Química
Boletim da Sociedade Portuguesa de Química

Manuscrito Aceite

Título: Sistemas Aquosos Bifásicos com Líquidos Iónicos: Novas Abordagens em Bioanálise

Autores: Maria S. M. Mendes, Inês B. Santana, Mara G. Freire, Francisca A. e Silva

Este manuscrito foi aceite após revisão por pares e aparece como um Manuscrito Aceite *online* antes de edição, provas e publicação formal da versão final (VF) no "QUÍMICA". A VF será disponibilizada brevemente e pode ser ligeiramente diferente do Manuscrito Aceite como resultado de edição.
Os autores são responsáveis pelo conteúdo deste Manuscrito Aceite.

Disponível *online*: 03/06/2025

Sociedade Portuguesa de Química

Este artigo é protegido por copyright. Todos os direitos reservados. SPQ 2025

Sistemas Aquosos Bifásicos com Líquidos Iónicos: Novas Abordagens em Bioanálise

Maria S. M. Mendes,[1] Inês B. Santana,[1] Mara G. Freire,[1] Francisca A. e Silva[1,*]

[1]*CICECO – Instituto de Materiais de Aveiro, Departamento de Química, Universidade de Aveiro*

francisca.silva@ua.pt

Manuscrito Aceite

Abstract

Ionic Liquid-Based Aqueous Biphasic Systems: New Approaches in Bioanalysis. *Biomarkers play a crucial role in clinical practice, enabling early diagnosis and personalized treatments. In this context, the effective pre-treatment of human samples is essential to optimize the detection and quantification of biomarkers. This review article addresses the main challenges in clinical biomarker analysis, highlighting ionic liquid-based aqueous biphasic systems (IL-ABS) as an innovative solution for the pre-treatment of human samples. When properly designed, IL-ABS offer several advantages over conventional methods, providing higher efficiency, selectivity, biocompatibility, and cost-effectiveness. Their potential is evidenced by integration with various analytical techniques, improving sensitivity and accuracy in the analysis of biomarkers in urine, blood, and saliva samples. Several studies demonstrate the potential of IL-ABS, establishing them as promising tools in modern medicine.*

Resumo

Os biomarcadores desempenham um papel crucial na prática clínica, permitindo diagnósticos precoces e tratamentos personalizados. Neste contexto, o pré-tratamento eficaz das amostras humanas é fundamental para otimizar a deteção e quantificação de biomarcadores. Este artigo de revisão aborda os principais desafios na análise de biomarcadores clínicos, destacando os sistemas aquosos bifásicos com líquidos iónicos (SAB-LI) como uma solução inovadora para o pré-tratamento de amostras humanas. Quando devidamente projetados, os SAB-LI oferecem diversas vantagens em relação aos métodos convencionais, proporcionando maior eficiência, seletividade, biocompatibilidade e custo-benefício. O seu potencial é evidenciado pela integração

Este artigo é protegido por copyright. Todos os direitos reservados. SPQ 2025

com diversas técnicas analíticas, melhorando a sensibilidade e precisão na análise de biomarcadores em amostras de urina, sangue e saliva. Vários estudos demonstram o potencial dos SAB-LI, posicionando-os como ferramentas promissoras na medicina moderna.

1. Introdução

Os biomarcadores clínicos são ferramentas essenciais na medicina moderna, oferecendo uma avaliação objetiva do estado de saúde dos pacientes e complementando a observação de sintomas clínicos [1]. Estes indicadores biológicos incluem enzimas, proteínas e alterações genéticas, e fornecem informações detalhadas sobre processos biológicos e patológicos a nível molecular e celular [2-6]. A monitorização contínua possibilita a deteção precoce de alterações subtis, permitindo intervenções terapêuticas mais eficazes e personalizadas, além de contribuir para a avaliação da progressão de doenças crónicas e para o acompanhamento da resposta a tratamentos [7]. Contudo, a sua integração na prática clínica enfrenta desafios, como a interpretação dos resultados, que requer consideração do contexto individual de cada paciente, e a necessidade de validação rigorosa em termos de precisão e sensibilidade [8,9]. Para melhorar a deteção, é fundamental o pré-tratamento das amostras, aumentando a sensibilidade e especificidade dos testes [10,11].

A Figura 1 ilustra as principais etapas do processo de análise de biomarcadores, destacando o pré-tratamento das amostras humanas, especialmente em fluidos como sangue e urina [12]. Este processo visa remover interferentes, concentrar os biomarcadores e melhorar a precisão e sensibilidade das técnicas analíticas adotadas a jusante [12]. A remoção de interferentes evita distorções nos sinais dos biomarcadores, enquanto a concentração dos analitos-alvo permite alcançar os limites de deteção das técnicas analíticas [12,13]. Assim, o pré-tratamento assegura que as análises sejam mais fiáveis, permitindo a deteção de biomarcadores em concentrações mínimas, o que é crucial para diagnósticos precoces e monitorização de doenças [14].

Manuscrito Aceite

Este artigo é protegido por copyright. Todos os direitos reservados. SPQ 2025

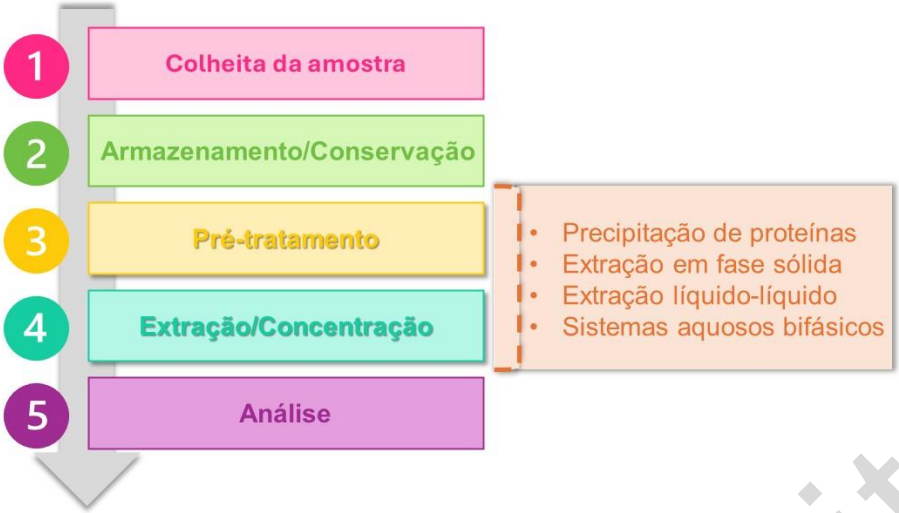

Figura 1 - Principais etapas do processo de análise de biomarcadores, destacando a fase de pré-tratamento e a etapa de extração/concentração da amostra.

A seleção da técnica de pré-tratamento mais adequada depende de vários fatores, como a natureza das amostras, as características dos analitos de interesse (tamanho molecular, polaridade e estabilidade) e a sensibilidade necessária para a análise [15,16]. Amostras com analitos em baixas concentrações exigem métodos sensíveis e eficientes na concentração dos analitos. A técnica de pré-tratamento deve ser compatível com os métodos analíticos subsequentes, como cromatografia líquida acoplada a um método de deteção e espectrometria de massa, para garantir uma preparação adequada das amostras [15,17]. Dada a complexidade das amostras biológicas, a combinação de diferentes técnicas de pré-tratamento tem-se mostrado a estratégia mais eficaz, maximizando a eficiência e assegurando resultados precisos e reprodutíveis na análise de biomarcadores [18].

As técnicas mais comuns de pré-tratamento de amostras humanas incluem: (i) precipitação de proteínas, que usa solventes, ácidos ou polímeros para desnaturar e precipitar proteínas, mas pode resultar em perda de analitos e baixa seletividade [19,20]; (ii) extração em fase sólida, que permite a concentração de analitos e remoção de interferentes, mas exige adsorventes específicos que têm um custo elevado e um tempo de vida limitado, além de exigirem um processo de otimização demorado para a sua seleção [21]; e (iii) extração líquido-líquido, que separa analitos entre duas fases imiscíveis, sendo eficaz na remoção de interferentes, mas com uso de solventes orgânicos e tempos de extração longos [22]. Até ao momento, nenhuma técnica resolve de forma individual e simultânea questões de seletividade, rendimento, custo e impacto ambiental.

Manuscrito Aceite

Este artigo é protegido por copyright. Todos os direitos reservados. SPQ 2025

Os sistemas aquosos bifásicos (SAB) surgem como uma alternativa promissora face às técnicas convencionais de pré-tratamento, superando desafios contemporâneos na extração e purificação de biomarcadores. O elevado conteúdo de água, a alta biocompatibilidade, o custo-benefício vantajoso, a flexibilidade tecnológica e o potencial de miniaturização e automação tornam os SAB particularmente adequados para esta função. Assim, têm sido aplicados em diversos domínios da bioanálise, desde proteómica até testes laboratoriais e *point-of-care*, com o objetivo de melhorar a precisão e a sensibilidade dos resultados [23,24]. Este artigo oferece uma visão global sobre o desenvolvimento e aplicação dos SAB, com foco nos avanços proporcionados pela utilização de líquidos iónicos na análise de biomarcadores clínicos.

2. Sistemas aquosos bifásicos em aplicações bioanalíticas

Os SAB formam-se quando duas soluções aquosas incompatíveis, normalmente compostas por dois polímeros ou por um polímero e um sal, são misturadas dentro de uma determinada gama de concentração, temperatura e pH, resultando na formação de duas fases ricas em água [25]. O fenómeno foi observado inicialmente por Beijerinck no final do século XIX e, mais tarde, consolidado por Albertsson como uma técnica eficiente para separação de biomoléculas [26,27].

Os SAB são descritos por diagramas de fases que fornecem informações sobre a composição e propriedades das fases em equilíbrio termodinâmico, essenciais para aplicações bioanalíticas, tal como demonstrado na Figura 2 [25]. Na Figura 2A, é apresentado um esquema geral de um diagrama de fases correspondente a um SAB, num sistema ortogonal onde a concentração de água não é apresentada. A quantidade de água será a necessária para perfazer os 100% de composição. A curva de solubilidades, que delimita a região monofásica da bifásica, e as linhas de equilíbrio, que mostram a concentração dos solutos nas duas fases, são fundamentais para otimizar a extração de biomarcadores. As misturas de uma mesma linha de equilíbrio têm fases com composições e propriedades termodinâmicas idênticas, mas diferem nas razões volumétricas ou mássicas, gerando diferentes fatores de concentração (FC) que podem ser adaptados às necessidades da técnica analítica (Figura 2B). Estes diagramas auxiliam no ajuste das condições ideais para a formação dos SAB e modulação da partição seletiva de componentes entre as fases (Figura 2C).

Manuscrito Aceite

Este artigo é protegido por copyright. Todos os direitos reservados. SPQ 2025

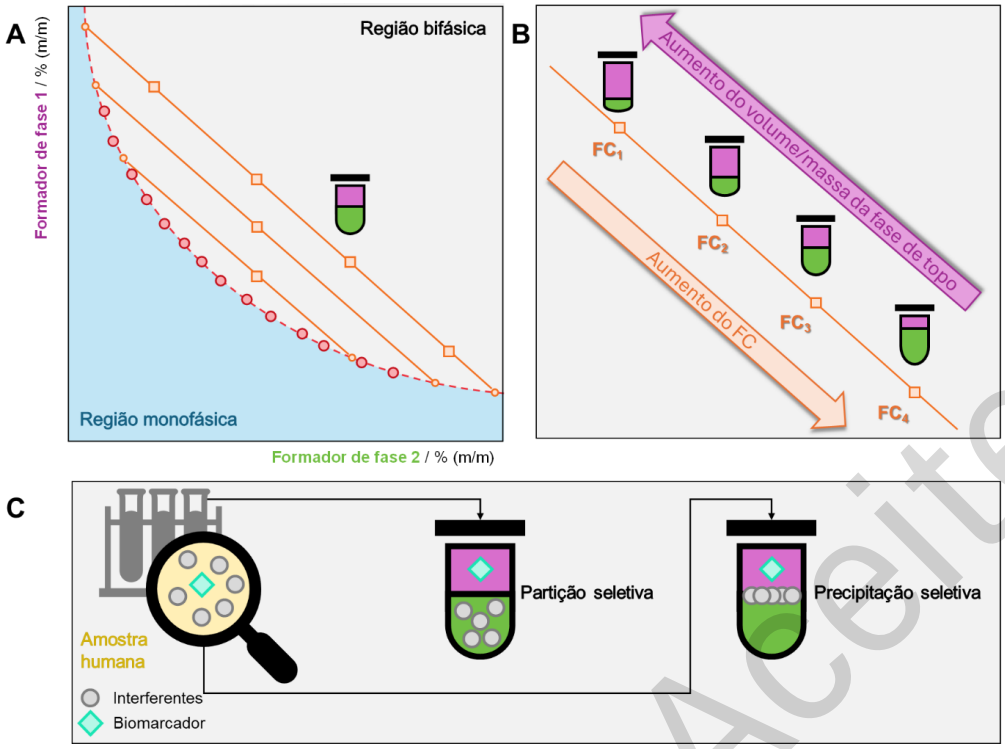

Figura 2 - Aspetos relevantes no desenvolvimento de estratégias de pré-tratamento de amostras humanas com recurso a SAB: (A) Diagrama de fases de um SAB, em representação ortogonal, mostrando a curva de solubilidade (linha vermelha tracejada) e as linhas de equilíbrio (linha laranja) associadas a um determinado ponto de mistura (quadrado laranja); (B) Plataforma de concentração através da manipulação do FC ajustando a composição inicial da mistura ao longo de uma linha de equilíbrio; (C) Adaptação do conceito de SAB ao pré-tratamento de amostras humanas.

Os SAB compostos por polímeros, como a combinação de polietileno glicol (PEG) e dextrano (DEX), têm sido amplamente utilizados no pré-tratamento de amostras humanas, sendo aplicados, por exemplo, na extração de vesículas extracelulares para diagnóstico e monitorização de doenças da próstata, e no confinamento de anticorpos em imunoensaios [28-32]. Além de reduzirem o volume de amostra e o tempo dos procedimentos, melhoram os limites de deteção e ajudam a evitar falsos positivos e negativos. A substituição de um polímero por um sal de alta densidade de carga, como sulfato, fosfato ou citrato, acelera a formação de SAB, diminui a viscosidade e aumenta a diferença de polaridade entre as fases [25]. Neste tipo de sistemas, o biomarcador e as moléculas interferentes tendem a interagir com o polímero, enquanto são simultaneamente sujeitas ao efeito de *salting-out* induzido pelo componente salino [33]. Esta sinergia é útil no pré-tratamento de fluidos humanos, como a depleção de proteínas abundantes ou a extração seletiva de biomarcadores (ver Figura 2C), com destaque para a deteção de biomarcadores do cancro do pulmão e indicadores

Manuscrito Aceite

Este artigo é protegido por copyright. Todos os direitos reservados. SPQ 2025

nutricionais [34-36]. Adicionalmente, os SAB podem ser aplicados na pré-concentração de amostras para ensaios imunocromatográficos de fluxo lateral, aumentando significativamente a sensibilidade em diagnósticos *point-of-care* [37,38].

Embora os SAB convencionais apresentem resultados promissores no pré-tratamento de amostras humanas, há ainda limitações em termos de remoção de interferentes e extração completa do biomarcador-alvo, especialmente em contextos clínicos que exigem elevada seletividade [39]. Para superar essas limitações, têm sido adotadas estratégias como o uso de componentes de fase alternativos e a incorporação de adjuvantes, incluindo líquidos iónicos, com o objetivo de expandir a gama de polaridades dos SAB e, consequentemente, melhorar a seletividade [40-44].

3. Líquidos iónicos como componentes de sistemas aquosos bifásicos no pré-tratamento de amostras humanas

Os líquidos iónicos (LIs) são sais orgânicos, compostos por combinações quase ilimitadas de catiões orgânicos e aniões, que podem ser tanto orgânicos quanto inorgânicos. A assimetria estrutural e cargas deslocalizadas destes compostos impede a formação de uma rede cristalina bem definida, permitindo que tenham pontos de fusão muito inferiores aos dos sais inorgânicos. Ao contrário de muitas substâncias iónicas, como o cloreto de sódio, que funde a cerca de 800°C, uma grande fração de LIs apresenta-se no estado líquido a temperaturas próximas da ambiente [45].

A maior diversidade de polaridades das fases e a versatilidade química conferida pelos LIs fazem da sua integração em SAB uma abordagem inovadora que permite superar as limitações dos sistemas poliméricos convencionais [46]. Esta estratégia combina as vantagens dos SAB, como elevado conteúdo de água e biocompatibilidade, com as possibilidades estruturais dos LIs, permitindo o desenvolvimento de sistemas específicos, seletivos e eficientes, sem depender de protocolos complexos, melhorando a seletividade na extração de biomarcadores e remoção de interferentes, e adequando-se aos requisitos das análises clínicas [23,47].

A bibliografia, conforme resumido na Figura 3, descreve diversos exemplos da aplicação dos SAB-LI no pré-tratamento de amostras humanas, permitindo a extração e análise de biomarcadores relacionados com o diagnóstico, prognóstico, monitorização de terapias e avaliação da biossegurança. Os tipos de LIs utilizados estão sumariados na Figura 4, evidenciando tanto a sua diversidade estrutural como a versatilidade na formação e aplicação dos SAB-LI.

Manuscrito Aceite

Este artigo é protegido por copyright. Todos os direitos reservados. SPQ 2025

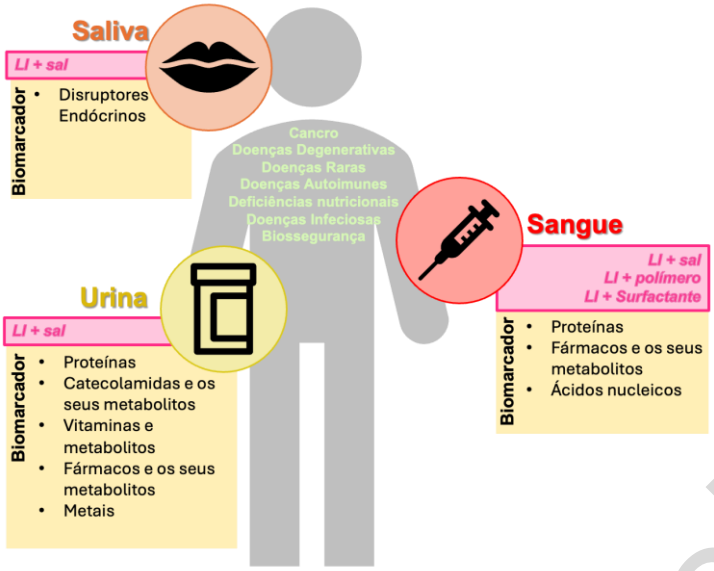

Figura 3 - Tipos de amostras humanas, biomarcadores, doenças e SAB-LI descritos na literatura no contexto da bioanálise.

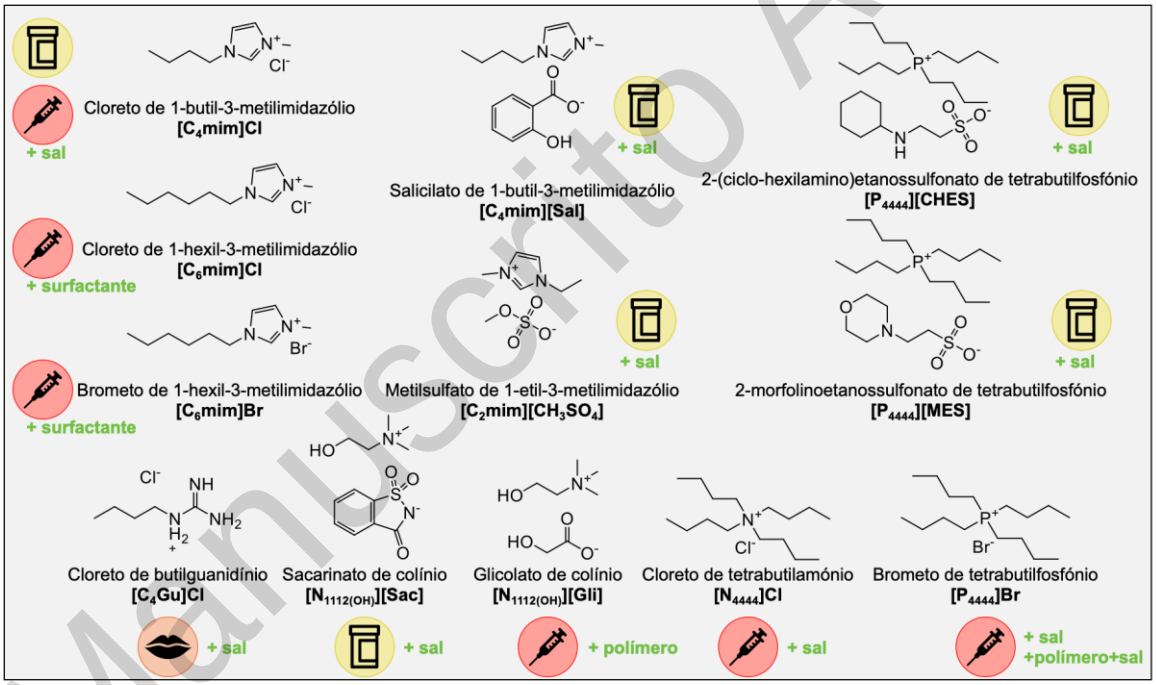

Figura 4 - Estruturas químicas, denominações e abreviaturas dos LIs, juntamente com o tipo de amostra e o par formador de SAB, aplicados no contexto da bioanálise.

3.1. Pré-tratamento de amostras de urina

A deteção de biomarcadores na urina oferece uma abordagem não invasiva e eficaz para diagnóstico, monitorização e avaliação de terapias, refletindo o estado metabólico do organismo [48]. O pré-tratamento da urina envolve filtração, centrifugação e técnicas de extração, como a extração em fase sólida, para isolar os analitos de interesse, melhorando a sensibilidade das análises seguintes [49-51]. Na literatura, os SAB-LI

Manuscrito Aceite

Este artigo é protegido por copyright. Todos os direitos reservados. SPQ 2025

surgem como uma alternativa eficiente e sustentável, permitindo a extração e concentração de biomarcadores como proteínas, catecolaminas, vitaminas, fármacos e metais, enquanto separam eficazmente os interferentes, facilitando a deteção de diversas condições médicas. A Figura 5 apresenta um resumo dos trabalhos abordados nesta secção, destacando as diversas aplicações dos SAB-LI no pré-tratamento de amostras de urina.

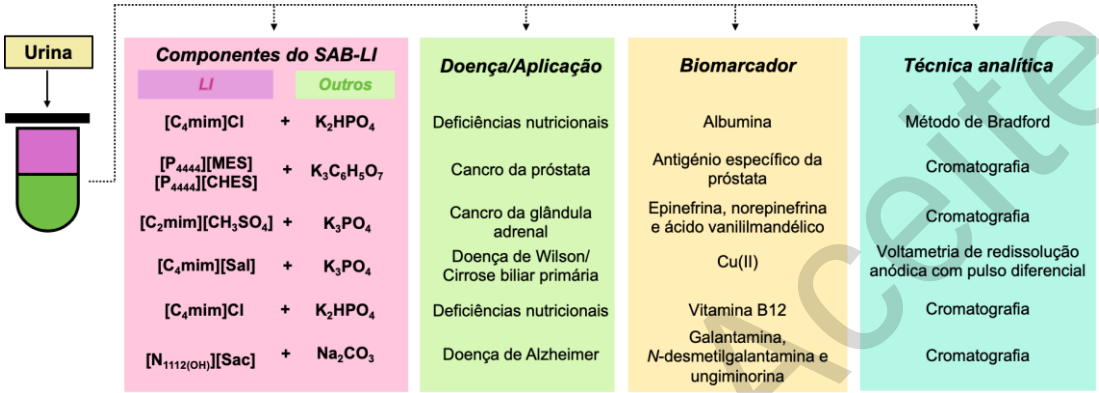

Figura 5 - Aplicação de SAB-LI no pré-tratamento de amostras de urina no contexto da bioanálise.

O primeiro exemplo da utilização de SAB-LI para a extração e concentração de biomarcadores a partir de amostras biológicas envolveu uma combinação padrão de LI e sal, nomeadamente o [C_4mim]Cl e o hidrogenofosfato de dipotássio (K_2HPO_4) [52]. A extração de albumina, um biomarcador importante para avaliar o estado nutricional e as funções renal e hepática de pacientes, foi avaliada em urina artificial. As proteínas foram concentradas na fase rica em [C_4mim]Cl, com um fator de concentração (FC) de 5, enquanto os metais e outros contaminantes foram removidos pela fase rica em sal. Com a adição de sal à fase separada rica em [C_4mim]Cl, o FC aumentou para 20. Embora tenham alcançado eficiências de extração de 100%, os FC obtidos foram limitados [52]. Um avanço significativo neste sentido foi descrito posteriormente pela possibilidade de manipular o FC, ajustando a composição inicial da mistura ao longo de uma linha de equilíbrio no diagrama de fases de SAB-LI [53]. A redução do volume da fase rica em LI aumentou proporcionalmente o FC do analito. A composição bifásica foi escolhida para garantir a extração completa sem saturar a fase rica em LI, utilizando uma linha de equilíbrio ideal para maximizar o FC, alcançando um valor de 100 [53]. Esta estratégia foi aplicada com sucesso ao desenvolvimento de plataformas de pré-concentração dedicadas ao diagnóstico do cancro [54,55]. A deteção urinária do antigénio específico da próstata (PSA), viabilizada por esta técnica, revelou-se

Manuscrito Aceite

Este artigo é protegido por copyright. Todos os direitos reservados. SPQ 2025

promissora no diagnóstico diferencial do cancro da próstata. Foram utilizados LIs com capacidade para manter o pH, com a seleção de aniões derivados de tampões de *Good,* combinados com o citrato de tripotássio ($K_3C_6H_5O_7$) para promover o efeito de *salting-out* e obter linhas de equilíbrio ideais, resultando numa extração completa do PSA urinário na fase rica em LI. A seleção de SAB-LI com [P_{4444}][MES] e [P_{4444}][CHES] permitiu alcançar FC adequados (de até 250) para uma deteção eficiente do PSA, sem perdas ou saturação das fases, eliminando a necessidade de imunoensaios [54]. Esta estratégia mostrou-se ainda viável para o diagnóstico de cancro da glândula adrenal, utilizando o sistema formado por [C_2mim][CH_3SO_4] e fosfato de tripotássio (K_3PO_4) para pré-concentrar catecolaminas como epinefrina e norepinefrina, bem como o ácido vanililmandélico, permitindo a análise por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa [55].

A flexibilidade dos SAB-LI destaca-se na aplicação em diversas patologias, como na Doença de Alzheimer, onde foram utilizados para extrair inibidores da acetilcolinesterase em amostras de urina [56]. O SAB-LI composto por [$N_{111(2OH)}$][Sac], um LI de baixa toxicidade, e carbonato de sódio (Na_2CO_3) permitiu a recuperação eficiente de fármacos como galantamina e *N*-desmetilgalantamina, facilitando a quantificação precisa através de cromatografia líquida com deteção UV, contribuindo para tratamentos mais eficazes [56].

O uso de SAB-LI permite o controlo rigoroso do pH, o qual é crucial no pré-tratamento de amostras de urina, pois afeta a afinidade, solubilidade e estabilidade dos componentes da matriz. Sendo especialmente determinante para a seletividade e adequabilidade do sistema em relação aos analitos de interesse, um exemplo notável de extração de biomarcadores sensíveis ao pH é o caso dos iões metálicos [57]. Esta abordagem, que se baseou na formação de complexos estáveis entre o anião do LI [C_4mim][Sal] e o cobre, prevenindo a sua hidrólise, foi eficaz na análise de cobre em matrizes complexas e assume especial relevância na monitorização de doenças raras e autoimunes, como a Doença de Wilson [57].

Outra das principais vantagens dos SAB-LI é a simplificação do processo analítico, integrando num único passo a remoção de interferentes e a extração/concentração dos analitos. Contudo, a extração de vitamina B12 a partir de urina humana exigiu uma etapa prévia de centrifugação antes da aplicação de um SAB-LI constituído por [C_4mim]Cl e K_2HPO_4 [58]. Apesar da complexidade adicional, a estratégia permitiu extrair 97% da vitamina e viabilizou a sua deteção por cromatografia líquida com

Manuscrito Aceite

Este artigo é protegido por copyright. Todos os direitos reservados. SPQ 2025

deteção UV/Vis, demonstrando potencial para diagnóstico precoce de deficiências nutricionais [58].

Com base na informação analisada, a utilização de SAB-LI tem um impacto positivo no pré-tratamento de amostras de urina, proporcionando uma abordagem eficiente e seletiva para a extração e concentração de biomarcadores. Por um lado, ao explorar a manipulação da composição do sistema ao longo de uma linha de equilíbrio, alcançando FC elevados, é possível detetar biomarcadores tumorais (ver Figura 2B). Por outro lado, os SAB-LI têm demonstrado eficácia na monitorização do tratamento de doenças, ao permitir a extração de fármacos e simplificar o seu processo de quantificação. No entanto, apesar dos avanços, alguns desafios ainda persistem, incluindo a necessidade de etapas adicionais, como a centrifugação, para a extração e análise de determinados biomarcadores, o que pode aumentar a complexidade do pré-tratamento. De forma geral, a capacidade dos SAB-LI de integrar diversas etapas de processamento de amostras de urina – como extração, purificação e concentração – num único passo destaca-se como uma das suas principais vantagens, tornando o processo analítico mais eficiente e sustentável.

3.2. Pré-tratamento de amostras de sangue

As amostras de sangue, particularmente o soro e o plasma, são fundamentais na prática clínica para o diagnóstico e monitorização de diversas patologias [59]. O plasma corresponde à porção líquida do sangue obtida após a centrifugação de uma amostra com anticoagulantes. O soro é obtido após a coagulação do sangue e subsequente centrifugação, resultando numa solução contendo eletrólitos, proteínas e outras substâncias dissolvidas [60]. O pré-tratamento destas amostras visa remover componentes interferentes, como proteínas abundantes e lípidos, que podem comprometer a deteção de biomarcadores-alvo [61]. Os SAB-LI têm sido recentemente reconhecidos na literatura como uma estratégia eficaz para a separação seletiva de biomarcadores, como proteínas, ácidos nucleicos e fármacos, sendo compatíveis com técnicas analíticas como cromatografia líquida acoplada a um método de deteção e imunoensaios. A versatilidade dos SAB-LI, potenciada pela combinação de LIs com sais, surfactantes ou polímeros, tem impulsionado a sua aplicação na deteção de várias doenças, conforme ilustrado na Figura 6.

Manuscrito Aceite

Este artigo é protegido por copyright. Todos os direitos reservados. SPQ 2025

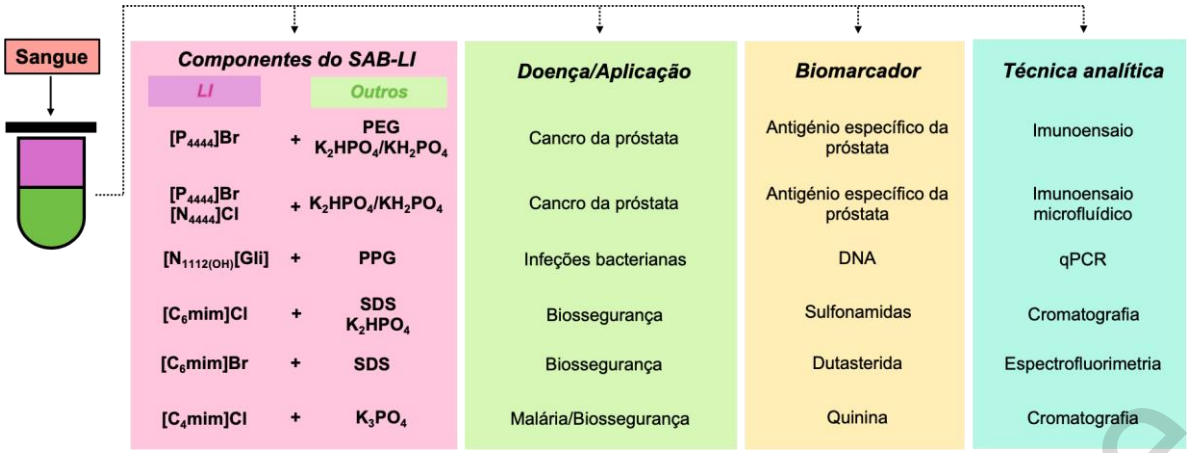

Figura 6 - Aplicação de SAB-LI no pré-tratamento de amostras de sangue no contexto da bioanálise.

Os SAB-LI apresentam-se como um método eficiente para a depleção das proteínas maioritárias do sangue, nomeadamente a imunoglobulina G e a albumina, permitindo, simultaneamente, a extração de biomarcadores tumorais. Para atingir este objetivo, os SAB-LI podem ser formulados de duas formas, com o LI a desempenhar o papel de adjuvante ou como formador de fase principal [62]. Um exemplo promissor envolve o uso de PEG de 1000 g/mol, K_2HPO_4/KH_2PO_4 e $[P_{4444}]Br$ como adjuvante, permitindo uma depleção superior a 95% de albumina e 99% de imunoglobulina G na interface, além de uma extração superior a 97% do PSA para a fase rica em PEG/LI (Figura 2C) [62]. A utilização de LIs como adjuvantes melhorou significativamente a eficácia do pré-tratamento e da extração do PSA, em comparação com sistemas compostos exclusivamente por PEG e sal [62]. Esta abordagem mostrou ser particularmente útil em contextos com recursos limitados, ao proporcionar uma alternativa eficiente e acessível para a deteção do cancro da próstata no *point-of-care*. A aplicabilidade dos SAB-LI foi demonstrada na quantificação do PSA em microescala, por meio de um imunoensaio miniaturizado em dispositivos microfluídicos, obtendo um limite de deteção de 5 ng/mL, valor que se encontra dentro da faixa clinicamente relevante para diagnóstico do cancro da próstata [63].

Visando aprimorar o diagnóstico de infeções bacterianas, foi desenvolvido um SAB-LI inovador, combinando $[N_{1112(OH)}][Gli]$, com polipropileno glicol (PPG) de 400 g/mol e ampliando a gama de SAB-LI estudados, que, até ao momento, se baseava em combinações de LI com sais ou no uso do LI como adjuvante [64]. Esta formulação permitiu, a pH 5, a precipitação seletiva da albumina na interface e a extração eficiente de ADN bacteriano na fase rica em LI. O ADN obtido apresentou elevada pureza

Manuscrito Aceite

Este artigo é protegido por copyright. Todos os direitos reservados. SPQ 2025

(>98%) e estabilidade (de pelo menos 6 meses), possibilitando a sua quantificação por PCR em tempo real [64].

Finalmente, a utilização de SAB-LI também mostrou ser promissora para a monitorização de biomarcadores de biossegurança, permitindo a deteção de compostos farmacológicos e outras substâncias no organismo humano. Sistemas contendo [C_6mim]Cl ou [C_6mim]Br combinados com K_2HPO_4 e SDS permitiram extrair sulfonamidas e dutasterida com eficiências superiores a 90%, em apenas três minutos [65,66]. A extração com SAB-LI aumentou significativamente a intensidade de fluorescência da dutasterida, permitindo a sua deteção a níveis clinicamente relevantes [66]. De igual modo, o uso de um SAB-LI constituído por [C_4mim]Cl/K_3PO_4 para a extração de quinina em plasma permitiu um rendimento elevado (89-106%) e a sua quantificação por cromatografia líquida com deteção por fluorescência, sendo útil no controlo terapêutico da malária [67]. Estas abordagens destacam-se pela rapidez, sensibilidade e menor impacto ambiental face a SAB mais comuns, como por exemplo, SAB constituídos por acetonitrilo e K_2HPO_4 [68].

De acordo com os trabalhos discutidos, os SAB-LI demonstram grande potencial no pré-tratamento de amostras de sangue, destacando-se pela sua capacidade de depleção eficaz de proteínas maioritárias e extração de biomarcadores com elevada pureza. A versatilidade destes sistemas, ao combinar LIs com diferentes sais, polímeros e surfactantes, aliada à sua seletividade, permite a adaptação a várias aplicações bioanalíticas, incluindo a deteção precoce de cancro e de infeções bacterianas. Quando corretamente formulados, os SAB-LI não só possibilitam a extração eficiente de biomarcadores, como também oferecem uma alternativa acessível para ambientes com recursos limitados. Contudo, os principais desafios permanecem na otimização das condições de pH e na necessidade de garantir a estabilidade das amostras e dos analitos de interesse em diferentes contextos clínicos.

3.3. Pré-tratamento de amostras de saliva

A saliva, por ser um fluido rico em biomoléculas e de colheita não invasiva, oferece a vantagem de ser mais acessível do que a análise de outros fluidos biológicos, como o sangue [69]. Embora a análise direta da saliva seja, idealmente, a abordagem preferencial, o seu pré-tratamento é frequentemente indispensável para garantir a preparação adequada da amostra e obter resultados fidedignos [70,71]. A literatura

Manuscrito Aceite

Este artigo é protegido por copyright. Todos os direitos reservados. SPQ 2025

relata apenas uma aplicação de SAB-LI na análise de saliva, integrando num único procedimento a limpeza, microextração e pré-concentração da amostra [72].

A Figura 7 apresenta um resumo da abordagem proposta para o pré-tratamento de amostras de saliva com SAB-LI, com o objetivo de melhorar a análise de disruptores endócrinos. Utilizando o LI $[C_4Gu]Cl$ com o sal K_2HPO_4 para a formação do SAB-LI, foi possível remover aproximadamente 70% das proteínas salivares através da precipitação na interface do sistema (Figura 2C). A microextração e pré-concentração dos biomarcadores, neste caso vários bisfenóis, foram realizadas de forma simultânea, resultando em FC de até 3 vezes. A análise foi realizada com sucesso utilizando cromatografia líquida com deteção de fluorescência, apresentando limites de deteção de até 0,40 ng/mL e recuperações médias de 106%. Este trabalho resultou no desenvolvimento de um método analítico que, além de ser altamente eficiente, é também mais sustentável, estando alinhado com os princípios da Química Analítica Verde e apresentando um índice de sustentabilidade ambiental (AGREEprep) satisfatório, de 0,63 [72,73].

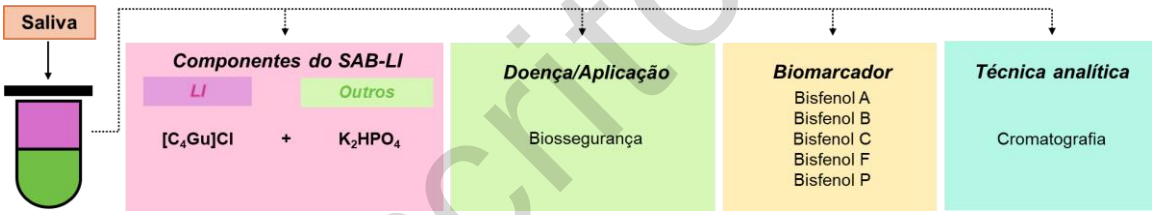

Figura 7 - Aplicação de SAB-LI no pré-tratamento de amostras de saliva no contexto da bioanálise.

Embora ainda pouco explorados em contextos de análise de saliva, os SAB-LI oferecem uma abordagem eficiente, sustentável e acessível para a determinação de biomarcadores salivares, com grande potencial para aplicações clínicas no diagnóstico e monitorização de riscos em saúde.

4. Conclusões e Perspetivas Futuras

O presente artigo de revisão apresenta uma análise abrangente sobre o potencial dos SAB-LI em bioanálise, com enfoque nas suas aplicações clínicas. Os SAB-LI constituem uma inovação determinante no pré-tratamento de amostras humanas, aliando seletividade, sustentabilidade e eficiência analítica. A sua implementação revela-se decisiva para contornar as limitações impostas pelos métodos tradicionais, como a extração em fase sólida, a extração líquido-líquido clássica e a precipitação de

Manuscrito Aceite

Este artigo é protegido por copyright. Todos os direitos reservados. SPQ 2025

proteínas, impulsionando a deteção fiável de biomarcadores em ambientes laboratoriais e *point-of-care*.

A Figura 8 apresenta uma análise SWOT (forças, fraquezas, oportunidades e ameaças) dos SAB-LI comparados com as abordagens convencionais de pré-tratamento de amostras humanas. De forma geral, os SAB-LI destacam-se pela alta seletividade, sustentabilidade e compatibilidade com biomarcadores, mas enfrentam desafios como custos associados ao uso de LIs da família dos imidazólios. As oportunidades incluem aplicações em novas plataformas bioanalíticas, miniaturização e automação, enquanto as ameaças advêm da forte concorrência com métodos já estabelecidos e desafios regulatórios.

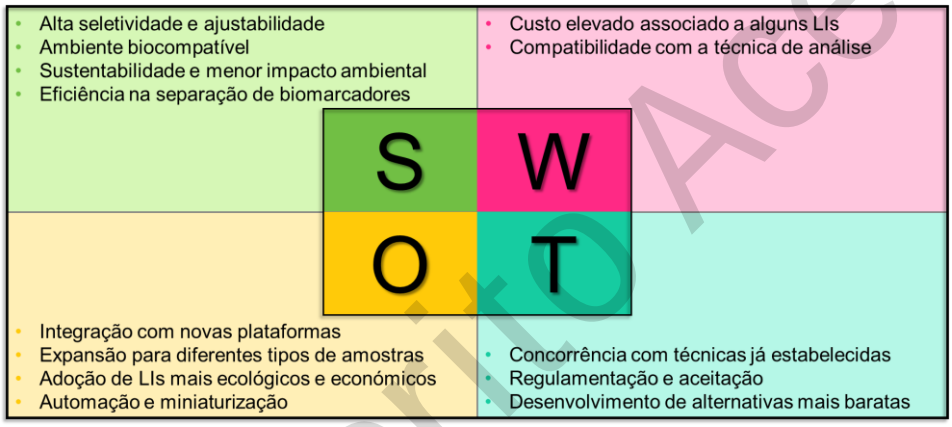

Figura 8 - Análise SWOT dos SAB-LI em relação às técnicas tradicionais de pré-tratamento de amostras humanas.

Para consolidar os SAB-LI como estratégias eficazes de pré-tratamento de amostras humanas na área clínica, é crucial considerar diversos aspetos técnicos e de desempenho que garantam a eficiência da extração e a fiabilidade dos resultados analíticos:

- **Seleção do LI:** O LI influencia diretamente a formação do SAB, bem como a seletividade e a eficiência de extração dos biomarcadores e remoção dos principais interferentes da matriz biológica. Devem ser cuidadosamente avaliados parâmetros como polaridade, hidrofobicidade e interações específicas do LI com os analitos-alvo.
- **Escolha do par formador de SAB:** O par formador de SAB-LI é essencial para o pré-tratamento e a sua escolha depende do tipo de amostra. Sais com elevado poder de *salting-out* são eficazes na pré-concentração de biomarcadores urinários e salivares e na precipitação de interferentes em sangue e saliva. Para amostras de

Manuscrito Aceite

Este artigo é protegido por copyright. Todos os direitos reservados. SPQ 2025

sangue, que exigem maior seletividade, o uso de polímeros e surfactantes pode ser uma opção viável, oferecendo um controlo mais preciso das interações sem a sobreposição do efeito de *salting-out*.

- **Otimização das condições experimentais:** O pH e a composição do SAB podem afetar a partição dos biomarcadores, sendo necessário ajustá-los para maximizar a seletividade da extração. A razão volumétrica ou mássica das fases influencia a eficiência de pré-concentração e deve ser ajustada conforme os requisitos analíticos.
- **Mecanismos de extração e pré-concentração:** O pré-tratamento pode ser impulsionado por interações eletrostáticas, ligações por pontes de hidrogénio ou efeitos hidrofóbicos, dependendo da natureza dos biomarcadores e da sua afinidade para os componentes do SAB-LI. A pré-concentração pode ser modulada através da manipulação da composição do SAB-LI, melhorando a sensibilidade da análise.
- **Integração com técnicas analíticas:** Os SAB-LI podem ser combinados com métodos cromatográficos, espectrométricos e imunoensaios, permitindo a deteção precisa dos biomarcadores-alvo. A compatibilidade dos SAB-LI com a técnica analítica deve ser cuidadosamente avaliada para evitar interferências nos sinais analíticos e possíveis danos nos equipamentos.
- **Flexibilidade tecnológica:** Os SAB-LI têm grande potencial para o desenvolvimento de plataformas universais de pré-tratamento de amostras clínicas, permitindo a extração seletiva de diversos biomarcadores de fluidos biológicos como sangue, urina e saliva, e podendo ser aplicados a outros tipos de matrizes biológicas.
- **Sustentabilidade:** A aplicação dos SAB-LI melhora a sensibilidade e especificidade das análises, enquanto reduz ou elimina o uso de solventes orgânicos, promovendo práticas laboratoriais sustentáveis e alinhadas aos princípios "verdes" de preparação de amostras. Sugere-se a utilização de métricas como o AGREEprep para avaliar o impacto ambiental [73,74].
- **Validação com amostras de pacientes:** É fundamental avaliar a transferibilidade dos SAB-LI para amostras de pacientes, a fim de garantir a sua eficácia e reprodutibilidade em condições reais. Os principais desafios incluem a complexidade e variabilidade das matrizes biológicas, que podem ser influenciadas por condições fisiológicas específicas ou comorbilidades.

Manuscrito Aceite

Este artigo é protegido por copyright. Todos os direitos reservados. SPQ 2025

Posto isto, as perspetivas futuras para esta tecnologia são extremamente promissoras, abrangendo a expansão das suas aplicações clínicas e a otimização e padronização de protocolos. Além disso, a miniaturização, automação e a possibilidade de implementação no *point-of-care*, com especial relevância em contextos de recursos limitados, são aspetos de grande potencial. Com o avanço da investigação nesta área, espera-se que os SAB-LI se tornem uma ferramenta importante na medicina moderna, contribuindo para avanços no rastreio e diagnóstico clínico, bem como para cuidados de saúde mais eficazes e acessíveis a uma população global.

Agradecimentos

Este trabalho foi desenvolvido no âmbito do projeto CICECO–Aveiro Institute of Materials, UIDB/50011/2020 (DOI: 10.54499/UIDB/50011/2020), UIDP/50011/2020 (DOI: 10.54499/UIDP/50011/2020) & LA/P/0006/2020 (DOI: 10.54499/LA/P/0006/2020), financiado por fundos nacionais através da FCT/MCTES (PIDDAC). Este trabalho foi financiado por fundos nacionais (OE), através da FCT/MCTES, no âmbito do projeto ILSurvive, PTDC/EMD-TLM/3253/2020 (DOI: 10.54499/PTDC/EMD-TLM/3253/2020). Maria S. M. Mendes agradece à FCT pela bolsa de doutoramento 2022.11229.BD. Francisca A. e Silva agradece à FCT pelo contrato de investigador CEECIND/03076/2018/CP1559/CT0024 (DOI: 10.54499/CEECIND/03076/2018/CP1559/CT0024) ao abrigo do Estímulo ao Emprego Científico.

Referências

[1] J. K. Aronson, R. E. Ferner, *Curr. Protoc. Pharmacol.* **2017**, *76*, 1-17. DOI: 10.1002/cpph.19.

[2] J. Gao, L.-A. Garulacan, S. M. Storm, G. J. Opiteck, Y. Dubaquie, S. A. Hefta, D. M. Dambach, A. R. Dongre, *Methods* **2005**, *35*, 291-302. DOI: 10.1016/j.ymeth.2004.08.020.

[3] P. M. Ridker, *Circulation* **2003**, *108*, e81-e85. DOI: 10.1161/01.CIR.0000093381.57779.67.

[4] K. Thygesen, J. S. Alpert, A. S. Jaffe, M. L. Simoons, B. R. Chaitman, H. D. White, K. Thygesen, J. S. Alpert, H. D. White, A. S. Jaffe, H. A. Katus, F. S. Apple, B. Lindahl, D. A. Morrow, B. R. Chaitman, P. M. Clemmensen, P. Johanson, H. Hod, R. Underwood, J. J. Bax, R. O. Bonow, F. Pinto, R. J. Gibbons, K. A. Fox, D. Atar, L. K. Newby, M. Galvani, C. W. Hamm, B. F. Uretsky, P. Gabriel Steg, W. Wijns, J.-P. Bassand, P. Menasché, J. Ravkilde, E. M. Ohman, E. M. Antman, L. C. Wallentin, P. W. Armstrong, M. L. Simoons,

Manuscrito Aceite

Este artigo é protegido por copyright. Todos os direitos reservados. SPQ 2025

J. L. Januzzi, M. S. Nieminen, M. Gheorghiade, G. Filippatos, R. V. Luepker, S. P. Fortmann, W. D. Rosamond, D. Levy, D. Wood, S. C. Smith, D. Hu, J.-L. Lopez-Sendon, R. M. Robertson, D. Weaver, M. Tendera, A. A. Bove, A. N. Parkhomenko, E. J. Vasilieva, S. Mendis, J. J. Bax, H. Baumgartner, C. Ceconi, V. Dean, C. Deaton, R. Fagard, C. Funck-Brentano, D. Hasdai, A. Hoes, P. Kirchhof, J. Knuuti, P. Kolh, T. McDonagh, C. Moulin, B. A. Popescu, Ž. Reiner, U. Sechtem, P. A. Sirnes, M. Tendera, A. Torbicki, A. Vahanian, S. Windecker, J. Morais, C. Aguiar, W. Almahmeed, D. O. Arnar, F. Barili, K. D. Bloch, A. F. Bolger, H. E. Bøtker, B. Bozkurt, R. Bugiardini, C. Cannon, J. de Lemos, F. R. Eberli, E. Escobar, M. Hlatky, S. James, K. B. Kern, D. J. Moliterno, C. Mueller, A. N. Neskovic, B. M. Pieske, S. P. Schulman, R. F. Storey, K. A. Taubert, P. Vranckx, D. R. Wagner, *Eur. Heart J.* **2012**, *33*, 2551-2567. DOI: 10.1093/eurheartj/ehs184.

[5] A. S. Levey, J. Coresh, *Lancet* **2012**, *379*, 165-180. DOI: 10.1016/S0140-6736(11)60178-5.

[6] D. Z. Chang, K. S. Panageas, I. Osman, D. Polsky, K. Busam, P. B. Chapman, *J. Transl. Med.* **2004**, *2*, 46. DOI: 10.1186/1479-5876-2-46.

[7] R. Mayeux, *NeuroRX* **2004**, *1*, 182-188. DOI: 10.1602/neurorx.1.2.182.

[8] M. J. Pletcher, M. Pignone, *Circulation* **2011**, *123*, 1116-1124. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.943860.

[9] F.-S. Ou, S. Michiels, Y. Shyr, A. A. Adjei, A. L. Oberg, *J. Thorac. Oncol.* **2021**, *16*, 537-545. DOI: 10.1016/j.jtho.2021.01.1616.

[10] A. Bodaghi, N. Fattahi, A. Ramazani, *Heliyon* **2023**, *9*, e13323. DOI: 10.1016/j.heliyon.2023.e13323.

[11] P. L. Kole, G. Venkatesh, J. Kotecha, R. Sheshala, *Biomed. Chromatogr.* **2011**, *25*, 199-217. DOI: 10.1002/bmc.1560.

[12] K. Chandramouli, P.-Y. Qian, *Hum. Genomics Proteomics* **2009**, 239204. DOI: 10.4061/2009/239204.

[13] C. E. Thomas, W. Sexton, K. Benson, R. Sutphen, J. Koomen, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2010**, *19*, 953-959. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-10-0069.

[14] S. Rischke, L. Hahnefeld, B. Burla, F. Behrens, R. Gurke, T. J. Garrett, *J. Mass Spectrom. Adv. Clin. Lab* **2023**, *28*, 47-55. DOI: 10.1016/j.jmsacl.2023.02.003.

[15] Z. Niu, W. Zhang, C. Yu, J. Zhang, Y. Wen, *TrAC Trends Anal. Chem.* **2018**, *102*, 123-146. DOI: 10.1016/j.trac.2018.02.005.

[16] L. Huasheng, L. Gongke, *J. Chromatogr. A* **2024**, *1734*, 465293. DOI: 10.1016/j.chroma.2024.465293.

[17] P. Ray, Y. Le Manach, B. Riou, T. T. Houle, D. S. Warner, *Anesthesiology* **2010**, *112*, 1023-1040. DOI: 10.1097/ALN.0b013e3181d47604.

[18] J. Moreda-Piñeiro, A. Moreda-Piñeiro, *TrAC Trends Anal. Chem.* **2015**, *71*, 265-274. DOI: 10.1016/j.trac.2015.02.025.

Manuscrito Aceite

Este artigo é protegido por copyright. Todos os direitos reservados. SPQ 2025

[19] J. L. Nickerson, A. A. Doucette, *J. Proteome Res.* **2020**, *19*, 2035-2042. DOI: 10.1021/acs.jproteome.9b00867.

[20] R. R. Burgess, *Methods Enzymol.* **2009**, *463*, 331-342. DOI: 10.1016/S0076-6879(09)63020-2.

[21] X. Fang, W.-W. Zhang, *J. Proteomics* **2008**, *71*, 284-303. DOI: 10.1016/j.jprot.2008.06.011.

[22] S. F. Hammad, I. A. Abdallah, A. Bedair, F. R. Mansour, *J. Sep. Sci.* **2022**, *45*, 185-209. DOI: 10.1002/jssc.202100452.

[23] M. S. M. Mendes, M. E. Rosa, F. Ramalho, M. G. Freire, F. A. e Silva, *Sep. Purif. Technol.* **2023**, *317*, 123875. DOI: 10.1016/j.seppur.2023.123875.

[24] A. G. Teixeira, R. Agarwal, K. R. Ko, J. Grant-Burt, B. M. Leung, J. P. Frampton, *Adv. Healthcare Mater.* **2018**, *7*, 1701036. DOI: 10.1002/adhm.201701036.

[25] M. Iqbal, Y. Tao, S. Xie, Y. Zhu, D. Chen, X. Wang, L. Huang, D. Peng, A. Sattar, M. A. B. Shabbir, H. I. Hussain, S. Ahmed, Z. Yuan, *Biol. Proced. Online* **2016**, *18*, 18. DOI: 10.1186/s12575-016-0048-8.

[26] M. W. Beijerinck, *Zeitschrift für Chemie und Ind. der Kolloide* **1910**, *7*, 16-20. DOI: 10.1007/BF01503954.

[27] P.-Å. Albertsson, *Nature* **1958**, *182*, 709-711. DOI: 10.1038/182709a0.

[28] H. Shin, C. Han, J. M. Labuz, J. Kim, S. Cho, Y. S. Gho, S. Takayama, J. Park, *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 13103. DOI: 10.1038/srep13103.

[29] H. Shin, Y. H. Park, Y. G. Kim, J. Y. Lee, J. Park, *PLoS One* **2018**, *13*, e0194818. DOI: 10.1371/journal.pone.0194818.

[30] B. H. Han, S. Kim, G. Seo, Y. Heo, S. Chung, J. Y. Kang, *Lab Chip* **2020**, *20*, 3552-3559. DOI: 10.1039/d0lc00345j.

[31] J. P. Frampton, J. B. White, A. B. Simon, M. Tsuei, S. Paczesny, S. Takayama, *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 4878. DOI: 10.1038/srep04878.

[32] M. Kvas, A. G. Teixeira, B. Chiang, J. P. Frampton, *Analyst* **2020**, *145*, 5458-5465. DOI: 10.1039/D0AN00699H.

[33] A. Barani, M. Pirdashti, Z. Heidari, E.-N. Dragoi, *Fluid Phase Equilib.* **2018**, *459*, 1-9. DOI: 10.1016/j.fluid.2017.11.037.

[34] A. Mahn, M. E. Lienqueo, C. Quilodrán, A. Olivera-Nappa, *J. Sep. Sci.* **2012**, *35*, 3184-3189. DOI: 10.1002/jssc.201200646.

[35] M. S. M. Mendes, M. E. Rosa, J. A. P. Coutinho, M. G. Freire, F. A. e Silva, *Int. J. Biol. Macromol.* **2023**, *253*, 127540. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2023.127540.

[36] M. E. Rosa, M. S. M. Mendes, D. C. V. Belchior, J. A. P. Coutinho, F. A. e Silva, M. G. Freire, *Adv. Sample Prep.* **2024**, *10*, 100116. DOI: 10.1016/j.sampre.2024.100116.

[37] A. P. Luu, S. S. Rao, H. Y. Malik, R. B. Shi, A. A. Toubian, D. T. Kamei, *Anal. Biochem.* **2024**, *694*, 115634. DOI: 10.1016/j.ab.2024.115634.

Manuscrito Aceite

Este artigo é protegido por copyright. Todos os direitos reservados. SPQ 2025

[38] D. W. Bradbury, M. Azimi, A. J. Diaz, A. A. Pan, C. H. Falktoft, B. M. Wu, D. T. Kamei, *Anal. Chem.* **2019**, *91*, 12046-12054. DOI: 10.1021/acs.analchem.9b03105.

[39] J. F. B. Pereira, L. P. N. Rebelo, R. D. Rogers, J. A. P. Coutinho, M. G. Freire, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 19580. DOI: 10.1039/c3cp53701c.

[40] B. A. Shoushtari, G. Pazuki, J. R. Shahrouzi, S. Shahriari, N. Hadidi, *Fluid Phase Equilib.* **2020**, *505*, 112360. DOI: 10.1016/j.fluid.2019.112360.

[41] L. Das, S. P. Paik, K. Sen, *J. Chem. Eng. Data* **2021**, *66*, 4629-4638. DOI: 10.1021/acs.jced.1c00632.

[42] R. Sadeghi, B. Hamidi, N. Ebrahimi, *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118*, 10285-10296. DOI: 10.1021/jp505383r.

[43] M. A. O. da Silva, M. A. Z. Arruda, *Talanta* **2009**, *77*, 985-990. DOI: 10.1016/j.talanta.2008.07.055.

[44] P. Xu, Y. Wang, J. Chen, X. Wei, W. Xu, R. Ni, J. Meng, Y. Zhou, *Talanta* **2018**, *189*, 467-479. DOI: 10.1016/j.talanta.2018.07.035.

[45] W. Silva, M. Zanatta, A. S. Ferreira, M. C. Corvo, E. J. Cabrita, *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 7745. DOI: 10.3390/ijms21207745.

[46] S. F. Carvalho, M. H. Custódio, Ana B. Pereiro, João M. M. Araújo, *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 5766. DOI: 10.3390/ijms25115766.

[47] A. Basaiahgari, R. L. Gardas, *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* **2021**, *27*, 100423. DOI: 10.1016/j.cogsc.2020.100423.

[48] D. Fliser, J. Novak, V. Thongboonkerd, A. G. A. Argiles, V. Jankowski, M. A. Girolami, J. Jankowski, H. Mischak, *J. Am. Soc. Nephrol.* **2007**, *18*, 1057-1071. DOI: 10.1681/ASN.2006090956.

[49] L.-A. K. Djomnang, C. Li, O. Mzava, A. P. Cheng, A. Chang, J. S. Lenz, M. Suthanthiran, J. R. Lee, D. M. Dadhania, I. De Vlaminck, *Sci. Rep.* **2024**, *14*, 10872. DOI: 10.1038/s41598-024-54239-x.

[50] N. Chungkanchana, P. Sithithaworn, C. Worasith, P. Wongphutorn, S. Ruantip, K. Y. Kopolrat, A. Jusakul, R. Thanan, K. Duenngai, J. Sithithaworn, A. Techasen, *J. Clin. Microbiol.* **2022**, *60*, e01454-21. DOI: 10.1128/JCM.01454-21.

[51] E. Eren, A. Göncü Sürü, N. Yilmaz, C. Öz, *New Trends Med. Sci.* **2022**, *3*, 91-97. DOI: 10.56766/ntms.823790.

[52] Z. Du, Y. Yu, J. Wang, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 2130-2137. DOI: 10.1002/chem.200601234.

[53] H. Passos, A. C. A. Sousa, M. R. Pastorinho, A. J. A. Nogueira, L. P. N. Rebelo, J. A. P. Coutinho, M. G. Freire, *Anal. Methods* **2012**, *4*, 2664-2667. DOI: 10.1039/c2ay25536g.

[54] M. M. Pereira, J. D. Calixto, A. C. A. Sousa, B. J. Pereira, Á. S. Lima, J. A. P. Coutinho, M. G. Freire, *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 14931. DOI: 10.1038/s41598-020-71925-8.

[55] M. M. Pereira, L. L. R. Brito, R. de C. M. de Miranda, R. L. de Souza, C. M. F. Soares, J.

Manuscrito Aceite

Este artigo é protegido por copyright. Todos os direitos reservados. SPQ 2025

A. P. Coutinho, M. G. Freire, Á. S. Lima, *J. Mol. Liq.* **2022**, *367*, 120409. DOI: 10.1016/j.molliq.2022.120409.

[56] M. G. Bogdanov, I. Svinyarov, *J. Chromatogr. A* **2018**, *1559*, 62-68. DOI: 10.1016/j.chroma.2018.01.007.

[57] T. Trtić-Petrović, A. Dimitrijević, N. Zdolšek, J. Đorđević, A. Tot, M. Vraneš, S. Gadžurić, *Anal. Bioanal. Chem.* **2018**, *410*, 155-166. DOI: 10.1007/s00216-017-0705-z.

[58] P. Berton, R. P. Monasterio, R. G. Wuilloud, *Talanta* **2012**, *97*, 521-526. DOI: 10.1016/j.talanta.2012.05.008.

[59] N. Rifai, M. A. Gillette, S. A. Carr, *Nat. Biotechnol.* **2006**, *24*, 971-983. DOI: 10.1038/nbt1235.

[60] A. Vignoli, L. Tenori, C. Morsiani, P. Turano, M. Capri, C. Luchinat, *J. Proteome Res.* **2022**, *21*, 1061-1072. DOI: 10.1021/acs.jproteome.1c00935.

[61] P. Y. Lee, J. Osman, T. Y. Low, R. Jamal, *Bioanalysis* **2019**, *11*, 1799-1812. DOI: 10.4155/bio-2019-0145.

[62] M. E. Rosa, M. S. M. Mendes, E. Carmo, J. P. Conde, J. A. P. Coutinho, M. G. Freire, F. A. e Silva, *Sep. Purif. Technol.* **2023**, *322*, 124248. DOI: 10.1016/j.seppur.2023.124248.

[63] F. C. Flora, S. B. Relvas, F. A. e Silva, M. G. Freire, V. Chu, J. P. Conde, *Biosensors* **2023**, *13*, 334. DOI: 10.3390/bios13030334.

[64] A. M. Ferreira, M. V. Quental, M. Sharma, D. Mondal, A. Q. Pedro, J. A. P. Coutinho, M. G. Freire, *Sep. Purif. Technol.* **2023**, *316*, 123801. DOI: 10.1016/j.seppur.2023.123801.

[65] W. Yu, K. Li, Z. Liu, H. Zhang, X. Jin, *Microchem. J.* **2018**, *136*, 263-269. DOI: 10.1016/j.microc.2017.03.053.

[66] A. Gong, X. Zhu, *Fluid Phase Equilib.* **2014**, *374*, 70-78. DOI: 10.1016/j.fluid.2014.04.022.

[67] J. Flieger, A. Czajkowska-Żelazko, *Food Chem.* **2015**, *166*, 150-157. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.06.037.

[68] W. Yu, Z. Liu, S. Gao, S. Cui, X. Yang, W. Qiu, H. Zhang, A. Yu, Y. Huan, *Anal. Methods* **2013**, *5*, 5983-5989. DOI: 10.1039/C3AY40902C.

[69] M. Song, H. Bai, P. Zhang, X. Zhou, B. Ying, *Int. J. Oral Sci.* **2023**, *15*, 2. DOI: 10.1038/s41368-022-00209-w.

[70] I. T. Gug, M. Tertis, O. Hosu, C. Cristea, *TrAC Trends Anal. Chem.* **2019**, *113*, 301-316. DOI: 10.1016/j.trac.2019.02.020.

[71] F. G. Bellagambi, T. Lomonaco, P. Salvo, F. Vivaldi, M. Hangouët, S. Ghimenti, D. Biagini, F. Di Francesco, R. Fuoco, A. Errachid, *TrAC Trends Anal. Chem.* **2020**, *124*, 115781. DOI: 10.1016/j.trac.2019.115781.

[72] R. González-Martín, F. A. e Silva, M. J. Trujillo-Rodríguez, D. Díaz Díaz, J. Lorenzo-Morales, M. G. Freire, V. Pino, *Green Chem.* **2023**, *25*, 8544-8557. DOI: 10.1039/D3GC02046K.

[73] W. Wojnowski, M. Tobiszewski, F. Pena-Pereira, E. Psillakis, *TrAC Trends Anal. Chem.*

Manuscrito Aceite

Este artigo é protegido por copyright. Todos os direitos reservados. SPQ 2025

2022, *149*, 116553. DOI: 10.1016/j.trac.2022.116553.

[74] Á. I. López-Lorente, F. Pena-Pereira, S. Pedersen-Bjergaard, V. G. Zuin, S. A. Ozkan, E. Psillakis, *TrAC Trends Anal. Chem.* **2022**, *148*, 116530. DOI: 10.1016/j.trac.2022.116530.

Manuscrito Aceite

Este artigo é protegido por copyright. Todos os direitos reservados. SPQ 2025