



Eclética Química

ISSN: 0100-4670

atadorno@iq.unesp.br

Universidade Estadual Paulista Júlio de
Mesquita Filho
Brasil

Giroto, G.; Nogueira, K. L.; Moura, J. A.; Souza, J. B.; Giacometti, L. L.; Marchi, M.R.R; Tognolli, J. O.
Estrógenos em água: otimização da extração em fase sólida utilizando ferramentas quimiométricas

Eclética Química, vol. 32, núm. 2, 2007, pp. 61-67
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
Araraquara, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=42932210>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica
Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal
Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

Estrógenos em água: otimização da extração em fase sólida utilizando ferramentas quimiométricas

G. Giroto (IC*), Nogueira, K. L. (IC), Moura, J. A. (PG), Souza, J. B. (PG), Giacometti, L. L. (PG), Marchi, M. R. R. (PQ), Tognolli, J. O. (PQ).

Instituto de Química; Unesp - Araraquara - São Paulo - Brasil

*ggiroto@gmail.com

Resumo: Muitos métodos analíticos estão sendo desenvolvidos visando à determinação de contaminantes orgânicos, especialmente alteradores endócrinos. Tais métodos baseiam-se geralmente na extração em fase sólida (SPE) seguida por determinação cromatográfica (CG ou HPLC). No presente trabalho utilizou-se ferramentas quimiométricas no processo de SPE para avaliar os principais fatores que influenciam tal processo e as interações entre os mesmos. Foram analisadas matrizes de água subterrânea fortificada com hormônios (17 β estradiol, estrona e 17 β etinilestradiol) e a determinação analítica foi feita por HPLC/Fluorescência. Um planejamento fatorial completo foi utilizado. Os fatores escolhidos incluíram: condicionamento da fase sólida, concentração dos analitos, volume da amostra e solvente de eluição. As melhores condições obtidas foram: 500 mL da amostra, condicionamento da fase sólida (C18) com acetona (4mL), metanol (6 mL) e água pH 3 (10 mL), e eluição dos analitos com 4 mL de acetona.

Palavras-chave: alteradores endócrinos; planejamento fatorial; extração em fase sólida.

Introdução

Alteradores endócrinos (EDCs), fármacos ativos (PhACs) e produtos de uso pessoal (PCPIs) vem despertando grande interesse em estudos ambientais pelo fato de estarem relacionados, dentre outros fatores, ao surgimento de anomalias no sistema endócrino de diversas espécies aquáticas e em seres humanos [1].

Dentre os contaminantes que afetam o ambiente aquático, os mais relevantes são os provenientes de efluentes industriais e domésticos, com ou sem tratamento, nos corpos d'água. A contaminação difusa proveniente da agricultura (fertilizantes e pesticidas), bem como a deposição seca e úmida de contaminantes atmosféricos também são relevantes.

Pesquisas realizadas em diferentes regiões do mundo [3-8] exibem dados que comprovam a presença destes micropoluentes e seus metabólitos em rios, o que denota que os efluentes domésticos ou não estão sendo tratados (realidade presente na maioria dos municípios

brasileiros) ou a eficiência do tratamento utilizado não é adequada.

Estes microcontaminantes podem apresentar efeito biológico em concentrações muito baixas (nanogramas/litro), principalmente a organismos aquáticos.

Dentre os efeitos mais preocupantes está o fato de apresentarem potencial de alteradores endócrinos. Em humanos alguns efeitos como a diminuição no número de espermatozoides em homem e o aumento da incidência de câncer de mama em mulheres tem sido correlacionados com a exposição ambiental a estes compostos. [9].

Diversos métodos analíticos vêm sendo desenvolvidos visando à determinação e análise de substâncias como (EDCs), (PhACs) e (PCPIs) em águas [10]. Estrógenos produzidos naturalmente por mamíferos, como o 17 β -estradiol e seus metabólitos, estriol e estrona, excretados principalmente por mulheres em idade fértil e estrógenos sintéticos como o etinilestradiol, usados extensivamente como contraceptivos e

propósitos terapêuticos (controle da síndrome da menopausa e câncer de próstata) tem tido grande interesse pela comunidade científica [11,12].

Uma das etapas mais críticas envolvidas na determinação de estrógenos consiste na prévia extração, isolamento e concentração dos analitos de interesse. Uma das técnicas que tem obtido maior êxito para tal processo é a extração em fase sólida (SPE) [13].

Diversos são os sorventes utilizados na SPE de EDCs, PhAs e PCPIs em amostras ambientais. Dentre as comercialmente disponíveis destacam-se pela grande utilização a contendo o grupo octadecilsilano (C-18) quimicamente ligado à sílica e a fase polimérica polidivinilbenzeno (PEDVB) conhecida por sua habilidade e eficiência em reter um grande número de compostos [14].

Na SPE vários são os fatores intervenientes no sucesso do processo de isolamento e concentração dos analitos. Na literatura encontra-se uma profusão de métodos díspares para um mesmo propósito, denotando que o estudo aprofundado da otimização da SPE muitas vezes não foi efetuado. Verifica-se, a distinção tanto na escolha dos fatores quanto aos níveis selecionados [14-19].

De modo a verificar as interações existentes entre cada etapa do processo buscou-se o auxílio da quimiometria, ferramenta útil no planejamento e análise experimental, e que permite a análise multivariada, ou seja, a análise simultânea dos vários fatores, fornecendo dentre outros resultados, os efeitos de interação entre os mesmos. As técnicas de análise estatística multivariada

tiveram sua aplicação em química iniciada no Brasil no Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas na década de 1980. A grande expansão destas ferramentas foi acompanhada da expansão de suas aplicações na análise química. Dentre alguma de suas aplicações estão inseridas a otimização de processos analíticos na determinação de compostos orgânicos como as técnicas cromatográficas, de análise térmica e de extração e pré - tratamento de amostras, envolvendo nesta última a concentração e isolamento dos compostos de interesse [20].

As necessidades da utilização de ferramentas quimiométricas na otimização de processos de extração, concentração e isolamento de substâncias baseia-se no fato de o processo admitir a otimização de uma série de fatores intervenientes e que possam ter interação entre si, suprimindo desta forma algumas das lacunas deixadas pela análise univariada.

Nos trabalhos reportados na literatura, diversos são os fatores considerados na otimização do processo de extração em fase sólida (SPE) de compostos orgânicos. Dentre eles se encontram o tipo de fase sólida, o volume da amostra, o volume e a composição do solvente de eluição, a temperatura da extração, o pH e a quantidade de sais dissolvidos na amostra. A gama de aplicações de técnicas quimiométricas na otimização da extração por SPE é bastante ampla, incluindo diferentes analitos e matrizes, com o por exemplo a determinação de quimioterápicos antimicrobianos em plasma sanguíneo, determinação de ácidos orgânicos em vinhos e

Tabela 1: Planejamentos experimentais em técnicas de extração de analito

REFERÊNCIA	TIPO DE EXTRAÇÃO	FASE SÓLIDA	TIPO(S) DE PLANEJAMENTO(S)	COMPOSTOS ANALISADOS / MATRIZ
21	SPME*	PDMS – DVB	Fatorial fracionado ; fatorial completo	Ataíclor/Água
22	SPE**	Carbono Grafitado	Fatorial fracionado ; Central Composto	27 pesticidas
23	SPME	PDMS	Fatorial completo; Central Composto	Alquilbenzenos / Detergentes
24	SPE	C-8; C-18; Sílica	Fatorial fracionado ; Central Composto	Drogas antidepressivas / Plasma sanguíneo
25	LLE / SPE	C-18	Plackett-Bruman	Ácidos orgânicos e compostos fenólicos
26	SPME	PDMS ; PDMS-DVB ; CAR-PDMS ; CA-DVB ; PA	Fatorial com resolução tipo V	Ésteres Ftálatos
27	SBSE-LD	PDMS	Fatorial com resolução tipo V	Ésteres difenílicos polibromados

SPE; Extração em fase sólida; SPME – Microextração em fase sólida; SBSE/LD - Extração por barra giratória/desorção líquida; LLE – Extração líquido – líquido; PDMS – Polidimetilsiloxano; DVB – Divinilbenzeno; CAR - Carboxen ; CA – Carbowax; PA - Poliacrilato

determinação de pesticidas em águas [22,23] .

Além da SPE outros métodos de extração são também utilizados como a microextração em fase sólida (SPME).

Nota-se, nos trabalhos reportados na literatura duas grandes tendências. A primeira envolve uma sondagem inicial geralmente feita a partir de um planejamento fatorial, completo ou fracionado, visando estabelecer os fatores principais na análise para o direcionamento de um estudo mais aprofundado e a segunda tendência é apresentar um segundo planejamento que acrescente informações ao primeiro a partir de experimentos mais específicos como o a construção de superfícies de resposta. A Tabela 1, lista o tipo de extração, a fase sólida utilizada, os procedimentos observados e os compostos analisados para uma série de artigos.

O presente trabalho consiste na utilização de ferramentas quimiométricas com o objetivo de inferir quais fatores apresentam importância significativa na determinação das melhores condições de SPE e conseqüentemente a melhor recuperação para os estrógenos: estrona, 17 β -estradiol e etinilestradiol, cujas fórmulas moleculares são mostradas na Figura 1 [24]. Têm-se também como objetivo verificar a influência nos níveis de cada fator visando estabelecer uma faixa ideal de trabalho para que posteriormente, a partir de estudos mais detalhados possa se estabelecer às condições ótimas para a análise.

Material e Métodos

A otimização das condições de extração foi realizada para a fase sólida C-18. Os fatores selecionados para o procedimento foram baseados nas diferentes condições observadas na literatura (3-8) e posteriormente comparado ao processo

utilizado por nosso grupo de pesquisa, o qual utiliza a metodologia desenvolvida por Ternes et al [27] modificada. Os fatores selecionados foram: concentração dos analitos, volume da amostra, solvente de eluição e condicionamento da fase sólida.

As concentrações foram definidas obedecendo à faixa de resposta linear da técnica HPLC/ Fluorescência para os estrógenos em questão.

A Tabela 2 ilustra os fatores escolhidos com seus respectivos níveis. O condicionamento denominado método 1 (HAMW) consiste em passar pelo cartucho 6 mL de hexano, 2 mL de acetona, 6 mL de metanol e 10 mL de água pH 3. O condicionamento pelo método 2 (AMW) consiste em 4 mL de acetona, 6 mL de metanol e 10 mL de água com pH 3. Um planejamento fatorial 2^4 foi realizado. A ordem de execução dos experimentos foi gerada e randomizada utilizando-se o aplicativo computacional MINITAB.

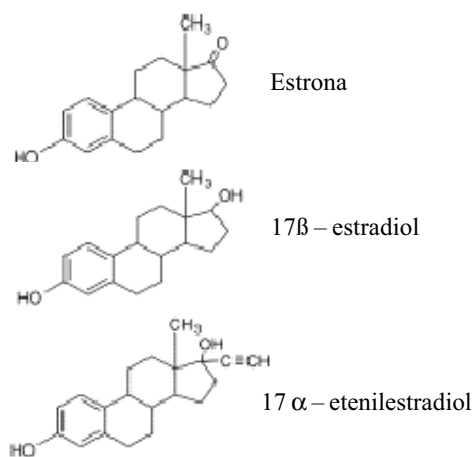


Figura 1: estruturas dos estrógenos que serão estudados [13]

Tabela 2: Fatores e níveis adotados para o planejamento fatorial

VARIÁVEIS	NÍVEIS SELECIONADOS	
	Nível Alto (máximo)	Nível Baixo (mínimo)
Concentração Estrona	5 $\mu\text{g.L}^{-1}$	0,4 $\mu\text{g.L}^{-1}$
Concentração Etinilestradiol	50 ng.L^{-1}	5 ng.L^{-1}
Concentração Estradiol	50 ng.L^{-1}	5 ng.L^{-1}
Volume da amostra	1 Litro	0,5 Litro
Solvente de Eluição	Acetona	Metanol
Condicionamento	Método 1	Método 2

Os experimentos foram realizados em oito blocos de dois experimentos cada um escolhido aleatoriamente pelo programa. Cada experimento foi realizado em triplicata, analisando-se também uma amostra testemunha (água sem a adição dos estrógenos).

Instrumentação

O sistema analítico utilizado foi um cromatógrafo líquido (Varian Pro-Star 230), equipado com injetor automático (Varian 400), e detector de Fluorescência (Varian 320). A separação cromatográfica foi obtida em uma coluna de fase reversa, C-18 octadecilsilano (Phenomenex) de 250 x 4,60 mm D.I. com partículas de 5 microns. Os dados foram adquiridos utilizando o software Varian PRO STAR. O planejamento fatorial e a análise dos dados recolhidos foram realizados utilizando-se o software MINITAB.

Reagentes

Estrona pureza 97,0%, 17- β -Estradiol pureza 97,0% e 17- β -Ethinilestradiol pureza 98% da Sigma Aldrich.

Os solventes metanol e acetonitrila da J. T. Baker e acetona e hexano da Mallickrodt.

Soluções estoque mistas de 10 mg/mL dos hormônios estrona, 17- β -Estradiol e 17- α -etinilestradiol foram preparadas em acetonitrila e armazenadas em ambiente sem a presença de luz e a -15 °C. Por diluição, preparou-se as soluções em concentrações adequadas à realização dos experimentos.

Extração em fase sólida

Neste estudo foi utilizada água subterrânea, obtida em Araraquara (SP), enriquecida com os estrógenos de interesse, nas concentrações previamente escolhidas.

O processo de SPE foi desenvolvido, utilizando o cartucho ACCUBOND C-18 (Octadecilsilano), 500 mg de sorvente e 6 mL de reservatório. A fortificação das amostras de água subterrânea foi efetuada adicionando-se 500 mL.L⁻¹ de uma solução o padrão mista (contendo os três estrógenos) de concentração conhecida, para a obtenção de água contendo os analitos nos níveis apresentados na Tabela 2.

A amostra de água foi filtrada utilizando membrana de fibra de vidro de 0,45 μ m de poro, (Schleicher & Schuell) e percolada pela fase sólida após o condicionamento. Após a eluição dos estrógenos, o eluato foi evaporado até a secura sob fluxo de nitrogênio. O resíduo foi redissolvido em 500mL de acetonitrila, filtrado com filtros MILLIPORE transferido para vials de (1,8 mL) analisado por HPLC/Fluorescência. Todas as análises foram efetuadas em triplicata, sendo a quantificação efetuada mediante a comparação com a curva analítica traçada para os estrógenos.

Condições cromatográficas

Na análise de estrógenos por HPLC, a mistura de solventes mais utilizada, é acetonitrila:

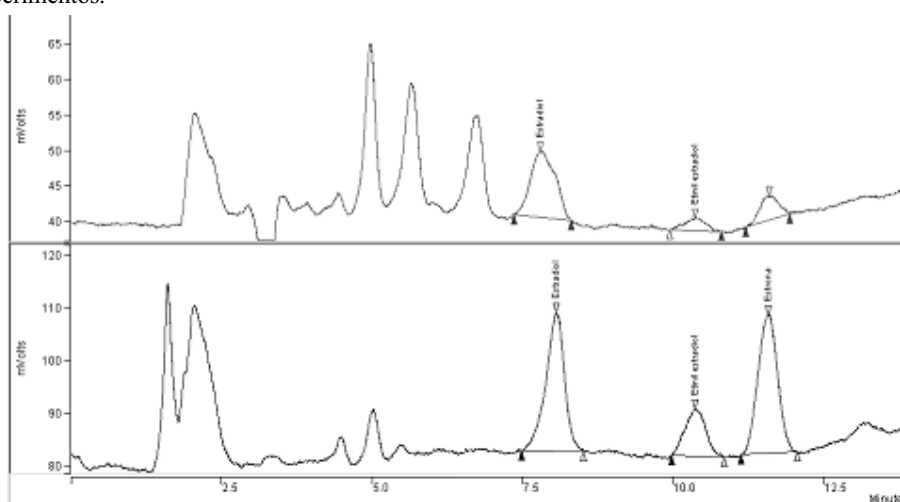


Figura 2: Cromatograma de recuperações. a) recuperação baixa; b) recuperação alta.

água [29-31]. Lopes, em trabalho desenvolvido anteriormente neste grupo de pesquisa [32] otimizou a separação cromatográfica dos estrógenos estudados utilizando gradiente de eluição de acetonitrila (solventeA) e água (solventeB), variando de 50:50 (v/v), mantido por 7 minutos, seguida de variação linear até 60:40 (v/v).

Resultados e discussão

A recuperação dos analitos foi obtida comparando-se a concentração obtida após o ensaio e a adicionada inicialmente. A Figura 2 apresenta um cromatograma de duas recuperações realizadas, obtendo-se para a primeira recuperação baixa e para a segunda recuperação alta. Os dados de recuperação foram tratados com o programa MINITAB, o qual através dos gráficos gerados propiciou estimar as condições que apresentaram maior influência para a realização da extração.

Estrona

O gráfico dos efeitos principais (Figura 3) para estrona apresenta quais fatores são de maior significância nos resultados finais da análise. As condições melhores são indicadas pelas retas e a inclinação indica o nível de significância, onde o ponto mais alto indica a melhor condição. Quanto maior a inclinação maior a variação na resposta causada por aquele efeito. Deste modo, para a estrona vemos que há uma variação na concentração, sendo a melhor condição obtida na concentração em nível alto, no solvente de eluição sendo o mais adequado o metanol e no condicionamento apresentando melhores resultados o condicionamento AMA. Quanto ao volume da amostra percebe-se uma reta com pouca

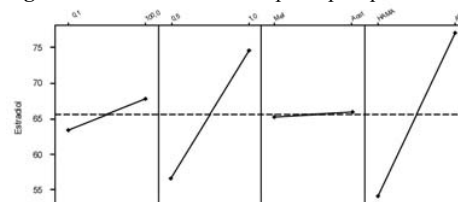
inclinação, o que indica menor influência em relação aos demais fatores, para a análise. Entretanto, pode-se ainda estabelecer o melhor volume como sendo o de 0,5 L.

Estradiol

Na Figura 4 temos o gráfico referente aos efeitos principais para o estradiol demonstrando que as melhores condições para a extração são: concentração em nível alto, acetona como solvente de eluição e condicionamento pelo método AMA e 1 L de amostra.

Verifica-se pelo gráfico que a variação do solvente de eluição praticamente não apresenta alteração nos resultados da análise, sendo deste modo pouco significativa.

Figura 4: Gráfico dos efeitos principais para Estradiol



Etinilestradiol

Na Figura 5 apresenta o gráfico referente aos efeitos principais para a extração do etinilestradiol demonstrando que as melhores condições para a extração são: concentração em nível baixo, acetona como solvente de eluição e condicionamento pelo método AMA e 0,5 L de amostra.

A partir do gráfico verifica-se que os fatores mais significativos são a concentração e o solvente de eluição. Outro ponto de destaque é a melhor condição para o volume como sendo 0,5 L. Isto pode ser explicado pelo efeito de arraste do solvente devido ao maior volume de água [33]. Outros autores também concluíram que volumes menores podem acarretar em melhores recuperações para etinilestradiol em esgoto [34].

Figura 5: Gráfico dos efeitos principais para etinilestradiol

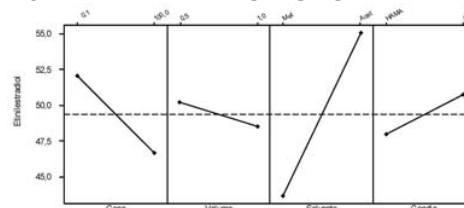


Figura 3: Gráfico dos efeitos principais para estrona

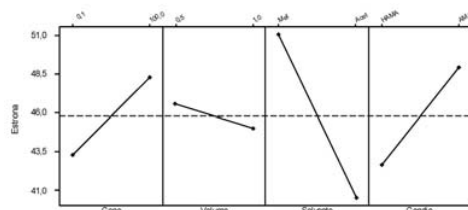


Tabela 3: Condições obtidas para a extração em fase sólida com C18 dos hormônios estudados em água.

	Concentração	Condicionamento	Solvente de eluição	Volume da amostra
Estrona	5 g.L ⁻¹	4 ml Acetona + 6 mL metanol + 10 mL água pH3	Metanol	0,5 L
Estradiol	50 ng.L ⁻¹	4 ml Acetona + 6 mL metanol + 10 mL água pH3	Metanol	1,0 L
Etinilestradiol	5 ng.L ⁻¹	4 ml Acetona + 6 mL metanol + 10 mL água pH3	<u>Acetona</u>	0,5 L

Conclusões

A utilização de métodos quimiométricos para a realização do planejamento e tratamento dos resultados se mostrou eficiente, fornecendo informações úteis para a otimização da análise.

A partir dos dados gerados podemos estabelecer os fatores que apresentam maior influência para a extração em fase sólida dos analitos de trabalho, para o adsorvente C18. A Tabela 3 ilustra as melhores condições obtidas no ensaio para a extração dos três hormônios.

Como os procedimentos descritos na literatura apresentam variações nas condições da extração, pode-se a partir dos dados obtidos padronizar este procedimento, evitando desta forma análises que promovam resultados não satisfatórios, resultando também em economia de tempo e material de consumo.

Recebido em: 16/03/2007

Aceito em: 05/06/2007

Referências

- [1] C. G. Daughton, T. A. Ternes, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 12 (2001) 1067
- [2] http://www.igm.ineti.pt/edicoes_online/diversos/agua_subterranea/aguaterra.htm acesso em: 09 mai. 2005.
- [3] R. M. Servos, T. D. Bennie, K. B. Burnison, A. Jurkovic, R. Mcinnis, T. Neheli, A. Schnell, P. Seto, A. S. Smuth, A. T. Ternes, Science of Tot. Environ. 336 (2005) 155.
- [4] E. R. Alcock, A. Sweetman, C. K. Jone, Chemosph. 38 (10) (1999) 2247.
- [5] A. Katsoyiannis, C. Samara, Environ. Research 97 (2005) 245.
- [6] P. E. Stackelber, E. R. Furlong, M. T. Meyer, S. D. Zaugg, A. K. Henderson, D. B. Reissman, Science of the Tot. Environ. 329 (2004) 99.
- [7] T. Urase, T. Kikuta, T. Water Research 39 (2005) 1289.
- [8] C. Adams, Y. Wang, K. Loftin, M. Meyer, J. Environ. Eng., 128 (3) (2002) 253.

G. Girotto, Nogueira, K. L., Moura, J. A., Souza, J. B., Giacometti, L. L., Marchi, M. R. R., Tognolli, J. O. Estrogens in water: optimization of solid phase extraction by chemometric tools

Abstract: Several analytical methods have been proposed for organic pollutants determination in water, specially endocrine disrupters. These methods are frequently based in solid phase extraction (SPE) followed by chromatographic determination (GC or HPLC). In this work it was used chemometric tools on experimental design and experimental data treatment to evaluate the principal factors in SPE process and their interactions. It was used water matrices fortified with hormones (17 β estradiol, estrone and 17 β ethinylestradiol) and HPLC/Fluorescence did analytical determination. It was used a factorial complete design. The choosed factors included: solid phase type, analytes concentration, sample volumen, eluent composition, analytes concentration and solvents to solid phase conditioning. The best condition obtained in this initial procedure included: 500 mL sample, conditioning SPE cartridge with acetone (4mL), methanol (6 mL) and water pH 3 (10 mL), and analytes elution with acetone.

Keywords: chemometry, estrogens, SPE

- [9] D.G.J. Larsson, M. Adolfsson-Erici, J. Parkkonen, M. Pettersson, A. H. Berg, P. E. Olsson, L. Förlin, *Aquat. Toxicol.* 45 (1999) 91.
- [10] M. A. Soliman, J. A. Pedersen, I. H. Suffet (Mel), *J. Chromatogr. A*, 1029 (2004) 223.
- [11] M. J. Sparrow, *N.Z. Med. J.* 100 (818) (1987) 102.
- [12] M.S. Diaz-Cruz, M.J. Lopez de Aldea, R. Lopez, D. Barcelo, *J. Mass Spectrom.* 38 (2003) 91.
- [13] M. L. Fernando, *Extração em fase sólida (SPE) São Carlos : RIMA (2004) chap. 1*.
- [14] A. Laganà, A. Bacaloni, I. De Leva, A. Faberi, G. Fago, A. Marino, *Anal. Chim. Acta* 501 (2004) 79.
- [15] R. Liu, J. L. Zhou, A. Wilding, *J. of Chromatogr. A*, 1022 (2004) 179.
- [16] L. Brossa, E. Pocurull, F. Borrull, R. M. Marce, *Chromatogr.* 59 (2004) 419.
- [17] T. Benijts, W. Lambert, A. A. De Leenheer, *Anal. Chem.* 76 (2004) 704.
- [18] H. Lee, T. E. Peart, M. Lewina Svoboda *J. of Chromatogr. A* 1094 (2005) 122.
- [19] S. R. Mozaz, M. J. López, A. D. Barceló, *J. of Chromatogr. A* 1045 (2004) 85.
- [20] Neto, B. B.; Scarminio, I. S.; Bruns, R. E. *Quim. Nova*, vol. 29, 6, (2006) 1401.
- [21] C. Gonzalez-Barreiro, M. Lores, M.C. Casais, R. Cela *J. of Chromatogr. A*, 896 (2000) 373.
- [22] Ferreiros, N.; Iriarte, G.; Alonso, R. M.; Jimenez R. M.; *Talanta* 69 (2006) 747.
- [23] Spanilá, M.; Pazourek, J.; Farková, M.; Havel, J.; *J. of Chromatogr. A*, 1084 (2005) 180.
- [24] C. Gonzalez-Barreiro, M. Lores, M.C. Casais, R. Cela *Journal of Chromatography A*, 896 (2000) 373.
- [25] Ferreiros, N.; Iriarte, G.; Alonso, R. M.; Jimenez R. M.; *Talanta* 69 (2006) 747.
- [26] Spanilá, M.; Pazourek, J.; Farková, M.; Havel, J.; *J. of Chrom. A*, 1084 (2005) 180–185
- [27] A. M. Carro, J. C. Cobas, J. B. Rodríguez, R. A. Lorenzo and R. Cela
- [28] D. B. Gower, *Catabolism and excretion of steroids*. In: Mark HLJ, editor. *Biochemistry of steroid hormones*. Oxford, UK: Blackwell, (1975) chap. 3.
- [29] T. TERNES, *Trends in analytical chemistry*, Amsterdam, 225, 81. <http://www.chemkeys.com> acessado em nov. de 2006
- [30] C. Baronti, R. Curini, G. D'ascenzo, A. Di Corcia, A. Gentili, R. Samperi, *Environ. Science and Technol.* 34 (24) (2000) 5049.
- [31] Y. Okho, K. I. Juchi, C. Niwa, T. Tatsuma, T. Nakashima, T. Iguchi, Y. Kubota, A. Fujishima, *Environ. Science & Technol.*, 36 (2002) 4175.
- [32] G. D'Ascenzo, A. Di Corcia, R. Mancini, R. Mastropasqua, M. Nazzari, R. Samperi, *The Science of the Tot. Environ.*, Amsterdam, 302 (2003) 199.
- [33] L.G. Lopes, *Tese de Doutorado Instituto de Química UNESP-Araraquara* (2006).
- [34] G. G.Ying, R. S. Kookana, Y. Ru, *Environ. International* 28 (2002) 545.
- [35] S. Rodriguez-Mozaz, M.J.Lopez de Alda, D.Barceló. *Anal. Chem.* 76 (2004) 6998