mistura DES:água e o analito estrona.....	46
Figura 22. PMF entre os diferentes componentes da mistura DES:água e o analito estrona.....	47
Figura 22. Cromatogramas de uma solução padrão de hormônios com concentração de 1 mg L^{-1} e de uma extração utilizando DES em amostra de urina fortificada com os analitos com concentração de $500 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estrutura química e propriedades físico-químicas dos estrogênios endógenos. (Fonte: Adaptado de (9)).	14
Tabela 2. Quantidades (g) utilizadas nos preparos dos DES.	26
Tabela 3. Variáveis utilizadas na otimização do método de extração de hormônios através da técnica UALLME	30
Tabela 4. Parâmetros obtidos no método proposto de UALLME e DES mentol : ácido decanóico	42
Tabela 5. Comparação dos dados obtidos em diferentes metodologias de extração com o trabalho desenvolvido.	50

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.2 Matrizes biológicas	12
1.3 Hormônios esteroides	13
1.4 Preparo de amostra e técnicas de extração	15
1.5 Solventes Verdes.....	18
1.6 Solventes Eutéticos Profundos	19
1.7 Métodos Cromatográficos.....	23
1.8 Simulação por Dinâmica Molecular.....	23
1.9 Justificativa	24
2 OBJETIVOS.....	25
2.1 Geral	25
2.2 Específicos	25
3 METODOLOGIA	26
3.1 Preparo dos DES.....	26
3.2 Caracterização dos DES.....	27
3.3 Padrões analíticos	28
3.4 Equipamento e condições de análise	28
3.5 Método HPLC-DAD utilizado para as análises	28
3.6 Amostra e pré-tratamento	29
3.7 Metodologia de extração.....	29
3.8 Parâmetros da otimização	30
3.9 Dinâmica Molecular	30
4 RESULTADOS.....	32
4.1 Preparo dos DES.....	32
4.2 Caracterização dos DES.....	32
4.3 Método HPLC-DAD utilizado para as análises	36
4.4 Análise do DES por HPLC-DAD	38
4.5 Teste de solubilidade em urina e ACN.....	39
4.6 Otimização mediante planejamento fatorial completo.....	39
4.7 Validação do método analítico	41
4.8 Simulações por Dinâmica Molecular.....	42
5 DISCUSSÃO	48
5.1 Caracterização dos DES.....	48
5.2 Comportamento do DES como solvente em amostra biológica.....	48
5.3 Determinação de hormônios esteroides em urina utilizando DES	49
6 CONCLUSÕES	52
7 REFERÊNCIAS.....	53
8 APÊNDICE A - Currículo Lattes.....	65
9 ANEXO A – Artigo Científico	69

1 INTRODUÇÃO

1.2 Matrizes biológicas

As matrizes biológicas são de fundamental importância para diversos tipos de análises. Em geral, apresentam grande complexidade e constituem-se como um desafio significativo para os analistas, uma vez que são utilizadas nas análises de diversos tipos de compostos de interesse nas determinações forenses, toxicológicas e clínicas. Existem inúmeras matrizes biológicas com diferentes graus de complexidade, dentre estas podem ser destacadas o fluído oral, sangue, urina e plasma.

A urina é uma matriz biológica convencional, muito utilizada para análises toxicológicas. É gerada a partir da ultrafiltração do sangue pelos rins e constituída basicamente por água e cerca de 2% de substâncias orgânicas como ureia, ácido úrico e creatinina, e substâncias inorgânicas como cloreto de sódio. Esta matriz é de particular interesse, uma vez que mais de 50% das substâncias excretadas pelo metabolismo humano podem ser encontradas nela (1). Assim, classes importantes de moléculas como biomarcadores patológicos e produtos de biotransformação podem ser monitoradas, permitindo valiosas ferramentas de diagnóstico e orientação de tratamento para algumas doenças. A principal vantagem dessa matriz é a coleta fácil e não invasiva, que não requer profissional treinado, permitindo também a autocoleta. Além disso, o volume coletado dessa matriz é geralmente maior em comparação com outras matrizes biológicas, e pode ser observado um número reduzido de componentes interferentes. Além disso, a urina apresenta alta estabilidade, permitindo o armazenamento em temperaturas de congelamento por um longo período (2,3).

Porém, devido à sua complexidade, na maioria das vezes, não é possível realizar a análise direta da matriz biológica em um instrumento analítico; desta forma, é necessário o preparo da amostra antes da análise instrumental para pré-concentrar e isolar os analitos das outras substâncias presentes na matriz, como sais inorgânicos que podem causar danos nos instrumentos (4). A diluição da urina também pode ser utilizada junto com

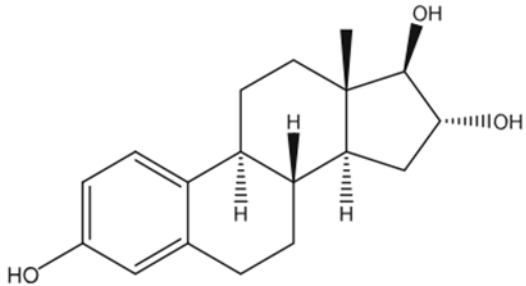
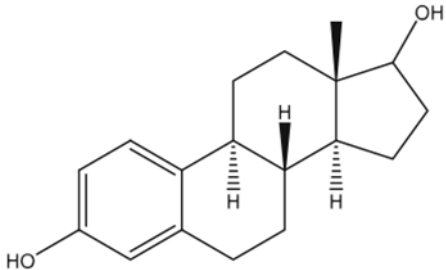
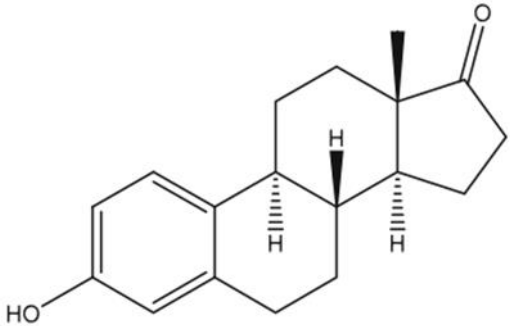
outras técnicas de preparo de amostra, podendo ser realizada em cerca de até 40 vezes de acordo estudos realizados (5).

1.3 Hormônios esteroides

Os hormônios esteroides são comumente divididos em estrogênio, progesterona e androgênio, sendo importantes para o crescimento e homeostase hormonal do organismo. Quando ocorre um desbalanço hormonal, diversas patologias podem ser desencadeadas, como a incidência de câncer, doenças cardíacas e diabetes. Dentre essas três classes de hormônios esteroides, o estrogênio desempenha função essencial no desenvolvimento e manutenção do sistema reprodutor feminino, auxiliando na regulação do sistema (6,7). São hormônios que estão envolvidos também na formação óssea, maturação sexual feminina e masculina e possuem funções cardiovasculares (8).

Os estrogênios são altamente lipossolúveis, após a sua síntese, são facilmente difundidos através da membrana celular para o sistema circulatório. O corpo feminino produz naturalmente três tipos de moléculas de estrogênio: estradiol (17- β -estradiol), estrona e estriol, cujas estruturas e propriedades físico-químicas estão indicadas na Tabela 1 a seguir.

Tabela 1. Estrutura química e propriedades físico-químicas dos estrogênios endógenos. (Fonte: Adaptado de (9)).

Analito	Estrutura química	log Kow	pKa
Estriol		2,45	10,38
17-β-estradiol		3,94	10,71
Estrona		3,43	10,34

O hormônio estradiol é sintetizado em grandes quantidades pelo ovário a partir do colesterol. O estradiol possui maior efeito em função da alta afinidade pelos receptores de estrogênio presente nas células e é predominante durante o período reprodutivo da mulher. A estrona é um metabólito do estradiol, sendo considerado um hormônio menos potente que o estradiol e torna-se predominante na menopausa. O estriol também é um metabólito do estradiol, sendo sintetizado em pequenas quantidades pela placenta durante a gravidez (10,11).

Uma desregulação ou variação nos níveis normais desses hormônios sexuais pode ocasionar problemas de saúde no organismo, incluindo a incidência de câncer, infertilidade e outras patologias (12,13). Sendo assim, níveis elevados de estrogênios endógenos em amostras de urina podem estar relacionados a presença dessas patologias (14–16), com isso, a determinação desses compostos em amostras de urina é um desafio significativo e de extrema importância, visando o monitoramento de condições clínicas específicas, como as desregulações citadas.

Nas matrizes biológicas, como urina, é possível a determinação de compostos como os biomarcadores tumorais que podem auxiliar no diagnóstico, prevenção e tratamento de doenças. Tipicamente, este diagnóstico pode ser feito através de biópsias que são invasivas, por isso há a necessidade pelo desenvolvimento de novas técnicas que possam ser eficazes na determinação de biomarcadores em matrizes cuja coleta não é invasiva e podem indicar precocemente a doença. Relacionados ao diagnóstico de doenças estão os biomarcadores estradiol, estrona e estriol que podem ser determinados na urina (17,18).

No momento, o desenvolvimento e a aplicação de metodologias para determinação de estrogênios em amostras biológicas ainda não são amplamente difundidos, em comparação com outras ferramentas experimentais. No entanto, é possível que seu uso aumente significativamente nos próximos anos devido à sua versatilidade e abordagens abrangentes. Por isso, se torna fundamental obter mais conhecimentos sobre as abordagens metodológicas e as aplicações relevantes dessas metodologias (19).

1.4 Preparo de amostra e técnicas de extração

O preparo da amostra é uma etapa importante do processo analítico, pois a determinação dos analitos de forma eficiente depende de técnicas capazes de concentrá-los e isolá-los da matriz complexa de maneira com que eles fiquem disponíveis para análise. Para isso, geralmente são empregadas técnicas tradicionais, como a extração líquido-líquido (LLE, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*) e extração em fase sólida (SPE, do inglês *Solid-Phase Extraction*).

Porém, essas técnicas clássicas apresentam diversos inconvenientes, incluindo alto consumo de solventes orgânicos - como os clorados, podendo resultar em problemas para o meio ambiente e saúde do analista, além disso, geralmente os processos apresentam longos tempos de extração. Com isso, técnicas miniaturizadas têm sido desenvolvidas para superar essas limitações, a partir da proposta das chamadas microextrações e da crescente busca de redução do uso de solventes orgânicos tóxicos pelas técnicas tradicionais, promovendo o cuidado com o meio ambiente e saúde do analista com base nos conceitos de Química Verde (20–22).

Entre tais técnicas estão a microextração em fase sólida (SPME, do inglês *Solid-Phase Microextraction*) e microextração em fase líquida (LPME, do inglês *Liquid-Phase Microextraction*) ou microextração líquido-líquido (LLME, do inglês *Liquid-Liquid Microextraction*). A técnica baseada em fase líquida consiste na migração do analito presente em uma fase aquosa (fase doadora) para um solvente que é imiscível em água (fase receptora), utilizando volumes pequenos de solvente e amostra, gerando menos resíduos. Atualmente, é um dos métodos de extração amplamente utilizados, devido à redução de volumes de solventes orgânicos e tempos de extração diminuídos, quando comparada com a técnica tradicional LLE. Com a utilização e ampliação da técnica miniaturizada, surgiram outras metodologias baseadas no princípio de extração líquido-líquido. Podendo, então, dividir em categorias: microextração em fase líquida empregando membrana oca (HF-LPME, do inglês *Hollow fiber Liquid-Phase Microextraction*), microextração em gota única (SDME, do inglês *Single-drop Microextraction*) e microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME, do inglês *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*) (22). Além das categorias, outras alternativas são utilizadas juntamente com a técnica de LPME, como a extração líquido-líquido homogênea (HLLME, do inglês *Homogenous Liquid-Liquid Microextraction*) (23), utilização de vórtex e microextração líquido-líquido assistida por ultrassom (UALLME, do inglês *Ultrasonic-assisted Liquid-Liquid Microextraction*), auxiliando na migração do analito para a fase extratora (24). As variações da técnica miniaturizada estão representadas na Figura 1 a seguir.

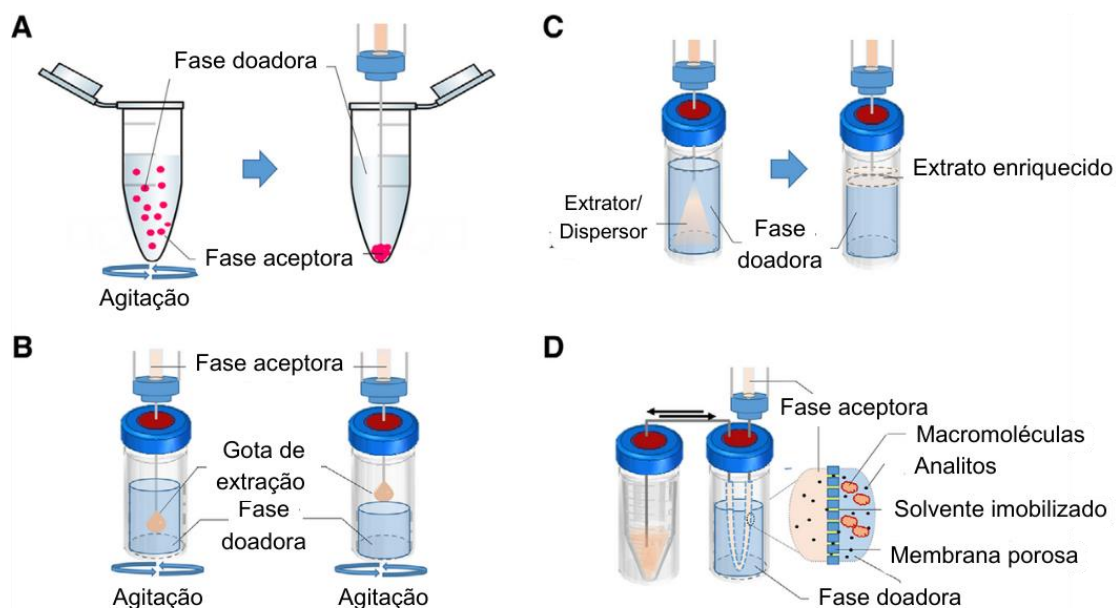


Figura 1. Representação das técnicas de microextração em fase líquida (LPME): (A) microextração líquido-líquido (LLME); (B) microextração em gota única; (C) microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME); e (D) microextração em fase líquida de fibra oca (HF-LPME) (Fonte: adaptado de Soares da Silva Burato et al. 2020 (25))

Em 1999 Pedersen-Bjergaard e Rasmussen (26) introduziram a técnica HF-LPME, baseada em uma membrana ou fibra porosa oca contendo na sua parte inferior (lúmen) a fase receptora/extratora. A fibra é uma barreira porosa entre o solvente extrator e a amostra, os seus poros são preenchidos com solvente orgânico formando uma camada líquida fina, SLM, do inglês *Supported liquid membrane*. Portanto, os analitos podem migrar para o lúmen dentro da membrana e a fase receptora é removida do interior da fibra com o auxílio de microseringa para posterior análise.

A técnica de DLLME foi proposta por Rezaee et al. (27) em 2006 e consiste na mistura de dois solventes, um imiscível na amostra (solvente orgânico extrator) e outro miscível na amostra e no solvente orgânico (solvente dispersor), os quais são introduzidos na amostra resultando em uma solução turva (9). Esta mistura de solvente dispersor e solvente de extração é rapidamente injetada na amostra aquosa formando microgotas com elevada área superficial. Assim, os analitos podem migrar da solução da amostra para o solvente de extração. Geralmente é necessária uma etapa de centrifugação para depositar o solvente de extração no fundo do frasco. Em seguida, o solvente de extração enriquecido com os analitos é retirado com o auxílio de

uma seringa antes da análise instrumental. É uma técnica simples, de baixo custo e rápida (28). Como variação da DLLME, a HLLME consiste em um sistema binário de solventes, sendo a amostra aquosa e o solvente de extração envolvidos no processo. O analito está presente na solução aquosa homogênea e extraído por um solvente imiscível na mesma. É uma técnica rápida, simples e eficiente, utilizando menos solventes quando comparada com a DLLME, que é um sistema ternário (23,29).

A eficiência da extração é diretamente influenciada pelo solvente utilizado, normalmente solventes clorados são usados nas técnicas envolvendo microextração em fase líquida. Apesar dos resultados satisfatórios nas determinações, esses solventes apresentam algumas desvantagens relacionadas à alta toxicidade e volatilidades (9). Por isso, novas técnicas empregando o uso de solventes menos tóxicos e biodegradáveis estão sendo desenvolvidas.

1.5 Solventes Verdes

Os solventes denominados verdes são substâncias que apresentam menor impacto ambiental e risco à saúde humana em comparação aos solventes convencionais, amplamente utilizados no preparo de amostras. Esses solventes são caracterizados por possuírem propriedades como baixa toxicidade, baixa volatilidade, não inflamabilidade e alta biodegradabilidade. Além disso, solventes verdes são geralmente provenientes de fontes renováveis ou são desenvolvidos a partir de processos que minimizam a geração de resíduos. Estes solventes têm sido avaliados como alternativa aos solventes tradicionais e incluem os líquidos iônicos (IL, do inglês *Ionic Liquid*), solventes supramoleculares (SUPRAS, do inglês *Supramolecular solvent*) e solventes eutéticos profundos (DES, do inglês *Deep eutectic solvent*) (30).

Os líquidos iônicos são solventes com ponto de fusão abaixo de 100°C, apresentando alta estabilidade térmica, boa capacidade de dissolução em compostos orgânicos e inorgânicos, baixa volatilidade e potencial de reutilização (31,32). Os líquidos iônicos (ILs) são compostos exclusivamente por íons e tipicamente por cátions orgânicos assimétricos que contêm heteroátomos de nitrogênio ou fósforo, juntamente com ânions tanto inorgânicos como orgânicos (33). Este tipo de solvente é empregado tanto nas

técnicas de microextração em fase sólida (na forma de polímeros) quanto em líquida. Dentre as vantagens associadas a estes materiais estão a versáteis e seletividade que é alcançada por permitir mudanças estruturais que, na maioria dos casos, são simples de serem realizadas em laboratório. Entre alguns exemplos de IL temos $[N^{+}_{4,4,4,4}][Cl^{-}]$, $[C_4MIm^{+}][PF_6^{-}]$ e $[FeCl_3Br^{-}]$ (30).

Os solventes supramoleculares (SUPRAS) são definidos como líquidos nano estruturados imiscíveis em água formados a partir de auto associação sequencial de diferentes moléculas anfifílicas, como surfactantes e ácidos carboxílicos de cadeia longa. Os SUPRAS apresentam uma importante vantagem como solventes extratores devido à sua natureza anfifílica, que possibilita diferentes polaridades em diferentes regiões dos agregados supramoleculares. Isso confere ótimas propriedades de solvatação para uma grande variedade de analitos (30,32,34). Os SUPRAS são solventes facilmente obtidos e caracterizam-se por sua versatilidade. Isso tem levado à aplicação de diferentes procedimentos de preparo de amostras que utilizam os solventes em técnicas de microextração (35,36). Podemos citar como SUPRAS a mistura dos solventes ácido decanóico/tetrahidrofurano (THF), heptanol/THF e pentanol/THF (32).

Outra importante classe de solventes verdes consiste nos solventes eutéticos profundos (DES), caracterizados como misturas eutéticas constituídas por dois ou mais componentes imiscíveis, capazes de formar uma nova fase líquida homogênea com um ponto de fusão mais baixo em relação aos seus componentes individuais (37).

1.6 Solventes Eutéticos Profundos

Os DES são constituídos pela mistura de dois componentes associados por ligações de hidrogênio, formando a mistura eutética com ponto de fusão inferior a temperatura de fusão dos percussores isolados, minimizando significativamente a geração de resíduos. Na Figura 2 está a representação de uma mistura formada de cloreto de colina e ureia para a formação do DES. A mistura apresenta ponto de fusão inferior, onde os componentes estão misturados, formando o solvente quando comparado com o ponto de fusão dos componentes isolados. Normalmente, os componentes do DES são biodegradáveis, não apresentam toxicidade, são baratos e preparados

facilmente. Devido às propriedades ambientalmente corretas e as boas eficiências de extração, esses tipos de solventes estão atraindo muita atenção da comunidade científica e estão sendo avaliados nas técnicas baseadas em microextração em fase líquida (LPME) (30,38).

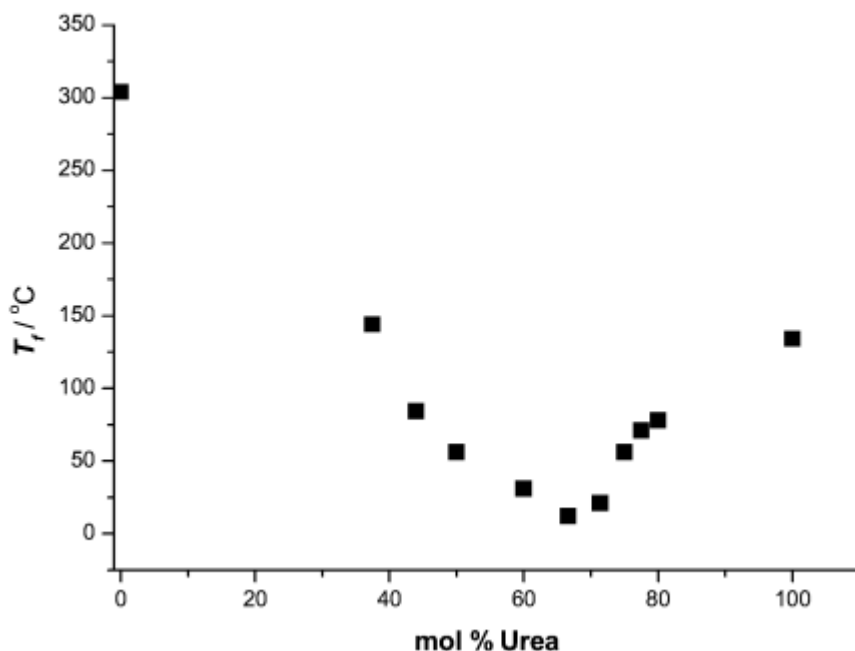


Figura 2. Ponto de congelamento de misturas de cloreto de colina/ureia em função da composição (39).

O surgimento dos DES ocorreu em 2001, com Abbott et al. (40), através da avaliação de misturas estáveis de líquidos iônicos compostos por sais de amônio quaternário. Os autores realizaram a preparação e caracterização de novos solventes estáveis, possibilitando pesquisas envolvendo a mistura de sais de amônio quaternário com metais, resultando em componentes fundidos (41). A maioria dos DES consiste em misturas binárias ou ternárias formadas por ligações de hidrogênio, resultando em misturas eutéticas. Essas misturas contêm um aceptor de ligação de hidrogênio (HBA, do inglês *hydrogen-bond acceptor*) e um doador de ligação de hidrogênio (HBD, do inglês *hydrogen-bond donor*), que resultam em solventes com pontos de fusão mais baixos e, geralmente, densidades mais altas do que os componentes individuais. As misturas desses componentes, comumente em uma proporção molar de 1:1 e 1:2, resultam na formação de líquidos à temperatura ambiente, caracterizados por apresentarem elevada estabilidade térmica, baixa volatilidade e alta viscosidade (42,43).

Esses solventes sustentáveis possuem propriedades atraentes, como aspectos ecologicamente amigáveis, versatilidade estrutural que permite o ajuste sua estrutura química de forma sistemática e procedimentos de preparação simples. Além disso, os DES são altamente versáteis, oferecendo várias combinações de HBA e HBD, que são alternativas mais sustentáveis aos solventes orgânicos convencionais. Isso torna os DES uma opção atraente para substituir solventes orgânicos tóxicos e estudos recentes têm mostrado o potencial desses solventes em diversas áreas e aplicações (44,45).

Há uma enorme possibilidade de composição dos DES, devido à variedade de componentes HBA e HBD. Entre os mais utilizados como HBA estão o cloreto de colina (ChCl) e sais de amônio quaternário como cloreto de tetrabutilamônio. Como HBD, os aminoácidos, ureia, glicerol, álcool e ácido carboxílicos têm sido avaliados em diversos estudos que envolvem a utilização destes compostos como componentes de misturas empregas em técnicas de extração. Algumas estruturas químicas destes compostos estão apresentadas na Figura 3. Na Figura é possível observar que algumas substâncias, como o mentol e timol, podem se comportar como HBA ou HBD, devido ao grupo funcional indicado em vermelho que pode ser o doador ou receptor da ligação de hidrogênio (44,46).

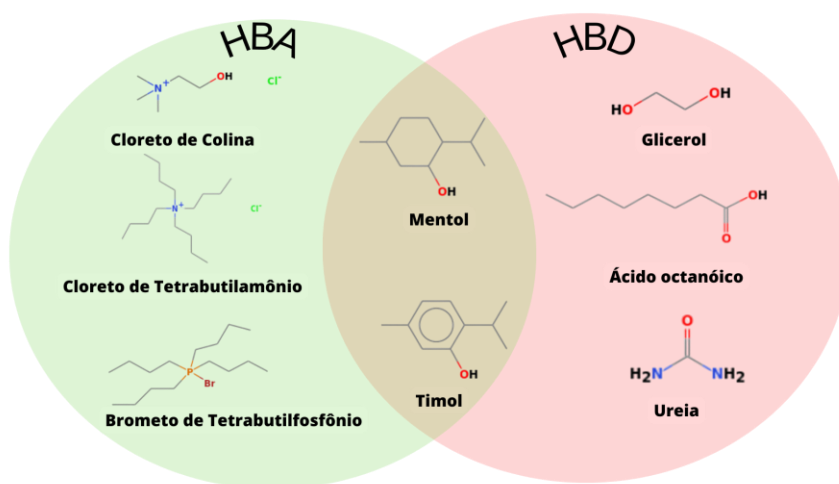


Figura 3. Estrutura química de alguns componentes usados como HBA e HBD

Alguns DES são denominados solventes eutéticos profundos naturais (NADES) e incluem aminoácidos, terpenos, ácidos orgânicos que são produzidos por fontes naturais. Estes compostos apresentam propriedades biodegradáveis e adequada estabilidade à temperatura ambiente, e por isso

sua utilização é interessante. Além disso, seu preparo é fácil, rápido, barato e não apresenta as rotas de preparo complexas as quais são comuns na maioria dos líquidos iônicos. Essas características os tornam promissores solventes de extração e cerca de 100 NADES podem ser produzidos, tendo em vista as combinações que podem ser feitas durante o preparo (32,47).

Os DES podem variar significativamente no que se refere à polaridade, podendo ser hidrofílicos ou hidrofóbicos (hDES). Os solventes hidrofóbicos são muito interessantes na utilização em técnicas e procedimentos de extração, uma vez que são imiscíveis em soluções aquosas e podem ser retirados com facilidade devido a uma adequada separação de fase após a extração (42). Há diferentes formas de preparo dos DES, mas a mais usual e simples é a técnica que consiste na mistura de dois ou mais componentes de forma a obter um líquido homogêneo límpido, já descrito por Abbott et al. (41). Diversos estudos avaliam variações nas condições de preparo, como diferentes temperaturas de aquecimento e utilização de ultrassom associada ao aquecimento (48–51).

Para a caracterização dos DES geralmente emprega-se a técnica de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), onde os constituintes são avaliados individualmente e o DES formado é avaliado para comparação de espectros de infravermelho, comparando-os e verificando a formação do solvente, pois o FTIR é capaz de fornecer informações relacionadas a possíveis interações químicas, formação de ligação de hidrogênio e modificações estruturais. Além dessa técnica, utiliza-se também a espectroscopia de ressonância magnética nuclear de prótons (^1H NMR) (44,52–54).

A utilização dos DES em metodologias analíticas é considerada relevante devido às suas propriedades físico-químicas que podem ser usadas em matrizes complexas, como a urina. Por isso, os NADES têm recebido atenção uma vez que são solventes biodegradáveis e promissores nas abordagens analíticas sustentáveis. Os solventes eutéticos profundos já são utilizados há mais tempo como solventes extratores de diversos analitos em amostras ambientais, mas as aplicações em amostras biológicas ainda não são tão extensivamente exploradas (55).

1.7 Métodos Cromatográficos

A cromatografia líquida de alta eficiência (*High performance liquid chromatography* - HPLC) é uma aplicação da cromatografia líquida, sendo uma técnica importante, com diversas aplicações e com grande sensibilidade analítica. O método de HPLC é frequentemente utilizado na separação, identificação e quantificação de compostos em uma amostra líquida, apresentando versatilidade, precisão e possui relativamente um baixo custo quando comparado com outras técnicas como espectrometria de massas (56,57).

A técnica de HPLC envolve a passagem de uma solução contendo a amostra através de uma coluna cromatográfica, onde ocorre a separação dos componentes com base em suas diferentes interações com a fase estacionária e a fase móvel. A fase estacionária na HPLC é constituída por partículas adsorventes ou empacotadas dentro da coluna, que retêm e interagem seletivamente com os compostos presentes na amostra (58).

Além disso, a HPLC oferece uma variedade de detectores para análise dos componentes separados. Um dos detectores mais comumente utilizados é o detector de matriz de diodo (*Diode Array Detector* - DAD). O DAD é um detector de absorção de luz que mede a absorção da radiação eletromagnética em uma ampla faixa de comprimentos de onda simultaneamente, sendo de 190 a 800 nm. O DAD é altamente versátil, pois permite a obtenção de espectros de absorção em cada ponto da separação cromatográfica, proporcionando informações detalhadas sobre os componentes presentes na amostra. Isso permite a identificação de picos cromatográficos por meio de comparação com bancos de dados espectrais e a quantificação precisa dos componentes através da medição da área sob o pico correspondente (59,60).

1.8 Simulação por Dinâmica Molecular

A técnica de dinâmica molecular é um método de simulação clássico no qual o sistema é descrito como um conjunto de partículas que interagem entre si mediante forças derivadas ou não de um potencial de interação e cujo movimento é regido pelas leis de Newton da mecânica clássica. As equações diferenciais que expressam estas leis são escritas como equações de diferenças finitas e resolvidas numericamente em computador. O conhecimento

da posição das partículas em um dado instante de tempo permite calcular as forças que agem sobre elas e conhecer todos os seus movimentos futuros: a sua dinâmica. A partir do registro da dinâmica do sistema, pode-se extrair informações úteis, tais como propriedades estruturais, termodinâmicas, elétricas ou ópticas, propriedades relacionadas a fenômenos de transporte, dentre muitas outras (61,62). Por isso, a dinâmica molecular é uma ferramenta capaz de estabelecer uma compreensão microscópica do comportamento termodinâmico, dinâmico, mecânico e estrutural sistemas nanoestruturados como as microemulsões. A técnica pode ser utilizada para auxiliar nas previsões de experimentos, de forma com que o planejamento seja direcionado a partir de dados obtidos em simulações.

1.9 Justificativa

A urina pode ser utilizada como matriz para a determinação de diversos compostos de interesse clínico, no auxílio da descoberta de doenças que geralmente são determinadas após exames invasivos. Mas para isso, é necessário um preparado dessa amostra que é uma etapa de extrema importância, visto que as matrizes biológicas apresentam características complexas que, muitas vezes, impossibilitam a análise direta das amostras sem preparo prévio. Para isso, técnicas de extração são empregadas para isolar os analitos, porém muitas das técnicas tradicionalmente empregadas apresentam desvantagens como o longo tempo de extração e utilização de solventes tóxicos.

Logo, surge a necessidade do desenvolvimento de técnicas alternativas e ambientalmente corretas, como a microextração em fase líquida (LPME), empregando solventes considerados verdes e seguros, biodegradáveis e não tóxicos. A aplicação de DES como solventes é uma alternativa para a substituição dos solventes tóxicos tipicamente utilizados em amostras biológicas. Além disso, quando comparada com as técnicas de extração tradicionais, a microextração utiliza volumes inferiores de amostra e solvente extrator, resultando em uma significativa redução na geração de resíduos.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Desenvolver uma metodologia analítica baseada em microextração em fase líquida utilizando solventes eutéticos profundos para a determinação de hormônios em amostras biológicas.

2.2 Específicos

Preparar e caracterizar as fases extratoras baseadas em solventes eutéticos profundos.

Otimizar o método empregando estratégias quimiométricas.

Desenvolver a separação dos analitos no instrumento.

Comparar a eficiência das diferentes fases extratoras constituídas pelos solventes eutéticos profundos.

3 METODOLOGIA

3.1 Preparo dos DES

Para o preparo dos DES, foram utilizados Mentol ($\geq 98\%$) da Neon® como HBA e ácidos carboxílicos como HBD, sendo o Ácido Decanóico ($\geq 98\%$) da Neon® e Ácido Octanóico P.A da Synth®. A etapa de preparo dos solventes foi realizada nos laboratórios da Central Analítica da UFCSPA.

O procedimento de preparo consistiu na pesagem dos componentes da mistura em balança analítica, nas proporções desejadas, com aquecimento a 60°C em chapa de aquecimento por aproximadamente 10 minutos. O tempo de aquecimento variou de acordo com as quantidades pesadas. Diferentes proporções de mistura foram preparadas, com razões molares de 1:1 e 1:2 de HBA:HBD. As massas pesadas para o preparo dos DES estão indicadas na Tabela 2 a seguir.

Tabela 2. Quantidades (g) utilizadas nos preparos dos DES.

DES	Componentes	Massas (g)
Mentol:Ácido decanóico	Mentol	1,00671
	Ácido decanóico	1,10916
Mentol:Ácido octanóico	Mentol	1,03571
	Ácido octanóico	0,95578

O esquema de preparo do DES está representado na Figura 4 a seguir.

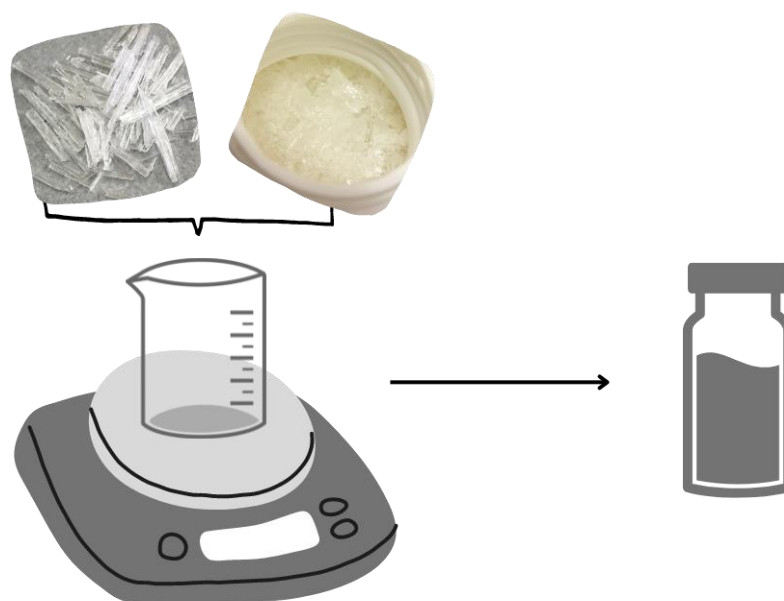


Figura 4. Procedimento de preparo dos DES

3.2 Caracterização dos DES

Os DES preparados foram caracterizados por técnicas usuais de FTIR utilizando-se pastilhas de KBr. Além disso, foram também realizados testes de solubilidade em matriz aquosa e, também, na presença de outros solventes orgânicos para verificar a hidrofobicidade do solvente tendo em vista que se desejavam solventes pouco solúveis em fase aquosa.

Neste caso, os componentes dos solventes foram analisados individualmente e após as misturas resultantes no DES em Espectrofotômetro Infra-vermelho por transformada de Fourier, marca SHIMADZU, modelo IR PRESTIGE21, com detector modelo DLATGS (Deuterated Triglycine Sulfate Doped with L-Alanine) e faixa espectral 7800 cm^{-1} até 350 cm^{-1} .

Uma vez que o DES enriquecido com os analitos seria injetado diretamente no instrumento de cromatografia líquida de alta eficiência, foram testadas a solubilidades dos DES produzidos em urina e acetonitrila (ACN). Foram adicionados cerca de $200\text{ }\mu\text{L}$ de DES em aproximadamente 1 mL de urina. O procedimento foi reproduzido com ACN.

O solvente produzido, após a otimização e escolha do solvente extrator, também foi devidamente analisado no instrumento nas condições determinadas

de análise. Neste caso, procurou-se avaliar se o mesmo apresentaria “fundo” ou “background” que poderia prejudicar a análise dos compostos em estudo.

3.3 Padrões analíticos

Os padrões analíticos utilizados foram padrões sólidos de Estriol ($\geq 97\%$), $-\beta$ -estradiol ($\geq 98\%$), e Estrona ($\geq 99\%$), obtidos da Sigma-Aldrich®. O solvente utilizado para a dissolução dos padrões sólidos foi a acetonitrila (ACN) Supelco®.

Foram preparadas soluções padrões de cada um dos analitos em concentração de 500 mg L^{-1} dos padrões sólidos a partir da dissolução dos mesmos em ACN. A partir das soluções individuais foi preparada uma mistura contendo os três analitos na concentração de 10 mg L^{-1} , que foi utilizada para o preparo da curva analítica e estudos de exatidão.

3.4 Equipamento e condições de análise

As análises cromatográficas foram realizadas em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), marca SHIMADZU modelo PROMINENCE, com amostrador automático modelo SIL-20A, forno CTO-20A, detector espectrofotométrico “Photodiode Array” modelo SPDMA20A – HPLC-DAD.

3.5 Método HPLC-DAD utilizado para as análises

Os analitos foram analisados individualmente no equipamento, em concentração de 10 mg L^{-1} e também analisados simultaneamente, como uma mistura dos três componentes. Para verificação do método de análise mais adequado, foram testadas condições cromatográficas variando as concentrações das fases móveis, nos modos de separação gradiente e isocrático a fim de verificar a melhor condição de separação dos três analitos.

Para a separação dos analitos, utilizou-se uma coluna cromatográfica formada por C18 modelo Promosil ($4,6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$; 5 um ; 100 Å ; Agela) mantida a 30°C no forno. A fase móvel foi constituída de água tipo I (A) e ACN (B) em modo isocrático de separação, com composição de $60\% \text{ v/v}$ de B. O volume de amostra injetada foi de $20 \text{ }\mu\text{L}$ e o fluxo da fase móvel foi mantido constante em 1 mL min^{-1} , com 20 minutos de corrida cromatográfica. Todos os

analitos foram detectados no comprimento de onda de 200 nm e os dados cromatográficos foram analisados através do software *LC Solutions* da Shimadzu.

3.6 Amostra e pré-tratamento

As amostras utilizadas para a realização de todos os experimentos deste projeto foram obtidas somente dos pesquisadores envolvidos no estudo. Neste caso, seguiu-se o protocolo de pesquisa aprovado segundo parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UFCSPA (CAAE 09022919.2.0000.5345).

Em um primeiro momento, para avaliar uma possível redução da concentração de substâncias que poderiam interferir na análise instrumental, uma amostra de urina foi diluída 10 vezes com água tipo I, ultrapurificada em sistema Milli-Q® (com resistividade de 18,2 MΩ cm a 25 °C), marca Millipore (Massachusetts, USA). Para simulação de amostras reais, na urina diluída foram adicionadas quantidades conhecidas de analitos para fortificação.

3.7 Metodologia de extração

As extrações basearam-se em UALLME com utilização de banho de ultrassom, 3 mL de urina diluída (10 vezes) fortificada com os analitos. O restante das condições de extração, como tempo de extração em banho de ultrassom sem a utilização de controle de temperatura, volume de solvente extrator utilizado, composição e proporção de solvente foram otimizadas através de planejamentos multivariados. Um esquema da extração proposta neste estudo está representado na Figura 5 a seguir.

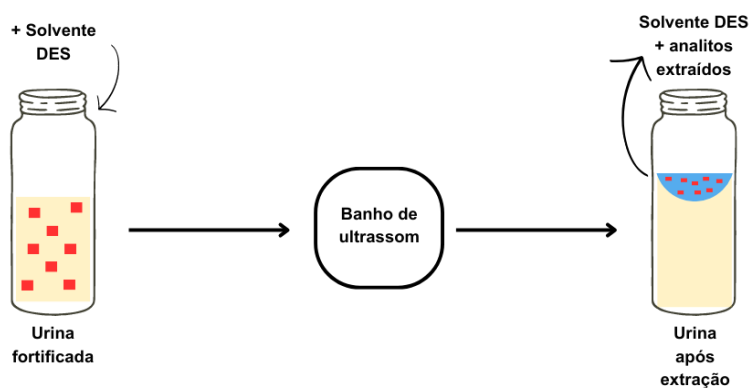


Figura 5. Representação da microextração líquido-líquido com a utilização de ultrassom - UALLME

3.8 Parâmetros da otimização

Na etapa de otimização, inicialmente manteve-se fixa a concentração dos analitos em 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ e volume de amostra de 3 mL de urina diluída (10 vezes). Neste caso, foram variados os parâmetros envolvendo volume de DES empregado na extração (150 e 350 μL), tempo de extração em banho de ultrassom (3 e 9 minutos), proporção dos componentes do DES (1:1 e 1:2 de HBA e HBD, respectivamente) e tipo do DES, variando a composição de um dos constituintes (mentol:ácido octanóico e mentol:ácido decanóico). Com a variação dos parâmetros, realizou-se um planejamento fatorial completo 2^4 , resultando em 16 experimentos distintos. Posteriormente, para o volume de DES empregado na extração, realizou-se mais uma otimização com planejamento univariado com três volumes distintos.

As variáveis foram categorizadas em diferentes níveis, como está descrito na Tabela 3.

Tabela 3. Variáveis utilizadas na otimização do método de extração de hormônios através da técnica UALLME

Variáveis		Níveis	
		(-)	(+)
1	Volume DES (μL)	150	350
2	Tempo de extração (min)	3	9
3	Proporção DES	1:1	1:2
4	Tipo DES (composição)	Mentol : Ácido Octanóico	Mentol : Ácido Decanóico

Os dados obtidos a partir das abordagens multivariadas foram tratados usando o software Statistica 8.0 (STATSOFT, EUA). Os dados utilizados como resposta analítica foram as médias geométricas das áreas dos picos cromatográficos dos analitos obtidas nas extrações em cada condição experimental.

3.9 Dinâmica Molecular

Os estudos de dinâmica molecular *all-atom* foram realizados utilizando o pacote GROMACS (63). Os parâmetros ligados e não-ligados para os componentes do DES (ácido decanóico (ACD) e mentol (MTL)), bem como para os analitos (estradiol, estriol e estrona) utilizados foram do campo de forças CHARMM (64,65) e obtidos a partir do webserver CHARMM-GUI (66). As configurações iniciais de simulação foram construídas utilizando o programa

PACKMOL (67,68), o analito foi solvatado em uma mistura de DES e água, o modelo de água utilizado foi o TIP3P (Transferrable Intermolecular Potential with Three Points) (69).

A temperatura e a pressão das simulações foram mantidas a 298 K e 1 atm, respectivamente, utilizando o termostato *V-rescale* (70) e o barostato de *Parrinello-Rahman* (71). As interações eletrostáticas foram tratadas utilizando o método PME (Particle Mesh Ewald) (72) com um *cut-off* igual a 1.0 nm para as interações de van der Waals.

Para cada analito foi submetida uma simulação em um ensemble NPT por 100 ns. Durante cada simulação os últimos 25 ns foram utilizados para obtenção dos resultados do perfil de densidade e da função de distribuição radial ($g(r)$). Para avaliar a intensidade das interações analito-ACD, analito-MTL e analito-água foi calculado o potencial de força média (PMF) utilizando a equação (73):

$$PMF = -RT \ln g(r)$$

onde R é a constante universal dos gases ($8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) e T é a temperatura do sistema.

4 RESULTADOS

4.1 Preparo dos DES

Os DES usados neste projeto foram preparados conforme mencionado previamente e foram obtidos compostos líquidos, homogêneos e incolores. Além disso, outra propriedade observada foi uma maior viscosidade comparada a solventes orgânicos convencionais. Na Figura 6 está representada uma imagem do DES formado a partir dos componentes mentol e ácido decanóico.

O tempo de preparo variou de acordo com o volume final desejado, para o preparo de aproximadamente 5 mL o tempo de aquecimento foi inferior a 10 minutos. Quando foi necessário o preparo de volumes maiores, entre 10 e 15 mL, o aquecimento foi em torno de 15 minutos.

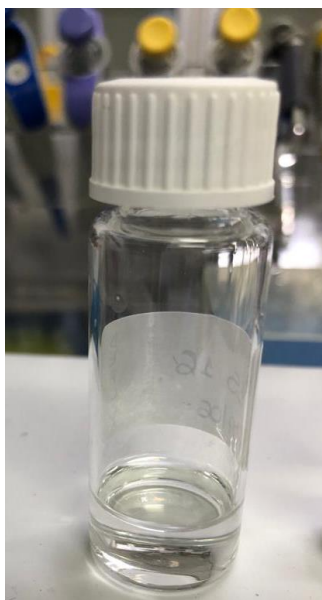


Figura 6. Imagem de um dos DES produzidos neste estudo. Mistura de Mentol:Ácido Decanóico

4.2 Caracterização dos DES

Espectroscopia no Infravermelho

Após o preparo dos DES formados por mentol:ácido decanóico e mentol:ácido octanóico, foram obtidos os espectros de infravermelho apresentados nas Figuras 7 e 8, respectivamente. Onde (a) e (b) de ambas as figuras são os componentes individuais e (c) são os DES produzidos após a mistura entre HBD e HBA. É possível observar, por meio de comparação entre

(a)/(b) com (c) a presença dos picos característicos (74) de ligações dos grupos funcionais da estrutura dos componentes percussores. Após a ligação, há deslocamento das ligações que são evidenciados nos espectros (c). Para o mentol, o grupo -OH livre de ligação com outras moléculas presente em sua estrutura, é evidenciado na região de vibração da ligação em torno de 3400 a 3300 cm^{-1} , o estiramento de C-H está presente na região de 2900 cm^{-1} . No caso dos ácidos carboxílicos, o grupo carbonila é evidenciado pela vibração da ligação C=O em 1725 a 1700 cm^{-1} e os picos de estiramentos de C-H na região de 2900 cm^{-1} . Nos espectros (c) de ambos os solventes produzidos, as vibrações dos grupos -OH em torno da região de 3400 cm^{-1} estão menos pronunciados do que no espectro do mentol analisado individualmente. Indicando a ligação do grupo com o grupo funcional do ácido carboxílico, e assim, evidenciando a formação da ligação no preparo do solvente. É possível observar, também, a presença dos grupos carbonila em (c) nas regiões levemente deslocadas de (b), indicando também, a possível interação entre as moléculas dos ácidos com o mentol e consequente ligação de H.

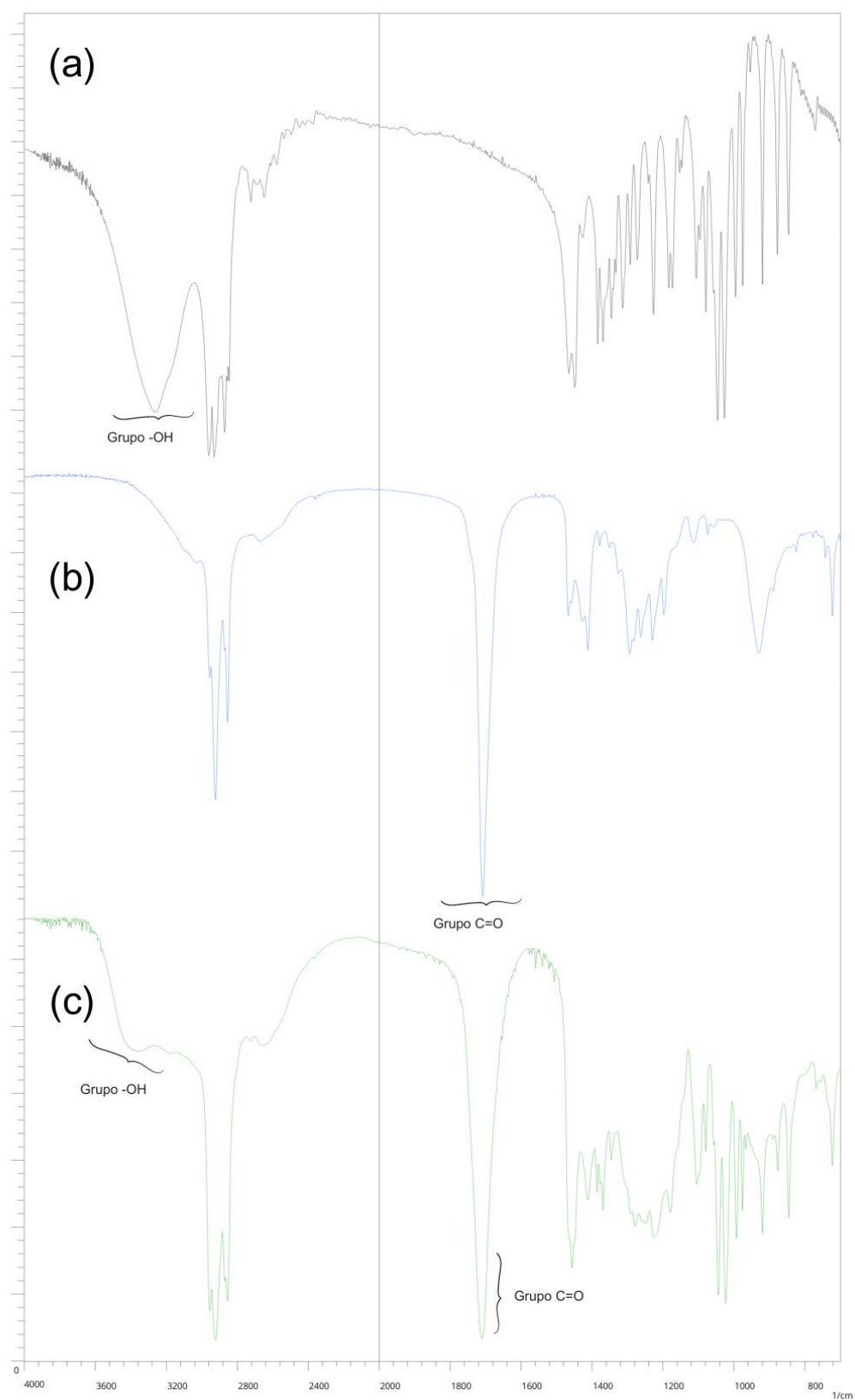


Figura 7. Espectro de infravermelho do DES mentol:ácido decanóico, onde (a) Mentol, (b) Ácido Decanóico e (c) DES produzido.

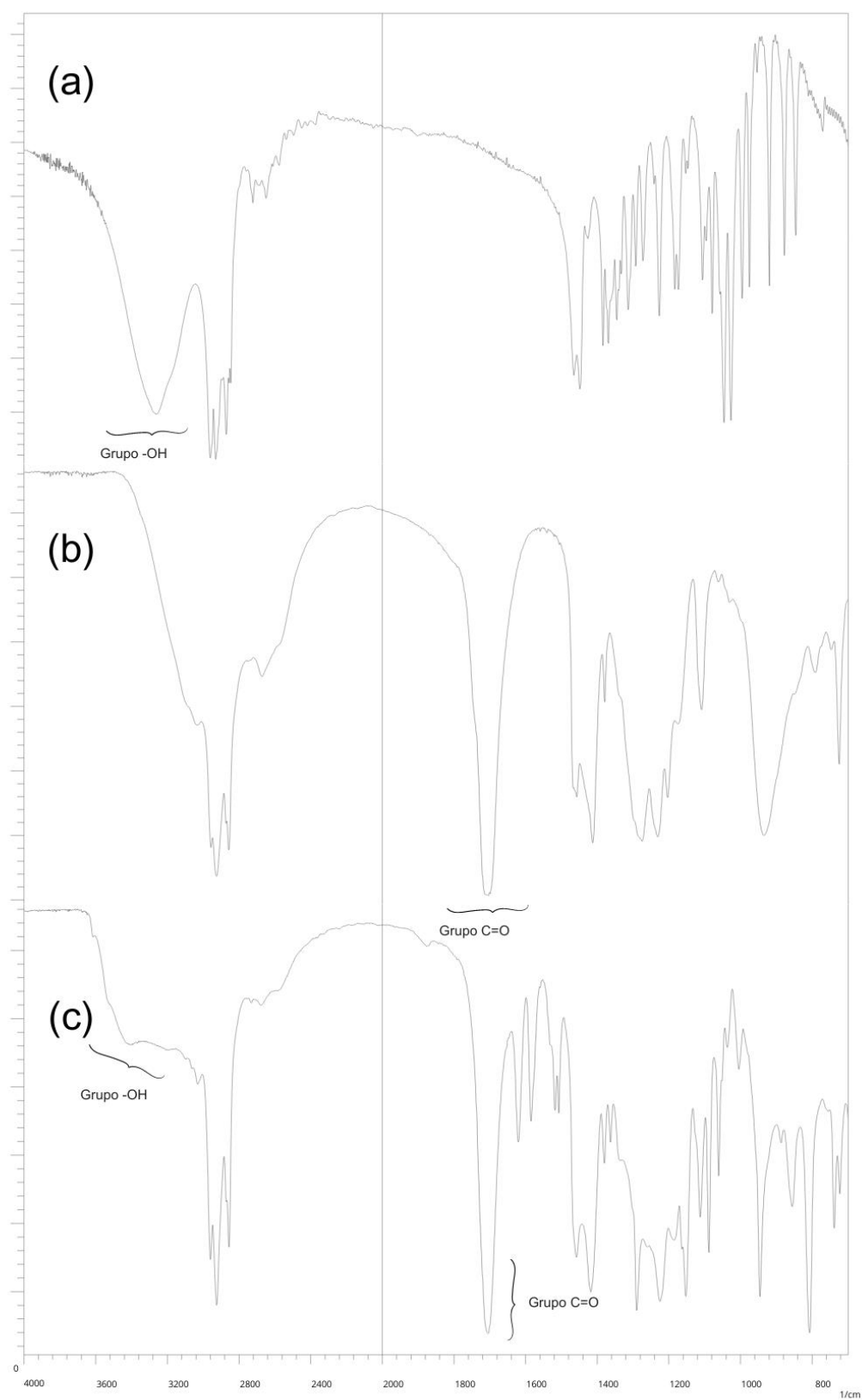


Figura 8. Espectro de infravermelho do DES mentol:ácido octanóico, onde (a) Mentol, (b) Ácido Octanóico e (c) DES produzido.

4.3 Método HPLC-DAD utilizado para as análises

As condições de separação cromatográficas foram definidas como separação por eluição isocrática, ou seja, com a composição da fase móvel constante ao longo de toda a corrida. Foram observados que os analitos foram separados de forma eficiente, sem a coeluição dos picos quando analisados juntos. Então, foi definido a separação com 60% de ACN e 40% de água tipo I como fase móvel.

Os cromatogramas dos analitos estão apresentados na Figura 9, todos com concentração de 10 mg L^{-1} , onde constam o (a) estriol com tempo de retenção próximo a 2,5 minutos, (b) estradiol com tempo de retenção próximo a 4,6 minutos e (c) estrona com tempo de retenção próximo a 6,1 minutos. Na Figura 10 está o cromatograma dos analitos juntos na concentração de 10 mg L^{-1} , em forma de mistura dos padrões, com a separação evidente deles, nos tempos aproximados observados na análise individual.

Além disso, o tempo total de corrida é de aproximadamente 20 minutos, apresentando tempo maior quando comparado com a eluição do último analito em aproximadamente 6,1 minutos. Optou-se pelo maior tempo para garantir a limpeza do sistema antes da injeção de novas amostras, para evitar contaminações entre as corridas.

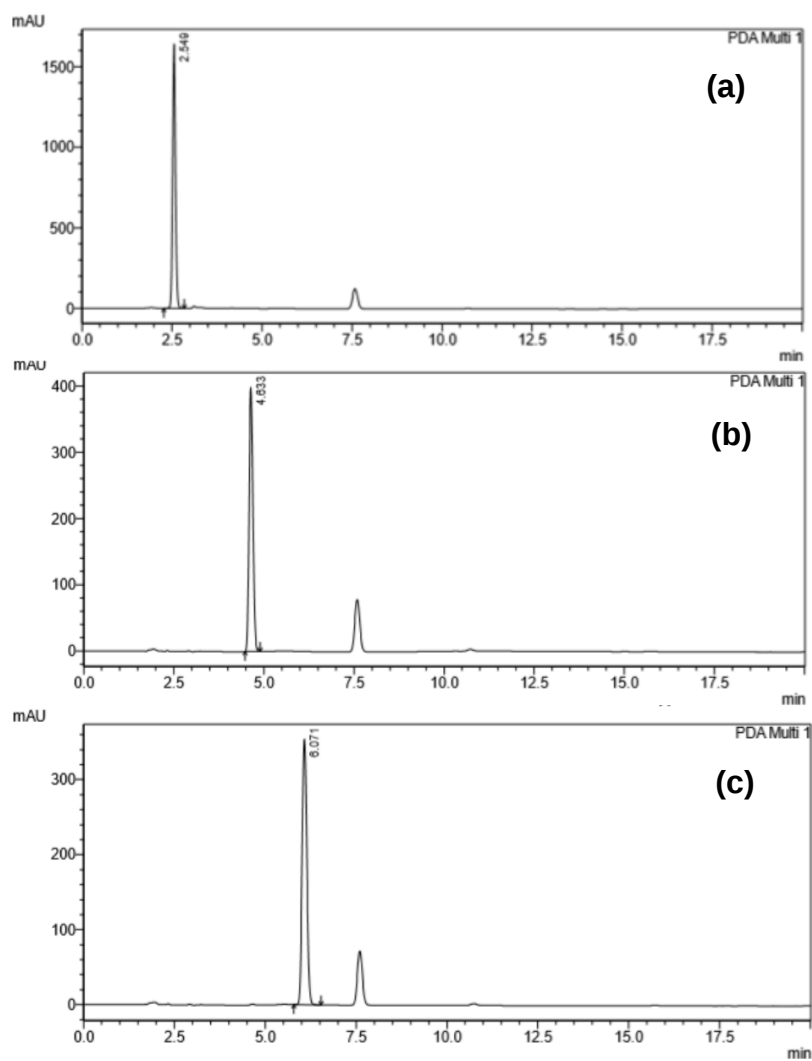


Figura 9. Cromatograma dos analitos, onde (a) Estriol com pico em aproximadamente 2,5 minutos, (b) Estradiol com pico em aproximadamente 4,6 minutos e (c) Estrona com pico aproximadamente 6,1 minutos.

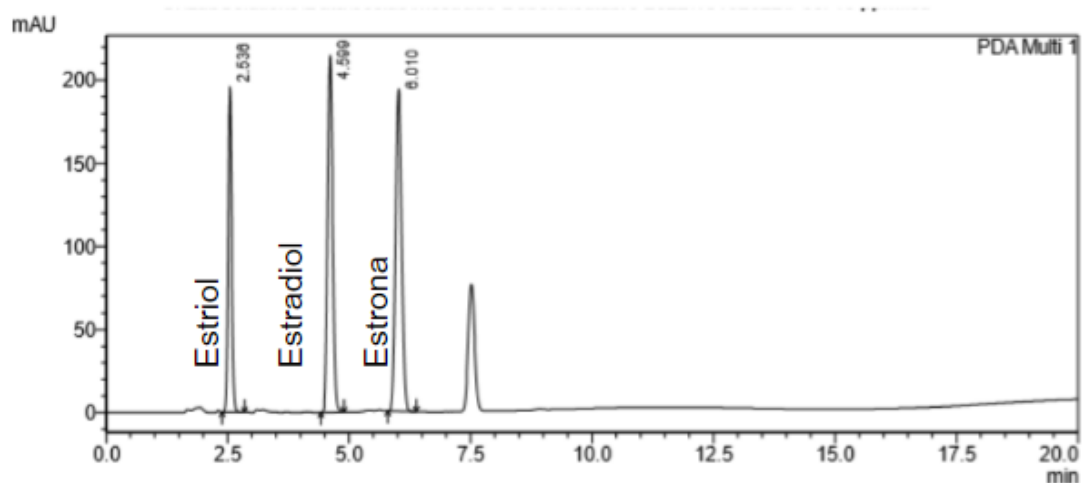


Figura 10. Cromatograma com a mistura dos três analitos em solução, na seguinte ordem de eluição: Estriol, Estradiol e Estrona.

4.4 Análise do DES por HPLC-DAD

O DES formado por mentol:ácido decanóico apresentou melhor desempenho após uma avaliação inicial; desta forma, foi analisado no HPLC-DAD para fins de observação do perfil cromatográfico relacionado ao solvente. O cromatograma está representado na Figura 11 e é possível observar que não há a presença de picos oriundos do DES nos tempos de retenção dos analitos.

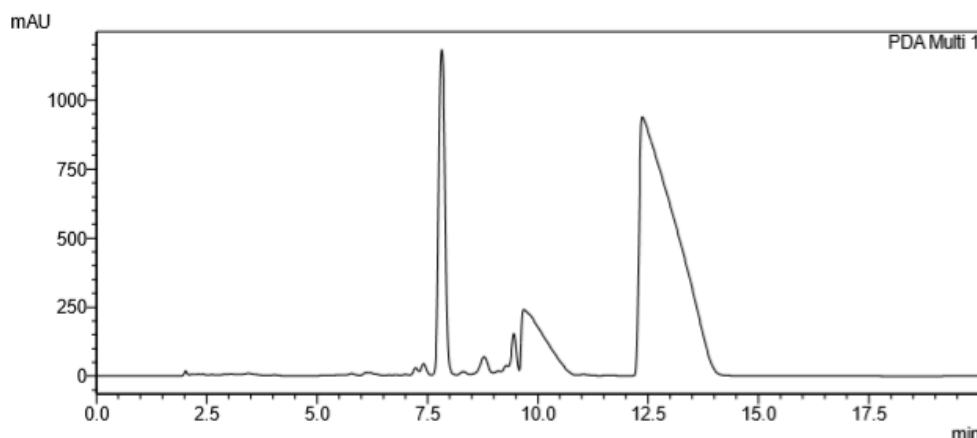


Figura 11. Cromatograma do DES formado por mentol:ácido decanóico no equipamento instrumental HPLC-DAD, nas condições otimizadas de separação cromatográfica

4.5 Teste de solubilidade em urina e ACN

Tendo em vista a necessidade por fases extratoras estáveis durante o procedimento de microextração, o DES foi também avaliado em termos de solubilidade na amostra bem como em solvente orgânico. A imagem da Figura 12 (a) demonstra que o DES apresentou-se pouco solúvel em urina. Neste caso, é possível observar a formação de duas fases imiscíveis, onde a fase inferior é a urina e a fase superior é o solvente. As fases são mantidas estáveis e separadas mesmo após a agitação do frasco. Já em ACN, o DES mostrou-se solúvel, como está representado na Figura 12 (b). Assim, o indicativo é de que o DES apresenta caráter hidrofóbico.

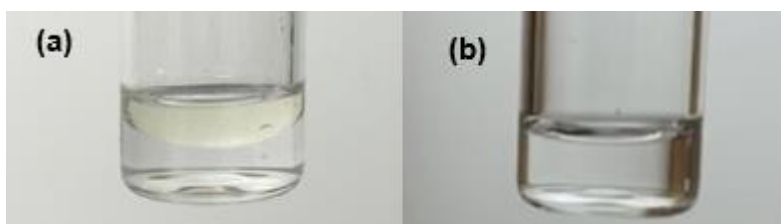


Figura 12. Teste de solubilidade do DES em (a) urina e (b) ACN

4.6 Otimização mediante planejamento fatorial completo

Após as extrações mediante planejamento experimental multivariado disposto anteriormente, utilizou-se as áreas obtidas nas extrações dos analitos e através das médias geométricas desses dados. Neste caso os resultados foram devidamente tratados e foi obtido o gráfico de Pareto mostrado na Figura 13. Essa ferramenta é particularmente interessante para discriminar as variáveis ou interações entre variáveis que apresentam significância estatística na resposta analítica.

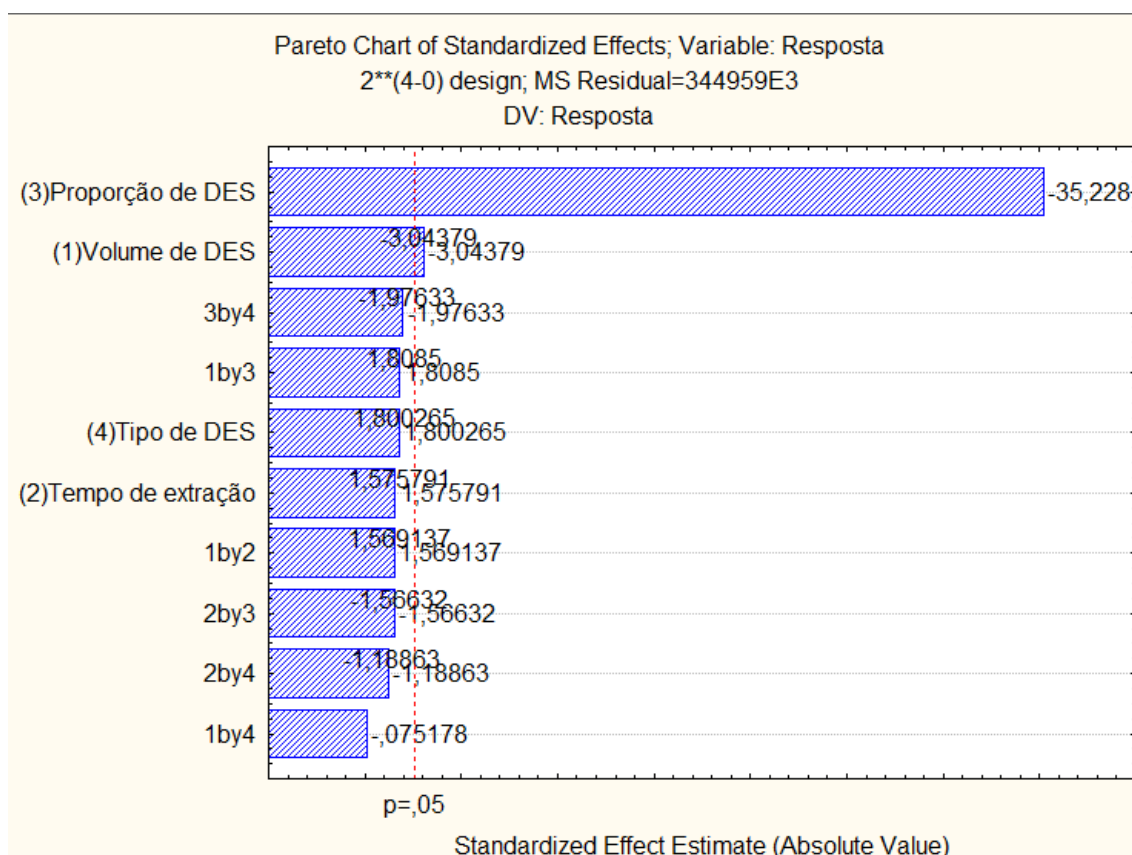


Figura 13. Gráfico de Pareto com as variáveis utilizadas na otimização

De acordo com o gráfico de Pareto da Figura 13, algumas variáveis apresentaram influência significativa no procedimento de extração (nível de confiança de 95%). No caso da proporção de DES que foi utilizado na extração, essa variável exibiu significativo efeito com valor negativo, indicando que as proporções 1:1 de HBA:HBD fornecem as melhores respostas cromatográficas quando comparadas com a proporção 1:2 de HBA:HBD. Mesmo apresentando um efeito positivo, o tipo de DES e o tempo de extração no ultrassom não apresentaram influência significativa na resposta cromatográfica.

O volume de DES usado na extração também apresentou influência significativa na resposta analítica com efeito de valor negativo. Tendo em vista que o menor valor avaliado nesta etapa foi 150 μ L optou-se por uma avaliação mais detalhada de forma univariada com os volumes de 100, 150 e 200 μ L de solvente, os resultados das áreas cromatográficas são apresentados na Figura 14. É possível observar que com a utilização de 150 μ L de solvente, a resposta cromatográfica foi maior quando comparada com os outros volumes.

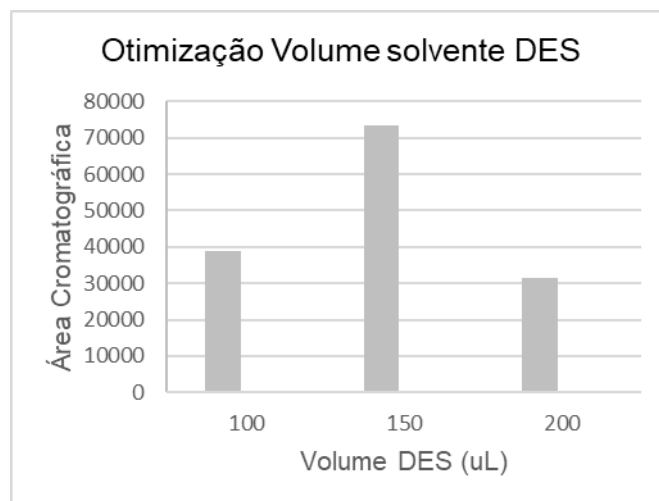


Figura 14. Gráfico de barras da otimização do volume de DES utilizado na extração. Relacionando as das médias geométricas das áreas cromatográficas dos analitos e o volume de solvente utilizado na extração

As condições otimizadas foram definidas como 150 μ L de solvente extrator, 3 minutos de extração em banho de ultrassom, solvente na razão molar 1:1 e composição de mentol:ácido decanóico.

4.7 Validação do método analítico

Após a otimização das condições experimentais de extração e definição do método de separação cromatográfica, foram obtidos os parâmetros analíticos de mérito para a determinação dos hormônios estriol, estrona e estradiol em urina. Neste caso, foram avaliadas faixa linear, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), exatidão, repetibilidade, e coeficiente de determinação (R^2).

Os dados obtidos a partir da construção de curvas analíticas através das extrações realizadas em amostras de urina diluída (1:10) isentas dos analitos, são descritos na Tabela 4 a seguir. Para a construção das curvas, as amostras já diluídas, foram fortificadas com concentrações conhecidas dos padrões dos analitos, sendo (25, 50, 75, 100, 250, 500 e 750) μ g L⁻¹ para estriol e estradiol e, para estrona (75, 100, 250, 500 e 750) μ g L⁻¹. Na Tabela 4 constam os resultados de validação do método.

Tabela 4. Parâmetros obtidos no método proposto de UALLME e DES mentol : ácido decanóico

Analito	Faixa Linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Equação da reta	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	R^2	Repetibilidade (n=3)		RSD %		Exatidão (%) em 100 $\mu\text{g L}^{-1}$
						25 $\mu\text{g L}^{-1}$	75 $\mu\text{g L}^{-1}$	250 $\mu\text{g L}^{-1}$	750 $\mu\text{g L}^{-1}$	
Estriol	25 -750	y=305,14 67 - 9452,14	8	25	0,992	8	-	3	4	97
Estradiol	25 -750	y=349,30 63 - 4352,88	8	25	0,99	9	-	8	6	119
Estrona	75 -750	y=348,98 53 - 30479,3	23	75	0,95	-	9	14	5	96

De acordo com a Tabela 4, os valores de LOD e o LOQ para os analitos estriol e estradiol foram (8 e 25) $\mu\text{g L}^{-1}$, e para estrona (23 e 75) $\mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente. Os coeficientes de determinação (R^2) foram de 0,992, 0,990 e 0,950, para estriol, estradiol e estrona. Em relação a precisão do método, avaliada no mesmo dia (n=3), os resultados foram de 3 a 14% para os analitos. Em relação a exatidão, as recuperações obtidas foram de 97, 119 e 96% para estriol, estradiol e estrona, respectivamente.

De acordo com o guia de validação de métodos bioanalíticos (75), os desvios padrões relativos (RSD%) aceitáveis não devem ultrapassar dos 15% e os valores de recuperação para avaliação da exatidão, devem estar entre 15% dos valores nominais, ou seja, na faixa de 85 a 115% de recuperação.

4.8 Simulações por Dinâmica Molecular

Analisando o perfil de densidade dos componentes da mistura (água, DES e analito) na Figura 15, podemos verificar regiões bem distintas separando água e DES, enquanto o analito está na parte central do DES. Isso mostra que os analitos são retirados da água e ficam retidos no DES.

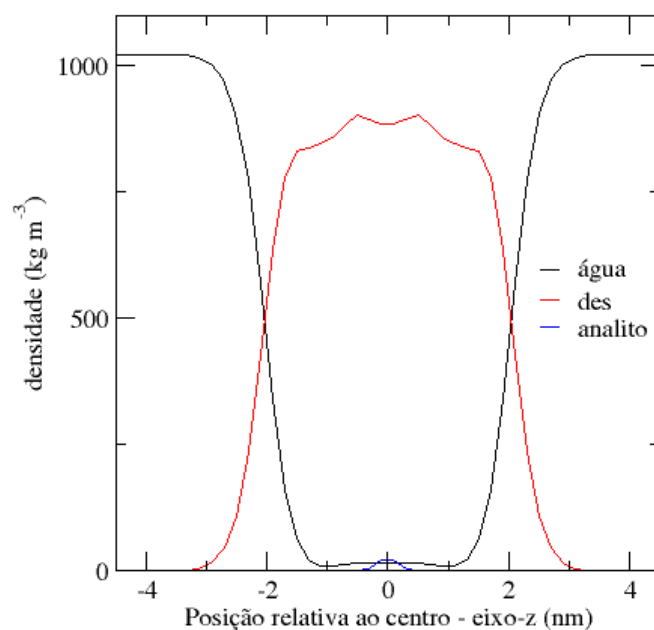


Figura 15. Perfil de densidade dos componentes do sistema ao longo do eixo-z.

Além disso, na Figura 16 a seguir, está representado o sistema após a mistura, onde os analitos se encontram somente no solvente, sendo indicativo de preferência pelo solvente do que pela água.

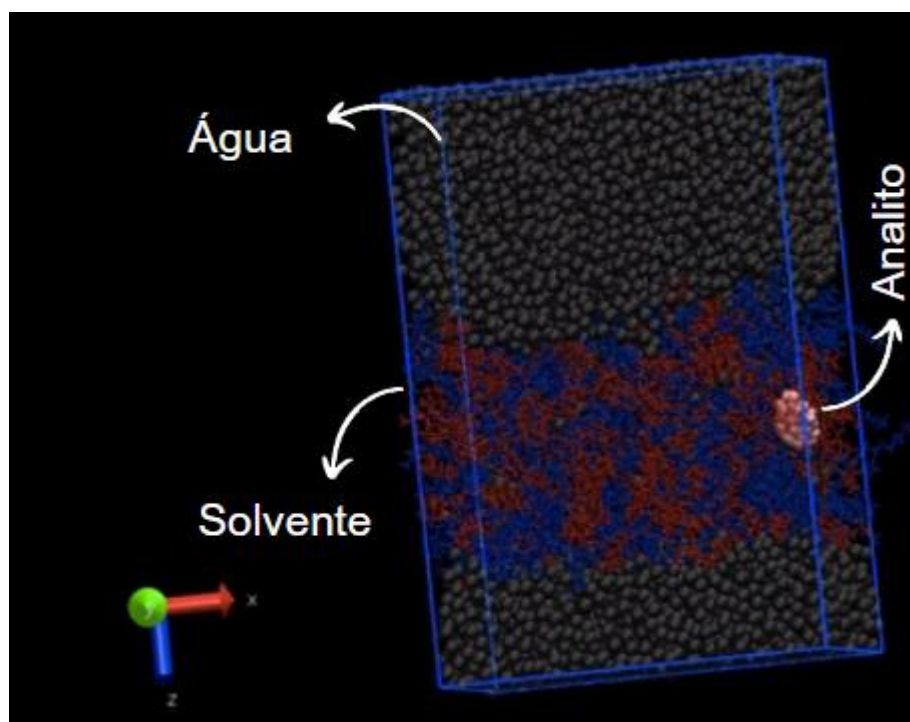


Figura 16. Representação do sistema com a migração do analito para o solvente e separação das fases com a água.

Nas Figuras 17, 19 e 21 foram apresentadas as curvas de distribuição radial dos componentes do DES (ácido decanóico e mentol) e da água ao redor do estradiol, estriol e estrona, respectivamente. Para todos os analitos verificou-se uma maior quantidade de mentol nas vizinhanças dos analitos. Nos casos de analitos como o estradiol e o estriol, o pico da primeira esfera de solvatação entre 0,15 e 0,30 nm mostra que a população de moléculas de mentol é, aproximadamente, cinco vezes maior que de ácido decanóico ao redor do estradiol e quatro vezes maior na vizinhança do estriol. Por outro lado, essa diferença é bem menos pronunciada para a estrona. Esses resultados são corroborados pelas curvas de PMF, considerando os mesmos pares entre solventes e analitos. O PMF é um indicativo, qualitativo, da energia livre de interação entre duas espécies. Analisando esse resultado para o estradiol a interação entre analito-mentol é da ordem de, aproximadamente, -2500 J mol^{-1} mais forte que a interação analito-decanóico, essa última por sua vez é da mesma magnitude das interações analito-água (Figura 18). O comportamento é muito similar para os outros sistemas (Figuras 20 e 22). Esse é um indício de que a interação analito-mentol é determinante para a extração, e sugere como perspectiva o estudo com outras proporções entre os componentes do DES.

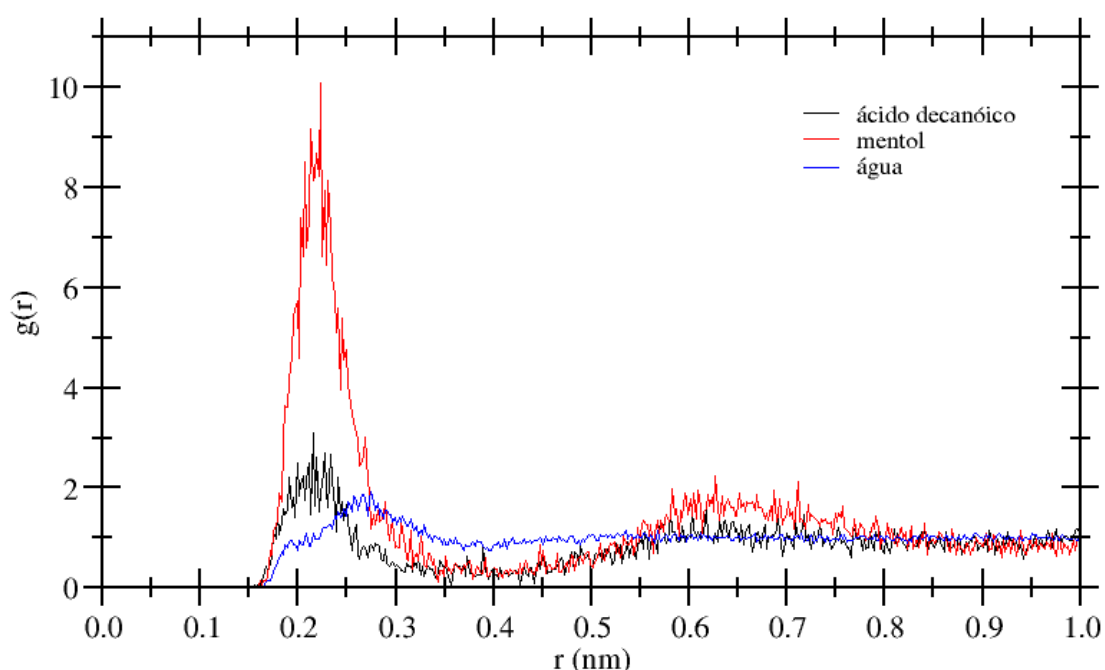


Figura 17. Distribuição radial para os diferentes componentes da mistura DES: água e o analito estradiol

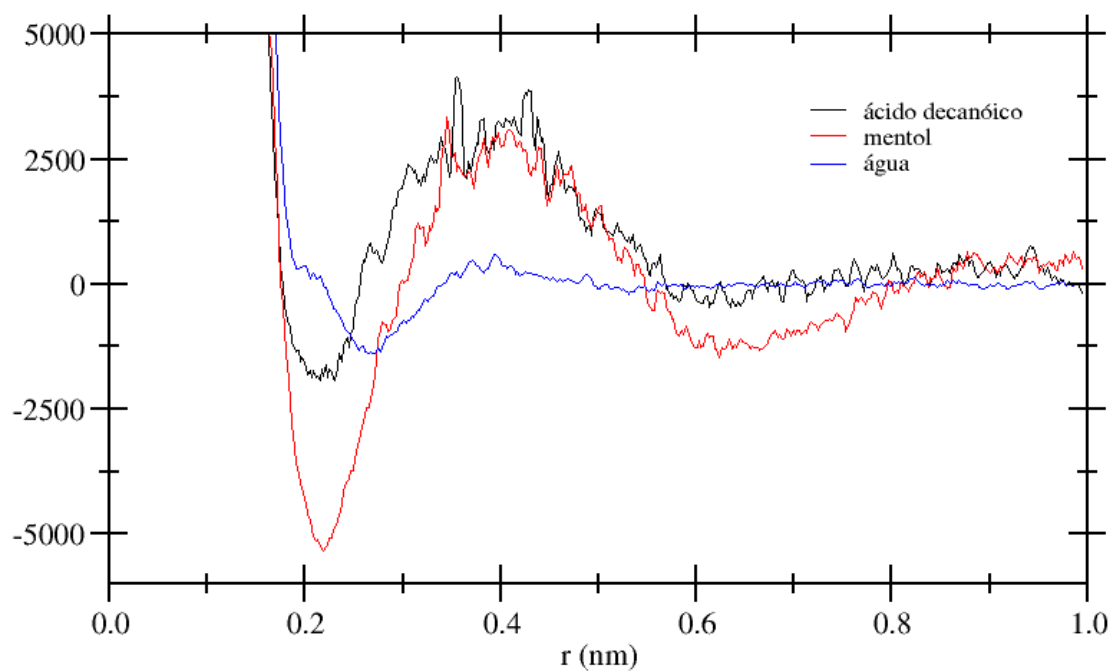


Figura 18. PMF entre os diferentes componentes da mistura DES:água e o analito estradiol.

PMF entre os diferentes componentes da mistura DES:água e o analito estradiol.

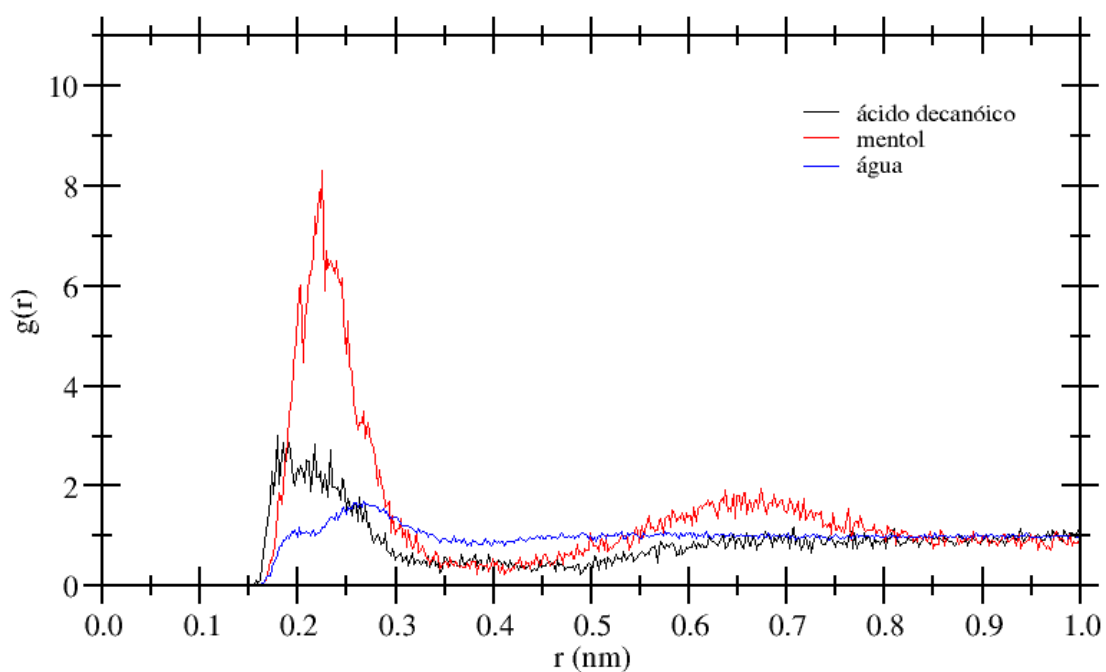


Figura 19. Distribuição radial para os diferentes componentes da mistura DES:água e o analito estradiol

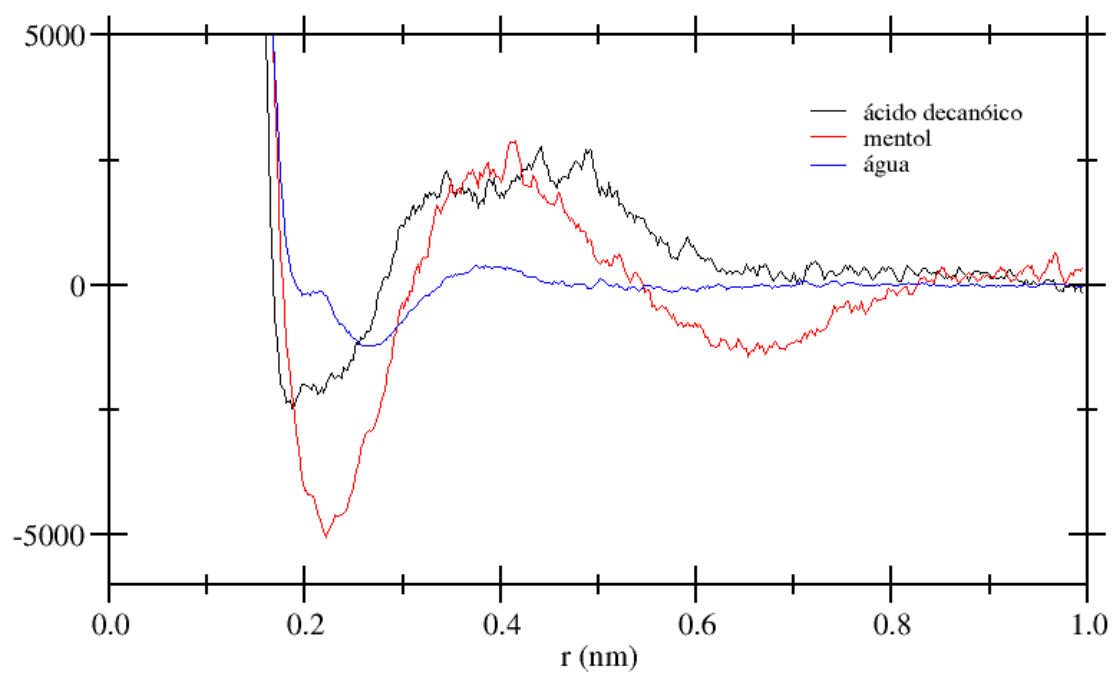


Figura 20. PMF entre os diferentes componentes da mistura DES:água e o analito estriol.

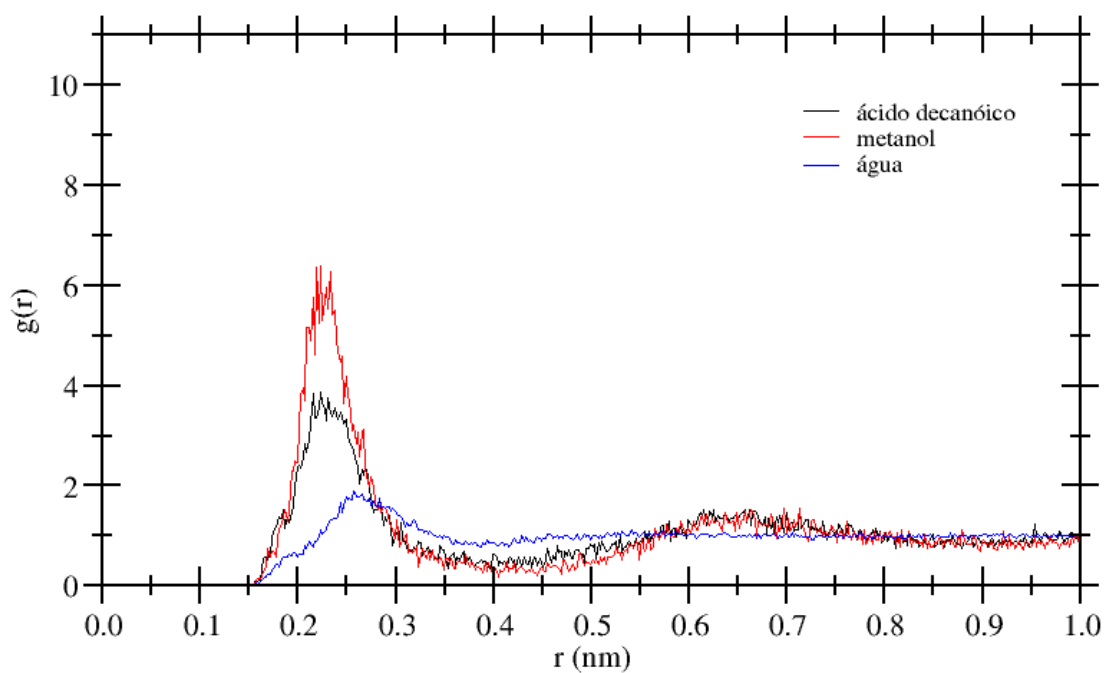


Figura 21. Distribuição radial para os diferentes componentes da mistura DES:água e o analito estrona

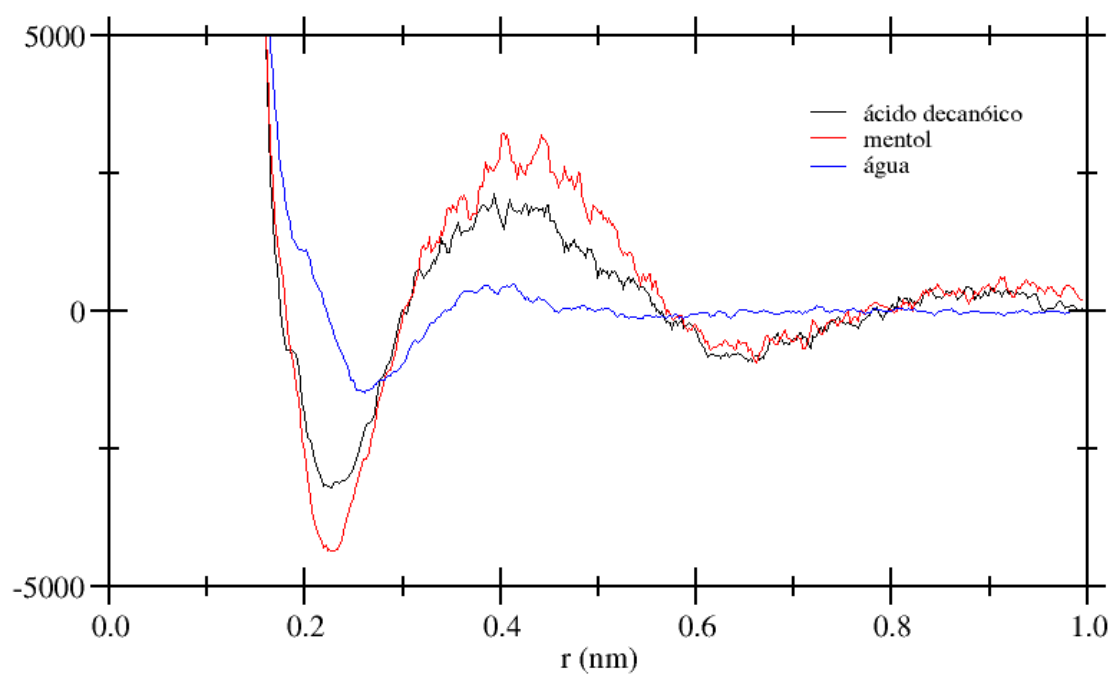


Figura 22. PMF entre os diferentes componentes da mistura DES:água e o analito estrona.

5 DISCUSSÃO

5.1 Caracterização dos DES

No trabalho, foram preparados solventes eutéticos profundos a partir da mistura de mentol com ácido decanóico e mentol com ácido octanóico. Os espectros de infravermelho dos componentes individuais apresentaram as bandas de absorção já esperados devido a estrutura química destes compostos. Os espectros dos solventes produzidos apresentaram as bandas características dos componentes ácidos e no caso da banda pico característica do estiramento da ligação -OH, este ficou menos pronunciado na mistura, indicando que o grupo funcional hidroxila não estava mais livre na molécula de mentol ligado ao ácido decanóico/octanóico, como no composto isolado, e, sim em interagindo com o HBD através de interação de hidrogênio. Com isso, constata-se que a interação de receptor e doador da ligação de H aconteceu na formação dos solventes.

Além disso, a aparência dos DES é semelhante ao relatado na literatura, com a formação de um líquido incolor, homogêneo e viscoso. Adicionalmente, é importante mencionar o fácil preparo do solvente com uma geração mínima de resíduos ou subprodutos.

5.2 Comportamento do DES como solvente em amostra biológica

O DES produzido apresentou propriedades hidrofóbicas, sendo possível a observação de duas fases quando posto em contato com urina. Além disso, o composto produzido apresentou solubilidade em solvente orgânico, por isso, apresentou potencial para a utilização como fase extratora em matrizes aquosas, uma vez que se necessita que essa fase seja insolúvel para ser retirada adequadamente da amostra aquosa após o procedimento de extração. Cabe ressaltar a importância de o DES ter alta solubilidade em fase orgânica, tendo em vista que o mesmo é diretamente inserido no instrumento para análise.

Além de todas as características físico-químicas desejáveis de uma boa fase extratora, o DES foi capaz de extrair os analitos da amostra de urina. Este fato, pode ser evidenciado através de comparação de cromatogramas, representado na Figura 22. Nesta figura estão comparados os cromatogramas

obtidos de uma solução contendo os três analitos com solvente orgânico ACN e o cromatograma após a extração utilizando o DES em uma amostra de urina diluída (1:10) fortificada com a solução dos analitos em concentração de $500 \mu\text{g L}^{-1}$. Os analitos presentes no extrato estão no mesmo tempo de retenção do que os analitos presentes na solução utilizada como padrão, indicando extração.

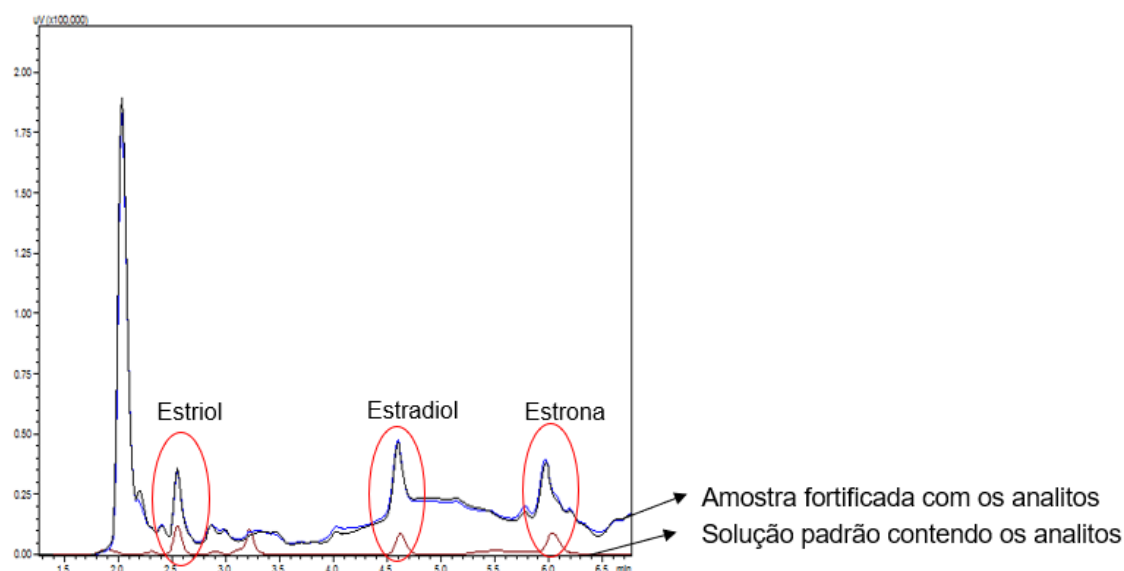


Figura 23. Cromatogramas de uma solução padrão de hormônios com concentração de 1 mg L^{-1} e de uma extração utilizando DES em amostra de urina fortificada com os analitos com concentração de $500 \mu\text{g L}^{-1}$

5.3 Determinação de hormônios esteroides em urina utilizando DES

Os dados da Tabela 4 indicam a extração dos analitos em urina com DES através da técnica UALLME, com % de RSD satisfatórios, de 5 a 14%, os resultados encontrados estão dentro dos limites indicados nos guias analíticos.

As recuperações da exatidão não se mostraram de acordo com os valores indicados no guia para o analito, sendo 119%. Nesse caso, estudos próximos são interessantes para aprimorar as extrações e diminuir essas taxas. Mas, nos outros analitos, os valores estão dentro das faixas aceitáveis, indicando a boa recuperação obtida na análise com os valores nominais de concentração previstos.

Outras técnicas de extração em urina com solventes verdes e clorados, hormônios estrogênicos como analitos, estão apresentados na Tabela 5 a seguir em comparação com os dados obtidos no trabalho. Foram selecionadas as

seguintes características para as comparações: analitos determinados, técnica de extração utilizada, LOD, tempo de extração, volume de solvente empregado na metodologia e equipamento instrumental utilizado para as análises.

Tabela 5. Comparação dos dados obtidos em diferentes metodologias de extração com o trabalho desenvolvido.

Analito	Técnica	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Tempo de extração (min)	Solvente extrator	Volume Solvente (μL)	Equipamento	Ref.
17- β -Estradiol	DLLME	250	1	CCl_4	600	HPLC - UV	(76)
Estriol 17- β -Estradiol Estrona	VA-DLLME-FOA*	0,01 e 0,06	6	Ácido nonanóico	150	HPLC - FLD	(77)
17- β -Estradiol Estrona	UACPE**	0,1 0,2	60	Tergitol TMN-6	500	HPLC - DAD	(78)
Estriol 17- α -ethynylestra diol 17- β -Estradiol Estrona	DLLME/MIL	2	1,5	$[\text{P}_{6,6,6,14}^{+}]2[\text{MnCl}_4^{2-}]$	8	HPLC-DAD	(9)
Estriol 17- β -Estradiol Estrona	UALLME	8 23	3	Mentol: Ácido decanóico	150	HPLC-DAD	-

* Microextração líquido-líquido dispersiva assistida por vórtex baseado em ácido orgânico flutuante

**Extração em ponto de nuvem assistida por ultrassom

Com os dados apresentados na Tabela 5, o método proposto utilizando o solvente DES apresenta tempos de extração satisfatórios (3 minutos), volume de solvente (150 μL) e LOD (8 e 25 $\mu\text{g L}^{-1}$) menores quando comparados a algumas das técnicas. Em todos os trabalhos o solvente utilizado é diferente, sendo um desafio fazer comparações diretas das metodologias. Porém, com os dados obtidos, é possível constatar que o método desenvolvido no presente estudo tem potencial de utilização para a aplicação proposta.

As predições obtidas por meio de dinâmica molecular demonstraram interações presentes principalmente entre os hormônios e o mentol, sendo

possível verificar uma maior afinidade dos hormônios com esse composto. Com base nesses resultados, tem-se como perspectiva a realização de experimentos produzindo DES com diferentes proporções de mentol, como 2:1. Assim espera-se obter maior extração dos analitos com o DES, utilizando como base as predições encontradas.

6 CONCLUSÕES

Neste trabalho, foi reportado o desenvolvimento de metodologias analíticas baseadas microextração em fase líquida com solventes eutéticos profundos para a determinação de esteroides em amostras de urina. A produção do solvente verde a partir de mentol e ácido decanóico apresentou praticidade e rapidez de preparo, obtendo uma mistura límpida e homogênea, porém viscosa em comparação aos solventes clássicos, mas essa propriedade não trouxe problemas instrumentais ao equipamento. O solvente produzido foi capaz de ser extraído da matriz aquosa de urina, devido a separação de fases.

As extrações foram avaliadas através dos dados obtidos nas extrações de urina diluída (1:10) fortificada com os analitos, variando de 25 a 750 $\mu\text{g L}^{-1}$ de faixa linear. Os resultados de LOD (8 e 23 $\mu\text{g L}^{-1}$) foram comparados com outras técnicas que avaliaram a extração dos analitos, porém com solventes e técnicas de extração diferentes, resultando em valores satisfatórios. Além disso, o desempenho analítico foi promissor quanto à precisão e recuperações dos analitos nas extrações.

Há potencial de formação de diversos tipos de DES devido a variação dos componentes da mistura e proporção deles, sendo assim, aumentando a aplicabilidade do desenvolvimento e utilização de metodologias analíticas com os solventes em matriz biológica, como a urina. Ainda, novos estudos podem ser realizados para a diminuição dos limites de quantificação e detecção do método, uma vez que a utilização dos solventes produzidos no trabalho é vantajosa pelo fácil e rápido preparo deles, mas ainda assim, é interessante avaliar as diferentes proporções nas composições produzidas, uma vez que na otimização variou-se a proporção de apenas um componente. Com base no presente estudo e com os dados obtidos através da simulação por dinâmica molecular, tem-se como perspectivas produzir novos DES com os mesmos componentes, porém com diferentes variações de proporções de HBA:HBD, visando uma maior eficiência de extração devido a possibilidade de interação solvente-analito ser maior.

7 REFERÊNCIAS

1. Bajkacz S, Adamek J. Development of a Method Based on Natural Deep Eutectic Solvents for Extraction of Flavonoids from Food Samples. *Food Anal Methods* [Internet]. 2018 May 2;11(5):1330–44. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12161-017-1118-5>
2. Carbonell-Rozas L, Canales R, Lara FJ, García-Campaña AM, Silva MF. A natural deep eutectic solvent as a novel dispersive solvent in dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic droplet for the determination of pesticide residues. *Anal Bioanal Chem* [Internet]. 2021 Oct 19;413(25):6413–24. Available from: <https://link.springer.com/10.1007/s00216-021-03605-z>
3. Florindo C, Branco LC, Marrucho IM. Quest for Green-Solvent Design: From Hydrophilic to Hydrophobic (Deep) Eutectic Solvents. *ChemSusChem* [Internet]. 2019 Apr 23;12(8):1549–59. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cssc.201900147>
4. Souza-Silva ÉA, Reyes-Garcés N, Gómez-Ríos GA, Boyaci E, Bojko B, Pawliszyn J. A critical review of the state of the art of solid-phase microextraction of complex matrices III. Bioanalytical and clinical applications. *TrAC - Trends Anal Chem* [Internet]. 2015;71:249–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.017>
5. Honda L, Arismendi D, Richter P. Integration of rotating disk sorptive extraction and dispersive-solid phase extraction for the determination of estrogens and their metabolites in urine by liquid chromatography/mass spectrometry. *Microchem J* [Internet]. 2023 Feb;185:108273. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0026265X22011018>
6. Almazrouei B, Islayem D, Alskafi F, Catacutan MK, Amna R, Nasrat S, et al. Steroid hormones in wastewater: Sources, treatments, environmental risks, and regulations. *Emerg Contam* [Internet]. 2023 Jun;9(2):100210. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2405665023000082>

7. Ezhilarasan D. Critical role of estrogen in the progression of chronic liver diseases. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* [Internet]. 2020 Oct;19(5):429–34. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1499387220300722>
8. De Giorgi V, Gori A, Grazzini M, Rossari S, Scarfi F, Corciova S, et al. Estrogens, estrogen receptors and melanoma. *Expert Rev Anticancer Ther* [Internet]. 2011 May 10;11(5):739–47. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/era.11.42>
9. Merib J, Spudeit DA, Corazza G, Carasek E, Anderson JL. Magnetic ionic liquids as versatile extraction phases for the rapid determination of estrogens in human urine by dispersive liquid-liquid microextraction coupled with high-performance liquid chromatography-diode array detection. *Anal Bioanal Chem* [Internet]. 2018 Jul 8;410(19):4689–99. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-017-0823-7>
10. Scioscia G, Carpagnano GE, Lacedonia D, Soccio P, Quarato CMI, Trabace L, et al. The Role of Airways 17 β -Estradiol as a Biomarker of Severity in Postmenopausal Asthma: A Pilot Study. *J Clin Med* [Internet]. 2020 Jun 29;9(7):2037. Available from: <https://www.mdpi.com/2077-0383/9/7/2037>
11. Ruggiero RJ, Likis FE. ESTROGEN: PHYSIOLOGY, PHARMACOLOGY, AND FORMULATIONS FOR REPLACEMENT THERAPY. *J Midwifery Womens Health* [Internet]. 2002 May 6;47(3):130–8. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1016/S1526-9523%2802%2900233-7>
12. Ondieki AM, Birech Z, Kaduki KA, Kaingu CK, Ndeke AN, Namanya L. Biomarker Raman bands of estradiol, follicle-stimulating, luteinizing, and progesterone hormones in blood. *Vib Spectrosc* [Internet]. 2022 Sep;122:103425. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924203122000923>
13. Hilder TA, Hodgkiss JM. Molecular Mechanism of Binding between 17 β -Estradiol and DNA. *Comput Struct Biotechnol J* [Internet]. 2017;15:91–7.

Available

from:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2001037016300800>

14. Maskarinec G, Beckford F, Morimoto Y, Franke AA, Stanczyk FZ. Association of estrogen measurements in serum and urine of premenopausal women. *Biomark Med* [Internet]. 2015 May;9(5):417–24. Available from: <https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/bmm.15.10>
15. Zheng Y, Zhao H, Zhu L, Cai Z. Comprehensive identification of steroid hormones in human urine based on liquid chromatography-high resolution mass spectrometry. *Anal Chim Acta* [Internet]. 2019;1089:100–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.09.058>
16. Rosner W, Hankinson SE, Sluss PM, Vesper HW, Wierman ME. Challenges to the Measurement of Estradiol: An Endocrine Society Position Statement. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2013 Apr 1;98(4):1376–87. Available from: <https://academic.oup.com/jcem/article/98/4/1376/2536715>
17. Li J, Guan X, Fan Z, Ching L-M, Li Y, Wang X, et al. Non-Invasive Biomarkers for Early Detection of Breast Cancer. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2020 Sep 27;12(10):2767. Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6694/12/10/2767>
18. Prasad S, Tyagi AK, Aggarwal BB. Detection of inflammatory biomarkers in saliva and urine: Potential in diagnosis, prevention, and treatment for chronic diseases. *Exp Biol Med* [Internet]. 2016 Apr 24;241(8):783–99. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1535370216638770>
19. Gea M, Toso A, Schilirò T. Estrogenic activity of biological samples as a biomarker. *Sci Total Environ* [Internet]. 2020;740:140050. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140050>
20. Gałuszka A, Migaszewski Z, Namieśnik J. The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. *TrAC Trends Anal Chem* [Internet]. 2013 Oct;50:78–

84. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993613001234>
21. Aly A, Górecki T. Green Approaches to Sample Preparation Based on Extraction Techniques. *Molecules* [Internet]. 2020 Apr 9;25(7):1719. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/7/1719>
22. Moreau RL., De Siqueira MEPB. *Ciências Farmacêuticas: Toxicologia Analítica*. 2nd ed. Guanabara Koogan, editor. Rio de Janeiro; 2017. 313 p.
23. Ramezani AM, Ahmadi R, Yamini Y. Homogeneous liquid-liquid microextraction based on deep eutectic solvents. *TrAC Trends Anal Chem* [Internet]. 2022 Apr;149:116566. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993622000498>
24. Lamei N, Ezoddin M, Ardestani MS, Abdi K. Dispersion of magnetic graphene oxide nanoparticles coated with a deep eutectic solvent using ultrasound assistance for preconcentration of methadone in biological and water samples followed by GC–FID and GC–MS. *Anal Bioanal Chem* [Internet]. 2017 Oct 26;409(26):6113–21. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-017-0547-8>
25. Soares da Silva Burato J, Vargas Medina DA, Toffoli AL, Vasconcelos Soares Maciel E, Mauro Lanças F. Recent advances and trends in miniaturized sample preparation techniques. *J Sep Sci* [Internet]. 2020 Jan 23;43(1):202–25. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jssc.201900776>
26. Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen KE. Liquid–Liquid–Liquid Microextraction for Sample Preparation of Biological Fluids Prior to Capillary Electrophoresis. *Anal Chem* [Internet]. 1999 Jul 1;71(14):2650–6. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac990055n>
27. Rezaee M, Assadi Y, Milani Hosseini M-R, Aghaee E, Ahmadi F, Berijani S. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid–liquid microextraction. *J Chromatogr A* [Internet]. 2006 May;1116(1–2):1–

9. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967306005280>
28. Carasek E, Morés L, Merib J. Basic principles, recent trends and future directions of microextraction techniques for the analysis of aqueous environmental samples. *Trends Environ Anal Chem* [Internet]. 2018;19:e00060. Available from:
<https://doi.org/10.1016/j.teac.2018.e00060>
29. Musarurwa H, Tavengwa NT. Homogenous liquid-liquid micro-extraction of pollutants in complex matrices. *Microchem J* [Internet]. 2021 Nov;170:106750. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0026265X21008365>
30. Pacheco-Fernández I, Pino V. Green solvents in analytical chemistry. *Curr Opin Green Sustain Chem* [Internet]. 2019 Aug;18:42–50. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2452223618301391>
31. Ahmadi R, Azooz EA, Yamini Y, Ramezani AM. Liquid-liquid microextraction techniques based on in-situ formation/decomposition of deep eutectic solvents. *TrAC Trends Anal Chem* [Internet]. 2023;161:117019. Available from:
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2023.117019>
32. Carasek E, Bernardi G, Morelli D, Merib J. Sustainable green solvents for microextraction techniques: Recent developments and applications. *J Chromatogr A* [Internet]. 2021;1640:461944. Available from:
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.461944>
33. Trujillo-Rodríguez MJ, Nan H, Varona M, Emaus MN, Souza ID, Anderson JL. Advances of Ionic Liquids in Analytical Chemistry. *Anal Chem* [Internet]. 2019 Jan 2;91(1):505–31. Available from:
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.analchem.8b04710>
34. Musarurwa H, Tavengwa NT. Emerging green solvents and their applications during pesticide analysis in food and environmental samples. *Talanta* [Internet]. 2021 Feb;223:121507. Available from:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914020307980>

35. Arghavani-Beydokhti S, Rajabi M, Asghari A, Hosseini-Bandegharai A. Highly efficient preconcentration of anti-depressant drugs in biological matrices by conducting supramolecular solvent-based microextraction after dispersive micro solid phase extraction technique. *Microchem J* [Internet]. 2023 Jul;190:108703. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0026265X23003211>
36. Memarbashi Avval M, Khani R. Eco-friendly and affordable trace quantification of riboflavin in biological and food samples using a supramolecular solvent based liquid–liquid microextraction. *J Mol Liq* [Internet]. 2022 Sep;362:119725. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167732222012636>
37. Santos LB, Assis RS, Barreto JA, Bezerra MA, Novaes CG, Lemos VA. Deep eutectic solvents in liquid-phase microextraction: Contribution to green chemistry. *TrAC Trends Anal Chem* [Internet]. 2022 Jan;146:116478. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993621003010>
38. Liu Y, Xu W, Zhang H, Xu W. Hydrophobic deep eutectic solvent-based dispersive liquid–liquid microextraction for the simultaneous enantiomeric analysis of five β -agonists in the environmental samples. *Electrophoresis* [Internet]. 2019 Nov 15;40(21):2828–36. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/elps.201900149>
39. Abbott AP, Capper G, Davies DL, Rasheed RK, Tambyrajah V. Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures Electronic supplementary information (ESI) available: spectroscopic data. See <http://www.rsc.org/suppdata/cc/b2/b210714g/>. *Chem Commun* [Internet]. 2003 Dec 19;(1):70–1. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b210714g>
40. Abbott AP, Capper G, Davies DL, Munro HL, Rasheed RK, Tambyrajah V. Preparation of novel, moisture-stable, Lewis-acidic ionic liquids containing quaternary ammonium salts with functional side chains. *Chem Commun* [Internet]. 2001;(19):2010–1. Available from:

<http://xlink.rsc.org/?DOI=b106357j>

41. Abbott AP, Capper G, Davies DL, Rasheed RK, Tambyrajah V. Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. *Chem Commun* [Internet]. 2003 Dec 19;(1):70–1. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b210714g>
42. Tang W, An Y, Row KH. Emerging applications of (micro) extraction phase from hydrophilic to hydrophobic deep eutectic solvents: opportunities and trends. *TrAC - Trends Anal Chem* [Internet]. 2021;136:116187. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116187>
43. Zainal-Abidin MH, Hayyan M, Hayyan A, Jayakumar NS. New horizons in the extraction of bioactive compounds using deep eutectic solvents: A review. *Anal Chim Acta* [Internet]. 2017;979:1–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2017.05.012>
44. Farooq MQ, Abbasi NM, Anderson JL. Deep eutectic solvents in separations: Methods of preparation, polarity, and applications in extractions and capillary electrochromatography. *J Chromatogr A* [Internet]. 2020;1633:461613. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461613>
45. Perna FM, Vitale P, Capriati V. Deep eutectic solvents and their applications as green solvents. *Curr Opin Green Sustain Chem* [Internet]. 2020 Feb;21:27–33. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2452223619300458>
46. Li K, Jin Y, Jung D, Park K, Kim H, Lee J. In situ formation of thymol-based hydrophobic deep eutectic solvents: Application to antibiotics analysis in surface water based on liquid-liquid microextraction followed by liquid chromatography. *J Chromatogr A* [Internet]. 2020 Mar;1614:460730. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967319311628>
47. Dai Y, van Spronsen J, Witkamp GJ, Verpoorte R, Choi YH. Natural deep

- eutectic solvents as new potential media for green technology. *Anal Chim Acta* [Internet]. 2013;766:61–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2012.12.019>
48. Naeemullah, Tuzen M. A new robust, deep eutectic-based floating organic droplets microextraction method for determination of lead in a portable syringe system directly couple with FAAS. *Talanta* [Internet]. 2019;196(December 2018):71–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.12.027>
 49. Qu Q, Lv Y, Liu L, Row KH, Zhu T. Synthesis and characterization of deep eutectic solvents (five hydrophilic and three hydrophobic), and hydrophobic application for microextraction of environmental water samples. *Anal Bioanal Chem* [Internet]. 2019 Nov 8;411(28):7489–98. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-019-02143-z>
 50. Khare L, Karve T, Jain R, Dandekar P. Menthol based hydrophobic deep eutectic solvent for extraction and purification of ergosterol using response surface methodology. *Food Chem* [Internet]. 2021;340(August 2020):127979. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127979>
 51. Wang X, Wu Y, Li J, Wang A, Li G, Ren X, et al. Ultrasound-assisted deep eutectic solvent extraction of echinacoside and oleuropein from *Syringa pubescens* Turcz. *Ind Crops Prod* [Internet]. 2020 Sep;151:112442. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669020303587>
 52. Jurić T, Uka D, Holló BB, Jović B, Kordić B, Popović BM. Comprehensive physicochemical evaluation of choline chloride-based natural deep eutectic solvents. *J Mol Liq* [Internet]. 2021 Dec;343:116968. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167732221016925>
 53. Liu X, Bian Y, Zhao J, Wang Y, Zhao L. Menthol-based deep eutectic solvent in dispersive liquid-liquid microextraction followed by solidification of floating organic droplet for the determination of three bisphenols with UPLC-MS/MS. *Microchem J* [Internet]. 2020;159(April):105438. Available

from: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105438>

54. Banjare RK, Banjare MK, Behera K, Pandey S, Ghosh KK. Micellization Behavior of Conventional Cationic Surfactants within Glycerol-Based Deep Eutectic Solvent. *ACS Omega* [Internet]. 2020 Aug 11;5(31):19350–62. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsomega.0c00866>
55. de Andrade DC, Monteiro SA, Merib J. A review on recent applications of deep eutectic solvents in microextraction techniques for the analysis of biological matrices. *Adv Sample Prep* [Internet]. 2022 Feb;1:100007. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2772582022000043>
56. Mukherjee PK, Venkatesh M, Gantait A. Ayurveda in Modern Medicine: Development and Modification of Bioactivity. In: *Comprehensive Natural Products II* [Internet]. Elsevier; 2010. p. 479–507. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780080453828006559>
57. Shockcor JP. HPLC–NMR, Pharmaceutical Applications. In: *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry* [Internet]. Elsevier; 2017. p. 141–51. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128032244003770>
58. Hamilton RJ, Sewell PA. *Introduction to high performance liquid chromatography*. 2nd ed. London; 1982.
59. Tauler R, Barceló D. Multivariate curve resolution applied to liquid chromatography—diode array detection. *TrAC Trends Anal Chem* [Internet]. 1993 Jan;12(8):319–27. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/016599369388015W>
60. Pragst F, Herzler M, Erxleben B-T. Systematic toxicological analysis by high-performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD). *Clin Chem Lab Med* [Internet]. 2004 Jan 1;42(11). Available from: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/CCLM.2004.251/html>
61. Hollingsworth SA, Dror RO. *Molecular Dynamics Simulation for All*.

- Neuron [Internet]. 2018 Sep;99(6):1129–43. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627318306846>
62. van Gunsteren WF, Bakowies D, Baron R, Chandrasekhar I, Christen M, Daura X, et al. Biomolecular Modeling: Goals, Problems, Perspectives. *Angew Chemie Int Ed* [Internet]. 2006 Jun 19;45(25):4064–92. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/anie.200502655>
 63. Abraham M, Hess B, van der Spoel D, Lindahl E. GROMACS User Manual [Internet]. 2020. Available from: www.gromacs.org
 64. Mackerell AD. Empirical force fields for biological macromolecules: Overview and issues. *J Comput Chem* [Internet]. 2004 Oct;25(13):1584–604. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcc.20082>
 65. Klauda JB, Venable RM, Freites JA, O'Connor JW, Tobias DJ, Mondragon-Ramirez C, et al. Update of the CHARMM All-Atom Additive Force Field for Lipids: Validation on Six Lipid Types. *J Phys Chem B* [Internet]. 2010 Jun 17;114(23):7830–43. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jp101759q>
 66. Jo S, Kim T, Iyer VG, Im W. CHARMM-GUI: A web-based graphical user interface for CHARMM. *J Comput Chem* [Internet]. 2008 Aug;29(11):1859–65. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcc.20945>
 67. Martínez JM, Martínez L. Packing optimization for automated generation of complex system's initial configurations for molecular dynamics and docking. *J Comput Chem* [Internet]. 2003 May;24(7):819–25. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcc.10216>
 68. Martínez L, Andrade R, Birgin EG, Martínez JM. PACKMOL: A package for building initial configurations for molecular dynamics simulations. *J Comput Chem* [Internet]. 2009 Oct;30(13):2157–64. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcc.21224>
 69. Jorgensen WL, Chandrasekhar J, Madura JD, Impey RW, Klein ML. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J*

- Chem Phys [Internet]. 1983 Jul 15;79(2):926–35. Available from: <https://pubs.aip.org/aip/jcp/article/79/2/926-935/776316>
70. Bussi G, Donadio D, Parrinello M. Canonical sampling through velocity rescaling. J Chem Phys [Internet]. 2007 Jan 7;126(1):014101. Available from: <https://pubs.aip.org/aip/jcp/article/186581>
 71. Parrinello M, Rahman A. Crystal Structure and Pair Potentials: A Molecular-Dynamics Study. Phys Rev Lett [Internet]. 1980 Oct 6;45(14):1196–9. Available from: <https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevLett.45.1196>
 72. Essmann U, Perera L, Berkowitz ML, Darden T, Lee H, Pedersen LG. A smooth particle mesh Ewald method. J Chem Phys [Internet]. 1995 Nov 15;103(19):8577–93. Available from: <https://pubs.aip.org/aip/jcp/article/103/19/8577-8593/180219>
 73. Lemkul JA, Bevan DR. Assessing the Stability of Alzheimer’s Amyloid Protofibrils Using Molecular Dynamics. J Phys Chem B [Internet]. 2010 Feb 4;114(4):1652–60. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jp9110794>
 74. Silverstein RM, Webster FX, Kiemle DJ. Spectrometric Identification of Organic Compounds. 2007. 455 p.
 75. European Medicines Agency C for MP for HU. Guideline on Bioanalytical Method Validation [Internet]. London; 2011. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf
 76. Kupcová E, Reiffová K. Dispersive liquid-liquid microextraction as an effective preanalytical step for the determination of estradiol in human urine. J Sep Sci [Internet]. 2017 Jun;40(12):2620–8. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jssc.201700123>
 77. Wang P, Qiu X, Yang Y. Determination of Estrogens in Human Urine by Vortex-Assisted Dispersive Liquid–Liquid Microextraction Based on Floating Organic Acid Droplet Combined with High-Performance Liquid

- Chromatography-Fluorescence Detection. *J Liq Chromatogr Relat Technol* [Internet]. 2015 Mar 16;38(5):640–6. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10826076.2014.913522>
78. Zou Y, Li Y, Jin H, Tang H, Zou D, Liu M, et al. Determination of estrogens in human urine by high-performance liquid chromatography/diode array detection with ultrasound-assisted cloud-point extraction. *Anal Biochem* [Internet]. 2012 Feb;421(2):378–84. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003269711006592>

8 APÊNDICE A - Currículo Lattes



Débora Coelho de Andrade

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/4157543234200846>

ID Lattes: 4157543234200846

Última atualização do currículo em 15/05/2023

Atualmente é mestranda do Programa de Pós-Graduação em Biociências (UFCSPA). Possui formação em Toxicologia Analítica pela Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre - UFCSPA (2022); formação em Química, com ênfase em Química Industrial, pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (2018); Técnica em Química formada pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (2014). Tem experiência na área de Química. (Texto informado pelo autor)

Identificação

Nome

Débora Coelho de Andrade

Nome em citações bibliográficas

ANDRADE, D. C.; DE ANDRADE, DÉBORA COELHO

Lattes iD

 <http://lattes.cnpq.br/4157543234200846>

Endereço

Formação acadêmica/titulação

2020	Mestrado em andamento em BIOCÊNCIAS (Conceito CAPES 4). Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil. Título: Desenvolvimento de metodologias analíticas baseadas microextração em fase líquida com solventes eutéticos profundos (Deep eutectic solvents) para a determinação de drogas de abuso e biomarcadores em amostras biológicas.. Orientador:  Josias de Oliveira Merib.
2019 - 2022	Graduação em Toxicologia Analítica. Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil.
2015 - 2018	Graduação em Química. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Brasil.
2012 - 2014	Curso técnico/profissionalizante em Técnico em Química. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, IFRS, Brasil.
2009 - 2011	Ensino Médio (2º grau). Escola de Educação Básica Rainha do Brasil, RB, Brasil.

Formação Complementar

2021 - 2021	Treinamento de Validação de Métodos de Ensaio. (Carga horária: 16h). Instituto do Petróleo e dos Recursos Naturais, IPR, Brasil.
2021 - 2021	Treinamento ISO/IEC 17025. (Carga horária: 10h). Instituto do Petróleo e dos Recursos Naturais, IPR, Brasil.
2021 - 2021	Oficina POPv, ITv, Elaboração de FOR e PLAN. (Carga horária: 1h). Instituto do Petróleo e dos Recursos Naturais, IPR, Brasil.
2020 - 2020	Princípios e Aplicações de Cromatografia Gasosa - Módulo I. (Carga horária: 1h). Shimadzu do Brasil Comércio, SBC, Brasil.
2020 - 2020	Curso teórico e prático de administração de medicamentos injetáveis. (Carga horária: 10h). Instituto Galeno, IG, Brasil.
2019 - 2019	Toxicologia Forense. (Carga horária: 20h). Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Brasil.
2019 - 2019	

Cromatografia Líquida. (Carga horária: 8h). ABQ - Associação Brasileira de Química do Rio Grande do Sul (RS), ABQ, Brasil.	2019 - 2019
Curso para usuários de GC e GCMS: fundamentos e práticas avançadas. (Carga horária: 8h). Agilent Technologies Brasil, AGILENT, Brasil.	2017 - 2017
Peritos e Perícias. (Carga horária: 10h). Instituto Galeno, IG, Brasil.	2016 - 2016
Treinamento Cromatógrafo Iônico. (Carga horária: 16h). Thermo Fisher Scientific, TFS, Brasil.	2016 - 2016
Excel Intermediário. (Carga horária: 16h). Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Brasil.	2016 - 2016
Biologia e Genética Forense. (Carga horária: 10h). Instituto Galeno, IG, Brasil.	2015 - 2015
Tratamento Físico Químico de Águas Industriais. (Carga horária: 8h). ABQ - Associação Brasileira de Química do Rio Grande do Sul (RS), ABQ, Brasil.	

Atuação Profissional

Centro de Informação Toxicológica do Rio Grande do Sul, CIT - RS, Brasil.

Vínculo institucional

2019 - 2021

Outras informações

Vínculo: Estágio, Enquadramento Funcional: Estagiária, Carga horária: 30
Núcleo de Análise Laboratorial

Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil.

Vínculo institucional

2020 - 2021

Outras informações

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Bolsista, Carga horária: 20
Bolsista de iniciação científica no projeto "Remoção de disruptores endócrinos (DE) de águas por adsorção em biossorventes naturais", sob orientação da profª Cristiane Oliveira Rodrigues, pelo PIC/UFCSPA.

Vínculo institucional

2019 - 2020

Outras informações

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Bolsista, Carga horária: 20
Bolsista de iniciação científica no projeto "Desenvolvimento de um processo de remoção de disruptores endócrinos de águas via adsorção em novos biossorventes gerados a partir de resíduos da indústria de alimentos", sob orientação da profª Cristiane Oliveira Rodrigues, pelo PIC/UFCSPA.

Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luís Roessler, FEPAM, Brasil.

Vínculo institucional

2018 - 2019

Vínculo: Estágio, Enquadramento Funcional: Estágio, Carga horária: 30

Outras informações

Análise de alcalinidade, cloreto, sólidos, nitrito e dureza em amostras de água.

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Brasil.

Vínculo institucional

2016 - 2018

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Instituto do Petróleo e dos Recursos Naturais, Carga horária: 20

Outras informações

Estágio no Laboratório de Análises Geoquímicas - LAG. Análise de metais em amostras salinas, terras e águas.

Laboratório Pró-Ambiente, PRÓ-AMBIENTE, Brasil.

Vínculo institucional

2015 - 2016

Outras informações

Vínculo: Celetista, Enquadramento Funcional: Técnica em Química, Carga horária: 40
Técnica em Química no Laboratório de Toxicologia Ocupacional. Análise de agentes de exposição em material biológico.

Vínculo institucional

2014 - 2014

Outras informações

Vínculo: Colaborador, Enquadramento Funcional: Estágio, Carga horária: 30
Análise de agentes de exposição em material biológico.

Instituto do Petróleo e dos Recursos Naturais, IPR, Brasil.

Vínculo institucional

2023 - Atual

Outras informações

Vínculo: Celetista, Enquadramento Funcional: Pesquisadora Assistente, Carga horária: 44,
Regime: Dedicação exclusiva.
Laboratório de Análises Químicas (LAQ)

Vínculo institucional

2021 - 2023

Outras informações

Vínculo: Celetista, Enquadramento Funcional: Auxiliar de Pesquisa, Carga horária: 44,
Regime: Dedicação exclusiva.
Laboratório de Análises Químicas (LAQ)

Projetos de pesquisa

2018 - 2018

Uso da Curcumina como Corante Natural e Fibras Têxtil de Algodão

Descrição: Os corantes naturais são utilizados desde o início dos tempos, porém, foram sendo substituídos pelos corantes sintéticos, por serem mais facilmente reproduzidos em larga escala e por terem maior estabilidade. Entretanto, os corantes sintéticos causam grande impacto ao meio ambiente. O objetivo desse trabalho é otimizar o processo de utilização da Curcumina como corante natural em fibra têxtil 100% algodão. Os resultados obtidos indicaram o melhor método de tingimento de tecidos de algodão com o corante natural Curcumina, utilizando água, mordente Alúmen e pré-tratamento da fibra com solução de NaOH..

Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.

Alunos envolvidos: Graduação: (3) .

Integrantes: Débora Coelho de Andrade - Coordenador / Nicole Pinheiro Rech - Integrante / Pedro Boni Gasparotto - Integrante.

Áreas de atuação

1. Grande área: Ciências Exatas e da Terra / Área: Química.
2. Grande área: Ciências Exatas e da Terra / Área: Química / Subárea: Química Analítica.
3. Grande área: Ciências Biológicas / Área: Farmacologia / Subárea: Toxicologia.
4. Grande área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia / Subárea: Avaliação e análises toxicológicas.

Prêmios e títulos

2019	Distinção acadêmica pelo maior coeficiente de rendimento na turma de Química Industrial 2018/2 da PUCRS., PUCRS.
------	--

Produções

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

Ordenar por

Ordem Cronológica



1. **DE ANDRADE, DÉBORA COELHO; MONTEIRO, SOFIA AQUINO ; MERIB, JOSIAS** . A review on recent applications of deep eutectic solvents in microextraction techniques for the analysis of biological matrices. *Advances in Sample Preparation*, v. 1, p. 100007, 2022.

Bancas

Participação em bancas de comissões julgadoras

Outras participações

1. **ANDRADE, D. C.**. Evento 20ª Mostra de Ensino, Pesquisa e Extensão do IFRS do Campus Porto Alegre - MOSTRAPOA. 2019. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul.

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. III QUIMTOX - Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. 2020. (Encontro).
2. VI Congresso Brasileiro de Toxicologia Clínica - ABRACIT. 2020. (Congresso).
3. II QUIMTOX - Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. 2019. (Encontro).
4. V Encontro Acadêmico de Biotecnologia.Minicurso Imobilização de substâncias bioativas. 2017. (Encontro).
5. 14ª Semana Acadêmica da Química - PUCRS. 2016. (Encontro).
6. Semana Acadêmica da Química - PUCRS. 2015. (Encontro).

Organização de eventos, congressos, exposições e feiras

1. **ANDRADE, D. C.**. Congresso UFCSPA. 2019. (Congresso).

9 ANEXO A – Artigo Científico



A review on recent applications of deep eutectic solvents in microextraction techniques for the analysis of biological matrices

Débora Coelho de Andrade^{a,c}, Sofia Aquino Monteiro^a, Josias Merib^{a,b,c,*}

^a Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS 90050-170, Brazil

^b Departamento de Farmacociências, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS 90050-170, Brazil

^c Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS 90050-170, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Deep eutectic solvents
Microextraction
Sample preparation
Biological matrices

ABSTRACT

In general, the analysis of biological matrices is challenging and a sample preparation step employing extraction/cleanup techniques is required. Liquid-phase microextraction using deep eutectic solvents has been exploited in numerous applications because these solvents exhibit fascinating physico-chemical properties in addition to simple and straightforward preparation. Varied configurations and strategies have been examined for the determination of different classes of analytes, and these methodologies offer environmentally friendly workflows with low solvent and sample consumption, rapid and simple experimental procedures, and satisfactory analytical performance. In this review, developments related to the use of deep eutectic solvents in microextraction approaches for the analysis of biological matrices are briefly discussed with a focus on studies reported from 2017 to 2021.

1. Introduction

The development of methodologies to analyze complex matrices is challenging. In particular, most of biological matrices require a sample preparation step prior to instrumental analysis due to the high complexity and/or low concentration of the analytes. In general, clinical, toxicological and forensic determinations utilize complex biological matrices including blood, plasma, urine, and oral fluids.

Urine is a conventional biological matrix consisting basically of water that is highly used for toxicological analysis. This matrix is of particular interest since more than 50% of the substances excreted by human metabolism can be found in urine [1]. Blood is another highly complex biological matrix that exhibits an important role for forensic and toxicological analysis. This matrix participates of the transport and elimination of substances including toxic agents. In analytical workflows, blood can be used in total form or subjected to sample pretreatment which generally includes centrifugation and protein precipitation [2].

Alternative matrices have also been explored in chemical analysis including oral fluid that consists of a mixture of saliva and other components such as mucous cells located in oral cavity. This matrix is generally used to identify recent consumption of substances in their original form. In some cases, information obtained with this matrix can replace those obtained from blood indicating the possibility of matrix replacement [3–5].

Considering the above-mentioned aspects, the analysis of biological matrices requires significant attention. It is worth mentioning that the success of an analytical methodology generally depends on satisfactory sample preparation with effective extraction of the target analytes. This crucial step within chemical analysis is important not only to remove possible interfering components but also for making the sample compatible with the analytical instrumentation. Therefore, sample preparation steps aim to isolate and concentrate the analytes at suitable levels for satisfactory chemical analysis. In this case, microextraction approaches can be highlighted as sustainable and eco-friendly sample preparation tools to promote Green Analytical Chemistry concepts [6,7].

Microextraction techniques have been proposed in order to maintain satisfactory analytical performances and, at the same time, provide safer alternatives to traditional sample preparation techniques. Liquid-phase microextraction (LPME), also known as liquid-liquid microextraction (LLME) or solvent microextraction (SME), consists of different approaches in which low volumes of solvents are used (generally few microliters) which is beneficial for both the analyst and environment. These techniques offer advantages such as satisfactory extraction efficiency, high preconcentration factors and adequate sample cleanup prior to instrumental analysis. Importantly, deep eutectic solvents (DES) have been successfully used as extraction phases in LPME approaches with varied configurations [8].

The use of DES in analytical extractions has been gaining significant attention in recent years, particularly due to the structural versatility and large applicability. These solvents exhibit advantageous

* Corresponding author at: 245, Sarmento Leite St., Porto Alegre RS, 90050-170.

E-mail address: josias@ufcsa.edu.br (J. Merib).

physico-chemical properties, and they generally consist of mixtures with lower melting points compared to those of individual components. This emerging class of solvents is increasingly being examined for the development of novel analytical strategies consisting of environmentally friendly alternatives to traditional methodologies based on toxic organic solvents.

This study aimed at providing a recent overview regarding the use of DES for the analysis of biological matrices such as urine, blood, plasma and oral fluid with a focus on microextraction techniques. Analytical features of the reviewed methodologies are highlighted, and a table containing applications of these sustainable solvents is included. Some fundamentals, experimental considerations as well as future trends in sample preparation with DES are briefly reported. The search in literature was performed at Pubmed, Scopus, and Web of Science databases applying "deep eutectic solvents", "DES", "biological matrices" and "microextraction" as descriptors, and the discussion was directed to articles published in the last five years (from 2017 to 2021). According to our knowledge, this is the first review on applications of DES specifically dedicated to biological matrices.

2. Fundamentals, preparation and characterization of DES

The evaluation of stable mixtures of ionic liquids comprised of quaternary ammonium salts was firstly reported in 2001 by Abbott et al. [9]. In this study, the preparation and characterization of new stable solvents were performed, which allowed for a subsequent study involving mixtures of quaternary ammonium salts with metals that resulted in molten components [10]. In this work, DES were introduced with a systematic evaluation of the solvent properties.

Most DES are binary or ternary mixtures obtained through hydrogen bonding to produce eutectic mixtures. The components may have a hydrogen bond acceptor (HBA) and hydrogen bond donor (HBD) that form solvents with lower melting points and, generally, higher densities compared to those of individual components. Mixtures of these components, usually at 1:1 and 1:2 molar ratio, produce liquids at room temperature, exhibiting high thermal stability, low volatility and high viscosity [11,12]. In addition, these sustainable solvents exhibit very attractive properties including environmentally friendly aspects, tunability of their chemical structure that can be systematically designed, and simple preparation procedures. Interestingly, DES exhibit high versatility with multiple possibilities of combinations of different HBA and HBD consisting of "greener" alternatives to traditional organic solvents. These factors make DES attractive to replace organic solvents that exhibit high toxicity. Recent studies have shown the potential of these solvents in different areas and applications [13–15].

A variety of components can act as HBD or HBA. In particular, choline chloride (ChCl), tetrabutylammonium chloride and tetrabutylphosphonium bromide have been frequently examined as HBA. Regarding HBD, alcohols, carboxylic acids, amides, amino acids, urea, glycerol and sugar have been successfully employed [13]. Chemical structures of some HBA and HBD are shown in Fig. 1. Some DES are termed natural deep eutectic solvents (NADES) including saccharides, polysaccharides, amino acids, terpenes, and natural organic acids obtained from natural sources [16]. NADES are of significant interest in diverse applications because they are biodegradable.

Importantly, studies have shown that NADES exhibit satisfactory chemical stability with significant solubility in biomolecules such as gluten, starch, and DNA. Therefore, the development of NADES as extraction solvents is expected to increase because they are cheap, easy to prepare, and stable at room temperature. According to Dai et al [17], the combination of various natural components has promoted the preparation of more than 100 different types of NADES. Some examples of the prepared NADES include mixtures of glucose-choline chloride-water, lactic acid-glucose-water, proline-malic acid-water, 1,2-propanediol-choline chloride-water and xylitol-choline chloride-water. Moreover, numerous studies have evaluated the potential of NADES in

analytical extractions with wide range of successful applications. Significant progress has been achieved in NADES-based extraction of natural products from complex matrices [18–21]. Moreover, NADES have been recently examined as disperser solvents in dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) approach [22], offering a new trend to be exploited in the next years also for biological matrices.

Particularly, DES are valuable tools to achieve the modern concepts of Green Analytical Chemistry. The chemical structures can be finely tuned to produce hydrophilic and hydrophobic DES (hDES). Most part of the studies reported up to 2015 involved hydrophilic DES since they were prepared from alcohols, sugars, acids, and other polar compounds. Typical hydrophilic DES are mostly comprised of mixtures of choline chloride with components of short alkyl chains such as amines, acids, alcohols, among others. However, the application of hydrophilic DES is limited due to their solubility in aqueous solutions; therefore, the use of hDES is promising in extraction techniques [11]. The preparation of hDES can be performed by combining quaternary ammonium salts containing long alkyl chains or natural hydrophobic components with carboxylic acids and alcohols comprised of long alkyl chains. Moreover, monoterpenes such as thymol and menthol can also be used as HBD [23].

Different strategies can be adopted to produce DES including freeze-drying and vacuum evaporation [24]; however, the most usual and simple approach involves mixing of two or more components to obtain a homogeneous liquid as described by Abbott et al [10]. In this study, a mixture was formed by heating the components at 100°C under stirring which resulted in a colorless homogeneous liquid [25,26]. Other studies have adopted similar procedures for the successful preparation of DES at different temperatures [27–30].

In addition, preparation of DES can also be achieved using strategies assisted by ultrasound combined with heating to form homogeneous and clear solvents [31,32]. Another possibility consists of grinding solid components in a mortar with a pestle to produce homogeneous liquids at room temperature [33]. In all cases, moisture content of the individual components or DES must influence on their physico-chemical properties. Therefore, drying steps prior to the preparation may be required especially for hydrophilic components/solvents [13].

The characterization of DES is typically performed using Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). In general, the constituents are evaluated individually and after the formation of DES. FTIR can provide information related to possible chemical interactions, hydrogen bond formation, and structural modifications [13,34,35]. Another technique commonly employed for characterizing DES is proton nuclear magnetic resonance spectroscopy ^1H NMR [36,37]. Studies have also reported characterization of DES using thermogravimetric analysis (TGA) and differential scanning calorimetry (DSC). Additionally, extraction phases comprised of solid/magnetic materials functionalized with DES can be characterized by X-ray diffraction, scanning electron microscopy (SEM) and Brunauer–Emmett–Teller (BET) analysis [13].

3. Experimental considerations in the use of DES for the analysis of biological matrices

The development of reliable analytical methodologies using DES in analytical extractions consists of a hot topic in chemical analysis. These solvents exhibit formidable physico-chemical properties which have been exploited to analyze biological matrices of varied complexities. The structural versatility of DES is important to enhance the selectivity of the methodology which can facilitate task-specific determinations. Moreover, NADES are gaining significant attention because most of these solvents are biodegradable consisting of important feature in terms of sustainable analytical approaches.

However, some limitations regarding the use of DES can also be highlighted. These solvents generally exhibit high viscosity, which can influence on the migration of analytes from the sample matrix to the extraction phase. Moreover, high viscosity DES can promote a significant in-

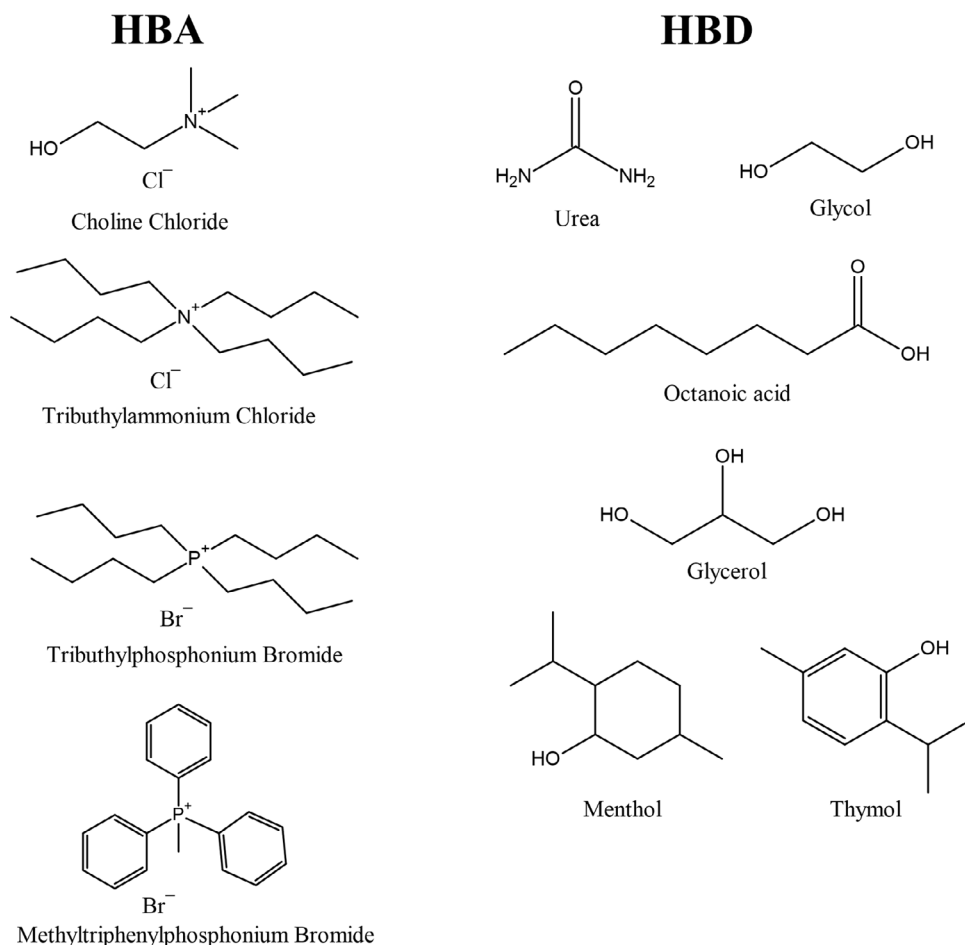


Fig. 1. Chemical structures of some DES used in analytical extractions.

crease of back-pressure in liquid chromatography. These limitations are being alleviated by diluting the DES prior to the extraction procedure or injection in chromatographic systems. In addition, higher temperatures can also decrease the viscosity of these solvents which is of particular interest in liquid chromatography. Other alternative recently proposed to reduce the viscosity of some DES is the use of acetic acid as HBD [38].

Another potential limitation is the fact that these solvents can absorb at determined wavelength regions in UV-Vis spectra. This fact can impart the determination of some analytes due to the chromatographic background obtained in spectrophotometric detectors. In this case, a careful evaluation of the chromatographic background generated by the solvent need to be performed prior to the extractions.

Specifically related to the analysis of biological matrices, a sample pretreatment prior to microextraction procedures such as hydrolysis with the enzyme β -glucuronidase, or protein precipitation with acids such as trichloroacetic acid may be required. In addition, dilution of the samples with ultrapure water is an alternative to decrease the matrix effects caused by matrices of high complexity. However, this fact can reduce sample throughput and the possibility of loss of analyte is enhanced. Furthermore, these above-mentioned steps may require additional solvents and reagents that can increase the analysis cost.

4. Recent applications of DES for the analysis of biological matrices

Most studies involving the application of DES in analytical extractions of biological samples are devoted to miniaturized techniques such as LPME [39]. These strategies have been proposed to determine analytes from different classes such as pharmaceuticals, drugs, hormones, metals, and pesticides. In recent years, some reviews were reported re-

garding the use of DES in microextraction techniques [13,24,40-42]. Interestingly, numerous studies reported the application of DES for the analysis of environmental samples [43-49]; however, applications in biological samples are still required. Different configurations have been proposed mainly based on DLLME and hollow fiber liquid phase microextraction (HF-LPME). Alternative configurations have also been developed for the analysis of biological samples including homogeneous liquid-liquid microextraction (HLLME) [50], vortex, air, and ultrasound assisted approaches.

Following, discussions related to some recent studies proposing the application of DES as extraction phase for the analysis of biological matrices are included, with analytical features and details of some experimental procedures.

4.1. DLLME-based approaches

DLLME was proposed in 2006 by Rezaee et al. [51] as versatile sample preparation technique which employs a ternary system consisting of aqueous sample, extraction solvent (immiscible in aqueous sample), and disperser solvent (miscible in both aqueous sample and extraction solvent). This technique is simple, fast, low-cost and provides an environmentally friendly and efficient alternative for the analysis of some biological matrices [52,53]. Moreover, the use of "greener" solvents such as DES is being preferred over toxic solvents typically used in DLLME.

Very recently, a methodology based on DLLME has been proposed for the determination of cortisol and cortisone in human saliva with analysis by high-performance liquid chromatography coupled to ultraviolet detector (HPLC-UV) [54]. A hydrophobic DES based on trioctylmethylammonium chloride (TAC) as HBA and pentafluorophenol (Pfp-OH) as HBD exhibited the best performance. This method has shown interesting

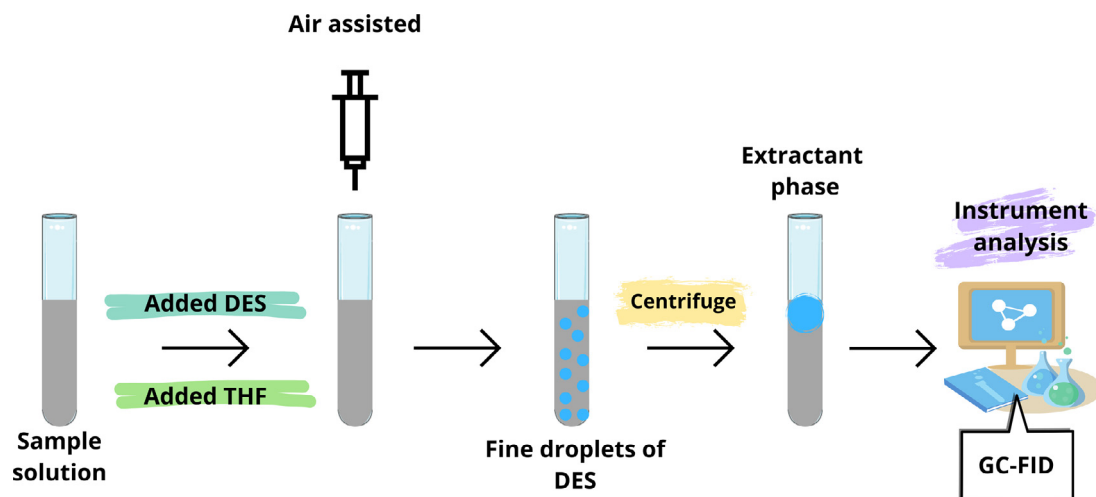


Fig. 2. Scheme of the experimental setup developed by Lamei et al termed air assisted emulsification liquid-liquid microextraction (AAELLME). Adapted with permission from ref [56].

results for the determination of cortisol and cortisone in human saliva, and the sample preparation workflow was facilitated by using a DES denser than water. A significant advantage consists of requiring low volumes of extraction solvent (approximately 10 μ L); on the other hand, this approach required several centrifugation steps which can lead to loss of analyte.

The determination of metallic analytes has also been exploited through an important contribution reported by Akramipour et al. that proposed an alternative configuration of vortex assisted microextraction combined with DLLME [55]. This study aimed at determining organic and inorganic mercury in blood samples using vortex assisted dispersive liquid-liquid microextraction based on the freezing of deep eutectic solvent (VADLLME-FDES) followed by analysis with graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS). Compared to traditional DLLME approaches, this configuration does not require any disperser solvent which is advantageous to provide sustainable analytical procedures. On the other hand, a previous treatment of blood samples was necessary prior to the extraction procedure. This methodology was successfully applied in real samples and proved to be an interesting alternative because required low volumes of sample and solvent, exhibiting simple workflow and low-cost.

4.2. Liquid-liquid microextraction approaches

Liquid-liquid microextraction techniques employing DES as extraction solvents have also been developed to analyze biological matrices. Important strategies consisting of LLME approaches assisted by air, ultrasound, and vortex can significantly enhance the mass transfer of the analytes and improve extraction kinetics. For example, Lamei et al. [56] proposed an analytical strategy termed air assisted emulsification liquid-liquid microextraction (AAELLME) using DES for the determination of methadone in water and biological samples (urine and blood) with analysis by gas chromatography coupled to flame ionization detector (GC-FID). In this technique, the extraction solvent is added to the sample solution, then the mixture is pulled in and pushed out several times forming a turbid solution with high surface area. In particular, the DES was prepared by mixing CHCl_3 with 5,6,7,8-tetrahydro-5,5,8,8-tetramethylnaphthalen-2-ol (TNO) previously synthesized at room temperature. A scheme of the experimental workflow is shown in Fig. 2.

Features such as speed, elimination of chlorinated solvents and low-cost make this approach interesting for further investigations. On the other hand, the synthesis of TNO required additional steps that increased solvent consumption, and the experimental procedure is relatively laborious for the analyst.

Another interesting air-assisted approach involved a new generation of hydrophobic DES comprised of borneol as HBA and decanoic acid, oleic acid, and thymol as HBD. In this case, air-assisted liquid-liquid microextraction (AALLME) was proposed for the determination of warfarin in human urine and plasma samples with analysis performed by HPLC-UV [57]. Although the use of NADES as extraction phases increased the sustainable aspects of this study, the samples required an additional pretreatment step consisting of protein precipitation that may decrease sample throughput. A scheme of the extraction procedure is shown in Fig. 3.

In addition, methodologies assisted by ultrasound can be useful in terms of extraction efficiency. Very recently, Li and Ding developed an ultrasound-assisted liquid-liquid microextraction (UALLME) using DES to determine residues of benzotriazole and benzothiazole derivatives in urine samples [58]. In this study, ultra-high performance liquid chromatography coupled to quadrupole-time-of-flight mass spectrometry (UHPLC-ESI-QTOF-MS) was used for the separation/detection. A scheme of the extraction procedure is shown in Fig. 4. This methodology also featured sustainability, high efficiency, and rapid extractions. On the other hand, the enzymatic de-conjugation required an additional step in the experimental workflow also increasing the analysis cost.

An important contribution based on vortex-assisted liquid-liquid microextraction (VALLME) was also reported [59]. Zhu et al. developed a sample preparation method involving methyl trioctyl ammonium chloride (N_{8881}Cl) as HBA and trichloroacetic acid, dichloroacetic acid, and bromoacetic acid as HBD that allowed for the successful determination of calcium dobesilate in urine by UV-Vis spectrophotometry. In addition, the solvent used in this study could be recycled after a back-extraction procedure which consist of formidable advantage considering the environmental aspects of this methodology.

4.3. HF-LPME-based approaches

HF-LPME was introduced in 1999 by Pedersen-Bjergaard and Rasmussen [60]. This technique is based on a hollow porous membrane containing the lumen filled with an acceptor phase. A supported liquid membrane (SLM) is also created by immobilization of few microliters of organic solvent into the membrane pores. This technique is more stable than other approaches such as SDME, and also exhibits low cost and low solvent consumption [53,61]. Importantly, factors such as pH of both acceptor and sample solution, and a proper selection of the extraction solvent must be carefully considered. DES have also been successfully explored in HF-LPME for the analysis of complex biological samples; however, applications are still scarce in literature.

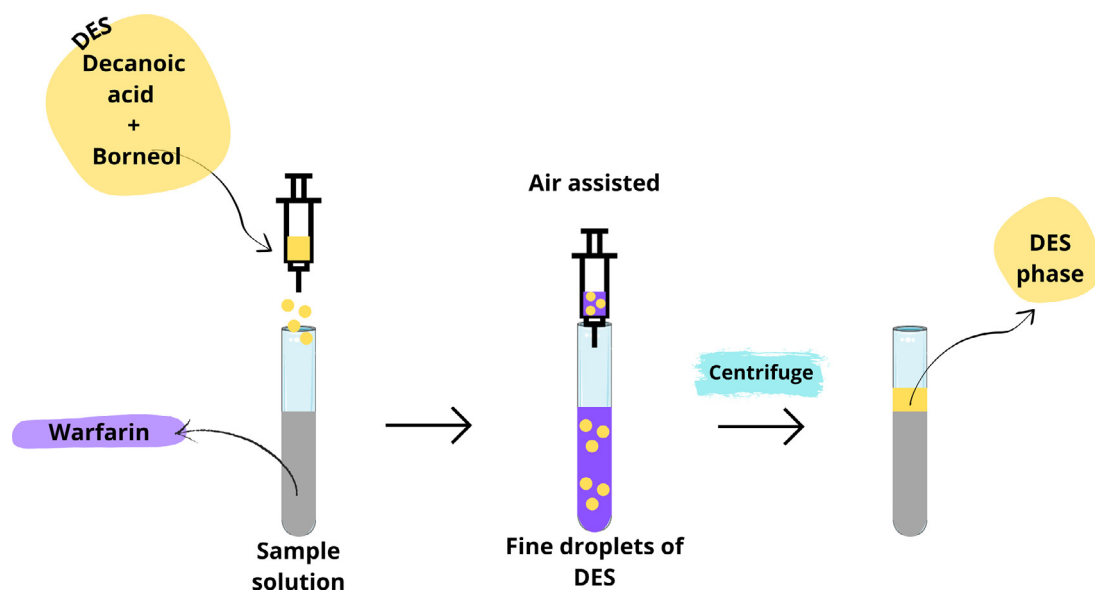


Fig. 3. Experimental workflow of air assisted liquid-liquid microextraction (AALLME) proposed by Majidi and Hadjmohammadi. Adapted with permission from ref [57].

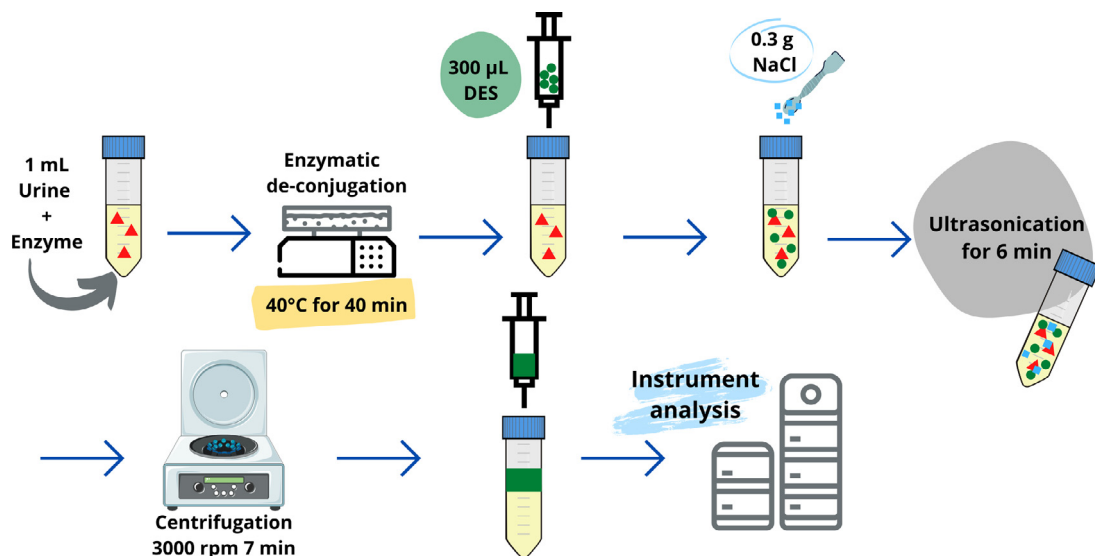


Fig. 4. Extraction procedure proposed by Li and Ding involving ultrasound-assisted liquid-liquid microextraction (UALLME) based on DES. Adapted with permission from ref [58].

Khataei et al. [61] proposed an analytical strategy involving DES as acceptor phase in three-phase HF-LPME for the determination of steroidal hormones (dydrogesterone and cyproterone acetate) in blood and urine samples with analysis by HPLC-UV. In this work, three types of DES were prepared using ChCl , methyltriphenylphosphonium bromide ($\text{Me(Ph)}_3\text{PBr}$) or methyltriphenylphosphonium iodide ($\text{Me(Ph)}_3\text{PI}$) as HBA, and ethylene glycol (EtGly) as HBD. However, because the high viscosity of DES that can hinder the interaction with analytes, a dilution of the extraction solvent was carried out. This methodology offered an important analytical tool to analyze complex biological fluids using a membrane-based approach.

4.4. Approaches involving DES associated with solid sorbents

In addition to liquid-based microextraction techniques, DES acting as modifiers of solid materials (hybrid adsorbents) consists of valuable strategy capable of being implemented for biological analysis. These

hybrid phases have been recently examined for the removal of environmental pollutants from water samples [62,63]. For example, the hybrid nanostructure formed by carbon nanotubes/ ZnCo_2O_4 functionalized with DES (CTAB:glycerol) was evaluated for removing eosin Y dye from water samples permitting very satisfactory recoveries.

A remarkable study involving the use of graphene oxide (GO) nanoparticles coated with deep eutectic solvent permitted the successful determination of methadone in urine and plasma samples [64]. These hybrid extraction phases were produced by mixing (under stirring) Fe_3O_4 @GO nanoparticles with certain amount of DES comprised of ChCl as HBA and phenol, glycerol, or TNO as HBD. A straightforward extraction procedure assisted by ultrasound was adopted by adding only 15 mg of the sorbent phase to the sample, followed by magnetic separation of the sorbent phase. The final extract was analyzed by GC-MS and GC-FID. More recently, another study based on magnetic dispersive micro-solid-phase extraction with DES (M-d- $\mu\text{SPE-DES}$) has been developed and optimized for the determination of meloxicam in plasma and urine. In this particular case, the ferrofluid formed by mixing DES

Table 1
Application of DES in analytical extractions for the analysis of biological matrices.

Analyte	Matrix	DES (HBA:HBD)	Extraction technique	Sample volume (mL)	DES volume (mL)	Instrumentation	Extraction time	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recovery (%)	Ref.
Cortisol and Cortisone	Oral fluid	Trioctylmethylammonium chloride (TAC): pentafluorophenol (Pfp-OH)	LLME using vortex and ultrasound	0.500	0.010	LC-UV	~ 25 min	2.1 and 1.8 ^a	95.0 - 99.5	[54]
Mercury	Blood	[DDMIM]Cl, [ODMIM]Cl, [OMIM]Cl, [C ₁₂ MIM]Cl and [DMIM]Cl ^f : 1-undecanol	VADLLME-FDES	0.015	0.055	GFAAS	< 13 min	0.10	90.0 - 109	[55]
Methadone	Urine	TNO:ChCl	AALLME ^b	10.0	0.100	GC-FID	< 4 min	0.7	97.6 - 98.8	[56]
Warfarin	Urine and plasma	Borneol:decanoic acid, oleic acid, and thymol	ALLME	10.0	0.060	HPLC	11 min ^c	2,1 and 2.7	88.8 - 98.4	[57]
Benzotriazole and benzothiazole	Urine	ChCl:urea, phenol, and 4-chlorophenol	UALLME	1.00	0.300	UHPLC-ESI(+)-QTOF-MS	< 15 min	0.1 - 3.0	80.0 - 101	[58]
Calcium Dobesilate	Urine	N ₈₈₈₁ Cl: Trichloroacetic acid, dichloroacetic acid and bromoacetic acid	VALLME	2.50	0.1 ^d	UV-vis spectrophotometer	3 min	0.05	93.2 - 108.6	[59]
Dydrogesterone (DYD) and cyproterone acetate (CPA)	Urine and plasma	ChCl:(Me(Ph) ₃ PBr) and (Me(Ph) ₃ PI):EtGly	HF-LPME	20 and 2	0.022	HPLC-UV	40 min	0.5 - 2.0	85.9 - 117.5 for urine and 93.8 - 111 for plasma	[61]
Methadone	Urine and plasma	ChCl:phenol, ChCl:glycerol, ChCl: TNO	UA-d-SPE-DES ^b	10		GC-MS GC-FID	~3 min	0.03 - 0.8	95.1 - 99.3	[64]
Tricyclic antidepressants	Urine and plasma	ChCl:4-chlorophenol	dSPE coupled with DES-based air-assisted liquid-liquid microextraction	5.00	0.150	GC-MS	~17 min ^c	0.008 - 0.060	62.0 - 74.0 and 64.0 - 72.0	[66]
Malondialdehyde (MDA) and formaldehyde (FA)	Urine	Methyltrioctylammonium bromide:decanoic acid	VALLME	10.0	0.035	HPLC-UV	~ 2 min	2.0 and 10.0	91.0 - 112	[70]
Ketoprofen and Diclofenac	Urine	Menthol	In-situ deep eutectic mixtures (DEM)	8.00	0.05 ^d	HPLC-UV	10 min ^c	15 and 44	93.0 - 97.0	[71]

(continued on next page)

Table 1 (continued)

Analyte	Matrix	DES (HBA:HBD)	Extraction technique	Sample volume (mL)	DES volume (mL)	Instrumentation	Extraction time	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recovery (%)	Ref.
Atenolol, propranolol, and metoprolol	Plasma	Tetramethylammonium chloride (TMAC):alpha terpineol	LLME	5.00	0.20 ^d and 0.610	GC-MS	~ 8 min ^c	0.130–0.205	72.0 - 86.0	[72]
Procainamide	Saliva	ChCl:glycerol	Automated liquid-liquid extraction (LLE).	0.200	0.100	HPLC-UV	1 min	1.5×10^{-6} ^e		[73]
Lorazepam and clonazepam	Urine	ChCl:Phenol, ChCl:ethylene glycol and ChCl:urea	<i>d</i> - μ -SPE/LPME	4.00	0.250	HPLC-UV	9 min	0.7 and 1.0	57.0 and 42.0	[74]
Pesticides	Urine and plasma	Menthol: phenylacetic	SFO-DLLME	5.00	0.041	GC-MS	2.5 min	0.002 – 0.036	79.0 - 97.0	[75]
Lamotrigine	Plasma	ChCl:1-phenylethanol	USAEME-DES ^g	1.20	0.126	Spectrophotometry	~ 12 min	150	-	[76]
Daclatasvir and Sofosbuvir	Urine	Tetrabutyl ammoniumchloride (TBAC):p-mminophenol	HLLME	5.00	0.105	HPLC-DAD	~ 17 min ^c	1.0 and 1.3	96.0 and 90.0	[78]

^a pmol.mL⁻¹^b Air assisted emulsification liquid-liquid microextraction^c Total sample preparation time^d mass (g)^e mol L⁻¹^f [DDMIM]Cl: 1-decyl-2,3-dimethylimidazolium chloride; [ODMIM]Cl: 1-octyl-2,3-dimethylimidazolium chloride; [OMIM]Cl: 1-octyl-3-methylimidazolium chloride; [C₁₂MIM]Cl: 1-dodecyl-3-methylimidazolium chloride; [DMIM]Cl: 1-decyl-3-methylimidazolium chloride^g USAEME-DES ultrasound-assisted emulsification-microextraction^h UA-*d*-SPE-DES - ultrasound-assisted dispersive-solid phase extraction

(ChCl:ethylene glycol) with $\text{SiO}_2@\text{Fe}_3\text{O}_4$ nanoparticles was used as extraction phase [65].

In general, solid materials functionalized with DES exhibit significant capacity of being dispersed through the samples enhancing the surface area between the sample and the sorbent phase. Therefore, high enrichment factors and excellent extraction efficiency can be achieved in most cases. Furthermore, ultrasound-assisted configurations offer fast and effective dispersion of the sorbent into the sample. Generally, this fact can accelerate the migration of the target analytes to the extraction phase [64].

In addition to the studies previously discussed, Table 1 contains some analytical features of experimental approaches employing DES for the analysis of biological matrices. Specifically, analytical methodologies for the determination of malondialdehyde and formaldehyde [70], non-steroidal anti-inflammatory drugs [71], β -blockers [72], procainamide [73], lorazepam and clonazepam [74], pesticides [75], lamotrigine [76], daclatasvir and sofosbuvir [78] were also included.

5. Trends in DES-based microextraction approaches in biological matrices

As previously mentioned, the application of DES in biological matrices is continuously increasing. However, the number of articles related to this subject is significantly lower compared to the analysis of environmental or food samples. Therefore, numerous possibilities of evaluating the potential of these solvents in complex biological matrices can be exploited in the next years, with particular interest to natural components [77].

Importantly, the association of DES with membrane-based techniques capable of being automated, as previously reported for environmental samples [47], can also be investigated for the analysis of biological matrices. Therefore, automation consists of an important trend to be examined in the next years. The development of flow-analysis systems, robotic autosamplers and the use of systems based on 96-well plate associated with DES can dramatically increase sample throughput and reduce errors caused by human manipulation.

Moreover, the combination of different sample preparation techniques in the same sample preparation procedure such as dispersive-SPE and DLLME [66] is an interesting alternative for integrating the advantages of both methodologies and provide more robust methodologies. Other approach that can be further explored for the analysis of biological matrices consists of magnetic DES. These materials are generally produced by the functionalization of a magneto-active core with DES. The magnetic properties of these extraction materials can significantly facilitate in retrieving the analyte-enriched DES for subsequent instrumental analysis [67].

Interestingly, recent developments related to poly (deep eutectic solvents) as a new class of sustainable sorbents for analytical extractions are gaining attention [68]. These materials aggregate the benefits of DES and porous materials in a single extraction phase consisting of formidable materials able to be further evaluated in complex biological matrices. Moreover, the development of biocompatible materials can provide new horizons in analytical extractions. In this sense, biocompatible and magnetic polymers of polyvinyl pyrrolidone deep eutectic solvent have been successfully evaluated for the adsorption of L-asparaginase [69]. These recent developments provided encouraging and promising results toward novel and environmentally friendly strategies capable of being coupled to microextraction techniques for the analysis biological matrices.

6. Conclusion

This study provided a recent overview on applications of DES in biological matrices associated with experimental considerations and features related to some of the most used matrices in clinical and toxicological analysis. The development of versatile microextraction approaches

involving DES has been increasing in the last years. Particularly related to biological matrices, the potential of these solvents is associated with numerous advantages such as simple and fast preparation, low toxicity, low-cost, rapid extractions, and simple analytical workflows.

It is worth mentioning that the high complexity of biological matrices can hinder some specific applications. Therefore, in some cases, the application of DES can be difficult due to some matrix components that can make the analysis a challenging task. However, in numerous cases, successful applications have been reported with particular interest to hydrophobic DES that can be used in aqueous matrices such as urine and oral fluid, for example. Importantly, applications of these “green” solvents in biological samples still limited. Therefore, efforts toward evaluation of DES in alternative matrices are still necessary, as well as the development and evaluation of automated and semi-automated methodologies. Novel materials comprised of poly (deep eutectic solvents) and magnetic DES also exhibit great potential to be applied for the analysis of biological matrices in the next years.

Declaration of Competing Interest

Authors declare no conflict of interest

Acknowledgements

The authors are grateful to the Brazilian governmental agency Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) grant number 21/2551-0000671-4 for the financial support that made this research possible.

References

- [1] É.A. Souza-Silva, N. Reyes-Garcés, G.A. Gómez-Ríos, E. Boyaci, B. Bojko, J. Pawliszyn, A critical review of the state of the art of solid-phase microextraction of complex matrices III. Bioanalytical and clinical applications, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 71 (2015) 249–264, doi:10.1016/j.trac.2015.04.017.
- [2] D.L. Nelson, M.M. Cox, *Principles of Biochemistry*, 7th ed., São Paulo, Artmed, 2019.
- [3] A. Denia, F.A. Esteve-Turrillas, S. Armenta, Analysis of drugs including illicit and new psychoactive substances in oral fluids by gas chromatography-drift tube ion mobility spectrometry, *Talanta* 238 (2021), doi:10.1016/j.talanta.2021.122966.
- [4] V. Reinstadler, S. Lierheimer, M. Boettcher, H. Oberacher, A validated workflow for drug detection in oral fluid by non-targeted liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 411 (2019) 867–876, doi:10.1007/s00216-018-1504-x.
- [5] C. Marasca, M. Protti, R. Mandrioli, A.R. Atti, A. Armirotti, A. Cavalli, D. De Ronchi, L. Mercolini, Whole blood and oral fluid microsampling for the monitoring of patients under treatment with antidepressant drugs, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 188 (2020), doi:10.1016/j.jpba.2020.113384.
- [6] A. Gałuszka, Z. Migaszkowski, J. Namieśnik, The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 50 (2013) 78–84, doi:10.1016/j.trac.2013.04.010.
- [7] A.A. Aly, T. Górecki, Green approaches to sample preparation based on extraction techniques, *Molecules* 25 (2020) 1–33, doi:10.3390/molecules25071719.
- [8] L.B. Santos, R.S. Assis, J.A. Barreto, M.A. Bezerra, C.G. Novaes, V.A. Lemos, Deep eutectic solvents in liquid-phase microextraction: contribution to green chemistry, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 146 (2022) 116478, doi:10.1016/j.trac.2021.116478.
- [9] A.P. Abbott, G. Capper, D.L. Davies, H.L. Munro, R.K. Rasheed, V. Tambyrajah, Preparation of novel, moisture-stable, Lewis-acidic ionic liquids containing quaternary ammonium salts with functional side chains, *Chem. Commun.* 1 (2001) 2010–2011, doi:10.1039/b106357j.
- [10] A.P. Abbott, G. Capper, D.L. Davies, R.K. Rasheed, V. Tambyrajah, Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures, *Chem. Commun.* (2003) 70–71, doi:10.1039/b210714g.
- [11] W. Tang, Y. An, K.H. Row, Emerging applications of (micro) extraction phase from hydrophilic to hydrophobic deep eutectic solvents: opportunities and trends, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 136 (2021) 116187, doi:10.1016/j.trac.2021.116187.
- [12] M.H. Zainal-Abidin, M. Hayyan, A. Hayyan, N.S. Jayakumar, New horizons in the extraction of bioactive compounds using deep eutectic solvents: a review, *Anal. Chim. Acta.* 979 (2017) 1–23, doi:10.1016/j.aca.2017.05.012.
- [13] M.Q. Farooq, N.M. Abbasi, J.L. Anderson, Deep eutectic solvents in separations: methods of preparation, polarity, and applications in extractions and capillary electrochromatography, *J. Chromatogr. A.* 1633 (2020) 461613, doi:10.1016/j.chroma.2020.461613.
- [14] B.B. Hansen, S. Spittle, B. Chen, D. Poe, Y. Zhang, J.M. Klein, A. Horton, L. Adhikari, T. Zelovich, B.W. Doherty, B. Gurkan, E.J. Maginn, A. Ragauskas, M. Dadmun, T.A. Zawodzinski, G.A. Baker, M.E. Tuckerman, R.F. Savinell, J.R. Sangoro,

- Deep eutectic solvents: a review of fundamentals and applications, *Chem. Rev.* 121 (2021) 1232–1285, doi:10.1021/acs.chemrev.0c00385.
- [15] F.M. Perna, P. Vitale, V. Capriati, Deep eutectic solvents and their applications as green solvents, *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* 21 (2020) 27–33, doi:10.1016/j.cogsc.2019.09.004.
- [16] E. Carasek, G. Bernardi, D. Morelli, J. Merib, Sustainable green solvents for microextraction techniques: recent developments and applications, *J. Chromatogr. A* 1640 (2021) 461944, doi:10.1016/j.chroma.2021.461944.
- [17] Y. Dai, J. van Spronsen, G.J. Witkamp, R. Verpoorte, Y.H. Choi, Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology, *Anal. Chim. Acta* 766 (2013) 61–68, doi:10.1016/j.aca.2012.12.019.
- [18] Y.C. Wu, P. Wu, Y.B. Lia, T.C. Liu, L. Zhang, Y.H. Zhou, Natural deep eutectic solvents as new green solvents to extract anthraquinones from *Rheum palmatum* L, *RSC Adv.* 8 (2018) 15069–15077, doi:10.1039/C7RA13581E.
- [19] D.T. Silva, R. Pualetto, S.S. Cavaleiro, V.C. Bochi, E. Rodrigues, J. Weber, C.B. Silva, F.D.P. Morisso, M.T. Barcia, T. Emanuelli, Natural deep eutectic solvents as a bio-compatible tool for the extraction of blueberry anthocyanins, *J. Food Compos. Anal.* 89 (2020) 103470, doi:10.1016/j.jfca.2020.103470.
- [20] Y. Xie, H. Liu, L. Lin, M. Zhao, L. Zhang, Y. Zhang, Y. Wu, Application of natural deep eutectic solvents to extract ferulic acid from *Ligusticum chuanxiong* Hort with microwave assistance, *RSC Adv* 9 (2019) 22677–22684, doi:10.1039/C9RA02665G.
- [21] S. Bajkacz, J. Adamek, Development of a method based on natural deep eutectic solvents for extraction of flavonoids from food samples, *Food Anal. Methods* 11 (2018) 1330–1344, doi:10.1007/s12161-017-1118-5.
- [22] L. Carbonell-Rozas, R. Canales, F.J. Lara, A.M. García-Campaña, M.F. Silva, A natural deep eutectic solvent as a novel dispersive solvent in dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic droplet for the determination of pesticide residues, *Anal. Bioanal. Chem.* 413 (2021) 6413–6424, doi:10.1007/s00216-021-03605-z.
- [23] C. Florindo, L.C. Branco, I.M. Marrucho, Quest for green-solvent design: from hydrophilic to hydrophobic (deep) eutectic solvents, *ChemSusChem* 12 (2019) 1549–1559, doi:10.1002/cssc.201900147.
- [24] M.B. Singh, V.S. Kumar, M. Chaudhary, P. Singh, A mini review on synthesis, properties and applications of deep eutectic solvents, *J. Indian Chem. Soc.* 98 (2021) 100210, doi:10.1016/j.jics.2021.100210.
- [25] A.P. Abbott, D. Boothby, G. Capper, D.L. Davies, R.K. Rasheed, Deep eutectic solvents formed between choline chloride and carboxylic acids: versatile alternatives to ionic liquids, *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 9142–9147, doi:10.1021/ja048266j.
- [26] F.M. Fuad, M.M. Nadzir, A. Harun/Kamaruddin, Hydrophilic natural deep eutectic solvent: a review on physicochemical properties and extractability of bioactive compounds, *J. Mol. Liq.* 339 (2021) 116923, doi:10.1016/j.molliq.2021.116923.
- [27] M. Tuzen Naemullah, A new robust, deep eutectic-based floating organic droplets microextraction method for determination of lead in a portable syringe system directly couple with FAAS, *Talanta* 196 (2019) 71–77, doi:10.1016/j.talanta.2018.12.027.
- [28] Q. Qu, Y. Lv, L. Liu, K.H. Row, T. Zhu, Synthesis and characterization of deep eutectic solvents (five hydrophilic and three hydrophobic), and hydrophobic application for microextraction of environmental water samples, *Anal. Bioanal. Chem.* 411 (2019) 7489–7498, doi:10.1007/s00216-019-02143-z.
- [29] Y. Liu, W. Xu, H. Zhang, W. Xu, Hydrophobic deep eutectic solvent-based dispersive liquid-liquid microextraction for the simultaneous enantiomeric analysis of five β -agonists in the environmental samples, *Electrophoresis* 40 (2019) 2828–2836, doi:10.1002/elps.201900149.
- [30] L. Khare, T. Karve, R. Jain, P. Dandekar, Menthol based hydrophobic deep eutectic solvent for extraction and purification of ergosterol using response surface methodology, *Food Chem* 340 (2021) 127979, doi:10.1016/j.foodchem.2020.127979.
- [31] X. Wang, Y. Wu, J. Li, A. Wang, G. Li, X. Ren, W. Yin, Ultrasound-assisted deep eutectic solvent extraction of echinacoside and oleuropein from *Syringia pubescens* Turcz, *Ind. Crops Prod.* 151 (2020) 112442, doi:10.1016/j.indcrop.2020.112442.
- [32] Y. Hsieh, Y. Li, Z. Pan, Z. Chen, J. Lu, Yuan J, Z. Zhu, J. Zhang, Ultrasonic-assisted synthesis of alcohol-based deep eutectic solvents for extraction of active compounds from ginger, *Ultrason. Sonochem.* 63 (2020) 104915, doi:10.1016/j.ultrsonch.2019.104915.
- [33] C. Florindo, F.S. Oliveira, L.P.N. Rebelo, A.M. Fernandes, I.M. Marrucho, Insights into the synthesis and properties of deep eutectic solvents based on cholinium chloride and carboxylic acids, *ACS Sustainable Chem. Eng.* 2 (2014) 2416–2425, doi:10.1021/sc500439w.
- [34] T. Jurić, D. Uka, B.B. Holló, B. Jović, B. Kordić, B.M. Popović, Comprehensive physicochemical evaluation of choline chloride-based natural deep eutectic solvents, *J. Mol. Liq.* 343 (2021) 116968, doi:10.1016/j.molliq.2021.116968.
- [35] X. Liu, Y. Bian, J. Zhao, Y. Wang, L. Zhao, Menthol-based deep eutectic solvent in dispersive liquid-liquid microextraction followed by solidification of floating organic droplet for the determination of three bisphenols with UPLC-MS/MS, *Microchem. J.* 159 (2020) 105438, doi:10.1016/j.microc.2020.105438.
- [36] R.K. Banjare, M.K. Banjare, K. Behera, S. Pandey, K.K. Ghosh, Micellization behavior of conventional cationic surfactants within glycerol-based deep eutectic solvent, *ACS Omega* 5 (2020) 19350–19362, doi:10.1021/acsomega.0c00866.
- [37] W.J. Jiang, J.B. Zhang, Y.T. Zou, H.L. Peng, K. Huang, Manufacturing acidities of hydrogen-bond donors in deep eutectic solvents for effective and reversible NH₃ capture, *ACS Sustain. Chem. Eng.* 8 (2020) 13408–13417, doi:10.1021/acssuschemeng.0c04215.
- [38] X. Zhu, S. Geng, T. Wen, F. Qin, L. Zhao, Vortex-assisted natural deep eutectic solvent dispersive liquid-liquid microextraction based on the solidification of a floating organic drop for the determination of benzoic acid and sorbic acid in condiments, *Anal. Methods* 13 (2021) 4805–4813, doi:10.1039/D1AY01218E.
- [39] H. Liu, P.K. Dasgupta, Analytical chemistry in a drop, *TrAC Trends Anal. Chem.* 15 (1996) 468–475, doi:10.1016/S0165-9936(96)00065-9.
- [40] P. Makoš, E. Słupek, J. Gębicki, Hydrophobic deep eutectic solvents in microextraction techniques—a review, *Microchem. J.* 152 (2020) 104384, doi:10.1016/j.microc.2019.104384.
- [41] O.E. Plastiras, E. Andreaidou, V. Samanidou, Microextraction techniques with deep eutectic solvents, *Molecules* 25 (2020) 6026, doi:10.3390/molecules25246026.
- [42] A. Shishov, A. Pochivalov, L. Nugbienyo, V. Andrich, A. Bulatov, Deep eutectic solvents are not only effective extractants, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 129 (2020) 115956, doi:10.1016/j.trac.2020.115956.
- [43] L. Qiao, R. Sun, C. Yu, Y. Tao, Y. Yan, Novel hydrophobic deep eutectic solvents for ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction of trace non-steroidal anti-inflammatory drugs in water and milk samples, *Microchem. J.* 170 (2021) 106686, doi:10.1016/j.microc.2021.106686.
- [44] N. Altunay, M. Tuzen, A simple and green ultrasound liquid-liquid microextraction method based on low viscous hydrophobic deep eutectic solvent for the preconcentration and separation of selenium in water and food samples prior to HG-AAS detection, *Food Chem.* 364 (2021) 130371, doi:10.1016/j.foodchem.2021.130371.
- [45] H. Sereshti, M. Zarei-Hosseinabadi, S. Soltani, F. Jamshidi, M.H. Shojaei AliAbadi, Hydrophobic liquid-polymer-based deep eutectic solvent for extraction and multi-residue analysis of pesticides in water samples, *Microchem. J.* 167 (2021) 106314, doi:10.1016/j.microc.2021.106314.
- [46] R. Chromá, M. Vilková, I. Shepa, P. Makoš-Chelstowska, V. Andrich, Investigation of tetrabutylammonium bromide-glycerol-based deep eutectic solvents and their mixtures with water by spectroscopic techniques, *J. Mol. Liq.* 330 (2021) 13–16, doi:10.1016/j.molliq.2021.115617.
- [47] D.C. Morelli, G. Bernardi, L. Morés, M.E. Pierri, E. Carasek, A green - high throughput -extraction method based on hydrophobic natural deep eutectic solvent for the determination of emerging contaminants in water by high performance liquid chromatography – diode array detection, *J. Chromatogr. A* 1626 (2020) 461377, doi:10.1016/j.chroma.2020.461377.
- [48] H. Sereshti, F. Karami, N. Nouri, A green dispersive liquid-liquid microextraction based on deep eutectic solvents doped with β -cyclodextrin: Application for determination of tetracyclines in water samples, *Microchem. J.* 163 (2021) 105914, doi:10.1016/j.microc.2020.105914.
- [49] S. Yıldırım, H.E. Sellitepe, Vortex assisted liquid-liquid microextraction based on in situ formation of a natural deep eutectic solvent by microwave irradiation for the determination of beta-blockers in water samples, *J. Chromatogr. A* 1642 (2021) 462007, doi:10.1016/j.chroma.2021.462007.
- [50] X. Di, Z. Zhang, Y. Yang, X. Guo, Switchable hydrophilicity solvent based homogeneous liquid-liquid microextraction for enrichment of pyrethroid insecticides in wolfberry, *Microchem. J.* 171 (2021) 106868, doi:10.1016/j.microc.2021.106868.
- [51] M. Rezaee, Y. Assadi, M.R. Milani Hosseini, E. Aghaei, F. Ahmadi, S. Berijani, Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction, *J. Chromatogr. A* 1116 (2006) 1–9, doi:10.1016/j.chroma.2006.03.007.
- [52] R.W. Becker, M.L. Wilde, D.S. Araújo, D.S. Lüdte, C. Sirtori, Proposal of a new, fast, cheap, and easy method using DLLME for extraction and preconcentration of diazepam and its transformation products generated by a solar photo-Fenton process, *Water Res* 184 (2020) 116183, doi:10.1016/j.watres.2020.116183.
- [53] E. Carasek, L. Morés, J. Merib, Basic principles, recent trends and future directions of microextraction techniques for the analysis of aqueous environmental samples, *Trends Environ. Anal. Chem.* 19 (2018) e00060, doi:10.1016/j.teac.2018.e00060.
- [54] N. Nishijo, T. Hayama, R. Tomita, T. Fujioka, Deep eutectic solvent extraction of cortisol and cortisone from human saliva followed by LC-UV analysis, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1179 (2021) 122828, doi:10.1016/j.jchromb.2021.122828.
- [55] R. Akramipour, M.R. Golpayegani, S. Gheini, N. Fattahi, Speciation of organic/inorganic mercury and total mercury in blood samples using vortex assisted dispersive liquid-liquid microextraction based on the freezing of deep eutectic solvent followed by GFAAS, *Talanta* 186 (2018) 17–23, doi:10.1016/j.talanta.2018.04.042.
- [56] N. Lamei, M. Ezoddin, K. Abdi, Air assisted emulsification liquid-liquid microextraction based on deep eutectic solvent for preconcentration of methadone in water and biological samples, *Talanta* 165 (2017) 176–181, doi:10.1016/j.talanta.2016.11.036.
- [57] S.M. Majidi, M.R. Hadjmohammadi, Hydrophobic borneol-based natural deep eutectic solvents as a green extraction media for air-assisted liquid-liquid microextraction of warfarin in biological samples, *J. Chromatogr. A* 1621 (2020) 461030, doi:10.1016/j.chroma.2020.461030.
- [58] Y.J. Li, W.H. Ding, Determination of benzotriazole and benzothiazole derivatives in human urine by eco-friendly deep eutectic solvent-based ultrasound-assisted liquid-liquid microextraction followed by ultrahigh performance liquid chromatography quadrupole-time-of-flight mass spectrometry, *Environ. Pollut.* 284 (2021) 117530, doi:10.1016/j.envpol.2021.117530.
- [59] W. Zhu, P. Jin, M. Cheng, H. Yang, M. Du, T. Li, G. Zhu, J. Fan, Novel recyclable acidic hydrophobic deep eutectic solvents for highly efficient extraction of calcium dobesilate in water and urine samples, *Talanta* 233 (2021) 122523, doi:10.1016/j.talanta.2021.122523.
- [60] S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, Liquid-liquid-liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis, *Anal. Chem.* 71 (1999) 2650–2656, doi:10.1021/ac990055n.
- [61] M.M. Khataei, Y. Yamini, A. Nazarpour, M. Karimi, Novel generation of deep eutectic solvent as an acceptor phase in three-phase hollow fiber liquid phase microextraction for extraction and preconcentration of steroidal hormones from biological fluids, *Talanta* 178 (2018) 473–480, doi:10.1016/j.talanta.2017.09.068.

- [62] I.A. Lawal, M. Klink, P. Ndungu, Deep eutectic solvent as an efficient modifier of low-cost adsorbent for the removal of pharmaceuticals and dye, *Environ. Res.* 179 (2019) 108837, doi:[10.1016/j.envres.2019.108837](https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108837).
- [63] I.A. Lawal, T.H. Dolla, K. Pruessner, P. Ndungu, Synthesis and characterization of deep eutectic solvent functionalized CNT/ZnCo₂O₄ nanostructure: kinetics, isotherm and regenerative studies on Eosin Y adsorption, *J. Environ. Chem. Eng.* 7 (2019) 102877, doi:[10.1016/j.jece.2018.102877](https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.102877).
- [64] N. Lamei, M. Ezzodin, M.S. Ardestani, K. Abdi, Dispersion of magnetic graphene oxide nanoparticles coated with a deep eutectic solvent using ultrasound assistance for preconcentration of methadone in biological and water samples followed by GC-FID and GC-MS, *Anal. Bioanal. Chem.* 409 (2017) 6113–6121, doi:[10.1007/s00216-017-0547-8](https://doi.org/10.1007/s00216-017-0547-8).
- [65] S. Rastbood, M.R. Hadjmohammadi, S.M. Majidi, Development of a magnetic dispersive micro-solid-phase extraction method based on a deep eutectic solvent as a carrier for the rapid determination of meloxicam in biological samples, *Anal. Methods* 12 (2020) 2331–2337, doi:[10.1039/D0AY00095G](https://doi.org/10.1039/D0AY00095G).
- [66] A. Mohebbi, S. Yaripour, M.A. Farajzadeh, M.R.A. Mogaddam, Combination of dispersive solid phase extraction and deep eutectic solvent-based air-assisted liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry as an efficient analytical method for the quantification of some tricyclic antidepressant drugs in biological fluids, *J. Chromatogr. A* 1571 (2018) 84–93, doi:[10.1016/j.chroma.2018.08.022](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.08.022).
- [67] M.A. Aguirre, A. Canals, Magnetic deep eutectic solvents in microextraction techniques, *Trends Anal. Chem.* 146 (2022) 116500, doi:[10.1016/j.trac.2021.116500](https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116500).
- [68] M. Abdolhosseini, F. Shemirani, S.M. Yousefi, Poly (deep eutectic solvents) as a new class of sustainable sorbents for solid phase extraction: application for preconcentration of Pb (II) from food and water samples, *Microchim. Acta* 187 (2020) 602, doi:[10.1007/s00604-020-04564-5](https://doi.org/10.1007/s00604-020-04564-5).
- [69] L. Li, K. Liu, H. Xing, X. Li, Q. Zhang, D. Han, H. He, H. Yan, B. Tang, Deep eutectic solvents functionalized polymers for easily and efficiently promoting biocatalysis, *J. Catal.* 374 (2019) 306–319, doi:[10.1016/j.jcat.2019.05.006](https://doi.org/10.1016/j.jcat.2019.05.006).
- [70] A. Safavi, R. Ahmadi, A.M. Ramezani, Vortex-assisted liquid-liquid microextraction based on hydrophobic deep eutectic solvent for determination of malondialdehyde and formaldehyde by HPLC-UV approach, *Microchem. J.* 143 (2018) 166–174, doi:[10.1016/j.microc.2018.07.036](https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.07.036).
- [71] A.Y. Shishov, M.V. Chislov, D.V. Nechaeva, L.N. Moskvina, A.V. Bulatov, A new approach for microextraction of non-steroidal anti-inflammatory drugs from human urine samples based on in-situ deep eutectic mixture formation, *J. Mol. Liq.* 272 (2018) 738–745, doi:[10.1016/j.molliq.2018.10.006](https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.10.006).
- [72] A. Jouyban, M.A. Farajzadeh, M.R.A. Mogaddam, F. Khodadadeian, M. Nemati, M. Khoubnasabjafari, In-situ formation of a hydrophobic deep eutectic solvent based on alpha terpineol and its application in liquid-liquid microextraction of three β -blockers from plasma samples, *Microchem. J.* 170 (2021) 106687, doi:[10.1016/j.microc.2021.106687](https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106687).
- [73] L. Nugbienyo, A. Shishov, S. Garmonov, L. Moskvina, V. Andruch, A. Bulatov, Flow method based on liquid-liquid extraction using deep eutectic solvent for the spectrofluorimetric determination of procainamide in human saliva, *Talanta* 168 (2017) 307–312, doi:[10.1016/j.talanta.2017.03.057](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.03.057).
- [74] M. Hemmati, M. Rajabi, A. Asghari, A twin purification/enrichment procedure based on two versatile solid/liquid extracting agents for efficient uptake of ultra-trace levels of lorazepam and clonazepam from complex bio-matrices, *J. Chromatogr. A* 1524 (2017) 1–12, doi:[10.1016/j.chroma.2017.09.045](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.09.045).
- [75] A. Jouyban, M.A. Farajzadeh, M.R. Afshar Mogaddam, Dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of deep eutectic solvent droplets for analysis of pesticides in farmer urine and plasma by gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 1124 (2019) 114–121, doi:[10.1016/j.jchromb.2019.06.004](https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.06.004).
- [76] H. Heidari, C. Mammostafaei, Spectrophotometric determination of lamotrigine in plasma samples: ultrasound-assisted emulsification-microextraction based on a hydrophobic deep eutectic solvent followed by back-extraction, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 247 (2021) 119098, doi:[10.1016/j.saa.2020.119098](https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.119098).
- [77] K. Li, Y. Jin, D. Jung, K. Park, H. Kim, J. Lee, In situ formation of thymol-based hydrophobic deep eutectic solvents: Application to antibiotics analysis in surface water based on liquid-liquid microextraction followed by liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1614 (2020) 460730, doi:[10.1016/j.chroma.2019.460730](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460730).
- [78] A. Jouyban, M.A. Farajzadeh, F. Khodadadeian, M. Khoubnasabjafari, M.R.A. Mogaddam, Development of a deep eutectic solvent-based ultrasound-assisted homogeneous liquid-liquid microextraction method for simultaneous extraction of daclatasvir and sofosbuvir from urine samples, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 204 (2021) 114254, doi:[10.1016/j.jpba.2021.114254](https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.114254).