

Diogo Cherem Morelli

**EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM E EM PONTEIRA  
DESCARTÁVEL PARA A DETERMINAÇÃO DE  
CONTAMINANTES FECAIS EM AMOSTRAS DE  
SEDIMENTOS POR GC-MS**

Dissertação submetido(a) ao Programa  
de Pós- Graduação em Química da  
Universidade Federal de Santa  
Catarina para a obtenção do Grau de  
Mestre em Química  
Orientador: Prof. Dr. Luiz Augusto dos  
Santos Madureira

Florianópolis  
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária  
da UFSC.

Morelli, Diogo Cherem  
EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM E EM PONTEIRA  
DESCARTÁVEL PARA A DETERMINAÇÃO DE CONTAMINANTES  
FECAIS EM AMOSTRAS DE SEDIMENTOS POR GC-MS / Diogo  
Cherem Morelli ; orientador, Luiz Augusto do  
Santos Madureira, 2019.

74 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e  
Matemáticas, Programa de Pós-Graduação em Química,  
Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Química. 2. esteróis. 3. DPX. 4. ultrassom. 5.  
sedimentos. I. Madureira, Luiz Augusto do Santos.  
II. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

Diogo Cherem Morelli

**EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSAOM E EM  
PONTEIRA DESCARTÁVEL PARA A DETERMINAÇÃO DE  
CONTAMINANTES FECAIS EM AMOSTRAS DE  
SEDIMENTOS POR GC-MS**

Esta Dissertação/Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre em Química” e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Química.

Florianópolis, 20 de fevereiro de 2019.

---

Prof. Dr. Vanderlei Gageiro Machado  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Química

**Banca Examinadora:**

---

Prof. Dr. Luiz Augusto dos Santos Madureira  
Orientador  
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

---

Dr.<sup>a</sup> Gabrieli Bernardi  
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

---

Dr.<sup>a</sup> Morgana Frena  
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)



“Dedico aos loucos. Os desajustados. Os rebeldes. Os criadores de caso. Os pinos redondos nos buracos quadrados. Aqueles que veem as coisas de forma diferente.”



## **AGRADECIMENTOS**

. Agradeço aos meus pais, Gerson e Janara que sempre acreditaram em mim, me motivaram, incentivaram, ajudaram em todos os momentos e tornaram possível todos os meus anos de estudo. Aos meus irmãos, Thiago e Pedro por sempre estarem do meu lado e me manterem são quando eu mais precisei. Amo vocês.

Aos meus amigos que me acompanharam de perto nesse período Marina, Duda, Geovanna, Morés, Murara e Ana. Todas as discussões, angústias e cafés que compartilhamos me tornaram mais forte e mais sábio. Que sorte a minha encontrar um grupo de pessoas assim para dividir esses dois anos.

Agradeço também aos meus amigos de Brusque que depois de anos e da distância ainda sempre presentes: Paza, Eduardo, Andrei, Juliane, Raquel, Giu, Joice, Paula e Bruna; aos amigos que a química me trouxe Cecília, Bea, Nicole e Sarita; amigos de Floripa: Jules, Hernandes; e ao João que surgiu nos últimos meses e já se tornou tão importante pra mim. A todos vocês agradeço pela motivação, por celebrarem minhas conquistas comigo e por todos os momentos de distração e parceria.

Ao meu orientador Luiz Madureira pelo apoio, conhecimento e ensinamentos compartilhados, pela confiança e por embarcar nas minhas sugestões e ideias para este trabalho. Também aos meus colegas de Laboratório Karine, Gustavo, Larissa, Angela, Sara e Rafael por toda sua ajuda.

Ao Professor Eduardo Carasek pela disponibilização do seu laboratório e a os alunos do CroMaas: Sangela, Helo e Gabi Corazza por sempre me acolherem lá. Um agradecimento em especial a Leila que me introduziu a todo funcionamento do laboratório e me ajudou de todas as formas, desde a parte prática a discussões sobre o trabalho, sempre me ajudando com meus questionamentos e disponibilizando seu tempo para me ajudar.

A UFSC pela estrutura e aos professores e servidores do programa de pós-graduação em química pelo ensino e auxílio.

A CAPES pela bolsa de estudos permitindo dedicação exclusiva ao programa.

Muito Obrigado a Todos!





“Se você assumir que não há esperança, você garante que não haverá esperança. Se você assumir que existe um instinto para a liberdade, que há oportunidades para mudar as coisas, então existe a possibilidade de você poder contribuir para criar um mundo melhor”.

(Noam Chomsky)



## RESUMO

O trabalho desenvolvido valida uma metodologia analítica de determinação de esteróis provenientes de contaminações fecais em amostras de sedimentos a partir do uso de extração assistida por ultrassom (UAE) seguida por uma extração em ponteira descartável (DPX). Como analitos foram utilizados o biomarcador fecal coprostanol e os esteróis colesterol, colestanol e estigmasterol. A técnica, juntamente com a cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), foi utilizada para a pré-concentração, separação e detecção dos analitos. A partir de experimentos multivariados foram otimizados os parâmetros das extrações. Para UAE o diclorometano foi selecionado como solvente de extração. Os parâmetros da DPX otimizados foram 5 ciclos de extração com 700  $\mu\text{L}$  de amostra, de 10 s cada, e 2 ciclos de dessorção de 200  $\mu\text{L}$ , de 20 s cada. O solvente de dessorção otimizado foi uma mistura composta por acetato de etila e acetonitrila 60/40 (v/v). Os limites de quantificação foram de 25  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para o colesterol e 250  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para os demais analitos. Os limites de detecção foram de 7,6  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para o colesterol e 75,8  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para os outros analitos determinados. Os coeficientes de determinação variaram de 0,9908 a 0,9983. A exatidão do método foi avaliada por meio da recuperação em 3 níveis de concentração e variou de 78 a 114% e a precisão foi medida pelo desvio padrão relativo alcançando valores entre 0,5 e 10% e de 2 a 16% para as precisões intradia ( $n=3$ ) e interdia ( $n=9$ ), respectivamente.

**Palavras-chave:** Esteróis. Ultrassom. DPX. Sedimento.



## ABSTRACT

The work developed validates an analytical methodology for the determination of fecal sterols in sediment samples using ultrasonic assisted extraction (UAE) followed by pre-concentration with the disposable tip extraction (DPX) technique. The fecal biomarker coprostanol and the sterols cholesterol, cholestanol and stigmasterol were the targeted analytes. Gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) was used for the separation and detection of the previously extracted compounds. From the multivariate experiments the extraction parameters were optimized. For UAE dichloromethane was selected as extracting solvent. The optimized DPX parameters were 5 cycles of extraction with 700  $\mu\text{L}$  of sample, of 10 s each, and 2 cycles of desorption of 200  $\mu\text{L}$ , of 20 s each. The optimized desorption solvent was a mixture composed of ethyl acetate:acetonitrile (60:40 v/v). The limits of quantification were 25  $\mu\text{g kg}^{-1}$  for cholesterol and 250  $\mu\text{g kg}^{-1}$  for the other analytes. The detection limits were 7.6  $\mu\text{g kg}^{-1}$  for cholesterol and 75.8  $\mu\text{g kg}^{-1}$  for the other determined analytes. The determination coefficient ranged from 0.9908 to 0.9983. The accuracy of the method was evaluated by means of recovery at 3 levels of concentration and ranged from 78 to 114% and accuracy was measured by relative standard deviation reaching values between 0.5 and 10% and from 2 to 16% for intraday ( $n = 3$ ) and interday ( $n = 9$ ), respectively.

**Keywords:** Sterols. Ultrasound. DPX. Sediment.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estrutura básica de um esterol..... 29
- Figura 2.** Esquematização da biotransformação do colesterol no intestino..... 30
- Figura 3.** Estrutura de uma ponteira DPX. .... 36
- Figura 4.** (a) Etapas envolvidas no processo da extração por ponteiras descartáveis; (b) processo de aspiração e liberação na ponteira. .... 37
- Figura 5.** Esquema de fortificação do sedimento. (a) escolha da quantidade a ser fortificada; (b) adição do padrão e solvente necessário para a cobertura e agitação; (c) frasco mantido fechado para a interação dos analitos com o sedimento; (d) abertura do frasco para evaporação do solvente; (e) acondicionamento do sedimento fortificado..... 43
- Figura 6.** Amostragem concêntrica ao redor do emissário realizada na Praia do Mar Grosso em Laguna- SC..... 49
- Figura 7.** Cromatograma obtido para o branco e para fortificação da matriz pela injeção de 1 $\mu$ L na concentração de 1000 ng g<sup>-1</sup>. Analitos: (1) coprostanol; (2) colesterol; (3) colestanol; (4) estigmasterol..... 51
- Figura 8.** Superfície ternária para o solvente de extração da UAE (fortificação 1 $\mu$ g g<sup>-1</sup>; condições da DPX: 40 mg de sílica, 3 ciclos de extração de 30 s, 1 ciclo de dessorção de 30 s e solução Ac. Etila : MeOH 3:1 (v/v) usada na dessorção), ..... 53
- Figura 9.** Superfícies de respostas: (a) ciclos x massa, (b) tempo x massa e (c) tempo x ciclos (Fortificação 1 $\mu$ g g<sup>-1</sup>, solvente de dessorção Ac Etila:ACN 3:2(v/v), 1 ciclo de dessorção de 30 segundos), ..... 54
- Figura 10.** Superfície gerada na otimização de número de ciclos e tempo de dessorção. (fortificação 1 $\mu$ g g<sup>-1</sup>; 50 mg de sílica; 5 ciclos de extração de 10 s, solvente de dessorção Ac Etila:ACN 3:2[v/v]). ..... 58

<b>Figura 11.</b> Superfície ternária dos solventes de dessorção.(fortificação $1\mu\text{g g}^{-1}$ ;40 mg de sílica; 3 ciclos de extração de 30 s, 1 ciclo de dessorção de 30 segundos).....	59
<b>Figura 12.</b> Gráfico de Lenth .....	63
<b>Figura 13.</b> Gráfico de Daniel.....	64
<b>Figura 14.</b> Cromatograma obtido por GC-MS para as amostras analisadas.....	65



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Critérios utilizados para a avaliação de contaminação fecal .	31
<b>Tabela 2.</b> Alguns esteróis comumente utilizados para a determinação de contaminação e presentes no meio ambiente e que serão objetos de estudos no presente trabalho.....	31
<b>Tabela 3.</b> Publicações com desenvolvimento e/ou aplicação de metodologias de determinações de esteróis , especificando método de extração e detecção.....	33
<b>Tabela 4.</b> Planejamento da superfície ternária para a avaliação do melhor solvente para a extração assistida por ultrassom.....	44
<b>Tabela 5.</b> Planejamento composto central para a avaliação da de etapa de extração da DPX.....	45
<b>Tabela 6.</b> Planejamento Doehlert para a dessorção.....	46
<b>Tabela 7.</b> Planejamento do solvente de dessorção.....	46
<b>Tabela 8.</b> Variações dos parâmetros utilizados no teste de robustez.....	48
<b>Tabela 9.</b> Planejamento dos experimentos de robustez segundo Placket e Burman.....	48
<b>Tabela 10.</b> Parâmetros analíticos de mérito.....	61
<b>Tabela 11.</b> Ensaio de Exatidão e Precisão.....	62
<b>Tabela 12.</b> Analitos presentes nas amostras coletadas.....	65
<b>Tabela 13.</b> Comparação entre trabalhos publicados o trabalho desenvolvido.....	66



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN – Acetonitrila.

Ac. Etila – Acetato de etila.

CASAN – Companhia Catarinense de Águas e Saneamento.

GC-MS – Cromatografia a Gás acoplada à Espectrometria de Massas, do inglês *Gas Chromatography Mass Spectrometry*.

DCM – Diclorometano.

DPX – Extração em ponteira descartável, do inglês *Disposable Pipette Extraction*.

DPX – RP - Extração em ponteira descartável com fase reversa, do inglês *Reverse Phase Disposable Pipette Extraction*.

EI – Ionização por elétrons, do inglês *Electronionization*.

FID – Detector por Ionização em Chama, do inglês *Flame Ionization Detector*.

PAH – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, do inglês *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*.

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*.

LOD – Limite de Detecção, do inglês *Limit of detection*.

LOQ – Limite de Quantificação, do inglês *Limit of quantification*.

ME – Erro marginal, do inglês *Marginal error*.

MeOH – Metanol.

PCC – Planejamento do composto central

PLE – Extração líquida pressurizada, do inglês *Pressurized liquid extraction*.

QAV – Química Analítica Verde

QuEChERS – Rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e simples, do inglês *Quick, easy, cheap, efetive, rugged and simple*.

SIM – Monitoramento seletivo de íons, do inglês *Selective Ion Monitoring*.

SME – Erro marginal simultâneo, do inglês *Simultaneous Marginal Error*.

SNIS – Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento.

UAE – Extração Assistida por Ultrassom, do inglês *Ultrasound Assisted Extraction*.



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>27</b>
1.1	CONSIDERAÇÕES GERAIS .....	27
1.2	BIOMARCADORES .....	28
1.3	ESTERÓIS .....	29
<b>1.3.1</b>	<b>Determinação de Esteróis .....</b>	<b>32</b>
1.4	QUÍMICA ANALÍTICA VERDE .....	34
<b>1.4.1</b>	<b>Extração Assistida por Ultrassom (UAE) .....</b>	<b>35</b>
<b>1.4.2</b>	<b>Extração em Ponteiros Descartáveis (DPX).....</b>	<b>36</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>39</b>
2.1	OBJETIVOS GERAIS .....	39
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA .....</b>	<b>41</b>
3.1	INSTRUMENTAÇÃO.....	41
3.2	MATERIAIS E REAGENTES .....	42
3.3	PROCEDIMENTOS .....	42
<b>3.3.1</b>	<b>Limpeza, Fortificação e Extração .....</b>	<b>42</b>
<b>3.3.2</b>	<b>Etapas de Otimização .....</b>	<b>43</b>
3.3.2.1	Solvente de Extração da UAE.....	43
3.3.2.2	Otimização da DPX .....	44
<b>3.3.3</b>	<b>Validação da Metodologia .....</b>	<b>47</b>
3.3.3.1	Curva Analítica .....	47
3.3.3.2	ROBUSTEZ.....	47
<b>3.3.4</b>	<b>Aplicação do Método.....</b>	<b>49</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>51</b>
4.1	SOLVENTE DE EXTRAÇÃO DA UAE .....	52
4.2	VARIÁVEIS DE EXTRAÇÃO DA DPX .....	53

4.3	VARIÁVEIS DE DESSORÇÃO .....	57
4.4	PARÂMETROS ANALÍTICOS DE MÉRITO .....	60
4.5	ROBUSTEZ.....	63
4.6	APLICAÇÃO DO MÉTODO.....	65
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>66</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>69</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

O saneamento básico engloba ações do governo que gerem melhores condições de vida à população. Inseridos nessas ações estão a acessibilidade à água potável, ao tratamento de esgoto e à coleta de resíduos. Segundo o Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento (SNIS), no ano de 2016, apenas 44,9% do esgoto gerado no país e 74,9% do esgoto coletado pela rede foram tratados (“Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento: Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgotos”, 2016). Em termos de volume significa que foram tratados 4,6 bilhões de m<sup>3</sup> de esgoto em 2016, o que indica que 1,54 bilhões de m<sup>3</sup> de esgoto foram lançados no ambiente sem tratamento prévio.

Esgoto não tratado é o principal responsável pela degradação de ambientes aquáticos como por exemplo, águas subterrâneas. Lançado em regiões costeiras, o esgoto pode causar diversos problemas ecológicos incluindo o sufocamento de organismos bentônicos, eutrofização e depleção de oxigênio, desregulação endócrina, além de ocasionar a bioacumulação de substâncias persistentes e potencialmente tóxicas como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA)(Saeed *et al.*, 2015).

A utilização de microrganismos (por exemplo, *Escherichia coli*) para estudar e confirmar a contaminação de esgoto doméstico em amostras de água e de sedimentos é limitada por falta de especificidade, sensibilidade à luz, vida curta e pouca resistência à temperatura, tornando-se impossível estudar as contaminações ocorridas no passado(Machado *et al.*, 2014). Além disso, o uso de bactérias tem sido questionado em alguns trabalhos, principalmente devido ao aumento do volume de resíduos industriais tóxicos, à cloração das águas residuais e à concentração de oxigênio dissolvido, que restringe a existência de bactérias coliformes. (Bachtiar *et al.*, 2004)

Uma alternativa é a determinação química que utiliza biomarcadores geoquímicos, como os esteróis fecais, que são incorporados aos sedimentos de uma certa região durante o período de descarte de águas não tratadas. Sedimentos provaram ser eficientes ferramentas para identificar impactos ambientais, pois, refletem a qualidade da água por conseguirem acumular metais e compostos orgânicos e por isso podem ser usados para detectar a presença de

contaminantes que não são solúveis após a sua descarga em águas superficiais (Froehner, Maceno e Martins, 2010).

Os questionamentos levantados para metodologias tradicionais tanto da área ambiental quanto química, faz com que seja necessário o desenvolvimento de novas metodologias que se adaptem às novas realidades do meio ambiente e que ao mesmo tempo sejam ambientalmente amigáveis, reduzindo o impacto causado com resíduos.

## 1.2 BIOMARCADORES

Biomarcadores geoquímicos moleculares são compostos orgânicos de origem biológica preservados em artefatos encontrados em sítios arqueológicos assim como na matéria orgânica encontrada em rochas, solos, sedimentos e no petróleo. A análise de biomarcadores pode fornecer informações sobre condições ambientais tanto em contextos naturais ou mais antropizados como uso e composição de sítios arqueológicos, áreas urbanas ou regiões de captação (Zocatelli *et al.*, 2017).

Os marcadores moleculares, no ramo da poluição ambiental, são determinados marcadores moleculares antropogênicos pois são compostos introduzidos no ambiente por fontes antropogênicas. Para serem classificados com marcadores moleculares precisam apresentar características como: alta especificidade em relação à fonte, boa resistência à destruição pela atividade bacteriana e ampla distribuição na água e/ou no sedimento (Carreira *et al.*, 2011). Os biomarcadores fecais produzidos no trato digestivo de grandes mamíferos são comumente usados para rastrear entradas fecais no meio ambiente. Destacam-se os esteróis e os ácidos biliares (Zocatelli *et al.*, 2017).

Quando o material fecal é introduzido em ambientes aquáticos, esteróis fecais lipofílicos, como o coprostanol, se ligam fortemente a materiais particulados. Na coluna de água, em condições aeróbicas, os esteróis fecais podem degradar em até duas semanas. Porém, a degradação de esteróis fecais se torna limitada uma vez que eles são incorporados aos sedimentos, fazendo com que se tornem bons biomarcadores (Leeming e Nichols, 1996).

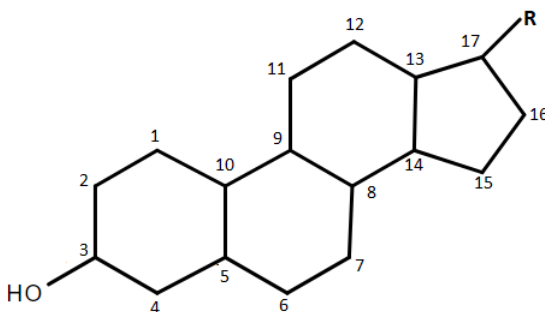


### 1.3 ESTERÓIS

Os esteróis são típicos exemplos de biomarcadores fecais; são considerados impressões digitais de poluição fecal devido a sua distribuição em fezes humana e animal. Além de sua natureza hidrofóbica, esteróis são facilmente associados a materiais particulados e sedimentos (Machado *et al.*, 2014).

Esteróis, lipídios estruturais, são esteroides com uma cadeia lateral alifática de 8-10 átomos de carbono e um grupo hidroxila no carbono 3. Todas estas substâncias têm um núcleo contendo o esqueleto (Figura 1) de carbono de quatro anéis do ciclopentenofenantreno (Yeagle e Yeagle, 2016).

**Figura 1.** Estrutura básica de um esterol.



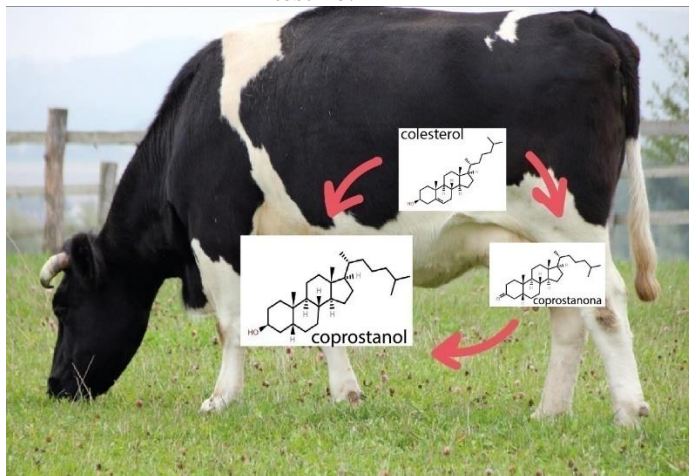
Fonte: Autoria própria.

Dentre os esteróis, os derivados do colesterol são os esteróis mais utilizados como biomarcadores. Foram relatados em fezes humanas as seguintes proporções de esteróis: 65% - coprostanol, 20% - colesterol, 10% - coprostanona e os 5% restantes são divididos entre outros derivados minoritários como colestanona, colestanol e epicoprostanol (Choi, Kwan e Wong, 1996).

A formação do coprostanol ainda é desconhecida, porém uma das teorias mais aceitas é que ela ocorra por hidrogenação bacteriana estereoespecífica do colesterol no carbono C-5. Essa transformação do

colesterol em coprostanol ocorre exclusivamente no intestino de humanos e mamíferos superiores (Figura 2).

**Figura 2.** Esquemática da biotransformação do colesterol no intestino.



Fonte: Autoria Própria

Ao contrário do colesterol, o coprostanol não ocorre naturalmente em ambientes aquáticos, assim sua presença nesses ambientes indica fortemente contaminação por esgoto (Matysik *et al.*, 2016).

Existe uma grande divergência sobre os limites de concentração de coprostanol considerada como contaminação por esgoto. Já foram reportados na literatura trabalhos mais antigos considerando limites de  $9 \mu\text{g g}^{-1}$  e  $0,5 \mu\text{g g}^{-1}$  (Martins, Fillmann e Montone, 2007). No trabalho publicado por Martins *et al.* 2008, é sugerido que uma concentração de  $1000 \text{ ng g}^{-1}$  juntamente com uma potencial fonte de contaminação já pode ser considerado uma contaminação.

Em baixas concentrações, a concentração do coprostanol, por si só, não é um bom indicativo, por isso são utilizadas razões de coprostanol com outros esteróis, como por exemplo, o colesterol (González-Oreja e Saiz-Salinas, 1998). Com essas razões é possível distinguir o que provém de fontes fecais e o que provém de fontes biogênicas e diagênicas. (Tolosa, Mesa e Alonso-Hernandez, 2014) A Tabela 1 traz as razões mais comumente utilizadas para avaliação da contaminação por esgoto utilizando esteróis.

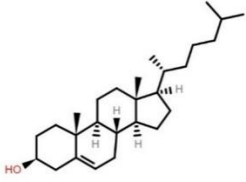
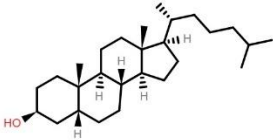
**Tabela 1.** Critérios utilizados para a avaliação de contaminação fecal .

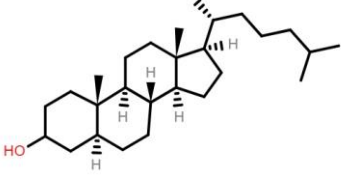
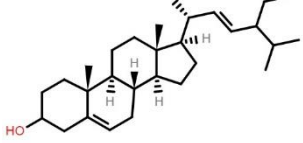
Parâmetros	Critério
<b>Concentração de Coprostanol</b>	$>0,5 \mu\text{gg}^{-1} \rightarrow$ contaminado
<b>Coprostanol / Colesterol</b>	$> 1 \rightarrow$ contaminado
<b>Coprostanol / (Coprostanol + Colestanol)</b>	0,00- 0,30 $\rightarrow$ não contaminado 0,3- 0,7 $\rightarrow$ moderadamente contaminado $> 0,7 \rightarrow$ contaminado

Fonte: Adaptado de Martins et al. (2008)

Para o presente trabalho os seguintes esteróis foram escolhidos de acordo com a sua disponibilidade: colesterol, coprostanol, colestanol e estigmasterol. A Tabela 2 traz algumas informações quanto a estes compostos.

**Tabela 2.** Alguns esteróis comumente utilizados para a determinação de contaminação e presentes no meio ambiente e que serão objetos de estudos no presente trabalho.

NOME	Formula Molecular	Estrutura	Massa Molar (g mol <sup>-1</sup> )
<b>Colesterol</b> 5-Cholesten-3 $\beta$ -ol	C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O		386.65
<b>Coprostanol</b> 5 $\beta$ -Cholestan-3 $\beta$ -ol	C <sub>27</sub> H <sub>48</sub> O		388.67

<p><b>Colestanol</b> 5<math>\alpha</math>-Cholestan-3<math>\beta</math>- ol</p>	<p>C<sub>27</sub>H<sub>48</sub>O</p>		<p>388.67</p>
<p><b>Estigmasterol</b> 3<math>\beta</math>-Hydroxy- 24-ethyl-5,22- cholestadiene</p>	<p>C<sub>29</sub>H<sub>48</sub>O</p>		<p>412.69</p>

O coprostanol, como citado anteriormente, é apenas produzido no intestino de mamíferos superiores, o que faz dele um excelente biomarcador, pois apresenta uma origem biológica inequívoca. Os demais esteróis escolhidos podem vir de diferentes fontes. O colesterol além de ser oriundo de animais também pode ser encontrado em plantas; o colestanol pode se originar da redução de esteróis insaturados sob condições anaeróbicas ou também vir diretamente de algas. O estigmasterol é considerado um fitoesterol, ocorre naturalmente, sendo encontrado diretamente em diversas espécies de plantas (KILLOPS; KILLOPS, 2005).

### 1.3.1 Determinação de Esteróis

Gorduras e óleos são tradicionalmente extraídos de sua matriz usando extração por Soxhlet. O método envolve uma percolação

interativa de vapores condensados de um solvente em ebulição. A extração com Soxhlet, apesar de simples, é demorada (longas horas de extração), utiliza grandes volumes de solventes orgânicos e são necessárias etapas de evaporação e concentração após a extração (Chemat *et al.*, 2017).

Dos métodos descritos na literatura, grande parte inclui extrações de no mínimo 24 horas em Soxhlet seguido de uma coluna de fracionamento para o *clean up* do extrato orgânico e posterior derivatização (Birk *et al.*, 2012; Carreira *et al.*, 2015; Cordeiro, Carreira e Wagener, 2008; Hughes e Thompson, 2004). Outros métodos ainda incluem uma etapa de saponificação (Chan *et al.*, 1998; Hudson, Parrish e Helleur, 2001). Um método por sonicação seguido de uma coluna de fracionamento foi proposto por Dachs *et al.* (1999). Em trabalhos mais recentes diversos pesquisadores já descreveram métodos de extração com líquido pressurizado, (Battistel *et al.*, 2015; Beck, Totsche e Kögel-Knabner, 2008; Li *et al.*, 2007; Osman e Saim, 2013). Um método que utilizou um sistema de micro-ondas foi descrito por Bataglion *et al.* 2016.

Os métodos descritos na literatura, em grande parte utilizam expressivas quantidades de solvente e tempos de extração extremamente longos. Tais procedimentos vão em sentido oposto aos métodos analíticos atuais que procuram diminuir o tempo do preparo de amostra e reduzir ou eliminar por completo o uso de solventes orgânicos. A tabela 3 traz um compilado de desenvolvimento e aplicação de métodos para a determinação de esteróis em sedimentos.

**Tabela 3.** Publicações com desenvolvimento e/ou aplicação de metodologias de determinações de esteróis , especificando método de extração e detecção.

<b>Autor/ Ano</b>	<b>Extração</b>	<b>Detecção</b>
<b>Sherwin et al.1993</b>	Soxhlet	GC-MS
<b>Choi et al. 1996</b>	Soxhlet	GC- MS
<b>Chan et al. 1997</b>	Soxhlet	GC- FID
<b>Dachs et al. 1999</b>	UAE	GC- MS
<b>Hudson et al. 2001</b>	Soxhlet	GC- MS
<b>Carreira et al. 2004</b>	Soxhlet	GC-MS
<b>Hughes et al. 2004</b>	Soxhlet	GC-MS

<b>Li et al. 2007</b>	PLE	GC- MS
<b>Beck et al. 2008</b>	PLE	GC- MS
<b>Cordeiro et al. 2008</b>	Soxhlet	GC- MS
<b>Birk et al. 2012</b>	Soxhlet	GC-MS
<b>Matić et al. 2014</b>	UAE	GC-MS
<b>Battistel et al. 2015</b>	PLE	GC- MS
<b>Carreira et al. 2015</b>	Soxhlet	GC- MS

#### 1.4 QUÍMICA ANALÍTICA VERDE

Devido ao fato de a análise de amostras ambientais , em certos casos, gerarem grande quantidade de resíduos e causarem impactos no meio ambiente e às vezes, até mesmo, gerarem resíduos mais tóxicos que as espécies que estão sendo determinadas, as metodologias analíticas começaram a ser questionadas em certos aspectos como a segurança do operador e o impacto que a análise poderiam trazer ao meio ambiente. Com isso surge a Química Analítica Verde (QAV) que aparece em busca de tratamento e diminuição dos resíduos gerados e a substituição de metodologias poluentes por mais limpas (Armenta, Garrigues e la Guardia, de, 2008; Gron, 2009).Tobiszewski *et al.* 2010 dissertaram sob os pilares da QAV e em que etapas da marcha analítica elas podem ser aplicadas, como por exemplo na amostragem, no preparo de amostra e no tipo de análise a ser realizada. Em uma publicação de Gałuszka *et al.* 2013 sugeriram o que seriam os 12 princípios da QAV:

1. Técnicas analíticas diretas devem ser aplicadas para evitar o tratamento da amostra;
2. Menor quantidade e número de amostras;
3. Medições *in situ* devem ser realizadas;
4. A integração de processos analíticos e operações que economizem energia e reduzam o uso de reagentes;
5. Métodos automatizados e miniaturizados devem ser selecionados;
6. Derivatização deve ser evitada;
7. A geração de um grande volume de resíduos deve ser evitada e a gestão adequada dos resíduos deve ser fornecida;

8. Métodos multi-analitos ou multi-parâmetros são preferidos versus métodos que analisem um analito de cada vez;
9. O uso de energia deve ser minimizado;
10. Os reagentes obtidos a partir de fontes renováveis devem ser preferidos;
11. Os reagentes tóxicos devem ser eliminados ou substituídos;
12. A segurança do operador deve ser aumentada.

Apesar de não se aplicarem a todas as metodologias esses princípios, sempre que possível, devem ser utilizados para diminuir o impacto no meio ambiente.

#### **1.4.1 Extração Assistida por Ultrassom (UAE)**

O ultrassom é uma tecnologia chave para atingir o objetivo da química verde de realizar uma extração sustentável. A técnica de ultrassom é bem conhecida por ter um efeito significativo no tempo de vários processos na indústria química e de alimentos. No geral, vários mecanismos têm sido identificados como atuantes na extração assistida por ultrassom: cavitação, fragmentação, erosão, efeito sonoro-capilar, sonoporação, estresse de cisalhamento local e destruição-detexturação (Chemat *et al.*, 2017).

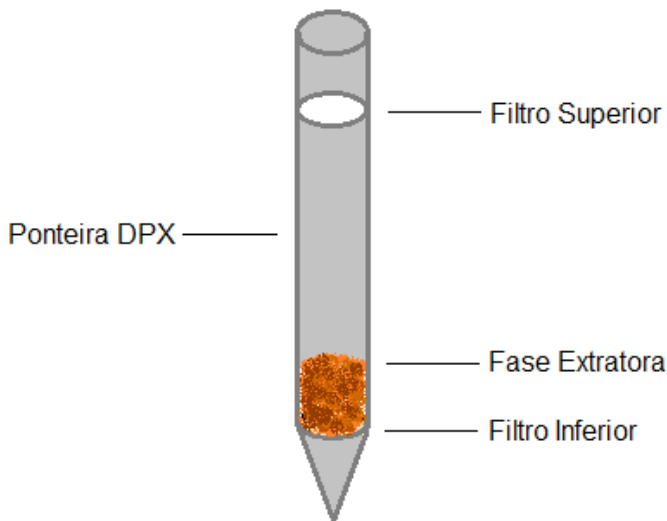
O banho ultrassônico é o tipo de dispositivo ultrassônico mais conhecido que consiste geralmente num tanque de aço inoxidável com um ou mais transdutores ultrassônicos. Banhos geralmente operam a uma frequência de cerca de 40 kHz e podem ser equipados com controle de temperatura (Chemat *et al.*, 2017). A aplicação de ultrassom em amostras de sedimento já foi descrita em diversos estudos tais como Dachs *et al.* (1999) e em trabalhos do grupo como Frena *et al.* (2016).

A UAE é uma técnica limpa que evita o uso de grandes quantidades de solventes. As vantagens da UAE são claras em termos de energia e tempo gastos. Sendo assim, ela se torna útil em laboratório quando é aplicada a métodos de extração ambientalmente amigáveis (Chemat *et al.*, 2017).

### 1.4.2 Extração em Ponteiras Descartáveis (DPX)

A técnica DPX (extração em ponteiras descartáveis) surgiu como uma técnica de extração mais limpa em relação às clássicas de análise. Pode ser incluída entre as técnicas de preparo de amostras consideradas ambientalmente amigáveis devido a sua reduzida quantidade de solvente utilizado (Figura 3). Ela é considerada uma extração em fase sólida dispersiva, pois consiste de uma ponteira com dois filtros, um inferior e outro superior, recheada com um material sorvente (fase extratora). A técnica consiste na aspiração da amostra e uma quantidade de ar. A aspiração do ar faz com que ocorra dispersão do material sorvente favorecendo um rápido equilíbrio de sorção dos analitos (Pinto e Queiroz, 2015).

**Figura 3.** Estrutura de uma ponteira DPX.



Fonte: Autoria Própria.

Diversos materiais podem ser empregados na constituição do material sorvente. Alguns exemplos de ponteiras comercialmente disponíveis são DPX-RP, que possui estireno divinil benzeno como material sorvente, e a DPX-WAX, que apresenta grupos poliaminos. Também estão comercialmente disponíveis ponteiras vazias, sendo



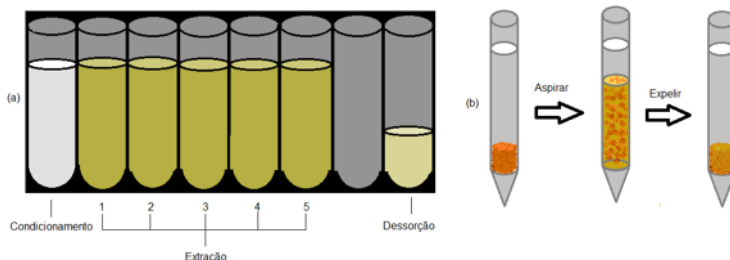
possível sintetizar materiais que favoreçam a interação com o analito de interesse (Pinto e Queiroz, 2015).

O uso das ponteiras descartáveis constitui de vários ciclos de aspiração e dessorção, onde diferentes soluções são aspiradas e depois expelidas. Normalmente a primeira etapa realizada é o condicionamento do material sorvente, na qual são usados solventes orgânicos ou até água. A necessidade de uma etapa de condicionamento e o número de ciclos (aspirar e expelir) irá depender do material sorvente utilizado na ponteira.

Em seguida é realizada a etapa de extração, na qual a amostra que contém os analitos de interesse é aspirada e expelida. Nessa etapa ocorre a dispersão do material sorvente na amostra, ocorrendo então a extração dos analitos que ficarão adsorvidos no material sorvente. O número de ciclos pode ser otimizado até se encontrar a saturação do material sorvente.

Após a extração, pode ser realizada uma etapa de limpeza, com solventes específicos, para retirar os analitos que ficaram adsorvidos, mas que não são de interesse, ou poderiam atrapalhar a análise. Em alguns casos logo após a etapa de extração é realizada a dessorção dos analitos de interesse. Um solvente ou uma mistura de solventes com o qual os analitos tem mais afinidade do que com a fase extratora, é aspirado e expelido para que ocorra a dessorção do material. O número de ciclos e o tempo desses ciclos são parâmetros a serem otimizados. Na Figura 4 é apresentado um esquema do processo da DPX com uma etapa de condicionamento e cinco ciclos de extração.

**Figura 4.** (a) Etapas envolvidas no processo da extração por ponteiras descartáveis; (b) processo de aspiração e liberação na ponteira.



Fonte: Autoria própria.

O uso de DPX em amostras de sedimento e ou solo foi descrito por Fernandes et al. (2012) para a determinação de pesticidas. Porém, naquele trabalho, ela foi aplicada no extrato após a extração pelo método QuEChERS, sendo utilizada nos processos de pré-concentração e limpeza do extrato.

Tendo em vista que a fração orgânica é rica em lipídios e que podem interferir na determinação dos esteróis, no presente trabalho a ponteira foi recheada com sílica e utilizada com o extrato dos sedimentos no processo de limpeza e pré-concentração dos analitos. Esse processo foi visto como uma possível miniaturização da etapa da coluna de fracionamento comumente utilizadas em análises ambientais para separação de diferentes frações de interesse.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVOS GERAIS

Desenvolvimento de uma metodologia analítica para a determinação de contaminantes fecais em amostras de sedimentos utilizando extração assistida por ultrassom (UAE) e em ponteiras descartáveis (DPX) recheadas com sílica com detecção por GC-MS.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimização da composição da mistura de solventes utilizada na etapa da UAE.
- Otimizações da massa de sílica; do tempo e número de ciclos de extração; do tipo de solvente, tempo e número de ciclos de dessorção da DPX.
- Obter os parâmetros analíticos de mérito (linearidade, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e robustez) para validar a metodologia proposta.
- Aplicação da metodologia em amostras reais de sedimentos.



### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 INSTRUMENTAÇÃO

Um banho ultrassônico Eco-Sonics (modelo Q3.0/40 de frequência 40kHz) foi utilizado para a UAE. Para o processo de otimização foi utilizado um cromatógrafo a gás modelo GC 2014 (Shimadzu, Kyoto, Japão), equipado com detector FID e injetor split/splitless, utilizando o software GC Solution para aquisição e tratamento dos dados. Para a separação foi usado uma coluna capilar DB-5MS (30m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m) composta de 95% de polidimetilsiloxano e 5% de fenila (Agilent J&W GC Columns, Santa Clara, CA, USA). Como gás de arraste empregou-se gás hidrogênio ultra puro (99,995%) em fluxo de 1 mL min<sup>-1</sup>. Para a realização das curvas de quantificação e análise de amostras reais foi usado um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas modelo GC-MS-QP 2010 Plus (Shimadzu, Kyoto, Japão). A separação foi feita numa coluna capilar (Torrance, CA, USA) modelo Rtx<sup>®</sup>-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m de espessura de filme de fase estacionária). Hélio ultrapuro foi usado como gás de arraste numa vazão constante 1mL min<sup>-1</sup>.

A separação foi feita com a injeção de um 1 $\mu$ L no modo splitless, com a temperatura do injetor em 290°C. A temperatura inicial da coluna foi de 180 °C, (mantido por 1 min) aumentando a uma taxa de 40 °C/min até 280 °C (mantida por 2 min) e por fim aquecida a uma taxa de 1 °C / min até 300 °C (mantida por 2 min).

A temperatura do detector no GC- FID , utilizado nas otimizações, foi de 300°C . No GC-MS temperatura da fonte de íons foi de 250 °C, e a da linha de transferência 290 °C. O espectrômetro de massa foi operado no modo de ionização por elétrons( EI) a 70 eV. A análise foi realizada em modo de monitoramento seletivo de íons (SIM) em duas janelas, a primeira de 10 a 14,10 min em que os íons selecionados foram m/z: 43, 55, 57, 81, 95, 107, 215, 233. Para a segunda janela entre 14,10 a 19 min os íons selecionados foram m/z: 55, 69, 81, 83, 412. Para a quantificação foram escolhidos para o coprostanol e para o colestanol o fragmento m/z 215, para o colesterol o fragmento m/z 107 e para o estigmasterol o fragmento m/z 55.

## 3.2 MATERIAIS E REAGENTES

Foram preparadas soluções estoque ( $2500 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) dos padrões analíticos (colesterol, coprostanol, colestanol e estigmasterol) obtidos da Sigma-Aldrich. Os solventes orgânicos hexano, diclorometano, acetonitrila e acetato de etila utilizados na extração e no preparo de padrões foram de grau HPLC adquiridos da Tedia (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). As ponteiras DPX foram adquiridas da DPX Technologies® sem nenhum material sorvente no interior.

A vidraria utilizada foi deixada de molho em Extran (Merck, Rio de Janeiro, Brasil) 5% e calcinada a  $400^\circ\text{C}$  por 4 horas antes de ser utilizada. A sílica utilizada foi a gel 60 para cromatografia em coluna 0,063-0,2 mm / 70-230 mesh ASTM da marca Macherey- Nagel, ativada em mufla a  $240^\circ\text{C}$  durante 2 horas e mantida em estufa a  $70^\circ\text{C}$ .

## 3.3 PROCEDIMENTOS

### 3.3.1 Limpeza, Fortificação e Extração

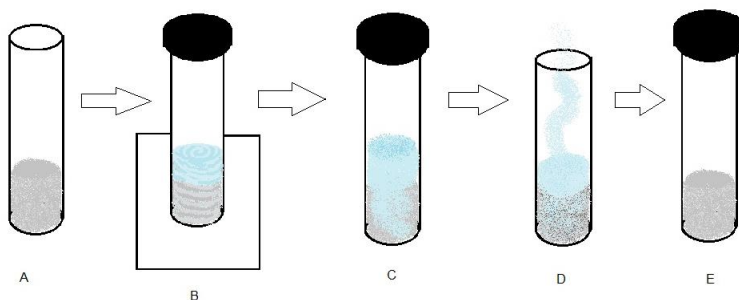
Os sedimentos usados como matriz foram oriundos de amostras coletadas por empresas de indústria petrolífera e passaram por processos de limpeza. Os sedimentos eram colocados em banho ultrassônico com uma solução diclorometano:metanol (2:1) durante 30 minutos, o sobrenadante era descartado e o procedimento realizado quatro vezes.

Para o processo de fortificação dos sedimentos, diferentes quantidades de padrão de  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$  dos compostos foram adicionados ao sedimento já limpo. O mesmo foi coberto por solvente e mantido sob agitação magnética por duas horas. Após a agitação o frasco foi mantido fechado por 24 horas para a melhor interação dos analitos com o sedimento e em seguida o frasco foi aberto até a evaporação total do solvente.

Para as extrações realizadas no ultrassom foram pesados 1 g de sedimento em um frasco de 20 mL e adicionados 3 mL de solvente orgânico (a ser otimizado). O frasco ficou em banho ultrassônico por 30 min e em seguida centrifugado para a decantação do sedimento. O sobrenadante foi retirado e o procedimento realizado em triplicata. O extrato total foi evaporado e ressuspensionado em hexano de acordo com o volume necessário decorrente dos ciclos de extração da DPX.

O extrato foi dividido em alíquotas (de acordo com o número de ciclos de extração da DPX) de 700  $\mu\text{L}$ . A pipeta era avolumada para 1,0 mL e a ponteira recheada com sílica (massa a ser otimizada), passava por uma etapa de condicionamento com 700  $\mu\text{L}$  hexano e em seguida pelos ciclos de extração (número e tempo dos ciclos a serem otimizados). Em sequência a pipeta era colocada em 400  $\mu\text{L}$ , e 200  $\mu\text{L}$  do solvente otimizado eram utilizados na etapa de dessorção (ciclos e tempo foram otimizados). A diferença de volume entre a pipeta e o volume aspirado serve para garantir que ocorra a entrada de ar e a fase extratora se disperse no extrato/ solvente de dessorção.

**Figura 5.** Esquema de fortificação do sedimento. (a) escolha da quantidade a ser fortificada; (b) adição do padrão e solvente necessário para a cobertura e agitação; (c) frasco mantido fechado para a interação dos analitos com o sedimento; (d) abertura do frasco para evaporação do solvente; (e) acondicionamento do sedimento fortificado.



Fonte: Autoria Própria

### 3.3.2 Etapas de Otimização

#### 3.3.2.1 Solvente de Extração da UAE

Os solventes selecionados foram acetato de etila (Ac.Etila), acetonitrila(ACN) e diclorometano (DCM). O planejamento foi realizado com 6 experimentos com um ponto central realizado em triplicata, gerando um total de 9 experimentos. Com os resultados foi elaborada a construção de uma superfície ternária *simplex lattice* em função das proporções dos solventes e a média geométrica das áreas correspondentes às respostas dos padrões. As

proporções dos solventes em cada experimento se encontram resumidas na Tabela 3.

**Tabela 4.** Planejamento da superfície ternária para a avaliação do melhor solvente para a extração assistida por ultrassom.

<b>Experimentos\ Solventes</b>	<b>Ac. Etila</b>	<b>ACN</b>	<b>DCM</b>
<b>1</b>	1	0	0
<b>2</b>	0	1	0
<b>3</b>	0	0	1
<b>4</b>	0,5	0,5	0
<b>5</b>	0,5	0	0,5
<b>6</b>	0	0,5	0,5
<b>7</b>	0,33333	0,33333	0,33333
<b>8</b>	0,33333	0,33333	0,33333
<b>9</b>	0,33333	0,33333	0,33333

Para esta otimização 1 g de sedimento foi adicionado a um frasco juntamente com 3 mL de solvente. O frasco foi submetido a 30 min de banho ultrassônico e depois centrifugado. O sobrenadante foi retirado com uma pipeta de Pasteur. O procedimento foi realizado em triplicada. O extrato foi evaporado e ressuspensionado com 3,5 mL de hexano e depois aplicado ao método DPX com a ponteira recheada com 40 mg de sílica, o procedimento foi realizado com 5 ciclos de extração de 30 s e 3 ciclos de dessorção de 30 s. Uma solução de DCM:MeOH (3:1) foi usada como solvente de dessorção.

### 3.3.2.2 Otimização da DPX

Foi preparada uma solução com a mistura dos padrões analíticos de coprostanol, colesterol, colestanol e estigmasterol na concentração de  $1\mu\text{g ml}^{-1}$ . Essa solução foi utilizada em todos os procedimentos de otimização da DPX.

O planejamento composto central (PCC) foi utilizado para a otimização das variáveis de extração. A massa de sílica foi variada



entre 20 e 60 mg, o número de ciclos entre 1 e 5 e o tempo de cada ciclo de 10 a 50 s. Utilizando o programa STATISTICA 8 gerou-se os experimentos conforme apresentados na Tabela 4. Foram fixadas as variáveis de dessorção em 3 ciclos de dessorção de 30 s e o solvente de dessorção foi uma solução de DCM:MeOH (3:1).

**Tabela 5.** Planejamento composto central para a avaliação da etapa de extração da DPX.

<b>Exp.\Variáveis</b>	<b>Massa (mg)</b>	<b>Ciclos</b>	<b>Tempo(s)</b>
<b>1</b>	30	2	20
<b>2</b>	30	4	40
<b>3</b>	50	2	40
<b>4</b>	50	4	20
<b>5</b>	40	3	30
<b>6</b>	30	2	40
<b>7</b>	30	4	20
<b>8</b>	50	2	20
<b>9</b>	50	4	40
<b>10</b>	40	3	30
<b>11</b>	20	3	30
<b>12</b>	60	3	30
<b>13</b>	40	1	30
<b>14</b>	40	5	30
<b>15</b>	40	3	10
<b>16</b>	40	3	50
<b>17</b>	40	3	30

Para a dessorção foi utilizado o planejamento Doehlert de duas variáveis. Nos experimentos foram variados o tempo (10 – 30 segundos) e o número de ciclos de dessorção (1 – 5). O planejamento se encontra na Tabela 5. Os parâmetros de extração foram utilizados de acordo com os resultados obtidos no PCC.

**Tabela 6.** Planejamento Doehlert para a dessorção.

Exp.\Variáveis	TEMPO (s)	CICLOS
1	30	2
2	30	4
3	20	1
4	20	5
5	10	2
6	10	4
7	20	3
8	20	3
9	20	3

O solvente usado para a dessorção também foi avaliado por meio de uma superfície ternária *simplex lattice*, onde os experimentos foram realizados com diferentes proporções de solvente (Tabela 6). Os solventes utilizados foram Ac. Etila, MeOH e ACN. As condições de extração e dessorção foram de acordo com as otimizações anteriores.

**Tabela 7.** Planejamento do solvente de dessorção.

Experimentos\ Solventes	Ac. Etila	ACN	MeOH
1	1	0	0
2	0	1	0
3	0	0	1
4	0,5	0,5	0
5	0,5	0	0,5
6	0	0,5	0,5
7	0,33333	0,33333	0,33333
8	0,33333	0,33333	0,33333
9	0,33333	0,33333	0,33333

### 3.3.3 Validação da Metodologia

#### 3.3.3.1 Curva Analítica

Segundo o procedimento de fortificação descrito, foram fortificados sedimentos nas concentrações de 10 ng g<sup>-1</sup>, 25 ng g<sup>-1</sup>, 50 ng g<sup>-1</sup>, 100 ng g<sup>-1</sup>, 200 ng g<sup>-1</sup>, 250 ng g<sup>-1</sup>, 500 ng g<sup>-1</sup>, 625 ng g<sup>-1</sup>, 750 ng g<sup>-1</sup>, 1000 ng g<sup>-1</sup> e 1250 ng g<sup>-1</sup>. Esses foram extraídos em quadruplicata segundo as condições previamente otimizadas e analisados por GC-MS.

As figuras analíticas de mérito foram obtidas através da curva de calibração na matriz. Os limites de quantificação (LOQ) foram definidos como o primeiro ponto da faixa linear da curva e os limites de detecção (LOD) foram definidos como o LOQ dividido por 3,3.

Os mesmos sedimentos utilizados para a curva analítica, extraídos de maneira otimizada, foram utilizados nos ensaios de precisão e exatidão por meio da recuperação das amostras fortificadas com as concentrações de 250, 750 e 1000 ng g<sup>-1</sup>. Os valores das áreas obtidos a partir dos cromatogramas foram aplicados nas respectivas equações da reta para cada analito. Valores de recuperação entre 60 e 115% foram considerados aceitáveis seguindo as recomendações da AOAC (AOAC, 2012).

Para a precisão foram realizados ensaios intradia e interdia, todos eles em triplicata. Os valores foram considerados aceitáveis para desvio padrão relativo de até 20%.

#### 3.3.3.2 ROBUSTEZ

Para a determinação da robustez foi realizado o teste de Youden. Sete parâmetros (Tabela 7) foram analisados em dois níveis, alto (+) e baixo (-). Foram tomados como normais os fatores previamente otimizados e usados no método. O planejamento foi feito de acordo com Placket e Burman que gerou um total de 8 experimentos apresentados na Tabela 8. O método de Lenth foi aplicado para avaliar os principais efeitos das variáveis.

**Tabela 8.** Variações dos parâmetros utilizados no teste de robustez.

<b>Parâmetro</b>	<b>Método</b>	<b>(-)</b>	<b>(+)</b>
Massa de Sílica (mg)	50	48	52
Massa de Solo (g)	1	0,9	1,1
Tempo de Extração(s)	10	9	11
Tempo de Dessorção (s)	20	18	22
Temperatura do Injetor (°C)	290	288	292
Tempo de Ultrassom (min)	30	28	32
Volume de Injeção (µL)	1	0,9	1,1

**Tabela 9.** Planejamento dos experimentos de robustez segundo Placket e Burman.

<b>Parâmetro/ Experimento</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>
Massa de Sílica (mg)	52	52	52	52	48	48	48	48
Massa de Solo (g)	1,1	1,1	0,9	0,9	1,1	1,1	0,9	0,9
Tempo de Extração DPX (s)	11	9	11	9	11	9	11	9
Tempo de Dessorção (s)	22	22	18	18	18	18	22	22
Temperatura do Injetor (°C)	292	288	292	288	288	292	288	292
Tempo de Ultrassom (min)	32	28	28	32	32	28	28	32
Volume de Injeção (µL)	1,1	0,9	0,9	1,1	0,9	1,1	1,1	0,9

### 3.3.4 Aplicação do Método

O método foi aplicado a amostras coletadas em Laguna, Santa Catarina, na Praia do Mar Grosso próximo ao emissário submarino da CASAN. A amostragem de 32 pontos foi realizada em março de 2018. O objetivo da determinação dos esteróis é avaliar a resposta das associações bênticas, meiofauna e macrofauna, à disposição oceânica de esgoto sanitário pelo emissário submarino. Dentre os pontos recebidos seis foram escolhidos ao acaso para a aplicação do método: pontos 2, 10,14,15,16 e 17. A Figura 6 mostra a localização dos pontos de coleta das amostras.

As amostras foram liofilizadas e passaram pelo processo de extração em ultrassom e DPX já validados.

**Figura 6.** Amostragem concêntrica ao redor do emissário realizada na Praia do Mar Grosso em Laguna- SC.



Fonte: Cedida por Thábata Fernandes Cândido

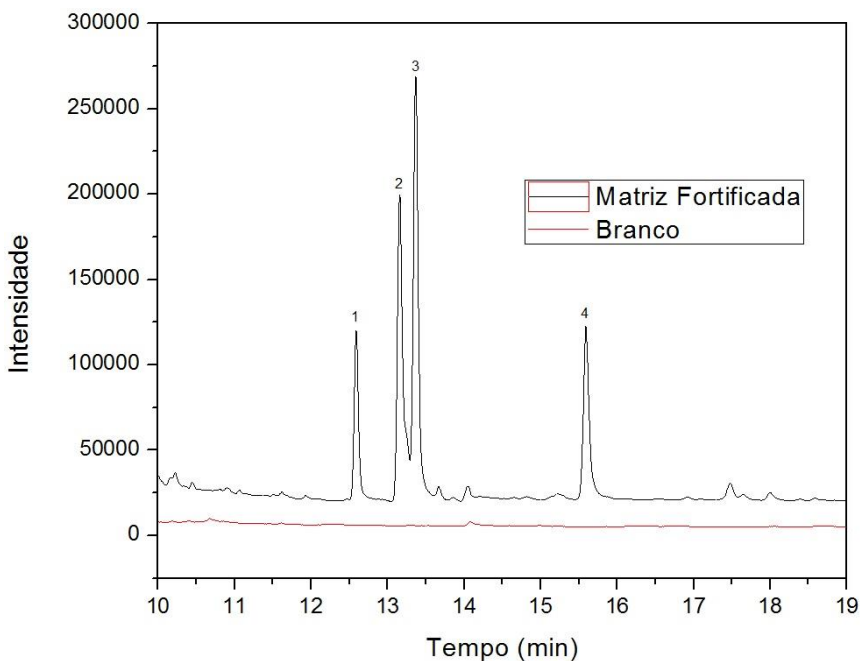


#### 4 RESULTADOS.

A fim de verificar a presença de interferentes na matriz (sedimento) foi realizado o processo de extração descrito no item 3.3.1. Não foram detectados interferentes que poderiam atrapalhar na análise dos esteróis, então, o mesmo foi utilizado para os demais processos.

A fortificação do sedimento foi avaliada pelo procedimento de fortificação na concentração de  $1000 \text{ ng g}^{-1}$  e em seguida pelo procedimento de extração. Verificou-se também a separação dos analitos no programa de temperatura realizado. Na Figura 7 encontra-se o cromatograma do branco (linha vermelha) e da fortificação (linha preta) com a identificação de cada analito.

**Figura 7.** Cromatograma obtido para o branco e para fortificação da matriz pela injeção de  $1 \mu\text{L}$  na concentração de  $1000 \text{ ng g}^{-1}$ . Analitos: (1) coprostanol; (2) colesterol; (3) colestanol; (4) estigmasterol



O processo de fortificação de sedimentos já foi questionado quanto a sua veracidade perante ao processo que realmente ocorre em ambientes aquáticos. Zhou e Liu(2000) demonstraram que o equilíbrio entre a fase aquosa e as partículas de sedimentos para o dietilhexilftalato ocorre entre 6-16 horas , mostrando que o processo de adsorção das moléculas orgânicas hidrofóbicas já estaria completo nesse período. Portanto o período de 24 horas usado para a fortificação demonstra-se o suficiente para que as interações ocorram.

#### 4.1 SOLVENTE DE EXTRAÇÃO DA UAE

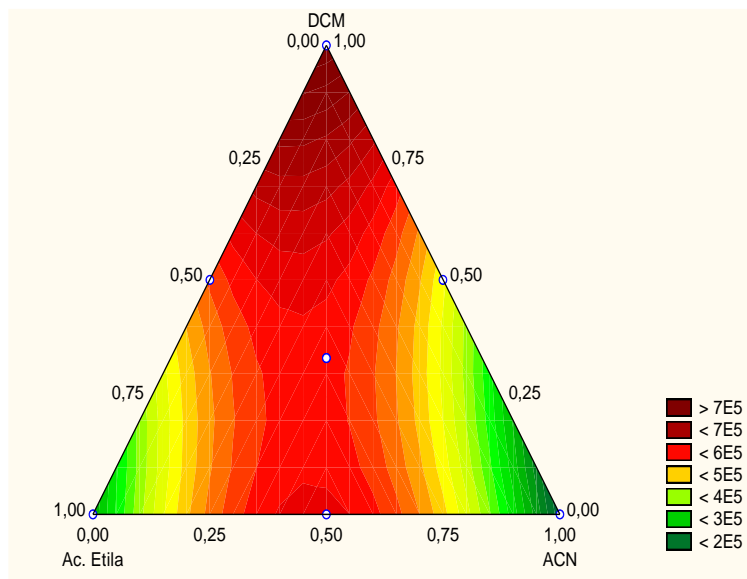
A escolha dos solventes se deu de acordo com os solventes normalmente utilizados em extrações dos esteróis. Havendo a limitação da impossibilidade da utilização de solventes próticos devido ao fato deles desativarem a sílica previamente ativada. Nesse caso utilizaram-se solventes que possuíam forças cromatográficas semelhantes.

A superfície ternária correspondente à otimização realizada mostrou que a melhor resposta foi obtida com o diclorometano puro (Figura 8 ). A superfície que seguiu o modelo quadrático gerou um coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,9086.

O DCM, o solvente menos polar, que apareceu como melhor solvente de extração, pode ser justificado pela baixa polaridade dos esteróis, que, devido às grandes cadeias hidrocarbônicas presentes diminuem a polaridade da molécula.



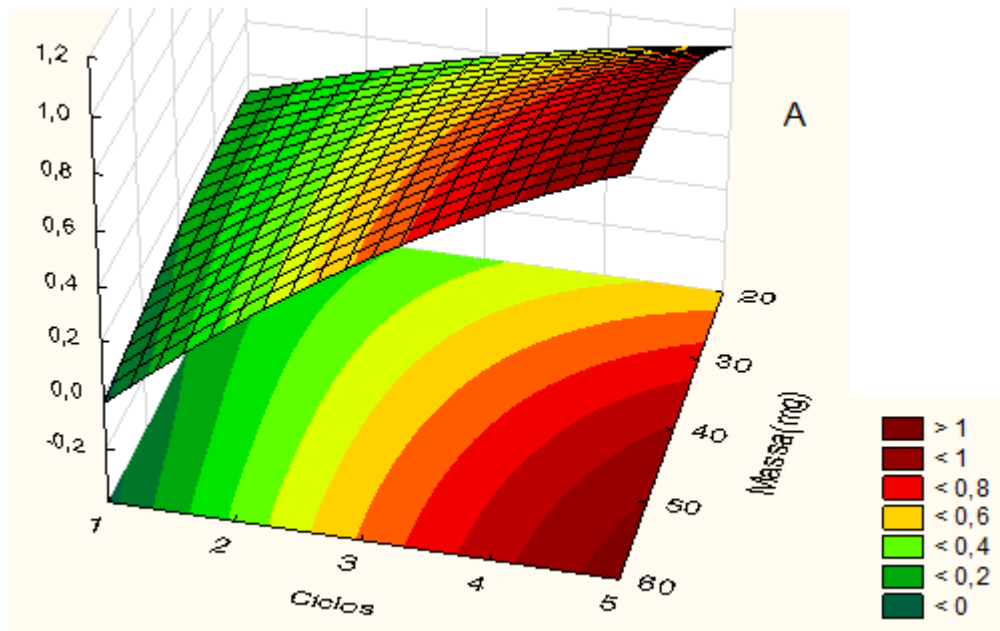
**Figura 8.** Superfície ternária para o solvente de extração da UAE (fortificação  $1\mu\text{g g}^{-1}$ ; condições da DPX: 40 mg de sílica, 3 ciclos de extração de 30 s, 1 ciclo de dessorção de 30 s e solução Ac. Etila : MeOH 3:1 (v/v) usada na dessorção),

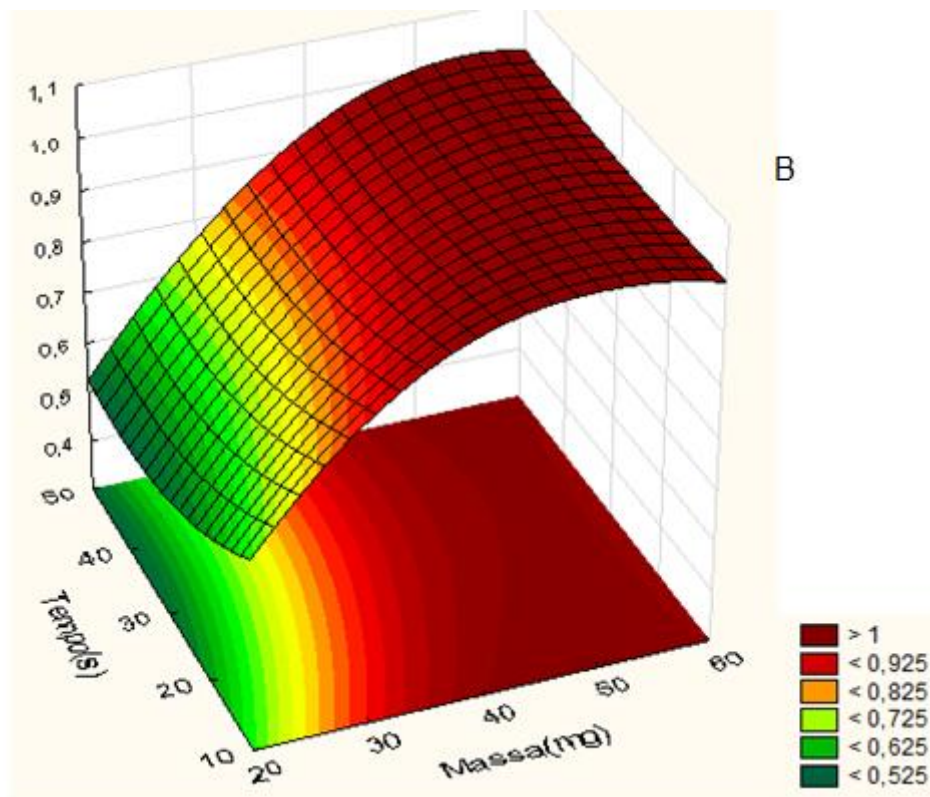


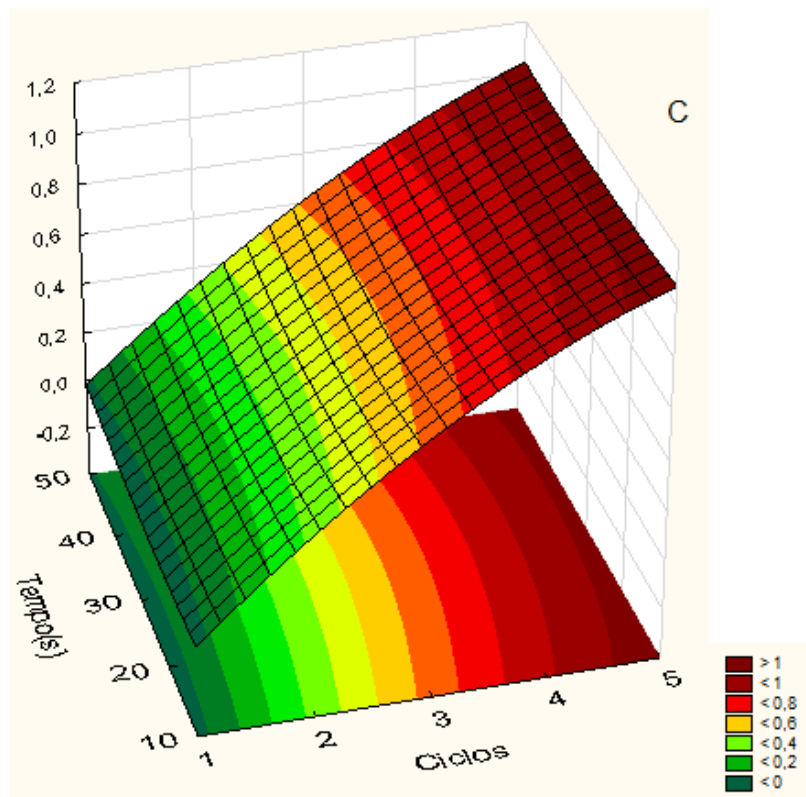
#### 4.2 VARIÁVEIS DE EXTRAÇÃO DA DPX

As respostas obtidas no planejamento do composto central, que levou em consideração o tempo, o número de ciclos e a massa de sílica, gerou as superfícies de respostas mostradas na Figura 9. Obteve-se um  $R^2$  de 0,95626 para as superfícies.

**Figura 9.** Superfícies de respostas: (a) ciclos x massa, (b) tempo x massa e (c) tempo x ciclos (Fortificação  $1\mu\text{g g}^{-1}$ , solvente de dessorção Ac Etila:ACN 3:2(v/v), 1 ciclo de dessorção de 30 segundos),







O melhor resultado obtido para a massa foi de 50 mg de sílica. Na superfície apresentada na Figura 6a o valor de 60 mg apresentou bons resultados, porém, ao ser adicionado volume de solvente utilizado para a dessorção (200  $\mu$ L) percebeu-se que o recobrimento da sílica não se completava e não ocorria uma dispersão da sílica no solvente, sendo assim a massa de 50 mg se mostrou mais adequada.

Os ciclos de extração mostraram-se numa razão crescente de acordo com o número de ciclos. Cinco ciclos foram escolhidos por uma melhor frequência analítica e foram obtidas respostas satisfatórias.

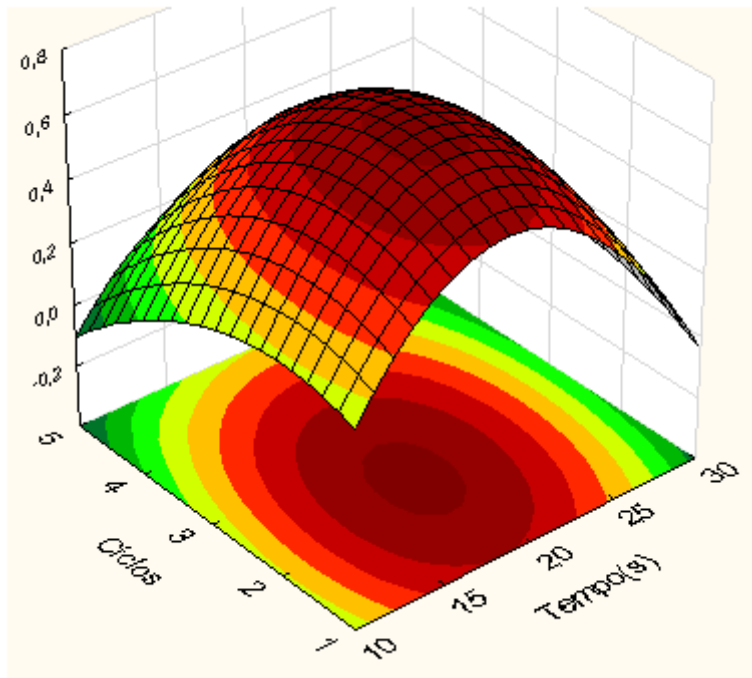
A resposta analítica não foi afetada pelos diferentes tempos de extração, como visto na Figura 6, principalmente no diagrama C, no qual é possível observar que a variação do tempo não afetou na resposta. Escolheu-se então o tempo de 10 s, que se mostrou o tempo necessário para a dispersão da solução na sílica e a extração dos compostos. Outros trabalhos já publicados mostram que o tempo de extração não afeta a resposta analítica. Em alguns casos como descrito por Mafra et al. 2018 e Scheidweiler et al. 2016 um valor mínimo de tempo foi fixado, enquanto em outros casos como Chaves et al. 2015 e Guan et al. 2010 o tempo nem foi levado em consideração e apenas foram contados o número de ciclos.

A etapa mais importante possivelmente é a dispersão da sílica na amostra, onde o ar entra e faz com que ocorra essa mistura, o que acaba fazendo com que o tempo de contato da sílica e da amostra não seja determinante.

### 4.3 VARIÁVEIS DE DESSORÇÃO

A otimização do número de ciclos e tempo de dessorção obtidos por meio do planejamento Dohler gerou uma superfície com um  $R^2$  de 0,81568 (Figura 7).

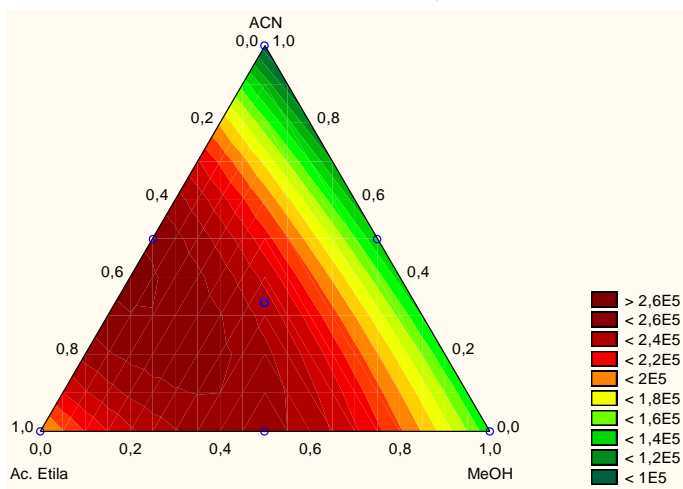
**Figura 10.** Superfície gerada na otimização de número de ciclos e tempo de dessorção. (fortificação  $1\mu\text{g g}^{-1}$ ; 50 mg de sílica; 5 ciclos de extração de 10 s, solvente de dessorção Ac Etila:ACN 3:2[v/v]).



Como visto na superfície as melhores respostas foram obtidas no tempo de 20 s e com 2 ciclos de dessorção. Quanto maior o número de ciclos era foi possível observar que ocorria um maior espalhamento da sílica na ponteira, que permanecia aderida à superfície da ponteira onde o solvente não recobria, causando assim, uma perda na resposta obtida.

O solvente de dessorção otimizado obtido por meio da superfície ternária (Figura 11), foi uma mistura com 60% de acetato de etila e 40% de acetonitrila. O  $R^2$  obtido para a superfície foi de 0,9887.

**Figura 11.** Superfície ternária dos solventes de dessorção.(fortificação  $1\mu\text{g g}^{-1}$ ;40 mg de sílica; 3 ciclos de extração de 30 s, 1 ciclo de dessorção de 30 segundos)



A combinação de solventes Ac. etila e ACN, se mostrou forte o suficiente para desfazer as interações dos compostos com a sílica, e fazer com que eles fossem liberados no solvente de dessorção. Utilizando uma tabela de força cromatográfica dos solventes em relação à sílica, é possível verificar que a força da mistura se aproxima muito do valor da mistura de solvente que normalmente é usada em colunas de separação (Ac. etila: MeOH (3:1)) para separar a fração dos esteróis.

O uso de solventes não tão polares pode favorecer a separação dos esteróis de ácidos graxos, compostos que geralmente coeluem em análises cromatográficas de extratos orgânicos de sedimentos.

#### 4.4 PARÂMETROS ANALÍTICOS DE MÉRITO

Com o método otimizado e aplicado para a construção da curva analítica os parâmetros analíticos de mérito foram determinados e estão apresentados na Tabela 10. A faixa linear variou de  $25\mu\text{g kg}^{-1}$  a  $1000\mu\text{g kg}^{-1}$  com LOD entre  $7,6\mu\text{g kg}^{-1}$  e  $75,8\mu\text{g kg}^{-1}$  e LOQ de 25 a  $250\mu\text{g kg}^{-1}$ . Os coeficientes de correlação variaram entre 0,9908 e 0,9983.

Os resultados de exatidão e precisão são apresentados na Tabela 11. Os ensaios de recuperação mostraram resultados variando entre 78% e 114%. Considerando que a calibração e a recuperação foram feitas diretamente na matriz, os resultados obtidos foram satisfatórios e de acordo com os encontrados na literatura. A precisão intradia variou entre 0,5 e 10% e a precisão intradia entre 2 e 16% .



**Tabela 10.** Parâmetros analíticos de mérito

<b>Analitos</b>	<b>LOD</b> ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	<b>LOQ</b> ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	<b>Faixa Linear</b> <b>de Trabalho</b> ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>Equação da Reta</b>
<b>Coprostanol</b>	75,8	250	250-1000	0,9938	$y = 104,18x - 25170$
<b>Colesterol</b>	7,6	25	25-1000	0,9908	$y = 164,25x + 12400$
<b>Colestanol</b>	75,8	250	250-1000	0,9938	$y = 412,72x - 101868$
<b>Estigmasterol</b>	75,8	250	250-1000	0,9983	$y = 201,1x - 38315$

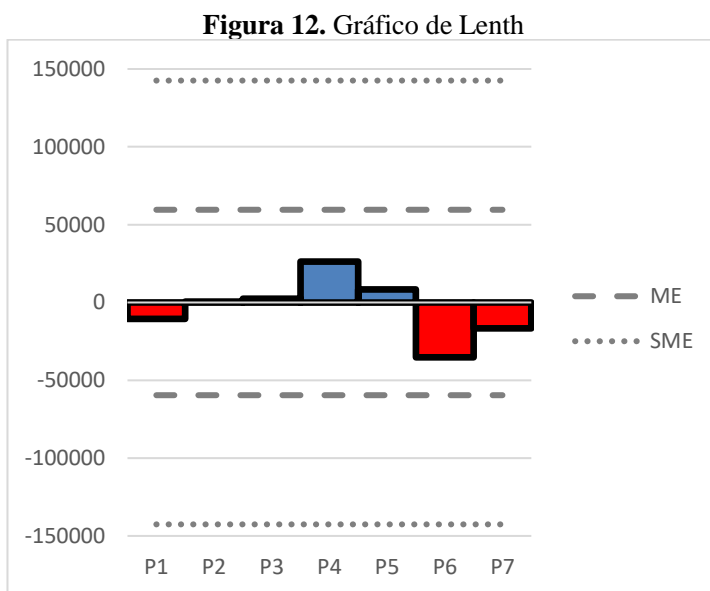
**Tabela 11.** Ensaio de Exatidão e Precisão.

<b>Analito</b>	<b>Fortificação (<math>\mu\text{g kg}^{-1}</math>)</b>	<b>Recuperação Relativa (%)</b>	<b>Precisão Intradia (%)</b> (n = 3)	<b>Precisão Interdia (%)</b> (n=9)
<b>Coprostanol</b>	250	114	1	2
	750	81	2	11
	1000	101	10	7
<b>Colesterol</b>	250	78	2,5	2
	750	105	1	16
	1000	96	6	10
<b>Colestanol</b>	250	114	2	9
	750	79	0,5	15
	1000	100	9	16
<b>Estigmasterol</b>	250	108	4	2
	750	95	4	5
	1000	107	9	11

Os valores de recuperação entre 78 e 114% estão de acordo com os encontrados em trabalhos publicados mais recentemente nos quais os percentuais de recuperação para sedimentos variaram de 45 a 130% (González-Gaya *et al.*, 2018; Santos, Santos e Andrade, 2018; Wang *et al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2018)

#### 4.5 ROBUSTEZ

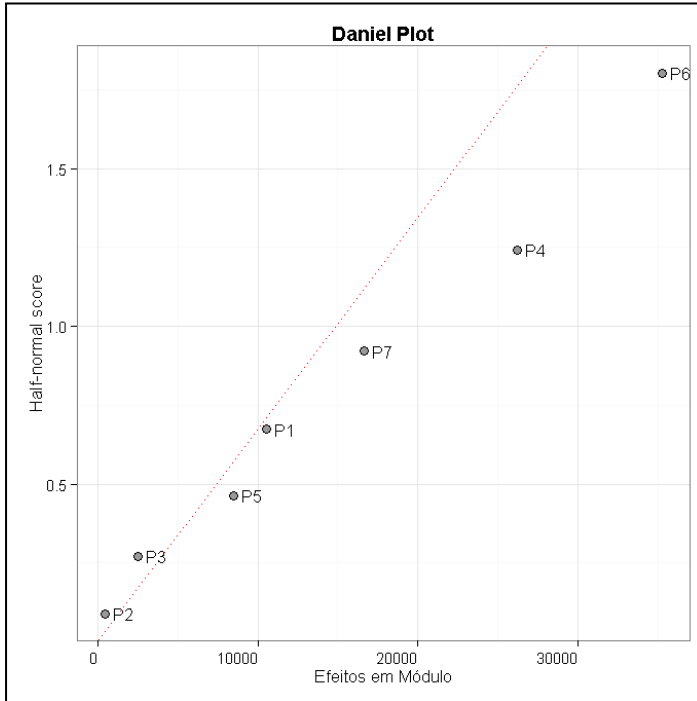
Os ensaios de robustez geraram os gráficos de Lenth (Figura 12) e Daniel (Figura 13). Pelo gráfico de Lenth é possível ver que os sete fatores analisados ficaram abaixo do erro marginal (ME) e do erro marginal simultâneo (SME).



O erro marginal é levado em consideração quando só um fator está sendo analisado, se usado como parâmetro quando mais de um está em análise, esse pode dar um resultado falso positivo. Como foram realizados testes com sete fatores utilizou-se o erro marginal simultâneo e o erro marginal juntos diminuindo a chance de resultados falso positivos e falso negativos. O teste t aplicado

mostrou que todos os valores calculados ficaram abaixo do t crítico comprovando que os resultados estão dentro do intervalo de confiança de 95% (Leonardi *et al.*, 2015).

**Figura 13.** Gráfico de Daniel

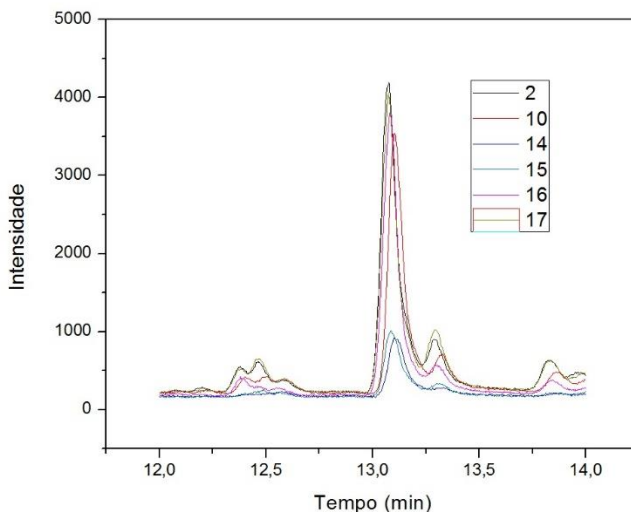


O gráfico de Daniel é analisado através da linha imaginária que resulta dos valores obtidos dos sete fatores, quanto mais afastado os fatores da linha imaginária mais representativos eles são. A análise de ambos os gráficos demonstra que nenhum fator tem muito impacto sobre a resposta analítica mostrando que o método desenvolvido não apresenta variações significativas perante às pequenas alterações no método.

#### 4.6 APLICAÇÃO DO MÉTODO

O método aplicado mostrou a presença apenas de colesterol em quatro das seis amostras coletadas na região da Laguna. O tempo de retenção diferenciou um pouco do padrão, porém todas os fragmentos correspondentes ao colesterol se encontraram presentes (Figura 14).

**Figura 14.** Cromatograma obtido por GC-MS para as amostras analisadas.



A Tabela 11 traz os valores encontrados para cada amostra quantificada com os fragmentos citados em 3.1 .

**Tabela 12.** Analitos presentes nas amostras coletadas.

Amostra\ Analito	Coprostanol	Colesterol ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Colestanol	Estigmasterol
2	< LOD	46,5	< LOD	< LOD
10	< LOD	< LOQ	< LOD	< LOD
14	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
15	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
16	< LOD	30,3	< LOD	< LOD
17	< LOD	38,3	< LOD	< LOD

#### 4.7 COMPARAÇÃO COM MÉTODOS DA LITERATURA

A tabela 13 traz, metodologias descritas na literatura para a determinação de esteróis. É possível verificar que essas metodologias são laboriosas e envolvem várias etapas. Destacam-se o tempo de extração e o volume de solventes dessas metodologias e, alguns casos, a presença da etapa de derivatização essas características refletem claramente as vantagens da metodologia desenvolvida.

**Tabela 13.** Comparação entre trabalhos publicados o trabalho desenvolvido.

<b>Autor</b>	<b>Extração</b>	<b>Etapas</b>	<b>Derivatização</b>	<b>Volume de Solvente (mL)</b>
<b>Este Trabalho</b>	<b>UAE (1h30min)</b>	<b>2</b>	<b>NÃO</b>	<b>13,1</b>
Battistel et al. 2015	PLE	3	SIM	90
Birk et al. 2012	Soxhlet (36h)	>5	SIM	150
Li et al. 2007	PLE (24h)	3	SIM	200
Matic et al. 2014	UAE	3	NÃO	30 + HPLC

## 5 CONCLUSÃO

A metodologia sugerida para identificação de contaminação fecal através da determinação do biomarcador fecal coprostanol, e os esteróis colesterol, colestanol e estigamsterol, mostrou-se válida. Foram obtidos limites de detecção e quantificação, que segundo a literatura existente, seriam o suficiente para determinar uma contaminação. A metodologia mostra que a análise de sedimentos, normalmente consumidora de muito tempo e reagentes, pode ser feita de um a maneira mais “limpa”. Enquanto trabalhos descritos na literatura utilizam centenas de mililitros de solventes orgânicos e inúmeras etapas de preparo de amostra para cada análise feita, o que inclui normalmente uma etapa de derivatização, este trabalho utiliza apenas 13,1 mL de solventes orgânicos, num tempo de preparo de amostra de aproximadamente 1 hora e 30 minutos. Os valores de precisão e exatidão se mostraram equiparáveis às metodologias mais clássicas e o método, apesar de simples, se mostrou robusto, não sendo influenciado por pequenas alterações.

As características da metodologia proposta fazem com que ela esteja de acordo com a tendência das metodologias atuais na química analítica: a miniaturização dos processos. A pequena quantidade de amostra necessária, o pequeno volume de solvente utilizado (se comparado a métodos de análise de sedimentos), o menor tempo do uso dos instrumentos, o menor tempo de contato do analista com a amostra e o fato de não existir uma etapa de derivatização fazem com que a metodologia se torne mais “verde”.

Sendo assim, um método com limites de detecção e quantificação satisfatórios; boa precisão e exatidão; robusto e mais “limpo” foi proposto como uma boa opção para a determinação de esteróis em amostras de sedimentos.





## 6 REFERÊNCIAS

AOAC. Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements - AOAC Official Methods of Analysis. **AOAC Official Methods of Analysis**, p. 1–17, 2012.

ARMENTA, S.; GARRIGUES, S.; LA GUARDIA, M. DE. Green Analytical Chemistry. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, n. 6, p. 497–511, 2008.

BACHTIAR, T.; BARDJO, I.; STUDIES, M. T.; PROGRAM, O. S. VERTICAL EXISTENCE OF COPROSTANOL IN A SEDIMENT CORE FROM SEMARANG COASTAL. v. 7, n. 3, p. 119–127, 2004.

BATTISTEL, D.; PIAZZA, R.; ARGIRIADIS, E.; MARCHIORI, E.; RADAELLI, M.; BARBANTE, C. GC-MS method for determining faecal sterols as biomarkers of human and pastoral animal presence in freshwater sediments. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 407, n. 28, p. 8505–8514, 2015.

BECK, J.; TOTSCHKE, K. U.; KÖGEL-KNABNER, I. A rapid and efficient determination of natural estrogens in soils by pressurised liquid extraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Chemosphere**, v. 71, n. 5, p. 954–960, 2008.

BIRK, J. J.; DIPPOLD, M.; WIESENBERG, G. L. B.; GLASER, B. Combined quantification of faecal sterols, stanols, stanones and bile acids in soils and terrestrial sediments by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1242, p. 1–10, 2012.

CARREIRA, R. S.; ALBERGARIA-BARBOSA, A. C. R.; ARGUELHO, M. L. P. M.; GARCIA, C. A. B. Evidence of sewage input to inner shelf sediments in the NE coast of Brazil obtained by molecular markers distribution. **Marine Pollution Bulletin**, v. 90, n. 1–2, p. 312–316, 2015.

CARREIRA, R.; WAGENER, A. L. R.; FILEMAN, T.; READMAN, J. W. Distribuição de coprostanol (5. **Quim. Nova**, v. 24, n. 1, p. 37–42, 2011.

CHAN, K.; LAM, M. H. W.; POON, K.; YEUNG, H.; CHIU, T.

K. T. Application of Sedimentary Fecal Stanols and Sterols in Tracing Sewage Pollution in Coastal Waters. v. 32, n. 1, p. 225–235, 1998.

CHAVES, A. R.; MOURA, B. H. F.; CARIS, J. A.; RABELO, D.; QUEIROZ, M. E. C. The development of a new disposable pipette extraction phase based on polyaniline composites for the determination of levels of antidepressants in plasma samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1399, p. 1–7, 2015.

CHEMAT, F.; ROMBAUT, N.; SICAIRE, A. G.; MEULLEMIESTRE, A.; FABIANO-TIXIER, A. S.; ABERT-VIAN, M. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 34, p. 540–560, 2017.

CHOI, S. M.; KWAN, S. . Y.; WONG, C. M. Studies of Coprostanol in Environmental Samples by Tandem Mass Spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 64, p. 54–64, 1996.

CORDEIRO, L. G. S. M.; CARREIRA, R. S.; WAGENER, A. L. R. Geochemistry of fecal sterols in a contaminated estuary in southeastern Brazil. **Organic Geochemistry**, v. 39, n. 8, p. 1097–1103, 2008.

DACHS, J.; BAYONA, J. M.; FILLAUX, J.; SALIOT, A.; ALBAIGÉS, J. Evaluation of anthropogenic and biogenic inputs into the western Mediterranean using molecular markers. **Marine Chemistry**, v. 65, n. 3–4, p. 195–210, 1999.

FROEHNER, S.; MACENO, M.; MARTINS, R. F. Sediments as a potential tool for assessment of sewage pollution in Barigüi River, Brazil. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 170, n. 1–4, p. 261–272, 2010.

GALUSZKA, A.; MIGASZEWSKI, Z.; NAMIEŚNIK, J. The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 50, p. 78–84, 2013.

GONZÁLEZ-GAYA, B.; CHERTA, L.; NOZAL, L.; RICO, A. An optimized sample treatment method for the determination of

antibiotics in seawater, marine sediments and biological samples using LC-TOF/MS. **Science of The Total Environment**, v. 643, p. 994–1004, dez. 2018.

GONZÁLEZ-OREJA, J. A.; SAIZ-SALINAS, J. I. Short-term spatio-temporal changes in urban pollution by means of faecal sterols analysis. **Marine Pollution Bulletin**, v. 36, n. 11, p. 868–875, 1998.

GRON, L. U. Green analytical chemistry: Application and education. **ACS Symposium Series**, v. 1011, p. 103–116, 2009.

GUAN, H.; BREWER, W. E.; GARRIS, S. T.; CRAFT, C.; MORGAN, S. L. Multiresidue analysis of pesticides in fruits and vegetables using disposable pipette extraction (DPX) and micro-luke method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 10, p. 5973–5981, 2010.

HUDSON, E. D.; PARRISH, C. C.; HELLEUR, R. J. Biogeochemistry of sterols in plankton, settling particles and recent sediments in a cold ocean ecosystem (Trinity Bay, Newfoundland). **Marine Chemistry**, v. 76, n. 4, p. 253–270, 2001.

HUGHES, K. A.; THOMPSON, A. Distribution of sewage pollution around a maritime Antarctic research station indicated by faecal coliforms, *Clostridium perfringens* and faecal sterol markers. **Environmental Pollution**, v. 127, n. 3, p. 315–321, 2004.

KILLOPS, Stephen D; KILLOPS, Vanessa J. **An Introduction to Organic Geochemistry**. New York: John Wiley & Sons , Inc., 1993. 253 p.

LEEMING, R.; NICHOLS, P. D. Concentrations of coprostanol that correspond to existing bacterial indicator guideline limits. **Water Research**, v. 30, n. 12, p. 2997–3006, 1996.

LEONARDI, F.; VESCHETTI, M.; TONNARINI, S.; CARDELLINI, F.; TREVISI, R. A step towards accreditation: A robustness test of etching process. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 102, p. 93–97, 2015.

LI, D.; DONG, M.; SHIM, W. J.; KANNAN, N. Application of pressurized fluid extraction technique in the gas chromatography-mass spectrometry determination of sterols from marine sediment samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1160, n. 1–2, p. 64–70, 2007.

MACHADO, K. S.; FROEHNER, S.; SA NEZ, J.; FIGUEIRA, R. C. L.; FERREIRA, P. A. L. Assessment of historical fecal contamination in Curitiba, Brazil, in the last 400years using fecal sterols. **Science of the Total Environment**, v. 493, p. 1065–1072, 2014.

MAFRA, 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**, v. 1102–1103, p. 159–166, dez. 2018.

MARTINS, C. D. C.; BOECHAT, F.; GOMES, A.; AURELIANO, J.; CARMELA, R.; PAULO, U. D. S.; Marcadores Orgânicos de Contaminação por Esgotos Sanitários em Sedimentos Superficiais da Baía de Santos, São Paulo. **Quim. Nova**, v. 31, n. 5, p. 1008–1014, 2008.

MARTINS, C. D. C.; FILLMANN, G.; MONTONE, R. C. Natural and anthropogenic sterols inputs in surface sediments of Patos Lagoon, Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 1, p. 106–115, 2007.

MATYSIK, S.; ROY, C. I. LE; LIEBISCH, G.; CLAUS, S. P. Metabolomics of fecal samples: A practical consideration. **Trends in Food Science and Technology**, v. 57, p. 244–255, 2016.

OSMAN, R.; SAIM, N. Selective extraction of organic contaminants from soil using pressurised liquid extraction. **Journal of Chemistry**, v. 2013, 2013.

PINTO, M. A. L.; QUEIROZ, M. E. C. Extração em ponteiros descartáveis: fundamentos teóricos e aplicações. **Scientia Chromatographica**, v. 7, n. 2, p. 101–108, 2015.

SAEED, T.; AL-SHIMMARI, F.; AL-MUTAIRI, A.; ABDULLAH, H. Spatial assessment of the sewage contamination of

Kuwait's marine areas. **Marine Pollution Bulletin**, v. 94, n. 1–2, p. 307–317, 2015.

SANTOS, L. O.; SANTOS, A. G.; ANDRADE, J. B. DE. Methodology to examine polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) nitrated PAHs and oxygenated PAHs in sediments of the Paraguaçu River (Bahia, Brazil). **Marine Pollution Bulletin**, v. 136, p. 248–256, nov. 2018.

SCHEIDWEILER, K. B.; NEWMeyer, M. N.; BARNES, A. J.; HUESTIS, M. A. Quantification of cannabinoids and their free and glucuronide metabolites in whole blood by disposable pipette extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1453, p. 34–42, jul. 2016.

**Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento: Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgotos.** Brasília, 2016.

TOBISZEWSKI, M.; MECHLIŃSKA, A.; NAMIEŚNIK, J. Green analytical chemistry - Theory and practice. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 8, p. 2869–2878, 2010.

TOLOSA, I.; MESA, M.; ALONSO-HERNANDEZ, C. M. Steroid markers to assess sewage and other sources of organic contaminants in surface sediments of Cienfuegos Bay, Cuba. **Marine Pollution Bulletin**, v. 86, n. 1–2, p. 84–90, 2014.

WANG, Q. WEN; YANG, G. P.; ZHANG, Z. MING; ZHANG, J. Optimization of sample preparation and chromatography for the determination of perfluoroalkyl acids in sediments from the Yangtze Estuary and East China Sea. **Chemosphere**, v. 205, p. 524–530, 2018.

YEAGLE, P. L.; YEAGLE, P. L. Chapter 9 – Cholesterol and Related Sterols: Roles in Membrane Structure and Function. **The Membranes of Cells**, p. 189–218, 2016.

ZHAO, X.; CUI, T.; GUO, R.; LIU, Y.; WANG, X.; AN, Y.; QIAO, X.; ZHENG, B. A clean-up method for determination of multi-classes of persistent organic pollutants in sediment and biota samples with an aliquot sample. **Analytica Chimica Acta**, out. 2018.

ZHOU, J. L.; LIU, Y. P. Kinetics and equilibria of the interactions between diethylhexyl phthalate and sediment particles in simulated estuarine systems. **Marine Chemistry**, v. 71, p. 165–176, 2000.

ZOCATELLI, R.; LAVRIEUX, M.; GUILLEMOT, T.; CHASSIOT, L.; MILBEAU, C. LE; JACOB, J. Fecal biomarker imprints as indicators of past human land uses: Source distinction and preservation potential in archaeological and natural archives. **Journal of Archaeological Science**, v. 81, p. 79–89, 2017.