



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**OTIMIZAÇÃO DE UM MÉTODO RÁPIDO E DE BAIXO CUSTO COMBINANDO HF-
MMLLE E SISTEMA DE 96-*WELL PLATE* PARA DETERMINAÇÃO DE
DESREGULADORES ENDÓCRINOS EM URINA HUMANA**

MARIA EDUARDA PIERRI

Florianópolis
Dezembro/2019

Maria Eduarda Pierri

OTIMIZAÇÃO DE UM MÉTODO RÁPIDO E DE BAIXO CUSTO COMBINANDO HF-MMLLE E SISTEMA DE 96-*WELL PLATE* PARA DETERMINAÇÃO DE DESREGULADORES ENDÓCRINOS EM URINA HUMANA

Relatório apresentado ao Departamento de Química
da Universidade Federal de Santa Catarina,
como requisito parcial da disciplina de
Estágio II (QMC 5512)

Prof. Dr. Eduardo Carasek da Rocha

Msc. Lucas Morés

Florianópolis
Dezembro/2019

Agradecimentos

Primeiramente agradeço aos meus pais, Marcelo e Edilene, por todo amor e apoio e que sempre batalharam para me dar todas as coisas. E claro, agradecer aos meus irmãos, Junior e Sofia, pelo companheirismo e ajuda nesses anos. Um agradecimento em especial ao meu namorado, Plínio, por ter sido companheiro, paciente e ter me apoiado nesses meses difíceis, obrigada por ser meu porto seguro. Obrigada por aparecer na minha vida.

As minhas amigas de infância, Larissa Salazar e Thamires de Oliveira, muito obrigada pela amizade de vocês, me deram suporte em todas as fases da graduação, eu amo vocês. As amigas que fiz durante a graduação e permaneceram até o final, Ana Paula, Amanda, Vanessa, o apoio de vocês foi essencial para conseguir trilhar todo esse caminho, e tenho certeza que fiz amizades que fizeram a minha graduação ser menos difícil. E claro, agradeço a todos os outros que entraram na minha vida nesse período e agregaram positivamente.

Um agradecimento ao Lucas Morés por sempre ter se mostrado tão empenhado e por ter me ensinado tudo que eu sei, você é uma pessoa maravilhosa e eu só tenho que agradecer por toda a ajuda. Obrigada por ter deixado tudo mais divertido, não poderia ter coorientador melhor. E claro, aos meus colegas do CroMaas, Camila, Gabriela Mafra, Heloísa, Gabriela Corazza, Leila, Diogo, Gabriela Bernardi, Leonardo, Ricardo, Julia. Com certeza aprendi um pouquinho com cada um e por sempre estarem dispostos a ajudar. E por fim, ao Professor Eduardo Carasek, por ter me dado a oportunidade de entrar nesse grupo maravilhoso e por ter me orientado neste trabalho contribuindo para minha formação acadêmica.

A UFSC, pelo espaço concedido, e ao ensino de qualidade gratuito. Ao CNPq pela bolsa de iniciação concedida. A todos os professores que me mostraram o prazer da química durante toda a graduação e a todos os colegas que me ajudaram durante minha caminhada, estando presentes hoje ou não. Obrigado a todos.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 8 |
| 2 REVISÃO DA LITERATURA | 10 |
| 2.1 Desreguladores endócrinos | 10 |
| 2.2 Urina | 14 |
| 2.3 Preparo de amostra | 14 |
| 2.4 Microextração em fase líquida suportada com fibra oca (HF-LPME) | 16 |
| 2.5 Extração líquido-líquido em membrana microporosa com fibra oca (HF-MMLLE) | 17 |
| 2.6 Sistema de 96– <i>well plate</i> | 18 |
| 3 OBJETIVOS | 19 |
| 3.1 Objetivo geral | 19 |
| 3.2 Objetivo específico | 19 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS | 19 |
| 4.1 Reagentes, materiais e amostras | 19 |
| 4.2 Instrumentação | 20 |
| 4.3 Preparação de HF-MMLLE em sistema de placas de 96 poços, etapas de extração e dessorção | 21 |
| 4.4 Otimização dos Parâmetros para HF-MMLLE | 21 |
| 4.4.1 Otimização da diluição da urina | 21 |
| 4.4.2 Otimização do Solvente de Dessorção | 22 |
| 4.4.3 Otimização do Tempo de Dessorção | 22 |
| 4.4.4 Otimização do Solvente Orgânico na Membrana | 22 |
| 4.4.5 Otimização de Tempo de Extração e pH da Amostra | 23 |
| 4.5 Parâmetros analíticos de mérito e análise de amostras reais de urina | 24 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES | 24 |
| 5.1 Separação cromatográfica | 24 |
| 5.2. Otimização das condições do sistema HF-MMLLE | 25 |
| 5.2.1 Otimização da diluição da amostra na urina | 25 |
| 5.2.2 Otimização da etapa de dessorção | 26 |
| 5.2.3 Otimização da etapa de extração | 28 |
| 5.3 Dados analíticos de mérito e aplicação de amostras reais | 31 |
| 5.4 Robustez do método | 34 |
| 5.5 Comparações com outros métodos | 35 |
| 6 CONCLUSÃO | 38 |
| 7 REFERÊNCIAS | 39 |

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema dos modos de extração utilizados em HF-LPME.....pag 18
- Figura 2.** a) Sistema manual 96-well plate; b) pinos contendo a membrana da fase extratora; c) poços para introdução da amostra.....pag 19
- Figura 3.** Separação cromatográfica dos analitos seguida na faixa de 200 a 284 nm.....pag 26
- Figura 4.** Gráfico de barras para otimização univariada da diluição da urina nas condições: não diluído, 10, 20 e 40x diluído em água ultrapura.....pag 27
- Figura 5.** Superfície triangular para dessorção de solvente usando água ultra pura (UP), acetonitrila e metanol.....pag 28
- Figura 6.** Gráfico de barras para otimização univariada do tempo de dessorção.....pag 29
- Figura 7.** Superfície triangular para SLM usando octano, hexano e 1-octanol.....pag 30
- Figura 8.** Gráfico de barras para comparação do solvente com maior eficiência na extração.....pag 31
- Figura 9.** Resposta da superfície para o planejamento Doehlert de extração de tempo e pH.....pag 32
- Figura 10.** Gráfico de Lenth obtido pela aplicação do método de Youden para os sete fatores estudados e os efeitos resultantes para o estudo de robustez.....pag 34

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|--------|
| Tabela 1. Desreguladores endócrinos e suas propriedades..... | pag 14 |
| Tabela 2. Razão entre os solventes de dessorção para o planejamento de superfície triangular..... | pag 23 |
| Tabela 3. Razão entre os solventes na membrana para o planejamento de uma superfície ternária do tipo Simplex Centroide. | pag 24 |
| Tabela 4. Experimentos para otimização do tempo de extração e pH da amostra pelo planejamento Doehlert..... | pag 25 |
| Tabela 5. Parâmetros analíticos de mérito obtidos para o método, incluindo limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), coeficiente de determinação (R^2), faixa linear e equação linear para cada analito..... | pag 33 |
| Tabela 6. Recuperações relativas (RR), precisão intradia (PA) e precisão interdia (PE) obtidas da amostra feminina de urina. | pag 34 |
| Tabela 7. Parâmetros analíticos e variações para avaliar a robustez pelo método de Youden. | pag 36 |
| Tabela 8. Comparação da placa HF-MMLLE/96 well plate com outros métodos relatados na literatura para os mesmos analitos e matriz de urina..... | pag 37 |

LISTA DE ABREVIATURAS

- DAD – Detector por arranjo de diodos, do inglês *diode array detection*.
- DEs - Desreguladores endócrinos, do inglês *endocrine disruptors*.
- HF-LPME – Microextração em fase líquida suportada com fibra oca, do inglês *hollow fiber-liquid phase microextraction*.
- HF-MMLE - Extração líquido-líquido em membrana microporosa com fibra oca, do inglês *hollow fiber-membrane microporous liquid-liquid extraction*.
- HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês *high performance liquid chromatography*,
- Ko/w – Coeficiente de partição n-octanol/água.
- LOD – Limite de detecção, do inglês *limit of detection*.
- LOQ- Limite de quantificação, do inglês *limit of quantitation*.
- R² - Coeficiente de determinação, do inglês *determination coefficient*.
- CBZ – Carbamazepina, do inglês *carbamazepine*.
- DCL – Diclofenaco, do inglês *diclofenac*.
- DIA - Diazepam.
- IBU – Ibuprofeno, do inglês *ibuprofen*.
- NAP – Naproxeno, do inglês *naproxen*.
- CBF – Carbofurano, do inglês *carbofuran*.
- MPT – Parationa metílica, do inglês *methyl paration*.
- EE- 17 α -etinilestradiol, do inglês *17- α -ethynyl estradiol*.
- BPA - Bisfenol A, do inglês *bisphenol A*.
- BZ3 – Benzofenona, do inglês *benzophenone*.
- LLE - Extração líquido líquido, do inglês *liquid-liquid extraction*.
- SPE – Extração em fase sólida, do inglês *solid phase extraction*.
- SPME - Microextração em fase sólida
- LPME - Microextração em fase líquida
- RSD - desvios padrão relativos.
- RR- Recuperações relativas, *relative recovery*.
- SLM - membrana líquida suportada, do ingles *supported liquid membrane*

RESUMO

Neste trabalho, um método único e rápido foi desenvolvido usando a técnica de extração líquido-líquido em membrana de polipropileno microporosa de fibra oca (HF-MMLLE) e um sistema de 96-well plate para uma determinação multiclasse de alta frequência analítica de dez desreguladores endócrinos (DEs), incluindo diclofenaco, diazepam, carbamazepina, ibuprofeno, naproxeno, carbofurano, parationa metílica, 17- α -etinilestradiol, bisfenol A e benzofenona em urina humana, sendo quantificados e detectados por HPLC-DAD. As condições fixas para extração dos analitos foram 1,5 mL de amostra e 300 μ L de solvente para dessorção. Para otimizar os parâmetros da técnica de HF-MMLLE foram aplicados modelos multivariados e univariados, obtendo as seguintes condições: urina diluída a 20% em água ultrapura, impregnação de 1-octanol na membrana microporosa, 70 min para extração em pH 3,00, e dessorção em 30 min com uma mistura de 75% de metanol e 25% de acetonitrila (v/v). Os coeficientes de determinação, R^2 , foram $\leq 0,9973$ para o ibuprofeno, o LOD variou de 3,3 a 16,7 ng mL⁻¹ e o LOQ variou de 10 a 50 ng mL⁻¹. As recuperações relativas variaram de 71% a 126% para benzofenona e carbamazepina, respectivamente, a precisão intradia (n = 3) variou de 0,22% para o bisfenol A a 12,01% para naproxeno e a precisão interdia (n = 9) variou de 0,13% para 17- α -etinilestradiol a 17,76% para o diclofenaco. Diferentes amostras foram submetidas à metodologia e a proposta foi apresentada como uma boa alternativa para diferentes classes de compostos na urina humana.

Palavras-chave: Desreguladores endócrinos, HF-MMLLE, multiclasse, urina, 96-well plate.

1 INTRODUÇÃO

Os desreguladores endócrinos (DEs) têm atraído grande atenção entre as comunidades científicas e legislativas devido à sua presença generalizada e capacidade de interferir nos sistemas hormonais como potenciais ameaças cancerígenas à população humana. Essa atenção está relacionada ao alto consumo desses compostos, pois podem ser encontrados em diferentes fontes, como drogas, pesticidas, hormônios e outros. Portanto, o desenvolvimento de um método de extração multiclases é de grande importância para a determinação desses compostos.

Como esses compostos muitas vezes não são totalmente metabolizadas pelo organismo e são excretados pela urina, esta foi então definida como a matriz do estudo. Como os compostos são frequentemente encontrados em baixas concentrações e a urina é uma matriz complexa com alto teor de sais inorgânicos dissolvidos e amplas faixas de pH, o que dificulta a análise direta, é necessária uma etapa de preparação da amostra antes da injeção e análise. O objetivo desta etapa de preparo de amostra está em concentrar e isolar os analitos e adicioná-los a uma matriz compatível aos instrumentos analíticos. Consequentemente, melhora-se a seletividade e a simplificação para determinação de diversos compostos.

Uma técnica recentemente desenvolvida é a extração líquido-líquido em membrana microporosa de fibra oca (HF-MMLLE) sendo derivada da LPME, onde se baseia em uma extração de membrana de duas fases com uma fase doadora aquosa (amostra) e outra fase receptora orgânica separada por uma membrana microporosa, que no caso é utilizada uma membrana de fibra oca (HF), onde o mesmo líquido orgânico é imobilizado nos poros da membrana. No preparo de amostra, o tempo das extrações se torna algo determinante, pois com grandes quantidades de experimentos, a análise se torna muito demorada. Então para aumentar a frequência analítica do método, um sistema foi desenvolvido para se realizar 96 experimentos de forma simultânea, sendo denominado 96-well plate.

O objetivo deste estudo foi desenvolver um método multiclasse, sendo simples e eficaz, com alta frequência analítica, combinando HF-MMLLE e um sistema de 96-well plate para determinação de drogas (diazepam, naproxeno, ibuprofeno, diclofenaco e carbamazepina), pesticidas (parationa metílica e carbofurano), hormônio (17- α -etinilestradiol), plastificante (bisfenol A) e filtro solar (benzofenona) em

amostras de urina com separação e quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência com detector por arranjo de diodos (HPLC-DAD).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Desreguladores endócrinos

Os desreguladores endócrinos (DEs) foram conceituados pela Comissão Europeia em 1996, como sendo substâncias exógenas que fomentam efeitos prejudiciais para um organismo intacto e suas futuras gerações, devido a alterações no sistema endócrino.¹ Tem atraído grande atenção entre comunidades científicas e legislativas devido a sua presença generalizada e à sua capacidade de interferir nos sistemas hormonais como ameaças potencialmente cancerígenas à população humana.² Essa atenção está relacionada a problemática do seu alto consumo, já que esses compostos desreguladores podem ser encontrados em diferentes classes. Os DEs podem ser classificados em: (i) substâncias sintéticas denominadas xenoestrogênios, a exemplo dos alquilfenóis, pesticidas, ftalatos, bifenilas policloradas (PCB), bisfenol A e agentes farmacêuticos (ex.: 17α -etinilestradiol); (ii) substâncias naturais, a exemplo dos estrogênios (ex.: estrona e 17β -estradiol), androgênios (ex.: di-hidrotestosterona) e fitoestrogênios.³

Em seres humanos e animais a desregulação endócrina é um mecanismo de efeito relacionado ao funcionamento do sistema endócrino. Segundo a União Europeia (UE), os desreguladores endócrinos podem: danificar diretamente um órgão endócrino; alterar diretamente a função de um órgão endócrino; interagir com um receptor de hormônios ou, alterar o metabolismo de um hormônio em um órgão endócrino.⁴ Sendo assim, a exposição a esses compostos pode ocasionar doenças como: câncer, disfunção no sistema reprodutor e imunológico, problemas na tireoide e no sistema neurológico, entre outros.⁵

Tendo em mente que diversas substâncias que estão presentes no nosso dia a dia são consideradas poluentes emergentes, sendo fármacos, como antibióticos (trimetoprim, eritromicina, lincomicina e sulfametoxazol), analgésicos e antiinflamatórios (codeína, ibuprofem, acetaminofem, ácido acetilsalicílico, diclofenaco e fenoprofem), drogas psiquiátricas (diazepam), contrastes para exames radiológicos (iopromide, iopamidol e diatrizoato), além de diversos produtos de higiene pessoal como fragrâncias (*Musks*), protetores solares (benzofenona e 3-(4-metilbenzilideno) cânfora) e repelentes de insetos (N,N-dietiltoluamida)⁶, e que além do uso direto dessas substâncias no cotidiano, há ainda as rotas indiretas de contaminação através do ar, água e alimentos. Por exemplo, na alimentação deve-se

considerar a presença de resíduos de pesticidas nas hortaliças e frutas, o uso de conservantes, hormônios e antibióticos nas carnes ou ainda a utilização de latas e embalagens que podem conter moléculas ativas que migram e se concentram nos alimentos.⁷

Pelo fato de diversas dessas substâncias agirem sobre o metabolismo hormonal e, por sua vez, de diversas condições patológicas (tais como o câncer de mama, testículo e próstata, além de disfunção reprodutiva) serem afetadas por influências hormonais, é plausível afirmar que a exposição aos poluentes emergentes, potencialmente DEs, seja capaz de induzir efeitos adversos à saúde humana.⁸ Por isso, o desenvolvimento de um método multiclasse é de grande importância para determinação desses compostos. Neste trabalho, algumas classes de compostos de possíveis DEs foram estudadas, dentre elas, fármacos, pesticidas, hormônios, plastificantes e filtros solares.

A primeira classe é a dos fármacos, que são utilizados em larga escala para diferentes finalidades, tanto para humanos quanto para uso veterinário, aumentando assim a sua preocupação. A ocorrência desses fármacos no ambiente depende de variáveis, por exemplo: quantidade fabricada, dosagem, frequência de uso e eficácia do tratamento de resíduo. O descarte inadequado de medicamentos, principalmente no lixo comum ou na rede de esgoto (urina), pode contaminar o solo, as águas superficiais, como em rios, lagos, oceanos, águas subterrâneas e nos lençóis freáticos.⁹ Mas nem toda contaminação é proveniente do descarte inadequado, alguns componentes são excretados pela urina ou pelas fezes. Entre 50% e 90% de uma dosagem são excretados sem sofrer alterações e persistem no ambiente. Por isso na urina pode conter o composto ativo do medicamento, que não é totalmente absorvido pelo organismo, além dos seus metabólitos.¹⁰ Neste estudo foram analisados cinco fármacos, diazepam (tranquilizante), naproxeno, ibuprofeno, diclofenaco (ambos são analgésicos/anti-inflamatórios) e carbamazepina (utilizada como anti-epilético).

A segunda classe é a dos pesticidas, que são compostos químicos amplamente utilizados para controlar ou destruir pragas agrícolas que afetam as culturas, o que resulta na melhoria da produção de alimentos em todo o mundo.¹¹ Esses compostos se tornaram amplamente disponíveis comercialmente, sendo utilizados de forma irregular em muitos países, causando danos à saúde humana com casos não

intencionais de intoxicação. A parationa metílica e o carbofurano foram proibidos no Brasil,¹² mas são muito utilizados de forma ilegal.

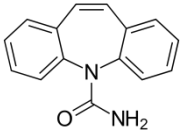
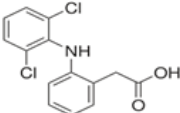
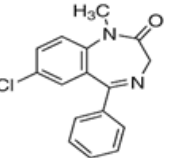
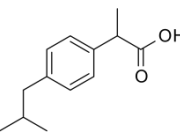
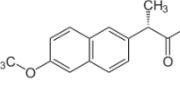
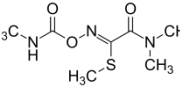
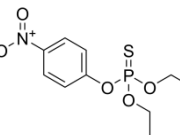
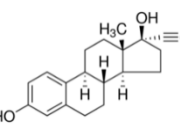
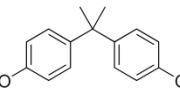
A terceira classe é a dos hormônios, que são substâncias biologicamente ativas responsáveis pelo funcionamento normal de vários órgãos e regulam a diferenciação sexual, podendo ser naturais ou sintéticos.¹³ Um dos principais hormônios sintéticos é o 17 α -etinilestradiol, que é um composto utilizado no mundo inteiro como contraceptivo.¹⁴ Acaba despertando uma maior preocupação devido a sua potência e pela quantidade contínua introduzida no ambiente.¹⁵

O bisfenol A é uma substância amplamente utilizada em processos industriais como monômero na produção de policarbonato e resinas epóxi, resinas de poliéster-estireno insaturadas e retardantes de chama.¹⁴ Este composto faz parte da classe dos plastificantes, que são compostos orgânicos adicionados a materiais poliméricos, com intuito de facilitar a produção e aumentar a flexibilidade e a resistência do produto em seu estágio final.¹⁶ Ele é usado em revestimento de algumas latas de alimentos e estudos demonstram que resíduos de bisfenol A podem ser encontrados em alguns alimentos devido a sua migração das embalagens.¹⁷

A última classe é a dos filtros solares, que são substâncias orgânicas ou inorgânicas de uso tópico, com capacidade de refletir ou absorver as radiações ultravioleta que atingem a pele, minimizando os efeitos causados pelo sol. A benzofenona é um exemplo de filtro solar químico, que absorve a energia eletromagnética na faixa denominada ultravioleta e a emite sob outra forma, a qual protege a pele da totalidade das radiações UVB e grande parte da UVA. A benzofenona-3 apresenta excelente estabilidade fotoquímica, mas não é totalmente tolerada e é responsável por diversas reações alérgicas ou dermatites de contato.¹⁸

Todos esses analitos, diazepam, naproxeno, ibuprofeno, diclofenaco, carbamazepina, parationa metílica, carbofurano, 17 α -etinilestradiol, bisfenol A e benzofenona são excretados através da urina por não serem totalmente metabolizados pelo organismo humano podendo causar problemas, dentre eles, a desregulação do sistema endócrino, sendo assim, foi definida como a matriz para a determinação desses compostos. Algumas das suas propriedades físico-químicas estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1: Desreguladores endócrinos e suas propriedades.

| Analito | Estrutura | Classe | pKa | Log K _{ow} | Ref. |
|----------------------------------|---|---------------|----------------|---------------------|------|
| Carbamazepina (CBZ) |  | Fármaco | 13,9 | 2,45 | 19 |
| Diclofenaco (DCL) |  | Fármaco | 4,15 | 4,51 | 19 |
| Diazepam (DIA) |  | Fármaco | 3,3 | 3,08 | 20 |
| Ibuprofeno (IBU) |  | Fármaco | 4,4 | 3,84 | 21 |
| Naproxeno (NAP) |  | Fármaco | 4,15 | 3,18 | 19 |
| Carbofurano (CBF) |  | Pesticida | - | 1,8 | 22 |
| Parationa Metílica (MPT) |  | Pesticida | - | 1,8 | 22 |
| 17 α- etinilestradiol (EE) |  | Hormônio | 10,7 | 4,12 | 23 |
| Bisfenol A (BPA) |  | Plastificante | 9,78- 10,39 | 4,04 | 24 |

| | | | | |
|----------------------|---|--------------|------|----|
| Benzofenona (BZF) |  | Filtro solar | 3,79 | 25 |
|----------------------|---|--------------|------|----|

Fonte: Autoria própria (2019).

2.2 Urina

A urina é uma das matrizes biológicas mais amplamente analisadas devido à sua pronta disponibilidade e coleta não invasiva em comparação com sangue, soro, fluidos amnióticos, conteúdo gástrico ou tecidos específicos, entre outros.²⁶ A análise direta da urina seria ideal, entretanto, na maioria dos casos, não é viável devido à complexidade inerente às amostras de urina, o que limita a seletividade e a sensibilidade das determinações.²⁷ O alto conteúdo de sais inorgânicos dissolvidos, suas variações lote a lote, as amplas faixas de pH e força iônica são algumas das dificuldades relacionadas à análise desta matriz. Por exemplo, é relatado que o pH da urina está na faixa de pH 5-8, com forças iônicas variadas, dependendo do nível de desidratação e dos hábitos alimentares do paciente.²⁸ A complexidade inerente à urina dificulta a análise direta e limita a sensibilidade e a seletividade na maioria das aplicações. Por esses motivos, é necessária uma etapa de preparação da amostra realizada antes da injeção do analito.²⁹

2.3 Preparo de amostra

Devido à complexidade das amostras biológicas, o preparo de amostras é uma parte fundamental para análises químicas e biológicas e pode ser considerada uma etapa importante em um procedimento analítico. Por isso, é um requisito essencial para o estabelecimento de um método cromatográfico sensível e seletivo destinado à análise de traços em matrizes complexas, como a urina.²⁹ Os métodos de preparo de amostras têm evoluído para atender as demandas analíticas e acompanhar o aumento da eficiência cromatográfica, resultante das novas instrumentações e fases estacionárias.³⁰

O principal objetivo de um preparo de amostra é a remoção de possíveis interferentes presentes na matriz, concentração dos analitos e, se necessário, adequação dos analitos para detecção e/ou separação instrumental.³¹ Com o tempo,

foram desenvolvidas técnicas de preparo de amostras que hoje em dia são consideradas técnicas tradicionais, tais como a extração líquido-líquido (LLE) e a extração em fase sólida (SPE).³² Apesar de serem técnicas que tem alta eficiência de extração, possuem algumas desvantagens, as técnicas de LLE laboriosa, requisitando grandes volumes de solventes orgânicos nas extrações e subsequentemente necessidade de um procedimento de evaporação para se obter uma concentração do analito significativa para análises em nível traço. Além disso, a evaporação dos solventes no ambiente do laboratório pode causar prejuízos à saúde do analista.³³ Já a SPE traz algumas vantagens em relação às outras duas técnicas pois menores volumes de solventes orgânicos são utilizados nas extrações que ocorrem no interior de cartuchos comerciais utilizados apenas uma única vez, mas traz como desvantagem a grande quantidade de resíduos gerada.³⁴

Muitos estudos estão sendo desenvolvidos para melhoria dessa importante etapa em um procedimento analítico, para que ocorra uma simplificação, miniaturização e automatização, reduzindo a utilização de solventes e resultando em processos menos agressivos ao meio ambiente, mantendo uma boa eficiência de extração.³⁵ Dentre as técnicas desenvolvidas, ganharam destaque as chamadas técnicas miniaturizadas de preparo de amostras, as quais tiveram grande impulso com o desenvolvimento da microextração em fase sólida (SPME) proposta por Pawliszyn e colaboradores no ano de 1990.³⁶ E em 1996 foram apresentados os primeiros trabalhos sobre a utilização da microextração em fase líquida (LPME) introduzidos por Dasgupta et al.³⁷ e Cantwell et al.³⁸ Partindo-se dos trabalhos pioneiros e das propriedades que as técnicas de microextração vinham apresentando, outras variantes começaram a ser desenvolvidas, com destaque para as derivadas da LPME, como a HF-LPME.

2.4 Microextração em fase líquida suportada com fibra oca (HF-LPME)

A Microextração em fase líquida suportada com fibra oca (HF-LPME) é uma variante da LPME que foi introduzida no final da década de 1990, sendo uma alternativa atraente às técnicas convencionais, uma vez que nestas, a extração demora muito, requer muito solvente, são métodos relativamente caros e aumenta a poluição ambiental com a grande geração de resíduos tóxicos.³⁹

A HF-LPME baseia-se na utilização de uma membrana oca hidrofóbica que é recoberta por um solvente orgânico que seja imiscível em água. No interior da

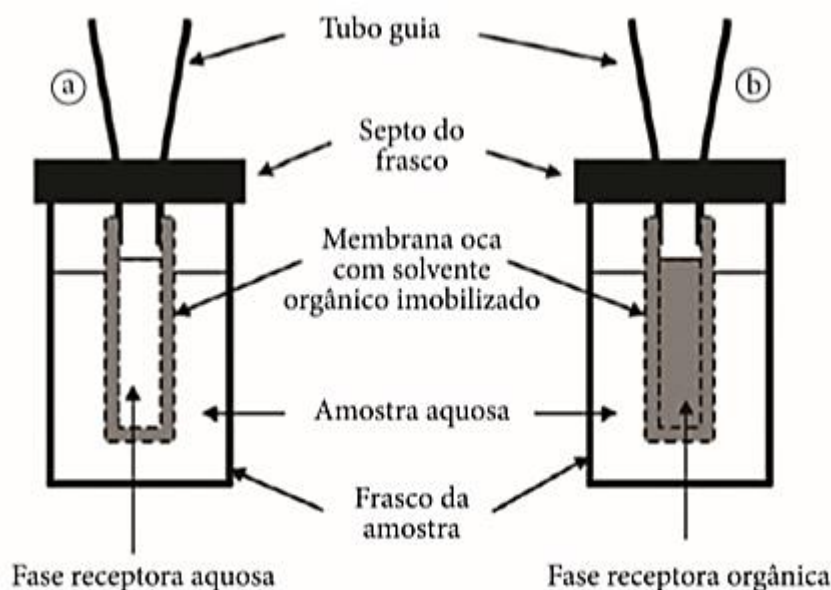
membrana são empregados alguns microlitros de um solvente (orgânico ou aquoso), o qual será o solvente receptor. A fase doadora será a matriz aquosa que contém os analitos a serem estudados.⁴⁰ O tamanho da membrana pode variar de 1,0 a 1,5 cm.

A imobilização do solvente ocorre pela imersão da membrana oca, por poucos segundos, no solvente orgânico, o qual imediatamente flui para os poros por força capilar. Os analitos serão extraídos da amostra aquosa através da membrana líquida formada e passam então para a fase receptora. Posteriormente a extração, o solvente presente no interior na membrana é retirado com ajuda de uma microsseringa e levado para a análise instrumental.⁴¹

A microextração em fase líquida utilizando membrana oca apresenta duas formas básicas: utilização de duas ou três fases. No sistema utilizando duas fases, o analito é extraído de uma amostra aquosa (fase doadora) através de um solvente imiscível com a água, o qual é imobilizado nos poros da membrana para formar a membrana líquida suportada (SLM), e utiliza-se também esse mesmo solvente orgânico no interior dessa membrana (fase extratora). Neste sistema, os analitos são extraídos por difusão passiva da amostra aquosa (solução doadora) diretamente para a solução orgânica receptora.⁴²

No sistema utilizando três fases, o analito é extraído de uma solução aquosa (fase doadora) através de um solvente orgânico imobilizado nos poros de uma membrana oca (fase orgânica) para uma nova fase aquosa (fase receptora) presente no interior da fibra oca. A fase orgânica, nesse caso, funciona como uma barreira entre a solução receptora e a solução doadora, essa barreira não permite a mistura dessas duas fases aquosas. No sistema de HF-LPME utilizando três fases, os analitos são extraídos mediante difusão passiva da amostra aquosa (fase doadora), através do solvente orgânico imobilizado nos poros da membrana oca (fase orgânica) e, posteriormente, pela fase receptora aquosa presente no interior dessa membrana.⁴³ Quando se usa três fases, a solução receptora é aquosa, e os compostos utilizados são os que sofrem ionização. Assim na matriz aquosa esses analitos encontram-se na forma neutra para possuir afinidade pela membrana e quando eles entram em contato com a fase receptora são ionizados.⁴² Na Figura 1 estão representados esquemas dos constituintes de um dos sistemas de HF-LPME utilizados, um com três fases (a) e outro com duas (b).

Figura 1. Esquema dos modos de extração utilizados em HF-LPME. Fonte: adaptado de Lee et al.⁴⁴



2.5 Extração líquido-líquido em membrana microporosa com fibra oca (HF-MMLLE)

Uma variação da HF-LPME é a extração líquido-líquido em membrana microporosa (HF-MMLLE), esta foi desenvolvida em 2007 por Zorita e colaboradores,⁴⁵ o grande diferencial do método é não empregar solvente no interior da membrana, apenas nos poros da mesma. A técnica baseia-se em uma extração de membrana de duas fases com uma fase doadora aquosa (amostra) e outra fase receptora orgânica separada por uma membrana microporosa, no caso é utilizada uma membrana de fibra oca (HF), onde o mesmo líquido orgânico é imobilizado nos poros desta membrana. A MMLLE é preferencialmente usada para compostos orgânicos em sua forma neutra e/ou mais hidrofóbicos. As principais vantagens das técnicas de extração baseadas em membranas por MMLLE, são alta capacidade de analito (coleta em um líquido em vez de usar adsorção), baixo consumo de solvente orgânico, fácil manuseio e baixos custos de análise.⁴⁶ Esta técnica pode ser realizada incorporando um sistema semi ou totalmente automatizado para extração dos analitos.

2.6 Sistema de 96-well plate

Na maioria das vezes o preparo de amostra tende a ser demorado, por isso a automatização ou semi automatização permite que as etapas de preparação sejam facilitadas e as torna mais rápidas. A técnica HF-MMLLE pode ser realizada incorporando um sistema para extração/dessorção dos analitos. Neste trabalho, foi utilizado o sistema de 96-well plate que aumenta a frequência analítica do método, pois diminui o tempo necessário para realização de todas as extrações, uma vez que podem ser realizadas até 96 ao mesmo tempo, minimizando os custos e apresentando uma boa precisão.⁴⁷

A amostra contendo os analitos é introduzida em um conjunto de espaços denominado poços contendo um volume de até 2 mL. Em uma escova, contendo até 96 pinos, são incorporadas as membranas da fase extratora, estando presentes em cada pino. Também pode ser realizada a etapa de dessorção, sendo introduzido um solvente em poços contendo volumes de 0,5 mL. Na Figura 2 estão apresentadas as principais partes para um sistema semiautomático de 96-well plate.

Figura 2 - a) Sistema semiautomático 96-well plate; b) pinos contendo a membrana da fase extratora; c) poços para introdução da amostra. Fonte: autoria própria 2019.



3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo deste estudo foi desenvolver um método multiclasse, combinando HF-MMLLE e um sistema 96-well plate para determinação de fármacos (diazepam, naproxeno, ibuprofeno, diclofenaco e carbamazepina), pesticidas (parationa metílica e carbofurano), hormônio (17- α -etinilestradiol), plastificante (bisfenol A) e filtro solar (benzofenona) em amostras de urina com separação e quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD).

3.2 Objetivo específico

- Preparar as membranas para uso no sistema de 96-well plate.
- Otimizar da separação e detecção dos compostos no sistema de HPLC-DAD.
- Otimizar os parâmetros para extração por HF-MMLLE, como tempo de extração, pH, diluição da urina, solvente extrator na membrana e para a dessorção, como tempo e solvente (ou misturas).
- Obter os parâmetros de mérito como limites de quantificação e detecção, faixas lineares de trabalho, coeficientes de determinação, recuperações relativas e precisão intradia e interdia.
- Aplicar a metodologia desenvolvida em amostras reais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Reagentes, materiais e amostras

Os padrões analíticos para todos os analitos foram obtidos na Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA), com os seguintes graus de pureza: diclofenaco (DCF) (99%), diazepam (DZP) (98%), carbamazepina (CBZ) (98%), ibuprofeno (IBF) (98%), naproxeno (NPA) (98%), carbofurano (CBF) (99%), parationa metílica (MPT) (99%), 17- α -etinilestradiol (EE) (99%), bisfenol A (BPA) (99%) e benzofenona (BZF) (98%). Os solventes metanol (MeOH) e acetonitrila de grau cromatográfico (ACN) foram obtidos da J.T. Baker (Mallinckrodt, NJ, EUA) sendo 99,95% e $\geq 99,9\%$, respectivamente. A água ultrapura (UP) foi produzida em um sistema de água de purificação (Mega Purity, Billerica, EUA). O ácido fórmico (98%) para ajuste do pH da

fase móvel no sistema HPLC foi obtido da Sigma Aldrich. As membranas ocas de polipropileno PP300/1200 Accurel® utilizadas neste estudo (diâmetro interno de 1,2 mm, espessura de 300 µm e tamanho de poro de 0,2 µm) foram obtidas na Membrane (Wuppertal, Alemanha). Para impregnação na membrana microporosa, os solventes hexano, n-octano, 1-octanol e acetona foram adquiridos da Sigma Aldrich (Milwaukee, WI, EUA) e todos os solventes têm pureza de grau cromatográfico ($\geq 99,9\%$). Os frascos de 2 mL foram usados para coletar solvente de dessorção antes da injeção no sistema HPLC. As amostras de urina foram coletadas em frascos de PTFE selados, mantidos refrigerados a 4°C e periodicamente coletados. Para o desenvolvimento do projeto, uma urina de uma voluntária saudável foi coletada, sem nenhum dos compostos. Para aplicar o método proposto, foram analisadas seis urinas de voluntários que usam ou têm contato possível com os analitos.

4.2 Instrumentação

Para a separação e quantificação dos analitos, um cromatógrafo líquido (modelo LC 20AT) e um detector de matriz de diodos (modelo SPD-20A série) foram obtidos da Shimadzu (Kyoto, Japão). O injetor manual Rheodyne 7725i (Rohnert Park, CA, EUA) conectado ao sistema possui um loop de 20 µL. A coluna utilizada é uma C18 com dimensões de 250 mm de comprimento x 4,6 mm i.d., espessura de filme de 5 µm (Kinetex, Core-Shell Technology, Phenomenex). Para a separação dos analitos, foi utilizado um gradiente de fase móvel com ACN (A) e UP (B) acidificado com H₂CO₂ 0,1% (v/v) e a condição cromatográfica a seguir: 50% de ambas as fases mantidas até 15 min; a fase A aumenta para 70% até 20 min; até 25% a condição inicial é restaurada. Para a quantificação, os comprimentos de onda monitorados foram estabelecidos de acordo com os dados da literatura, sendo CBZ, BPA e EE em 284 nm, DZP, IBP, BZ3 e NPA em 230 nm, DCF em 276 nm e CBF e MPT em 200 nm. O software da solução LC (Shimadzu, Kyoto, Japão) foi utilizado para avaliar os dados obtidos. Em combinação com HF-MMLLE, foi utilizado um sistema de 96-well plate obtido da Pas Technologies Inc. (Bruder Mannesmann Werkzeuge, Remscheid, Alemanha), sendo as etapas de extração e dessorção realizadas em placas de polipropileno de 96 poços com fundo 2 mL e 0,5 mL (Axygen Scientific, CA, Califórnia), respectivamente. O volume utilizado nessas etapas sem vazamento foi de 1,5 mL e 0,3 mL para extração e dessorção, respectivamente.

4.3 Preparação de HF-MMLLE em sistema de placas de 96 poços, etapas de extração e dessorção

A preparação da membrana microporosa é simples e rápida, onde um tubo cilíndrico de polipropileno é cortado em pedaços de 1 cm e lavado em acetona para remover possíveis contaminantes.⁴⁸ Após a lavagem, as membranas são acopladas ao sistema de 96-*well plate* através dos pinos na escova do sistema. Eles são imersos em 0,5 mL de 1-octanol por 10 s para impregnação com solvente para criar a membrana líquida suportada (SLM). O lúmen da membrana é usado para encaixar os pinos e um pequeno espaço é deixado abaixo da membrana para garantir que não haja solvente dentro da membrana e para evitar possíveis perdas devido à instabilidade causada pela agitação orbital do sistema, garantindo assim o conceito de HF-MMLLE. Após a preparação, as otimizações foram realizadas com as placas de fundo redondo de 2 mL para extração, com um volume final de amostra de 1,5 mL, sendo o procedimento realizado em 70 min com pH ajustado para 3,00 e a urina diluída a 20% em UP. Para dessorção, foram utilizadas placas de fundo afunilado de 0,5 mL com volume final de 0,3 mL para solvente e processadas em 30 min com uma mistura MeOH/ACN (75:25) (v/v). O conteúdo final é coletado em frascos de 1 mL para injeção posterior no sistema HPLC-DAD. As duas etapas foram realizadas sob agitação constante e orbital gerada pelo sistema de 96-*well plate*.

4.4 Otimização dos Parâmetros para HF-MMLLE

4.4.1 Otimização da diluição da urina

Primeiramente foi determinada a diluição da urina de forma univariada em três diluições e com a urina sem diluição. Para este procedimento realizou-se a extração com condições de concentração 300 $\mu\text{g L}^{-1}$ do MIX, volume de amostra de 1,5 mL, sem adição de sal, pH igual a 6,00 e tempo de extração de 1 h. Para a dessorção, foi utilizada uma mistura de MeOH/ACN, com proporção de 1:1, sendo o volume de 300 μL .

4.4.2 Otimização do Solvente de Dessorção

A escolha dos solventes de dessorção foi realizada através de um planejamento de superfície triangular. As extrações foram realizadas em um período de 1 h, com concentração de 300 $\mu\text{g L}^{-1}$ do MIX e volume final de 1,5 mL. A etapa de dessorção foi realizada com volume final de 300 μL e tempo de 15 min de dessorção.

Os solventes testados foram acetonitrila, metanol e acetona, sendo a razão entre eles apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Razão entre os solventes de dessorção para o planejamento de superfície triangular.

| Experimento | Acetonitrila | | Metanol | | Acetona | |
|-------------|--------------|-----------------|---------|-----------------|---------|-----------------|
| | (%) | (v/v) (μ) | (%) | (v/v) (μ) | (%) | (v/v) (μ) |
| 1 | 1,000 | 300 | 0,000 | 0 | 0,000 | 0 |
| 2 | 0,000 | 0 | 1,000 | 300 | 0,000 | 0 |
| 3 | 0,000 | 0 | 0,000 | 0 | 1,000 | 300 |
| 4 | 0,500 | 150 | 0,500 | 150 | 0,000 | 0 |
| 5 | 0,000 | 0 | 0,500 | 150 | 0,500 | 150 |
| 6 | 0,500 | 150 | 0,000 | 0 | 0,500 | 150 |
| 7 | 0,667 | 200,10 | 0,167 | 49,95 | 0,167 | 49,95 |
| 8 | 0,167 | 49,95 | 0,667 | 200,10 | 0,167 | 49,95 |
| 9 | 0,167 | 49,94 | 0,167 | 49,95 | 0,667 | 200,10 |
| 10 | 0,333 | 100,00 | 0,333 | 100,00 | 0,333 | 100,00 |
| 11 | 0,333 | 100,00 | 0,333 | 100,00 | 0,333 | 100,00 |
| 12 | 0,333 | 100,00 | 0,333 | 100,00 | 0,333 | 100,00 |

4.4.3 Otimização do Tempo de Dessorção

Para este procedimento realizou-se a extração com condições de concentração $300 \mu\text{g L}^{-1}$ do MIX, volume de amostra de 1,5 mL, sem adição de sal, pH igual a 6,00 e tempo de extração de 1 hora. Para a dessorção, foi utilizada uma mistura de

MeOH/ACN, com proporção de 2:1, sendo o volume de 300 µL e univariado em 3 tempos escolhidos de 10, 20 e 30 min, todos realizados em triplicata.

4.4.4 Otimização do Solvente Orgânico na Membrana

A escolha do solvente orgânico que foi impregnado na membrana foi realizada através de um planejamento de uma superfície ternária do tipo Simplex Centroide (12 experimentos, sendo 10, 11 e 12 a triplicata do ponto central). O procedimento de extração foi realizado em 1 hora com volume de amostra de 1,5 mL. Para a dessorção, foi utilizada uma mistura de MeOH/ACN, com proporção de 2:1, sendo volume final de 300 µL. Os solventes testados foram iso-octano, 1-octanol e hexano sendo a razão entre eles apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3. Razão entre os solventes na membrana para o planejamento de uma superfície ternária do tipo Simplex Centroide.

| Experimento | Iso-octano | | 1-Octanol | | Hexano | |
|-------------|------------|-----------|-----------|-----------|--------|-----------|
| | (%) | (v/v) (µ) | (%) | (v/v) (µ) | (%) | (v/v) (µ) |
| 1 | 1,000 | 300 | 0,000 | 0 | 0,000 | 0 |
| 2 | 0,000 | 0 | 1,000 | 300 | 0,000 | 0 |
| 3 | 0,000 | 0 | 0,000 | 0 | 1,000 | 300 |
| 4 | 0,500 | 150 | 0,500 | 150 | 0,000 | 0 |
| 5 | 0,000 | 0 | 0,500 | 150 | 0,500 | 150 |
| 6 | 0,500 | 150 | 0,000 | 0 | 0,500 | 150 |
| 7 | 0,667 | 200,10 | 0,167 | 49,95 | 0,167 | 49,95 |
| 8 | 0,167 | 49,95 | 0,667 | 200,10 | 0,167 | 49,95 |
| 9 | 0,167 | 49,94 | 0,167 | 49,95 | 0,667 | 200,10 |
| 10 | 0,333 | 100,00 | 0,333 | 100,00 | 0,333 | 100,00 |
| 11 | 0,333 | 100,00 | 0,333 | 100,00 | 0,333 | 100,00 |

| | | | | | | |
|----|-------|--------|-------|--------|-------|--------|
| 12 | 0,333 | 100,00 | 0,333 | 100,00 | 0,333 | 100,00 |
|----|-------|--------|-------|--------|-------|--------|

4.4.5 Otimização de Tempo de Extração e pH da Amostra

A última otimização foi baseada no planejamento multivariado Doehlert. Para a extração, manteve-se 300 µg L⁻¹ do MIX, volume final de 1,5 mL. Para a dessorção, o volume final foi de 300 µL, com tempo de 20 min e solventes MeOH/ACN (2:1). Na Tabela 4 é apresentado a proporção entre o tempo de extração e o pH da amostra. Os experimentos de 1 a 6 foram realizados em duplicata e 7, 8 e 9 são a triplicata do ponto central.

Tabela 4. Experimentos para otimização do tempo de extração e pH da amostra pelo planejamento Doehlert.

| Tempo de Extração | pH da Amostra | Tempo de Extração | pH da Amostra |
|-------------------|---------------|-------------------|---------------|
| -1,00000 | -1,00000 | 10 min | 6 |
| -1,00000 | 1,00000 | 25 min | 3 |
| 1,00000 | 1,00000 | 25 min | 9 |
| 1,00000 | -1,00000 | 55 min | 3 |
| 0,00000 | 0,00000 | 55 min | 9 |
| -1,00000 | 1,00000 | 70 min | 6 |
| -1,00000 | -1,00000 | 40 min | 6 |
| 1,00000 | -1,00000 | 40 min | 6 |
| 1,00000 | 1,00000 | 40 min | 6 |

4.5 Parâmetros analíticos de mérito e análise de amostras reais de urina

Para obter os parâmetros analíticos de mérito, foram realizadas curvas de calibração na matriz de urina da voluntária, com 8 pontos em triplicata cada. O limite de quantificação (LOQ) foi definido como o primeiro ponto da curva de calibração para cada analito e o limite de detecção (LOD) foi definido como o LOQ dividido por 3,3. Os coeficientes de determinação (R²) foram obtidos das curvas de calibração. Para obter a precisão do método, a recuperação relativa (RR) foi usada em 3 concentrações diferentes e em triplicata, cada uma sendo calculada de acordo com as equações

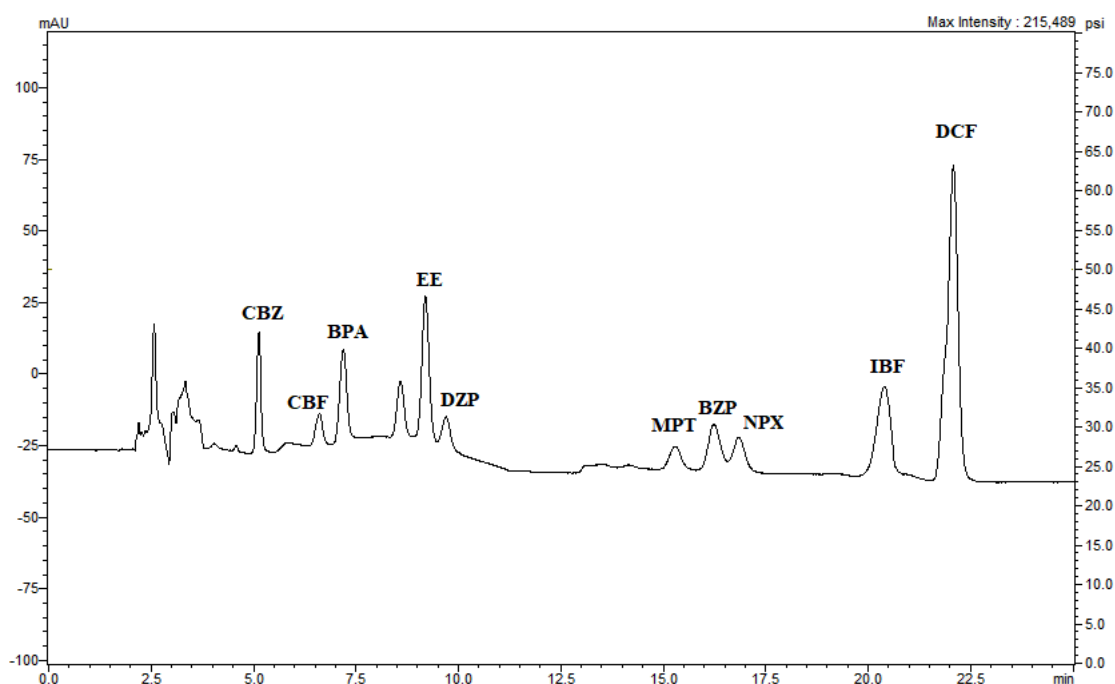
obtidas para cada analito. A precisão foi calculada pela intradia (PA) realizada no mesmo dia (n=3) e precisão interdia (PE) em três dias diferentes (n=9) usando o desvio padrão relativo (RSD). A robustez foi estudada pelos métodos de Youden e Lenth com 95% de confiança ($\alpha = 0,05$) dos resultados. As seis amostras reais de urina são analisadas aplicando o método otimizado e os parâmetros analíticos de mérito obtidos para quantificar a presença ou não dos analitos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Separação cromatográfica

Inicialmente, foi otimizada a separação cromatográfica utilizando uma solução de trabalho de 10 mg L⁻¹ contendo todos os analitos preparados em metanol. Foi empregado um gradiente de solvente com acetonitrila e água ultrapura, apenas a água foi acidificada com ácido fórmico, totalizando 25 min de corrida cromatográfica. A identificação dos analitos foi confirmada com a injeção dos padrões analíticos individuais.

Figura 3. Separação cromatográfica dos analitos seguida na faixa de 200 a 284 nm (carbamazepina (CBZ), carbofurano (CBF), bisfenol A (BPA), 17- α -etinilestradiol (EE), diazepam (DZP), parationa metilica (MPT), benzofenona (BZ3), naproxeno (NPA), ibuprofeno (IBF) e diclofenaco (DCF)).



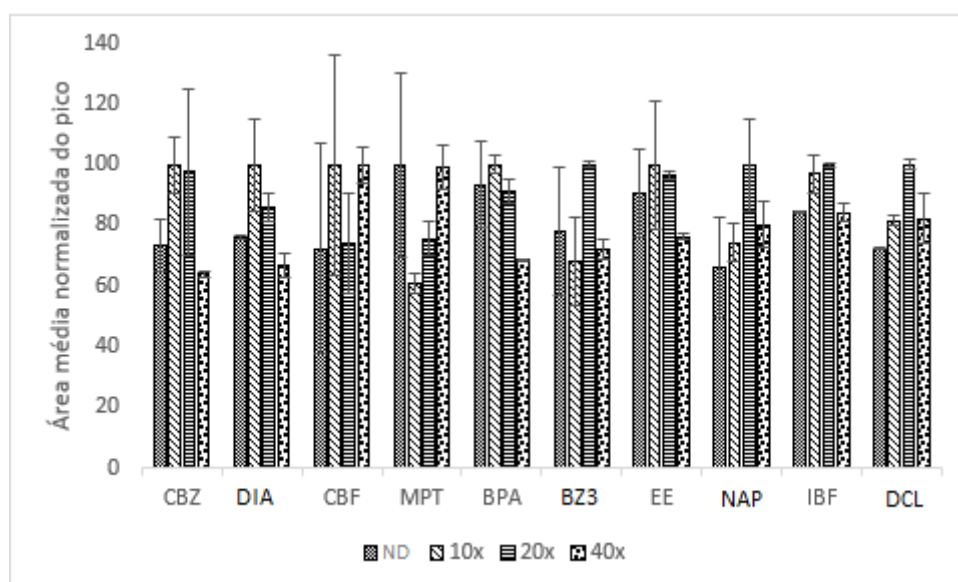
Observando a Figura 3, pode-se concluir que houve uma boa separação cromatográfica dos compostos em estudo. Sendo assim, prosseguiu-se com as otimizações do método.

5.2. Otimização das condições do sistema HF-MMLLE

5.2.1 Otimização da diluição da amostra na urina

A primeira etapa da otimização começa com o estudo do efeito da matriz de urina diluída em até 40x seu volume. A urina possui uma composição heterogênea, compreendendo sais, proteínas, macromoléculas, entre outros. Assim, interferências e problemas na eficiência da extração podem prejudicar a quantificação dos compostos alvo. A Figura 4 mostra os resultados para a urina não diluída (ND) e diluída 10, 20 e 40 vezes em água UP, e a triplicata de cada condição com as áreas cromatográficas de maior resposta é usada.

Figura 4. Gráfico de barras para otimização univariada da diluição da urina nas condições: não diluído, 10, 20 e 40x diluído em água ultrapura. A extração foi realizada por 1 hora com 1-octanol em SLM, 300 $\mu\text{g L}^{-1}$ de fortificação, sem ajuste de pH e volume de amostra de 1,5 mL. A dessorção foi realizada por 15 min com 150 μL de ACN e 150 μL de MeOH.



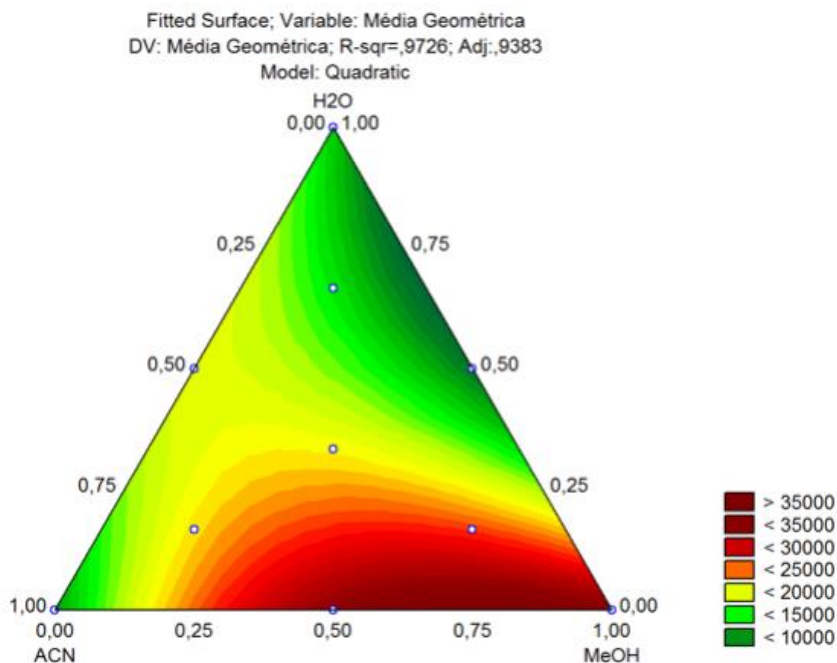
Considerando as respostas obtidas, em 20x diluída, os analitos já estão mais disponíveis para extração, considerando a presença de compostos orgânicos e inorgânicos em sua composição e obtendo respostas satisfatórias para todos os

analitos com baixos desvios padrão relativos (RSD). Além disso, não se diluiu muito os analitos, uma vez que matrizes reais serão afetadas pela adição de água UP. Portanto, esse valor foi selecionado como uma condição de compromisso.

5.2.2 Otimização da etapa de dessorção

A etapa de dessorção foi realizada antes da extração para garantir a dessorção máxima dos analitos e evitar o efeito de memória, levando a maior RSD e problemas na continuação do estudo. A primeira otimização da dessorção é o solvente que garantirá que a interação fase extratora-analito seja “quebrada”. O simplex centrado foi aplicado para avaliar qual solvente ou mistura tem o melhor desempenho e na Figura 5 a superfície de resposta resultante das áreas médias cromatográficas é apresentada e uma triplicata é aplicada no ponto central.

Figura 5. Superfície triangular para dessorção de solvente usando água ultra pura (UP), acetonitrila e metanol. A extração foi realizada por 1 hora com 1-octanol em SLM, 300 $\mu\text{g L}^{-1}$ de fortificação e 20x de urina diluída com volume de amostra 1,5 mL. A dessorção foi realizada por 15 min com 300 μL de solventes.

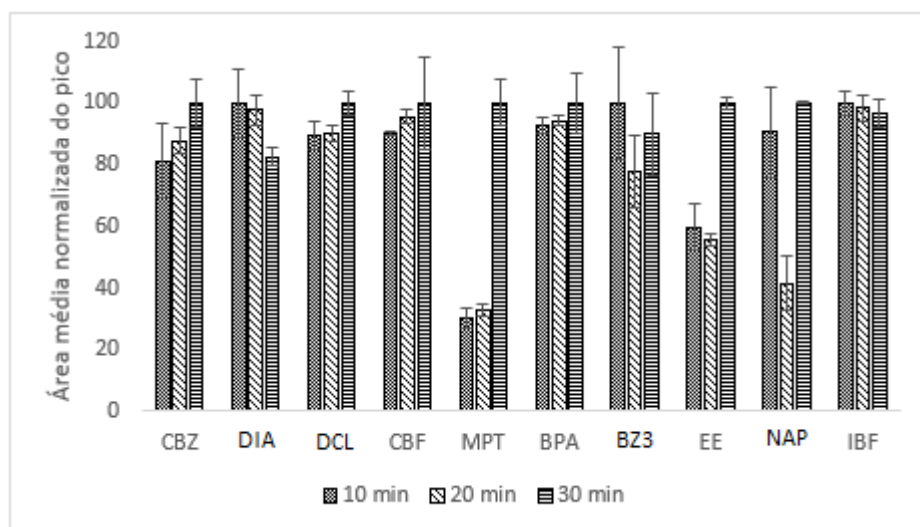


Os solventes utilizados foram selecionados de acordo com a compatibilidade com o sistema HPLC-DAD e possíveis interações com os analitos por seus grupos funcionais. Para a superfície obtida com $R^2 = 0,9726$, apresenta uma boa relação dos resultados e indica que na região de 50% a 100% de MeOH, os resultados são os que

apresentam maiores respostas. Portanto, uma proporção de 75:25 (v / v) de MeOH: ACN foi selecionada como a condição ideal.

Posteriormente, foi avaliado o tempo de dessorção necessário para garantir a máxima transferência de massa dos analitos da fase extratora SLM para o solvente de dessorção. A Figura 6 mostra as respostas em triplicata para cada condição e as médias geométricas das áreas cromatográficas. Os tempos estudados foram de 10, 20 e 30 min e pode ser observado um valor crescente, indicando que são necessários tempos mais longos para aumentar a resposta analítica. No entanto, para não prejudicar a frequência analítica do método, foram estabelecidos 30 min para continuar os estudos de extração.

Figura 6. Gráfico de barras para otimização univariada do tempo de dessorção nas condições: urina diluída 20x, tempo de extração de 1 hora com 1-octanol em SLM, 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de fortificação, sem ajuste de pH e volume de amostra de 1,5 mL. A dessorção foi realizada com 150 μL de ACN e 150 μL de MeOH.

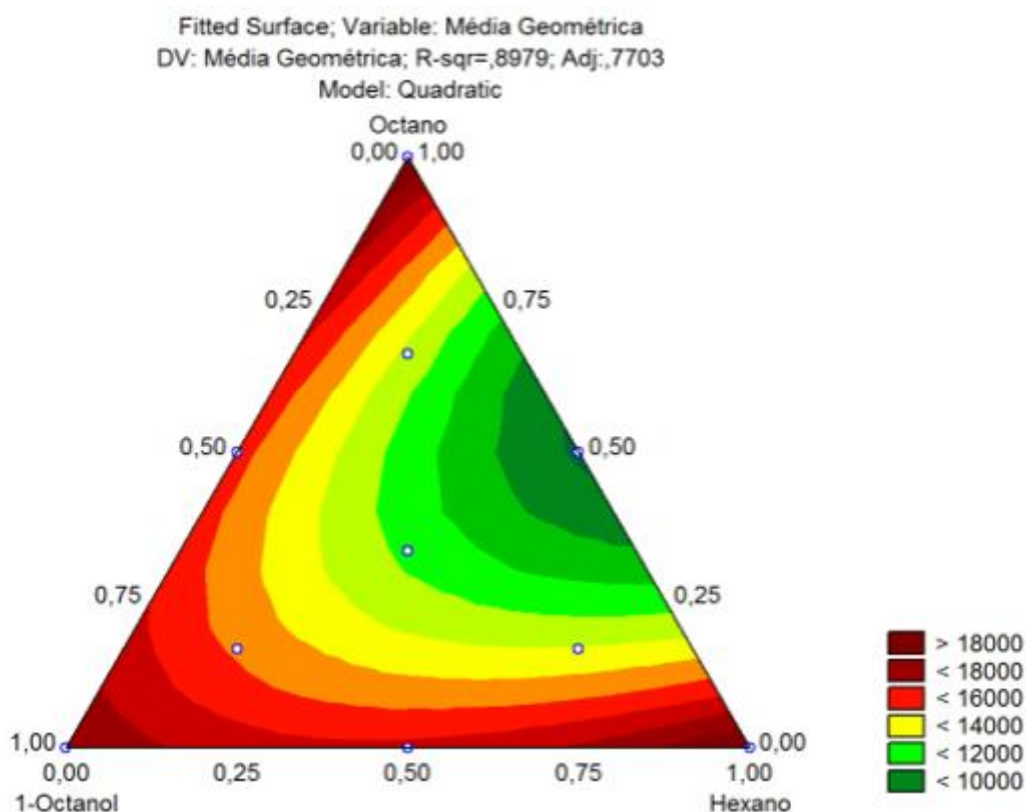


5.2.3 Otimização da etapa de extração

O fator crucial das técnicas baseadas em membrana são os solventes orgânicos impregnados nos poros da fibra oca, formando uma membrana líquida suportada (SLM), onde os analitos serão extraídos pela fase aquosa do doador. Portanto, os solventes que possuem baixas volatilidades e viscosidade suficiente para manter o filme líquido estável são os mais preferidos. Para avaliar os solventes da SLM, foram selecionados hexano, octano e 1-octanol, que se enquadram nos conceitos apresentados, além de serem os mais utilizados em técnicas de membrana.

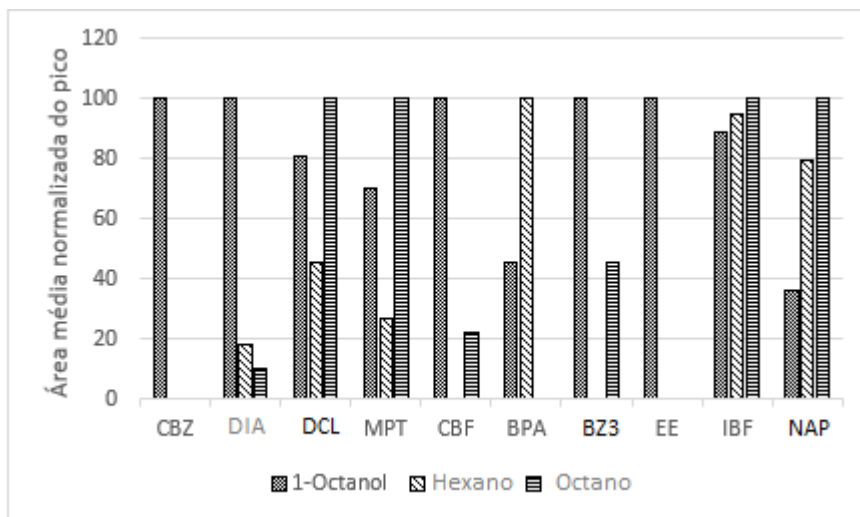
Um simplex centróide foi aplicado, com triplicata no ponto central, obtendo a superfície mostrada na figura 7. A superfície apresentou $R^2 = 0,8979$ e indica que para os três solventes puros utilizados as respostas são as mais altas.

Figura 7. Superfície triangular para SLM usando octano, hexano e 1-octanol. Tempo de extração de 1 hora, $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ de fortificação e 20x de urina diluída com volume de amostra de 1,5 mL. A dessorção foi realizada por 30 min com $300 \mu\text{L}$ de solventes.



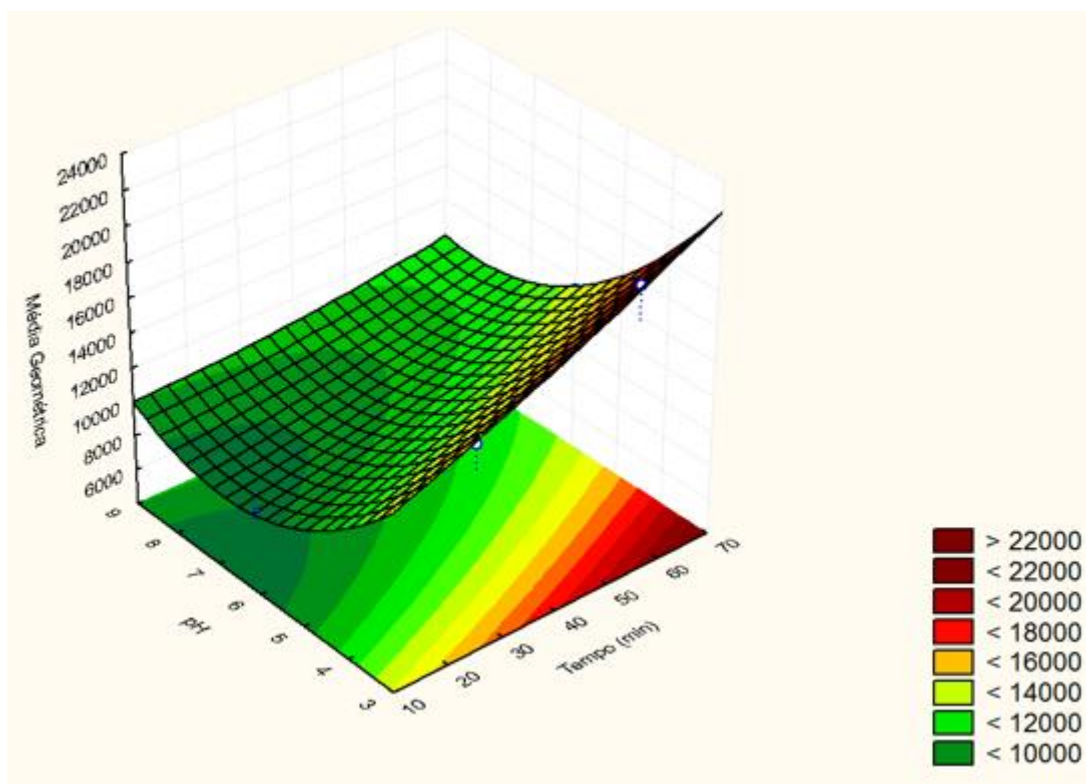
No entanto, uma comparação separada dos analitos foi feita para cada solvente puro, a fim de comparar aquele com a maior eficiência de extração. Isto ocorre pois foi utilizada a média geométrica entre as áreas cromatográficas para cada analito em cada condição, sendo que os solventes puros extraíram um ou mais analitos com áreas maiores, gerando essas três condições de máxima resposta. Na Figura 8 é apresentado um gráfico de barras comparativo entre os três solventes puros e os respectivos analitos extraídos. Em comparação, o hexano extrai apenas 6 e o octano extrai 7 analitos dos 10 selecionados neste estudo. Já o 1-octanol extrai com eficiência superior para quase todos os analitos. Assim, o 1-octanol foi estabelecido para formar SLM.

Figura 8. Gráfico de barras para comparação do solvente com maior eficiência na extração. Condições de otimização definidas: urina diluída 20x, tempo de extração de 1 hora, 300 µg mL⁻¹ de fortificação, sem ajuste de pH e volume de amostra de 1,5 mL. A dessorção foi realizada por 30 min com 75 µL de ACN e 2250 µL de MeOH



A seguir, um planejamento Doehlert foi utilizado para estudar o tempo de extração e o pH. A Tabela 1 apresenta algumas propriedades físico-químicas dos analitos, bem como seus pKas, onde estão na faixa de 3,3 a 13,9. Estruturas diferentes podem resultar em tempos distintos para poder extrair todos os analitos, bem como, a competição pelos sítios de interação. A partir disso, os tempos de estudo foram de 10 a 70 min e o pH foi avaliado de 3 a 9 para verificar a influência na extração dos analitos. Na Figura 9, a superfície de resposta é mostrada.

Figura 9. Resposta da superfície para o planejamento Doehlert de extração de tempo e pH. A extração foi realizada com 1-octanol em SLM, 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de fortificação e volume de amostra de 1,5 mL. A dessorção foi realizada por 30 min com 75 μL de ACN e 225 μL de MeOH.



Os dados obtidos apresentaram uma correlação de 99,68% da resposta, onde os melhores indicam por períodos mais longos, mas a partir de 60 min já indica uma boa resposta. Para o pH variado, o indicativo é para valores mais baixos, porque a maioria dos analitos ácidos estará em sua forma neutra para interagir com o SLM. Para garantir que as respostas fossem máximas sem afetar a frequência analítica, foram selecionados 70 minutos de extração e pH ajustado para 3,00.

5.3 Dados analíticos de mérito e aplicação de amostras reais

Os valores analíticos de mérito foram determinados usando a matriz de urina diluída e a metodologia otimizada. Os intervalos de concentração foram entre 10 – 300 $\mu\text{g L}^{-1}$ e foram realizados mais seis pontos dentro do intervalo, todos em triplicata para os dez analitos. Os resultados obtidos para as figuras analíticas de mérito são mostrados na Tabela 5.

Tabela 5. Parâmetros analíticos de mérito obtidos para o método, incluindo limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), coeficiente de determinação (R^2), faixa linear de trabalho e equação linear para cada analito.

| Analito | LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$) | LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$) | R^2 | Faixa Linear ($\mu\text{g L}^{-1}$) | Equação Linear |
|----------------|--|--|-------------------------|---|---------------------------|
| CBZ | 3,3 | 10 | 0.9984 | 10 – 300 | $y = 197,15x + 5156,3$ |
| DIA | 16,7 | 50 | 0.9840 | 50 – 300 | $y = 326,7x + 5073,8$ |
| CBF | 8,3 | 25 | 0.9847 | 25 – 300 | $y = 222,72x + 14389$ |
| MPT | 3,3 | 10 | 0.9902 | 10 – 300 | $y = 690,45x - 1695$ |
| BPA | 3,3 | 10 | 0.9884 | 10 – 300 | $y = 157,15x + 10594$ |
| IBF | 8,3 | 25 | 0.9973 | 25 – 300 | $y = 538,55x + 466021$ |
| NAP | 16,7 | 50 | 0.9882 | 50 – 300 | $y = 136,53x - 4009,1$ |
| EE | 8,3 | 25 | 0.9848 | 25 – 300 | $y = 183,26x - 4208,7$ |
| BZ3 | 3,3 | 10 | 0.9824 | 10 – 300 | $y = 425,89x - 8264$ |
| DCL | 3,3 | 10 | 0.9869 | 10 – 300 | $y = 135,72x + 482,6$ |

Os valores de LOD variaram de 3,3 a 16,7 $\mu\text{g L}^{-1}$ e, para LOQ, de 10 a 50 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os coeficientes de determinação (R^2) apresentaram resposta de 0,9824 para BZP a 0,9984 para CBZ, indicando boa linearidade. A exatidão foi determinada por recuperações relativas (RR), bem como a precisão intra (PA) e interdia (PE) também foram determinadas e os resultados são mostrados na Tabela 6.

Tabela 6: Recuperações relativas (RR), precisão intra (PA) e interdia (PE) obtidas da amostra feminina de urina.

| Analito | Fortificação ($\mu\text{g L}^{-1}$) | RR (%) | PA (%) | PE (%) |
|----------------|---|---------------|---------------|---------------|
| CBZ | 50 | 126 | 3,77 | 14,70 |
| | 100 | 109 | 1,34 | 12,84 |
| | 300 | 89 | 2,80 | 16,41 |
| DIA | 50 | 92 | 2,31 | 4,86 |
| | 100 | 96 | 4,04 | 2,73 |
| | 300 | 77 | 2,01 | 11,42 |
| CBF | 50 | 93 | 5,64 | 3,50 |
| | 100 | 94 | 5,26 | 3,08 |
| | 300 | 98 | 0,91 | 0,26 |
| MPT | 50 | 81 | 3,72 | 5,96 |
| | 100 | 106 | 1,50 | 5,98 |
| | 300 | 104 | 1,02 | 3,96 |
| BPA | 50 | 109 | 5,24 | 2,64 |
| | 100 | 88 | 0,22 | 9,56 |
| | 300 | 79 | 2,18 | 11,60 |

| | | | | |
|------------|-----|-----|-------|-------|
| IBF | 50 | 94 | 1,01 | 1,19 |
| | 100 | 114 | 2,01 | 0,46 |
| | 300 | 84 | 0,74 | 2,71 |
| NPA | 50 | 84 | 12,01 | 16,94 |
| | 100 | 80 | 0,84 | 13,41 |
| | 300 | 98 | 1,05 | 0,33 |
| EE | 50 | 108 | 2,94 | 0,23 |
| | 100 | 101 | 8,77 | 4,59 |
| | 300 | 76 | 0,40 | 0,13 |
| BZ3 | 50 | 89 | 6,90 | 9,64 |
| | 100 | 81 | 7,87 | 8,94 |
| | 300 | 71 | 1,13 | 0,92 |
| DCL | 50 | 101 | 3,73 | 17,76 |
| | 100 | 108 | 5,01 | 3,88 |
| | 300 | 79 | 1,86 | 12,33 |

As recuperações relativas variaram de 71% a 126% para BZP e CBZ, respectivamente, a precisão intradia ($n = 3$) variou de 0,22% para BPA a 12,01% para NPX e a precisão interdía ($n = 9$) apresentou valores menores para 17,76% para DCF. Todos os testes foram realizados em três concentrações (50, 100 e 300 $\mu\text{g L}^{-1}$) em triplicata para RR e PA e em triplicata em 3 dias diferentes, com 3 amostras diferentes para PE, totalizando 9 respostas. Todos os valores encontrados são satisfatórios e de acordo com o *Association Official of Analytical Chemists (AOAC)*.⁴⁹ As urinas utilizadas como amostras reais para a aplicação da metodologia foram obtidas de voluntários que concordam com a análise. Dois voluntários são usuários de contraceptivos com composição de EE, dois usuários são trabalhadores agrícolas com

possível contato e intoxicação por pesticidas, um usuário de comprimidos anti-inflamatórios com IBF em sua composição e um usuário ansiolítico contendo DZP como substância ativa. Das análises realizadas, nenhum analito foi detectado pelo sistema HPLC-DAD, que pode estar abaixo do LOD da metodologia apresentada.

5.4 Robustez do método

Robustez é um parâmetro que fornece informações adicionais para indicar a autenticidade do método desenvolvido. Este teste está relacionado às variáveis propositalmente alteradas para simbolizar possíveis erros associados à manipulação humana e instrumental. Uma das maneiras de avaliar a robustez através da variação mínima dos diferentes fatores envolvidos na metodologia é pelo método de Youden.⁵⁰ A Tabela 7 apresenta os fatores com variações positivas e negativas de acordo com os parâmetros otimizados e fixos do método. Para o estudo matricial, os resultados são avaliados através do gráfico de Lenth.

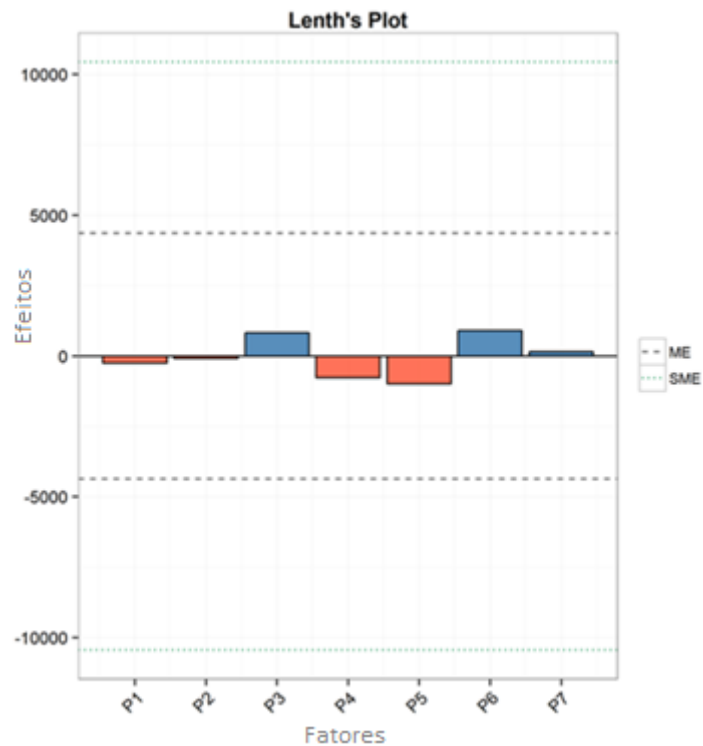
Tabela 7. Parâmetros analíticos e variações para avaliar a robustez pelo método de Youden.

| Fator | Condição | | | | |
|-----------|-----------------------|-----------|-------------------|-----------|---|
| | Variação Positiva | | Variação Negativa | | |
| P1 | Volume de amostra | 1,515 mL | A | 1,485 mL | a |
| P2 | Volume de dessorção | 303 µL | B | 297 µL | b |
| P3 | Tempo de extração | 70,70 min | C | 69,30 min | c |
| P4 | Tempo de dessorção | 30,30 min | D | 29,70 min | d |
| P5 | Proporção de solvente | 77%/23% | E | 73%/23% | e |
| P6 | Diluição da urina | 21% | F | 19% | f |
| P7 | pH | 3,10 | G | 2,90 | g |

Neste método, é aplicado um intervalo de confiança de 95%, onde são estabelecidas duas margens, o erro de margem (ME) e o erro de margem simultâneo

(SME). Esses dois limites são importantes, indicando a robustez do método, e na Figura 10 o gráfico foi obtido, sendo ME e SME valores de 4362,95 e 10441,42, respectivamente. O ME representa o limite quando apenas um efeito é testado, aumentando a chance de falso positivo quando múltiplos efeitos são avaliados; no entanto, a SME é usada para contornar esse problema, proporcionando uma melhor avaliação. Nesse fato, todos os fatores apresentaram respostas abaixo da ME, portanto, as variações aplicadas nos parâmetros mostraram que o método é robusto.

Figura 10. Gráfico de Lenth obtido pela aplicação do método de Youden para os sete fatores estudados e os efeitos resultantes para o estudo de robustez.



5.5 Comparações com outros métodos

Por fim, o método proposto foi comparado com outros estudos já publicados na literatura para os mesmos analitos em amostras de urina. Nesta comparação, este trabalho apresenta algumas vantagens, como mostra a Tabela 8.

Tabela 8. Comparação da técnica HF-MMLLE/96-well plate com outros métodos relatados na literatura para os mesmos analitos e matriz de urina. Técnicas de preparação de amostras: DLLME: microextração líquido-líquido dispersiva; μ -QuEChERS: micro-rápido, fácil, barato, eficaz, robusto, seguro; HF-LPME: microextração em fase líquida com fibra oca; AALLME: microextração líquido-líquido assistida por ar; SPME: microextração em fase sólida; DPX: extração de ponteira descartável.

| Técnica | Analitos | Separação/Identificação | LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$) | Tempo total | Volume total | Ref. |
|-----------------|-----------------------------|-------------------------|------------------------------|-------------|--------------|------|
| DLLME | BPA | LC-MS/MS | 0,1 | 10 sec | 16,25 mL | [51] |
| μ -QuEChERS | BPA | GC-MS | 0,13 | 1 hour | 2,2 mL | [52] |
| HF-LPME | BZP | GC-MS | 0,01 | 15 min | 1 mL | [53] |
| AALLME | BPA, BZP | LC-MS/MS | 0,03-0,02 | 20 min | 15 mL | [54] |
| SPME | CBF, MPT | GC-ECD/FPD | 0,1-0,5 | 30 min | 3 mL | [55] |
| DPX | DZP, DIC, NPX, IBU, CBZ, EE | HPLC-DAD | 1,5-3,0 | 2,5 min | 6,8 mL | [56] |
| DPX | CBF, MPT | GC-MS | 0,76-1,52 | 9 min | 6,25 mL | [57] |

| | | | | | | |
|----------|--|----------|-------|--------------|--------|--------------------|
| HF-MMLLE | CBZ, DZP, CBF, MPT, BPA, IBF, NPX, EE, BZP, DCF | HPLC-DAD | 10-50 | ~1,00 min | 1,8 mL | Este estud o |
|----------|--|----------|-------|--------------|--------|--------------------|

A partir dos dados apresentados, pode-se observar que a metodologia HF-MMLLE/96-*well plate* requer uma pequena quantidade de amostra e solvente para ser realizada (1,8 mL no total). Esse recurso é muito interessante para amostras biológicas, também apresenta uma alternativa “mais ecológica” às metodologias de bioanálise. Outro ponto importante a destacar é que, a maioria dos métodos publicados é para uma classe específica de compostos, enquanto o método desenvolvido é para determinação em várias classes. Devido ao sistema de 96-*well plate* que permite a extração de 96 amostras simultaneamente, o tempo por amostra foi de aproximadamente 1,0 min, garantindo um alto rendimento. Os LODs foram mais altos do que em outros estudos, no entanto, devem ser considerados os diferentes equipamentos (GC e LC) e sistemas de detecção (MS, MS / MS, ECD / FPD) usados. Devido à adequação da técnica, poderia ser usada com esses sistemas de detecção para diminuir os valores de LOD. Vale ressaltar que essa metodologia não utilizou derivatização ou sais e pode ser totalmente automatizada, reduzindo os erros, as perdas de analitos e a contaminação das amostras causadas pela manipulação humana, fornecendo quantificações mais precisas. Portanto, o estudo apresentado é uma alternativa promissora e satisfatória para a determinação simultânea de DEs em várias classes na urina humana, com boa eficiência, baixo custo, baixo volume de amostras e de solventes e tempo de preparação, evidenciando sua aplicação.

6 CONCLUSÃO

O método analítico desenvolvido neste trabalho demonstrou bons resultados para a extração das cinco diferentes classes de analitos, sendo limites de quantificação, limites de detecção, coeficiente de correlação linear, precisão e ensaios de recuperação confiáveis. As otimizações ocorreram de forma rápida e competente tanto para extração quanto para a dessorção. A etapa de extração efetuou-se em um período de 1 hora, entretanto com o uso do sistema de 96-well plate foi possível realizar até 96 extrações simultâneas, o que garantiu uma frequência analítica alta de aproximadamente menos de 1 min por experimento. Para a etapa de dessorção o tempo foi relativamente curto, de 30 minutos, sendo a frequência analítica de 18,75 segundos por experimento. A corrida cromatográfica realizada no HPLC-DAD apresentou um tempo de 25 minutos em um gradiente de água ultrapura acidificada e acetonitrila. O método possui inúmeras vantagens, tais como, uma excelente frequência analítica com a possibilidade de realizar até 96 extrações ao mesmo tempo, baixo custo, fácil aplicação, pouco uso de solvente e evita efeitos de memória, pois a membrana não é reutilizada. Atrelado a isto, pode-se citar o benefício de empregar a HF-MMLLE que é uma alternativa atraente frente às técnicas de membrana, uma vez que utiliza menor quantidade de solvente. Por fim, o método mostrou-se eficiente para a determinação de diazepam, naproxeno, ibuprofeno, diclofenaco, carbamazepina, parationa metílica, carbofurano, 17 α -etinilestradiol, bisfenol A e benzofenona em amostras de urina.

7 REFERÊNCIAS

- ¹BALEST, Lydia et al. Removal of endocrine disrupter compounds from municipal wastewater using an aerobic granular biomass reactor. **Biochemical Engineering Journal**, [s.l.], v. 41, n. 3, p.288-294, out. 2008. Elsevier BV.
- ²TFT Omar , A. Ahmad , AZ Aris , FM Yusoff; Compostos desreguladores endócrinos (EDCs) em matrizes ambientais e de biota: revisão de estratégias analíticas para produtos farmacêuticos, hormônios estrogênicos e compostos de alquilfenol. **Trac Trends Anal. Chem.** , 85 (2016) , pp. 241 - 259
- ³BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. **Quim. Nova.** v. 30, n. 3, p. 651-666, 2007
- ⁴European Workshop on Endocrine Disrupters, European ED workshop, Aronsborg (Balsa) Sweden, 2001.
- ⁵ Endocrine Disrupters in Wastewater and Sludge Treatment Processes. J. W. Birkett and J. N. Lester, eds. 2003.
- ⁶BARCELO, Damia`. Emerging pollutants in water analysis. **Trends In Analytical Chemistry**, Barcelona, v. 22, n. 10, p.14-16, 2003.
- ⁷ PILLIÈRE F., Perturbateurs endocriniens et effets toxiques. **Documents pour le Médecin du Travail.**, 92: 377-381, 2002.
- ⁸KOIFMAN, S. & PAUMGARTTEN, F. J. R., O impacto dos desreguladores endócrinos ambientais sobre a saúde pública. **Cad. Saúde Pública**, 18: 354-355, 2002.
- ⁹PINTO, Gláucia Maria Ferreira et al. Estudo do descarte residencial de medicamentos vencidos na região de Paulínia (SP), Brasil. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, [s.l.], v. 19, n. 3, p.219-224, set. 2014. FapUNIFESP (SciELO).
- ¹⁰UEDA, J.; TAVERNARO, R.; MAROSTEGA, V.; PAVAN, W. (2009). Impacto Ambiental do descarte de fármacos e estudo da conscientização da população a respeito do problema. **Revista Ciências do Ambiente** (on-line), v. 5, n. 1.
- ¹¹H. Guan, W.E. Brewer, S.T. Garris, S.L. Morgan, Disposable pipette extraction for the analysis of pesticides in fruit and vegetables using gas chromatography/mass spectrometry, **J. Chromatogr. A** 1217 (2010) 1867-1874.
- ¹²ALMEIDA, Vicente. Agrotóxicos no Brasil: o glifosato e os desafios para proteção da saúde e do ambiente. Disponível em: <<https://www.brasildefato.com.br/2018/09/18/agrotoxicos-no-brasil-o-glifosato-e-os-desafios-para-protecao-da-saude-e-do-ambiente/>>. Acesso em: 18 set. 2018.

¹³FERNANDES, Andreia N et al. Remoção dos hormônios 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol de soluções aquosas empregando turfa decomposta como material adsorvente. **Química Nova**, [s.l.], v. 34, n. 9, p.1526-1533, set. 2011.

¹⁴SODRÉ, Fernando Fabríz. Interferentes Endócrinos como Contaminantes Emergentes: Uma questão de saúde pública. **Artigos Temáticos do Aqqua**, Brasília, v. 1, n. 1, p.1-8, jul. 2012.

¹⁵REIS FILHO, Ricardo Wagner; ARAÏJO, Juliana Coutinho de; VIEIRA, Eny Maria. HORMÔNIOS SEXUAIS ESTRÓGENOS: CONTAMINANTES BIOATIVOS. **Química Nova**, São Carlos, v. 29, n. 4, p.817-822, abr. 2006.

¹⁶SOUZA, Renata Rodrigues et al. Determinação de plastificantes em água potável utilizando cromatografia gasosa e espectrometria de massas. **Química Nova**, [s.l.], v. 35, n. 7, p.1453-1458, 2012.

¹⁷KUO, Han-wen; DING, Wang-hsien. Trace determination of bisphenol A and phytoestrogens in infant formula powders by gas chromatography–mass spectrometry. **Journal Of Chromatography A**, [s.l.], v. 1027, n. 1-2, p.67-74, fev. 2004

¹⁸ROGGIA, Isabel. **Avaliação da estabilidade, liberação e permeação cutânea de nanocápsulas contendo benzofenona-3**. 2009. 134 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Tecnológicas, Ufsm, Santa Maria, 2009

¹⁹YING, G.G.; KOOKANA, R.S.; KOLPIN, D.W. Occurrence and removal of pharmaceutically active compounds in sewage treatment plants with different technologies. *Journal of Environmental Monitoring*. 11, 1498-1505, 2009.

²⁰HAN, Wesley W.; YAKATAN, Gerald J.; MANESS, Dale D.. Kinetics and Mechanisms of Hydrolysis of 1,4-Benzodiazepines II: Oxazepam and Diazepam. **Journal Of Pharmaceutical Sciences**, [s.l.], v. 66, n. 4, p.573-577, abr. 1977.

²¹SENA, Marcelo M. et al. **Determinação espectrofotométrica simultânea de paracetamol e ibuprofeno em formulações farmacêuticas usando calibração multivariada**. *Quím. Nova* [online]. 2007, vol.30, n.1, pp.75-79. ISSN 0100-4042.

²²OENNING, Anderson Luiz; MERIB, Josias; CARASEK, Eduardo. An effective and high-throughput analytical methodology for pesticide screening in human urine by disposable pipette extraction and gas chromatography – mass spectrometry. **Journal Of Chromatography B**, [s.l.], v. 1092, p.459-465, ago. 2018.

²³SILVA, Lúcia Guêzo Almeida da. **Desenvolvimento de métodos de extração para análise de 17 α -etinilestradiol e Bisfenol-A em amostras biológicas por cromatografia líquida de alta eficiência.** 2012. 45 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biodiversidade e Conservação, Universidade Federal do Maranhão, São Luis, 2012.

²⁴LOPES, Daniela et al. Hollow-fiber renewal liquid membrane extraction coupled with 96-well plate system as innovative high-throughput configuration for the determination of endocrine disrupting compounds by high-performance liquid chromatography-fluorescence and diode array detection. **Analytica Chimica Acta**, [s.l.], v. 1040, p.33-40, dez. 2018.

²⁵NEGREIRA; N.; RODRÍGUEZ; I.; RAMIL; M.; RUBÍ; E. & CELA; R. Solid-phase extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of hydroxylated benzophenone UV absorbers in environmental water samples. **Analytica Chimica Acta**, v 654, p.162–170, 2009.

²⁶PAVLOVIĆ, Dragana Mutavdžić et al. Sample preparation in analysis of pharmaceuticals. **Trac Trends In Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 26, n. 11, p.1062-1075, dez. 2007.

²⁷M. Cruz-Vera, R. Lucena, S. Cárdenas, M. Valcárcel, Sorptive microextraction for liquid-chromatographic determination of drugs in urine, **TrAC Trends in Analytical Chemistry** 28(10) (2009) 1164-1173.

²⁸E. Boyacı , K. Gorynski , A. Rodriguez-Lafuente , B. Bojko , J. Pawliszyn. Introduction of solid-phase microextraction as a high-throughput sample preparation tool in laboratory analysis of prohibited substances, **Anal. Chim. Acta** , 809 (2014) , pp. 69 - 81

²⁹DIONÍSIO, Amália G. G. et al. Novas Tendências em Preparo de Amostras para Cromatografia Líquida. *Scientia Chromatographica*, São Carlos, v. 2, n. 3, p.19-29, 2010.

³⁰GUILLARME, Davy et al. New trends in fast and high-resolution liquid chromatography: a critical comparison of existing approaches. **Analytical And Bioanalytical Chemistry**, [s.l.], v. 397, n. 3, p.1069-1082, 9 dez. 2009.

³¹WEN, Yingying et al. Recent advances in solid-phase sorbents for sample preparation prior to chromatographic analysis. **Trac Trends In Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 59, p.26-41, jul. 2014. Elsevier BV.

³²BOYACI, Ezel et al. Sample preparation with solid phase microextraction and exhaustive extraction approaches: Comparison for challenging cases. **Analytica Chimica Acta**, v. 873, p. 14-30, mai. 2015.

³³BIDARI, Araz et al. Sample preparation method for the analysis of some organophosphorus pesticides residues in tomato by ultrasound-assisted solvent extraction followed by dispersive liquid–liquid microextraction. **Food Chemistry**, v. 126, n. 4, p. 1840-1844, jun. 2011.

³⁴RODRIGUES, Sherol Acosta; CALDAS, Sergiane Souza; PRIMEL, Ednei Gilberto. A simple; efficient and environmentally friendly method for the extraction of pesticides from onion by matrix solid-phase dispersion with liquid chromatography–tandem mass spectrometric detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 678, n. 1, p. 82-89, set. 2010

³⁵Asensio-Ramos M, Ravelo-Pérez LM, GonzálezCurbelo MA, Hernández-Borges J. Liquid phase microextraction applications in food analysis. **Journal of Chromatography A** 2011; 1218

³⁶Arthur CL, Pawliszyn J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. **Analytical Chemistry**, 62, 2145-2148, 1990;

³⁷LIU, Hanghui; DASGUPTA, Purnendu K.. Analytical Chemistry in a Drop. Solvent Extraction in a Microdrop. **Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 68, n. 11, p.1817-1821, jan. 1996.

³⁸JEANNOT, Michael A.; CANTWELL, Frederick F.. Solvent Microextraction into a Single Drop. **Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 68, n. 13, p.2236-2240, jan. 1996.

³⁹SARAFRAZ-YAZDI, A.; AMIRI, A.h.; ES'HAGHI, Z.. BTEX determination in water matrices using HF-LPME with gas chromatography–flame ionization detector. **Chemosphere**, [s.l.], v. 71, n. 4, p.671-676, mar. 2008.

⁴⁰DIONÍSIO, A. G. G.; BASTITÃO, M. B.; SANTOS, V. B.; ICERI, T. M.; CASSIANO, N. M.; CASS, Q. B. Novas Tendências em Preparo de Amostras para Cromatografia Líquida. **Scientia Chromatographica**. v. 2, n. 3, p. 19-29, 2010.

⁴¹Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen KE. Liquidphase microextraction with porous hollow fibers, a miniaturized and highly flexible format for liquid–liquid extraction. **Journal of Chromatography A** 2008; 1184(1-2):132-142

- ⁴²MERIB, Josias; CARASEK, Eduardo. Microextração em fase líquida suportada com fibra oca (HF-LPME): Fundamentos e aplicações recentes. **Scientia Chromatographica**, [s.l.], v. 5, n. 4, p.249-262, 2013.
- ⁴³OLIVEIRA, A. R. M.; MAGALHÃES, I. R. S.; SANTANA, F. J. M.; BONATO, P. S. Microextração em fase líquida (lpme): fundamentos da técnica e aplicações na análise de fármacos em fluidos biológicos. **Quim. Nova**. v. 31, n. 3, p. 637-644, 2008.
- ⁴⁴Lee J, Lee HK, Rasmussen KE, Pedersen-Bjergaard S. Environmental and bioanalytical applications of hollow fiber membrane liquid-phase microextraction: A review. **Analytica Chimica Acta** 2008;
- ⁴⁵ZORITA, S.; BARRI, T.; MATHIASSEN, L. A novel hollow-fibre microporous membrane liquid-liquid extraction for determination of free 4-isobutylacetophenone concentration at ultra trace level in environmental aqueous samples. **Journal of Chromatography A**. v. 1157, p. 30-37, 2007
- ⁴⁶BEDENDO, G. C.; JARDIM, I. C. S. F.; CARASEK, E. A simple hollow fiber renewal liquid membrane extraction method for analysis of sulfonamides in honey samples with determination by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. v. 1217, p. 6449-6454, 2010.
- ⁴⁷MIRNAGHI, F. S.; PAWLISZYN, J. Development of coatings for automated 96-blade solid phase microextraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry system, capable of extracting a wide polarity range of analytes from biological fluids. **Journal of Chromatography A**. v. 1261, p. 91- 98, 2012.
- ⁴⁸LOPES, Daniela. **Aplicação de membrana oca em um sistema de 96-Well plate para determinação de desreguladores endócrinos em água por HPLC**. 2016. 96 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Ufsc, Florianópolis, 2016.
- ⁴⁹AOAC/ Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis: Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. **AOAC International**: Maryland, 2016.
- ⁵⁰Karageorgou, E., Samanidou, V. Youden test application in robustness assays during method validation. **Journal of Chromatography A**, 2014, 1353, 131-139.
- ⁵¹ Rocha, B. A., Costa, B. R. B., Albuquerque, N. C. P., Oliveira, A. R. M., Souza, J. M. O., Al-Tameemi, M., Campiglia, A. D., Barbosa, F. A fast method for bisphenol A and six analogues (S, F, Z, P, AF, AP) determination in urine samples based on dispersive liquid-liquid microextraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Talanta**, 2016, 154, 511-519.

⁵²Correia-Sá, L., Norberto, S., Delerue-Matos, C., Calhau, C., Domingues, V. F. Micro-QuEChERS Extraction coupled to GC-MS for a fast determination of bisphenol A in human urine. **Journal of Chromatography B**, 2018, 1072, 9-16.

⁵³Kawaguchi, M., Ito, R., Honda, H., Koganei, Y., Okanouchi, N., Saito, K., Seto, Y., Nakazawa, H. Miniaturized hollow fiber assisted liquid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry for determination of benzophenone and derivatives in human urine sample. **Journal of Chromatography B**, 2009, 877, 298-302.

⁵⁴Rocha, B. A., Oliveira, A. R. M., Barbosa, F. A fast and simple air-assisted liquid-liquid microextraction procedure for the simultaneous determination of bisphenols, parabens, benzophenones, triclosan and triclocarban in human urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Talanta**, 2018, 183, 94-101.

⁵⁵López, F. J., Pitarch, E., Egea, S., Beltran, J., Hernández, F. Gas chromatographic determination of organochlorine and organophosphorus pesticides in human fluids using solid phase microextraction. **Analytica Chimica Acta**, 2001, 433, 217–226.

⁵⁶Mafra, G., Spudeit, D., Brognoli, R., Merib, J., Carasek, E. Expanding the applicability of cork as extraction phase for disposable pipette extraction in multiresidue analysis of pharmaceuticals in urine samples. **Journal of Chromatography B**, 2018, 1102-1103, 159-166

⁵⁷Oenning, A. L., Merib, J., Carasek, E. An effective and high-throughput analytical methodology for pesticide screening in human urine by disposable pipette extraction and gas chromatography – mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, 2018, 1092, 459-465.