



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Gabriela Corazza

**Explorando o uso de fases extratoras alternativas em técnicas de microextração para a  
determinação de poluentes em amostras ambientais, contaminantes em amostras  
alimentícias e biomonitoramento de compostos orgânicos em amostras biológicas**

Florianópolis

2020

Gabriela Corazza

**Explorando o uso de fases extratoras alternativas em técnicas de microextração para a determinação de poluentes em amostras ambientais, contaminantes em amostras alimentícias e biomonitoramento de compostos orgânicos em amostras biológicas**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Doutora em Química Analítica. Orientador: Prof. Dr. Eduardo Carasek da Rocha.

Florianópolis

2020

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

Corazza, Gabriela

Explorando o uso de fases extratoras alternativas em técnicas de microextração para a determinação de poluentes em amostras ambientais, contaminantes em amostras alimentícias e biomonitoramento de compostos orgânicos em amostras biológicas / Gabriela Corazza ; orientador, Eduardo Carasek, 2020.

134 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Química. 2. Fase extratora alternativa. 3. Preparo de amostra. 4. Solvente com Hidrofilicidade Comutável. 5. Líquido Iônico Magnético. I. Carasek, Eduardo. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Química. III. Título.

Gabriela Corazza

**Explorando o uso de fases extratoras alternativas em técnicas de microextração para a determinação de poluentes em amostras ambientais, contaminantes em amostras alimentícias e biomonitoramento de compostos orgânicos em amostras biológicas**

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Ednei Gilberto Primel, Dr.  
Universidade Federal do Rio Grande

Prof.(a) Adriana Neves Dias, Dr.(a)  
Instituto Federal Catarinense

Prof. Luiz Augusto dos Santos Madureira, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.(a) Lizandra Czermainski Bretanha, Dr.(a)  
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em Química Analítica.

---

Prof. Dr. Marcus Cesar Mandolesi Sá  
Coordenador do Programa

---

Prof. Eduardo Carasek da Rocha, Dr.  
Orientador

Florianópolis, 2020.

Dedico esse trabalho à minha família e aos amigos que fiz no laboratório Cromaas.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, em especial aos meus pais que sempre me incentivaram a estudar e fizeram tudo para que isso fosse possível.

Ao professor Dr. Eduardo Carasek pela oportunidade de desenvolver essa pesquisa no laboratório Cromaas e pela valiosa orientação. Obrigada por me mostrar outra forma de orientação e por todo o ensinamento que levarei para a vida.

Aos professores Drs. Luciano Vitali, Alexandre Parize, Ademir Neves e Bruno Silveira de Souza pela participação e sugestões no Exame de Qualificação.

Aos membros da Comissão Examinadora deste trabalho, professores Drs. Ednei Gilberto Primel, Luiz Augusto dos Santos Madureira, Adriana Neves Dias e Lizandra Czermainski Bretanha, pelas valiosas críticas e sugestões.

Ao professor Dr. Josias Merib pelos ensinamentos e pela parceria nos trabalhos de pesquisa desenvolvidos, isso não seria possível sem você. Obrigada pela inspiração.

À professora Dra. Adriana Neves Dias por ter me recebido em sua casa no meu primeiro dia em Florianópolis, pelos ensinamentos e ajuda no início do período do doutorado.

Aos colegas e amigos do Laboratório Cromaas, em especial ao Lucas Morés, Leila, Sângela, Michela, Daniela, Gabrieli, Anderson, Camila Will, Josias e Vanessa pelas contribuições científicas e aprendizado que me proporcionaram. Obrigada pelos momentos de descontração e risadas, os quais foram muito importantes para tornar essa experiência mais feliz.

À Vanessa Meneghini, Camila Will e Michela Cancillier, obrigada pela oportunidade de auxiliá-las em uma etapa importante da vida acadêmica de vocês. Obrigada pela oportunidade de crescimento.

Às colegas de laboratório, vizinhas e amigas que levarei para a vida Sângela Nascimento do Carmo e Leila Dorácio Mendes pelas conversas, conselhos, incentivo e apoio nos momentos difíceis. Obrigada também por compartilharem comigo tantos momentos maravilhosos e por todo o ensinamento de vida. Você são mulheres incríveis.

À minha amiga Mônica Voss pela amizade e apoio em todos os momentos. Obrigada por sempre estar presente mesmo estando longe.

Ao Anderson Luiz Oenning pelos ensinamentos e contribuições nos trabalhos desenvolvidos. Obrigada pela sua amizade, conversas divertidas e apoio em momentos difíceis. Obrigada pela inspiração, admiro muito teu foco e persistência.

Ao Rafael César Carvalho da Silva por sempre me animar, me aconselhar e pelos ensinamentos de vida. Obrigada pela sua amizade e por ser o melhor instrutor.

À todos os amigos que fiz em Florianópolis por participarem dessa caminhada.

Aos docentes do Departamento de Química da UFSC, que ao longo do período do Doutorado contribuíram para a minha formação.

Aos funcionários da Pós-Graduação do Departamento de Química-UFSC, por toda a ajuda e esclarecimentos.

À CAPES pela bolsa de pesquisa concedida, sem o financiamento esse trabalho não seria possível.

À UFSC pelo ensino gratuito e de qualidade.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente colaboraram na execução deste trabalho e estiveram comigo ao longo destes 4 anos. Muito obrigada.

## RESUMO

Neste estudo foi proposta a utilização de fases extratoras alternativas em técnicas de microextração para adequar os métodos analíticos aos preceitos da química analítica verde, bem como melhorar a eficiência de extração das técnicas empregadas. Foram desenvolvidos três métodos abordando esse assunto, e em todos os casos, os principais parâmetros que influenciam a extração foram otimizados para a obtenção das melhores eficiências de extração. No primeiro trabalho o material  $\text{Si3Py}^+\text{Cl}^-$  foi sintetizado e caracterizado para ser aplicado na técnica de Extração em Ponteira Descartável (DPX) para a extração de compostos disruptores endócrinos fenólicos de amostras ambientais aquosas. O material apresentou estabilidade química frente a solventes orgânicos geralmente empregados na análise por DPX, uma vez que foi possível realizar até 15 procedimentos de extração sem perda da eficiência. Além disso, o material apresentou alta eficiência de extração para os compostos fenólicos em estudo em comparação a uma fase extratora comercialmente disponível para DPX (estireno-divinilbenzeno). O método proposto DPX- $\text{Si3Py}^+\text{Cl}^-$  também apresentou aspectos ambientalmente amigáveis e de alto rendimento, com tempo de extração curto (3,50 min), uso de pequenos volumes de solventes orgânicos (800  $\mu\text{L}$ ) e pequena massa de fase extratora (30 mg). No segundo trabalho, Líquidos Iônicos Magnéticos (MILs) foram sintetizados e caracterizados. Suas propriedades físico-químicas incluindo hidrofobicidade, pressão de vapor negligenciável e facilidade de ser retirado da solução aquosa com o auxílio de uma barra magnética foram exploradas na técnica de Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME) como uma alternativa aos solventes orgânicos clorados geralmente empregados. O método proposto DLLME/MIL empregando o MIL  $[\text{P}_{6,6,6,14}]_2[\text{MnCl}_4]^{2-}$  foi otimizado e aplicado pela primeira vez na determinação de hormônios em amostras de urina. A metodologia desenvolvida permitiu que as extrações fossem realizadas em tempos curtos (90 s) sem a necessidade de uma etapa de centrifugação, permitindo uma análises de alto rendimento. No terceiro trabalho uma nova classe de solventes denominados Solventes com Hidrofilicidade Comutável (SHSs) foi explorada na técnica de Microextração Líquido-Líquido Homogênea (HLLME) para a determinação de contaminantes provenientes de embalagens alimentícias em água de coco. O método proposto SHS-HLLME empregando o solvente *N,N*-dimetilciclohexalamina (DMCHA) como fase extratora apresentou vantagens como extrações rápidas (2 min), pequeno volume de fase extratora (100  $\mu\text{L}$ ) e uso de solvente menos tóxico como alternativa aos solventes convencionalmente empregados em técnicas de extração/microextração. Isso enfatizou os aspectos de alto rendimento e ambientalmente amigáveis do método desenvolvido, sendo uma vantagem frente aos métodos geralmente utilizados na análise de alimentos. As metodologias foram avaliadas através dos principais parâmetros analíticos de mérito e apresentaram desempenhos analíticos muito satisfatórios. Por fim, os métodos DPX- $\text{Si3Py}^+\text{Cl}^-$ , DLLME/MIL e SHS-HLLME foram aplicados em amostras de água de rio, urina humana e água de coco, respectivamente, evidenciando a versatilidade das fases extratoras alternativas propostas.

**Palavras-chave:** Fase extratora alternativa. DPX. DLLME. HLLME.  $\text{Si3Py}^+\text{Cl}^-$ . MIL. SHS. Amostra ambiental, Amostra biológica. Amostra alimentícia. Preparo de amostra. Disruptores endócrinos. Hormônios estrógenos. Embalagem alimentícia.



## ABSTRACT

In this study, it was proposed the use of alternative extraction phases in microextraction techniques to adapt the analytical methods to the green analytical chemistry precepts, as well as to improve the extraction efficiency of the employed techniques. Three methodologies were developed addressing this issue, and in all cases, the main parameters that influence the extraction were optimized to obtain the best extraction efficiencies. In the first work, the material Si3Py<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup> was synthesized and characterized to be applied in the Disposable Pipette Extraction (DPX) technique for the extraction of phenolic endocrine-disrupting compounds from aqueous environmental samples. The material showed chemical stability against organic solvents generally used in DPX analysis since it was possible to perform up to 15 extraction procedures without loss of efficiency. In addition, the material showed high extraction efficiency for the determination of phenolic compounds under study compared to a commercially-available extraction phase for DPX (styrene-divinylbenzene). The proposed DPX-Si3Py<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup> method also presented high-throughput and environmentally friendly aspects, with short extraction time (3.50 min), use of small volumes of organic solvents (800 µL) and small extraction phase mass (30 mg). In the second work, Magnetic Ionic Liquids (MILs) were synthesized and characterized. Its physicochemical properties including hydrophobicity, negligible vapor pressure, and the ease of retrieve with a rod magnetic from the aqueous solution have been explored in the Dispersive Liquid-Liquid Microextraction (DLLME) technique as an alternative to the commonly used chlorinated organic solvents. The proposed DLLME/MIL method employing the MIL [P<sub>6,6,6,14</sub><sup>+</sup>]<sub>2</sub>[MnCl<sub>4</sub><sup>2-</sup>] was optimized and applied for the first time to the determination of hormones in urine samples. The developed methodology allowed the extractions to be performed in very short times (90 s) without the need for a centrifugation step, allowing for high-throughput analysis. In the third work, a new class of solvents called Switchable Hydrophilicity Solvents (SHSs) was explored using the Homogeneous Liquid-Liquid Microextraction (HLLME) technique for the determination of contaminants from food packaging in coconut water. The proposed SHS-HLLME method employing the solvent N,N-dimethylcyclohexylamine as extraction phase has advantages such as fast extractions (2 min), small extraction phase volume (100 µL), and use of less toxic solvent as an alternative to solvents conventionally employed in extraction/microextraction techniques. These aspects emphasized the high-throughput and environmentally-friendly aspects of the developed method, which is an advantage over the methods commonly used in food analysis. The methodologies were evaluated through the main analytical parameters of merit and presented very satisfactory analytical performances. Finally, the DPX-Si3Py<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>, DLLME/MIL and SHS-HLLME methods were applied to samples of river water, human urine, and coconut water, respectively, showing the versatility of the proposed alternative extraction phases.

**Keywords:** Alternative extraction phase. DPX. DLLME. HLLME. Si3Py<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>. MIL. SHS. Environmental sample. Biological sample. Food sample. Sample preparation. Endocrine-disrupting. Estrogen hormones. Food packaging.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema do procedimento de DLLME. Em (a) injeção da mistura de extrator e dispersor em uma amostra aquosa e formação de uma solução turva composta por microgotas; em (b) centrifugação para separação das microgotas e formação de uma fase sedimentada; e em (c) retirada da fase sedimentada e transferência para um <i>microvial</i> para posterior análise. ....	29
Figura 2 – Ponteira de DPX. ....	32
Figura 3 – Etapas envolvidas na técnica de DPX. Em (1) condicionamento; (2) aspiração da amostra; (3) aspiração de ar; (4) descarte da amostra; (5) limpeza; (6) aspiração de solvente para dessorção líquida; (7) aspiração de ar; e (8) descarte do solvente em frasco para análise. ....	32
Figura 4 – Estrutura química do material $\text{Si3Py}^+\text{Cl}^-$ obtido através do método sol-gel. ....	36
Figura 5 – Comutação de um solvente com hidrofilicidade comutável através da adição e remoção de $\text{CO}_2$ . ....	40
Figura 6 – Espectro de FTIR do material $\text{Si3Py}^+\text{Cl}^-$ . ....	57
Figura 7 – Micrografias do material $\text{Si3Py}^+\text{Cl}^-$ obtidas por MEV. Em (A) ampliação de 1000x e em (B) ampliação de 150x. ....	58
Figura 8 – Otimização da massa de $\text{Si3Py}^+\text{Cl}^-$ usada no procedimento de DPX para a extração de BFA, EE2, 4- <i>t</i> -OF, 4-OF e 4-NF. ....	58
Figura 9 – Superfície resposta triangular obtida para a otimização do solvente de dessorção. $R^2 = 0,9931$ . ....	59
Figura 10 – Superfície resposta obtida utilizando o planejamento <i>Doehlert</i> para o número de ciclos de extração <i>versus</i> o número de ciclos de dessorção para a DPX- $\text{Si3Py}^+\text{Cl}^-$ . $R^2 = 0,9719$ . ....	60
Figura 11 – Avaliação do pH da amostra para o BFA, EE2, 4- <i>t</i> -OF, 4-OF e 4-NF. ....	61
Figura 12 – Avaliação da adição de sal na amostra para o BFA, EE2, 4- <i>t</i> -OF, 4-OF e 4-NF. ....	62
Figura 13 – Avaliação da estabilidade da fase extratora $\text{Si3Py}^+\text{Cl}^-$ . ....	64
Figura 14 – Comparação da eficiência de extração entre DPX- $\text{Si3Py}^+\text{Cl}^-$ e DPX-RP. ....	65
Figura 15 – Resultados para a eficiência de extração de compostos fenólicos com e sem possíveis compostos interferentes. ....	66
Figura 16 – Cromatograma resultante da extração de uma amostra de água de rio fortificada com os analitos BFA, EE2, 4- <i>t</i> -OF, 4-OF e 4-NF na concentração de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ utilizando o	

método proposto DPX-Si3Py <sup>+</sup> Cl <sup>-</sup> . Ordem de eluição: 1) BFA, 2) EE2, 3) 4- <i>t</i> -OF, 4) 4-OF e 5) 4-NF.....	71
Figura 17 – Visão geral do procedimento de extração usando a abordagem baseada em DLLME/MIL.....	81
Figura 18 – Em (A) espectro UV-Vis para o IL [P <sub>6,6,6,14</sub> <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ] e em (B) espectro UV-Vis para o MIL [P <sub>6,6,6,14</sub> <sup>+</sup> ] <sub>2</sub> [MnCl <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ], concentração das espécies: 250 mg mL <sup>-1</sup> em acetonitrila. Em (C) espectro UV-Vis para o IL [Aliquat <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ] e em (D) espectro UV-Vis para o MIL [Aliquat <sup>+</sup> ] <sub>2</sub> [MnCl <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ], concentração das espécies: 70 mg mL <sup>-1</sup> em acetonitrila. ....	84
Figura 19 – Superfície ternária obtida para a otimização do solvente dispersor. Extrações realizadas em amostra de urina diluída (1:40 v/v) fortificada com 400 ng mL <sup>-1</sup> de cada analito. Os experimentos foram realizados usando 20 mg de [P <sub>6,6,6,14</sub> <sup>+</sup> ] <sub>2</sub> [MnCl <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ], 5 µL de solvente dispersor, 120 s de tempo de extração e a dessorção foi realizada em 20 µL de acetonitrila. R <sup>2</sup> = 0,9760.....	85
Figura 20 – Gráfico de Pareto obtido para as variáveis: tempo de extração, concentração de NaCl, volume de MeOH e massa de MIL. Os experimentos foram realizados em amostra de urina diluída (1:40 v/v) fortificada com 400 ng mL <sup>-1</sup> de cada analito. Dessorção realizada em 20 µL de acetonitrila. R <sup>2</sup> = 0,9661.....	86
Figura 21 – Otimização univariada do tempo de extração para o procedimento DLLME/MIL usando 5 µL de MeOH como solvente dispersor, 5 mg de fase extratora ([P <sub>6,6,6,14</sub> <sup>+</sup> ] <sub>2</sub> [MnCl <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ]), 0% de NaCl e 400 ng mL <sup>-1</sup> de cada analito. ....	87
Figura 22 – Avaliação do pH da amostra usando 90 s de tempo de extração, 5 µL de MeOH como solvente dispersor, 5 mg de [P <sub>6,6,6,14</sub> <sup>+</sup> ] <sub>2</sub> [MnCl <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ] como fase extratora, 0% de NaCl e 400 ng mL <sup>-1</sup> de cada analito. ....	88
Figura 23 – Comparação da eficiência de extração entre [Aliquat <sup>+</sup> ] <sub>2</sub> [MnCl <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ] e [P <sub>6,6,6,14</sub> <sup>+</sup> ] <sub>2</sub> [MnCl <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ] usando as condições de extração otimizadas e 100 ng mL <sup>-1</sup> de cada analito. ....	89
Figura 24 – Cromatogramas obtidos a partir da extração de uma amostra de urina sem fortificação (linha tracejada) e a partir de uma amostra de urina fortificada com 100 ng mL <sup>-1</sup> de cada analito (linha sólida) usando a abordagem proposta DLLME/MIL nas condições otimizadas. Ordem de eluição: 1) estriol; 2) 17-β-estradiol; 3) 17-α-etinilestradiol e 4) estrona. ....	91
Figura 25 – Panorama geral do procedimento de extração empregando SHS-HLLME. ....	103
Figura 26 – Otimização univariada do tipo de solvente extrator no procedimento de SHS-HLLME utilizando DMCHA e DPA.....	107

Figura 27 – Superfície resposta obtida utilizando o planejamento <i>Doehlert</i> para o volume de DMCHA <i>versus</i> o volume de NaOH 10 mol L <sup>-1</sup> . R <sup>2</sup> = 0,9316.....	108
Figura 28 – Gráfico de Pareto obtido para as variáveis: volume de amostra, temperatura para a separação das fases e tempo de extração. R <sup>2</sup> = 0,8570.....	109
Figura 29 – Otimização univariada da temperatura para a separação das fases no procedimento de SHS-HLLME. ....	110
Figura 30 – Cromatograma no modo SIM da extração de uma amostra de água de coco natural fortificada com 30 µg L <sup>-1</sup> de cada analito e 10 µg L <sup>-1</sup> do PI na condição otimizada. Analitos: 1) DMF, 2) DEF, 3) BZF, 4) 4-OF, 5) 4-NF, 6) DBF, 7) PI, 8) BBF e 9) DNOF. ....	111
Figura 31 – Gráfico de Lenth obtido para a avaliação da robustez do método proposto SHS-HLLME otimizado. Fatores: P1 – volume de amostra; P2 – volume de DMCHA:HCl; P3 – volume de NaOH 10 mol L <sup>-1</sup> ; P4 – temperatura para a separação das fases; e P5 – tempo de extração.....	114

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Exemplos de MILs e suas estruturas. ....	38
Tabela 2 – Aplicações dos solventes com hidrofiliçidade comutável em técnicas de microextração. ....	42
Tabela 3 – Estrutura e algumas propriedades físico-químicas dos SHSs empregados nesse trabalho (ChemAxion, 2020). ....	45
Tabela 4 – Estrutura e algumas propriedades físico-químicas dos analitos selecionados para esse trabalho. Referência: (ChemAxon, 2020). ....	50
Tabela 5 – Matriz do planejamento <i>Simplex Lattice</i> para a otimização do solvente de dessorção. ....	54
Tabela 6 – Matriz do planejamento <i>Doehlert</i> para o número de ciclos de extração e dessorção. ....	54
Tabela 7 – Equação da reta, coeficientes de correlação, faixas lineares ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ), limites de detecção e quantificação ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) do método proposto usando a $\text{DPX-Si3Py}^+\text{Cl}^-$ . ....	66
Tabela 8 – Tabela ANOVA para a verificação da linearidade das curvas de calibração. ....	67
Tabela 9 – Resultados obtidos para concentração $\pm$ intervalo de confiança ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ), recuperações relativas (%) e desvio padrão relativo (%) para os analitos em água de rio usando o procedimento de $\text{DPX-Si3Py}^+\text{Cl}^-$ otimizado (n=3). ....	68
Tabela 10 – Avaliação da recuperação relativa em três níveis de concentração (2; 20 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ ) através do teste t- <i>Student</i> . ....	69
Tabela 11 – Comparação entre o método proposto $\text{DPX-Si3Py}^+\text{Cl}^-$ com outros métodos reportados na literatura para os mesmos analitos. Todos os estudos empregaram cromatografia líquida como técnica de separação e FLD ou MS/MS como detectores. ....	72
Tabela 12 – Estrutura e propriedades físico-químicas dos analitos selecionados para esse trabalho. ....	79
Tabela 13 – Matriz do planejamento <i>Simplex Lattice</i> para a otimização do solvente dispersor. ....	82
Tabela 14 – Matriz do planejamento fatorial completo $2^4$ para a otimização das variáveis: massa de MIL, volume de solvente dispersor, tempo de extração e concentração de NaCl. ...	82
Tabela 15 – Parâmetros analíticos de mérito para o método proposto DLLME/MIL usando o MIL $[\text{P}_{6,6,6,14}^+]_2[\text{MnCl}_4^{2-}]$ . ....	90
Tabela 16 – Recuperação relativa e RSD dos analitos para as amostras A, B e C, n=3. ....	92

Tabela 17 – Comparação dos parâmetros analíticos de mérito para o procedimento de DLLME/MIL com dados da literatura.....	94
Tabela 18 – Estrutura química, pKa, Log K <sub>ow</sub> , temperatura de ebulição e razões m/z monitoradas para identificação e quantificação dos analitos. Os valores em negrito representam os fragmentos utilizados para a quantificação. Referência: (ChemAxon).....	101
Tabela 19 – Matriz planejamento <i>Doehlert</i> para o volume de SHS:HCl (1:1) <i>versus</i> o volume de NaOH 10 mol L <sup>-1</sup> .....	104
Tabela 20 – Matriz do planejamento fatorial completo 2 <sup>3</sup> .....	105
Tabela 21 – Parâmetros avaliados, condição nominal e variações para o teste de Youden para avaliação da robustez do método.....	106
Tabela 22 – Experimentos realizados considerando a combinação dos parâmetros (variação menor e maior) para o teste de Youden para avaliação da robustez do método.....	106
Tabela 23 – Equação da reta, faixa linear, coeficiente de correção (r), limite de detecção e quantificação para o método proposto usando SHS-HLLME.....	112
Tabela 24 – Recuperação relativa e precisões intra-dia e inter-dia para os analitos em água de coco contida em embalagem alimentícia utilizando o procedimento proposto SHS-HLLME otimizado.....	113
Tabela 25 – Comparação entre o método proposto SHS-HLLME e outros métodos na literatura para os mesmos analitos em matrizes alimentícias.....	115
Tabela 26 – Análise de amostras de água de coco contidas em embalagens alimentícias.....	117

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcEt - Acetato de etila

ACN - Acetonitrila

4-NP - 4-nonilfenol

4-OP - 4-octilfenol

4-*t*-OF - 4-*terc*-octilfenol

BA $\mu$ E - Microextração em Barra Adsorptiva, do inglês *Bar Adsorptive Microextraction*

BBF - Benzil butil ftalato

BFA - Bisfenol A

BZF - Benzofenona

CPTS - Cloropropiltrimetoxisilano

DBF - Dibutil ftalato

DEF - Dietil ftalato

DLLME - Microextração Líquido-Líquido Dispersiva, do inglês *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*

DLLME-MIL - Microextração Líquido-Líquido Dispersiva baseada em Líquidos Iônicos Magnéticos, do inglês *Dispersive Liquid-Liquid Microextractio-based Magnetic Ionic Liquid*

DMCHA - *N,N*-dimetilciclohexilamina

DMF - Dimetil ftalato

DNOF - Di-*n*-octil ftalato

DPA - Dipropilamina

DPX - Extração em Ponteira Descartável, do inglês *Disposable Pipette Extraction*

EE2 - 17- $\alpha$ -etinilestradiol

FE - Fator de Enriquecimento

FTIR - Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier, do inglês *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*

GC-MS - Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas, do inglês *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*

GC-FID - Cromatografia Gasosa com Detector por Ionização de Chama, do inglês *Gas Chromatography-Flame Ionization Detector*

GL - Grau de Liberdade

HF-LPME - Microextração em Fase Líquida com Fibra Oca, do inglês *Hollow-Fiber Liquid-Phase Microextraction*

HLLME - Microextração Líquido-Líquido Homogênea, do inglês *Homogeneous Liquid-Liquid Microextraction*

HLPME – Microextração em Fase-Líquida Homogênea, do inglês *Homogeneous Liquid-Phase Microextraction*

HPAs - Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

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

HPLC-DAD - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos, do inglês *High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detector*

HPLC-FLD - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Fluorescência, do inglês *High Performance Liquid Chromatography-Fluorescence Detector*

HPLC-MS/MS - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas/Massas, do inglês *High performance Liquid Chromatography-Mass/Mass Detector*

HPLC-UV - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Ultravioleta, do inglês *High Performance Liquid Chromatography-Ultraviolet detector*

ILs - Líquidos Iônicos, do inglês *Ionic Liquids*

LC-MS/MS – Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas/Massas, do inglês *Liquid Chromatography-Mass/Mass detector*

LLE - Extração Líquido-Líquido, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*

LPME - Microextração em Fase Líquida, do inglês *Liquid-Phase Microextraction*

LOD - Limite de Detecção, do inglês *Limit of Detection*

LOQ - Limite de Quantificação, do inglês *Limit of Quantification*

MeOH - Metanol

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

MSPE - Extração Magnética em Fase Sólida, do inglês *Magnetic Solid-Phase Extraction*

MILs - Líquidos Iônicos Magnéticos, do inglês *Magnetic Ionic Liquids*

*m/z* - Razão massa/carga

NIAS - Substâncias Não Intencionalmente Adicionadas, do inglês *Non-Intentionally Added Substances*

PI - Padrão Interno

RSD - Desvio Padrão Relativo, do inglês *Relative Standard Deviation*

SBSE - Extração Sortiva em Barra de Agitação, do inglês *Stir-Bar Sorptive Extraction*

SDME - Microextração em Gota Única, do inglês *Single-Drop Microextraction*

SHS - Solvente com Hidrofilicidade Comutável, do inglês *Switchable Hydrophilicity Solvent*



SHS-HLLME: Microextração Líquido-Líquido Homogênea baseada em Solvente com Hidrofilicidade Comutável, do inglês *Switchable Hydrophilicity Solvent-based Homogenous Liquid-Liquid Microextraction*.

SLE - Extração Sólido-Líquido, do inglês *Solid-Liquid Extraction*

SPE - Extração em Fase Sólida, do inglês *Solid Phase Extraction*

SPME - Microextração em Fase Sólida, do inglês *Solid-Phase Microextraction*

TEOS - Ortosilicato de tetraetil

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>22</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>24</b>
2.1	PREPARO DE AMOSTRAS EM QUÍMICA ANALÍTICA.....	24
2.2	TÉCNICAS CLÁSSICAS DE PREPARO DE AMOSTRAS.....	25
2.3	TÉCNICAS DE MICROEXTRAÇÃO.....	27
2.3.1	Microextração Líquido-Líquido Dispersiva - DLLME.....	27
2.3.2	Microextração Líquido-Líquido Homogênea - HLLME .....	30
2.3.3	Extração em Ponteira Descartável – DPX.....	31
2.4	FASES EXTRATORAS ALTERNATIVAS EMPREGADAS EM MICROEXTRAÇÃO .....	34
2.4.1	Cloreto de 3-n-propil(3-metilpiridínio)silsesquioxano - Si3Py <sup>+</sup> Cl <sup>-</sup> .....	35
2.4.2	Líquidos Iônicos – IIs .....	36
2.4.2.1	<i>Líquidos Iônicos Magnéticos – MILs</i> .....	37
2.4.3	Solvente com Hidrofilicidade Comutável – SHS.....	40
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>46</b>
3.1	OBJETIVO GERAL .....	46
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	46
<b>4</b>	<b>EMPREGO DE MATERIAL HÍBRIDO COMO FASE EXTRATORA ALTERNATIVA NA TÉCNICA DE EXTRAÇÃO EM PONTEIRA DESCARTÁVEL PARA O AUMENTO DA EFICIÊNCIA DE EXTRAÇÃO DE DISRUPTORES ENDÓCRINOS FENÓLICOS .....</b>	<b>48</b>
4.1	INTRODUÇÃO .....	48
4.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	51
4.2.1	Reagentes e materiais .....	51
4.2.2	Instrumentação e condições cromatográficas .....	51
4.2.3	Síntese da fase extratora .....	52

<b>4.2.4</b>	<b>Caracterização da fase extratora .....</b>	<b>52</b>
<b>4.2.5</b>	<b>Otimização do procedimento de DPX.....</b>	<b>52</b>
4.2.5.1	<i>Otimização da massa de fase extratora.....</i>	53
4.2.5.2	<i>Otimização do solvente de dessorção.....</i>	53
4.2.5.3	<i>Otimização do número de ciclos de extração e dessorção.....</i>	54
4.2.5.4	<i>Otimização do pH da amostra e adição de sal.....</i>	54
4.2.5.5	<i>Otimização da etapa de limpeza.....</i>	55
<b>4.2.6</b>	<b>Avaliação da estabilidade da fase extratora e eficiência de extração da DPX-Si3Py<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup> na extração de compostos fenólicos .....</b>	<b>55</b>
<b>4.2.7</b>	<b>Parâmetros analíticos de mérito.....</b>	<b>56</b>
<b>4.2.8</b>	<b>Análise de amostras de água de rio .....</b>	<b>56</b>
<b>4.3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>57</b>
<b>4.3.1</b>	<b>Caracterização da fase extratora Si3Py<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup> .....</b>	<b>57</b>
<b>4.3.2</b>	<b>Otimização do procedimento de DPX.....</b>	<b>58</b>
4.3.2.1	<i>Otimização da massa de fase extratora.....</i>	58
4.3.2.2	<i>Otimização do solvente de dessorção.....</i>	59
4.3.2.3	<i>Otimização do número de ciclos de extração e dessorção.....</i>	60
4.3.2.4	<i>Otimização do pH da amostra e adição de sal.....</i>	61
4.3.2.5	<i>Otimização da etapa de limpeza.....</i>	63
<b>4.3.3</b>	<b>Avaliação da estabilidade da fase extratora e possíveis compostos interferentes para o material Si3Py<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup> .....</b>	<b>63</b>
<b>4.3.4</b>	<b>Parâmetros analíticos de mérito.....</b>	<b>66</b>
<b>4.3.5</b>	<b>Análise de amostras de água de rio .....</b>	<b>74</b>
<b>4.4</b>	<b>CONCLUSÕES PARCIAIS .....</b>	<b>75</b>
<b>5</b>	<b>LÍQUIDOS IÔNICOS MAGNÉTICOS COMO FASE EXTRATORA VERSÁTIL PARA A RÁPIDA DETERMINAÇÃO DE HORMÔNIOS ESTRÓGENOS EM URINA HUMANA USANDO MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-</b>	

<b>LÍQUIDO DISPERSIVA E CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECTOR DE ARRANJO DE DIODOS .....</b>	<b>76</b>	
5.1	INTRODUÇÃO..... 76	
5.2	MATERIAIS E MÉTODOS..... 78	
5.2.1	Reagentes e materiais ..... 78	
5.2.2	Instrumentação ..... 79	
5.2.3	Síntese e caracterização dos MILs ..... 80	
5.2.4	Procedimento baseado na DLLME/MIL..... 80	
5.2.5	Coleta das amostras..... 81	
5.2.6	Otimização do procedimento de DLLME/MIL ..... 81	
5.2.7	Parâmetros analíticos de mérito e aplicação em amostras de urina humana 83	
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 84	
5.3.1	Síntese e caracterização dos MILs ..... 84	
5.3.2	Otimização das condições de extração..... 84	
5.3.2.1	<i>Solvente Dispersor</i> ..... 84	
5.3.2.2	<i>Planejamento fatorial completo 2<sup>4</sup></i> ..... 85	
5.3.2.3	<i>Avaliação do pH da amostra</i> ..... 87	
5.3.3	Comparação da eficiência de extração ..... 88	
5.3.4	Parâmetros analíticos de mérito e aplicação em amostras de urina humana 89	
5.4	CONCLUSÕES PARCIAIS..... 95	
<b>6</b>	<b>EXPLORANDO O USO DE SOLVENTES COM HIDROFILICIDADE COMUTÁVEL COMO FASE EXTRATORA PARA DETERMINAÇÃO DE CONTAMINANTES PROVENIENTES DE EMBALAGENS ALIMENTÍCIAS EM ÁGUA DE COCO UTILIZANDO CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS .....</b>	<b>96</b>
6.1	INTRODUÇÃO..... 96	
6.2	MATERIAIS E MÉTODOS..... 100	
6.2.1	Reagentes e materiais ..... 100	

<b>6.2.2</b>	<b>Instrumentação e condições cromatográficas .....</b>	<b>102</b>
<b>6.2.3</b>	<b>Otimização do procedimento SHS-HLLME .....</b>	<b>102</b>
6.2.3.1	<i>Avaliação do tipo de SHS .....</i>	<i>103</i>
6.2.3.2	<i>Avaliação do volume de SHS e NaOH 10 mol L<sup>-1</sup> .....</i>	<i>103</i>
6.2.3.3	<i>Planejamento Fatorial Completo 2<sup>3</sup> .....</i>	<i>104</i>
6.2.3.4	<i>Avaliação da temperatura para a separação das fases.....</i>	<i>105</i>
<b>6.2.4</b>	<b>Parâmetros analíticos de mérito.....</b>	<b>105</b>
<b>6.2.5</b>	<b>Análise de amostras de água de coco contidas em embalagens alimentícias</b>	<b>106</b>
<b>6.3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>107</b>
<b>6.3.1</b>	<b>Otimização do procedimento SHS-HLLME .....</b>	<b>107</b>
6.3.1.1	<i>Avaliação do tipo de SHS .....</i>	<i>107</i>
6.3.1.2	<i>Avaliação do volume de DMCHA e NaOH 10 mol L<sup>-1</sup> .....</i>	<i>108</i>
6.3.1.3	<i>Planejamento Fatorial Completo 2<sup>3</sup> .....</i>	<i>109</i>
6.3.1.4	<i>Avaliação da temperatura para a separação das fases.....</i>	<i>110</i>
<b>6.3.2</b>	<b>Parâmetros analíticos de mérito.....</b>	<b>111</b>
<b>6.3.3</b>	<b>Análise de amostras de água de coco contidas em embalagens alimentícias</b>	<b>116</b>
<b>6.4</b>	<b>CONCLUSÕES PARCIAIS .....</b>	<b>118</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO FINAL E PERSPECTIVAS .....</b>	<b>119</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>122</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O preparo de amostras é uma das etapas mais importantes da metodologia analítica para a obtenção de resultados confiáveis. É empregada para reduzir interferentes, pré-concentrar os analitos e transferir os analitos para um meio compatível com a instrumentação analítica. As técnicas convencionais de preparo de amostras ainda são muito empregadas em laboratórios de rotina e aceitas em metodologias oficiais por muitas organizações. Contudo, muitas dessas são técnicas morosas e utilizam grandes volumes de solventes tóxicos, promovendo um maior risco para o analista e para o meio ambiente (Queiroz *et al.*, 2001; Borges *et al.*, 2015; Gama *et al.*, 2019).

Nesse contexto, surgiram as técnicas de microextração, as quais são baseadas em conceitos de miniaturização e simplificação das metodologias analíticas. Suas principais vantagens são a utilização de menores volumes de amostra e solventes orgânicos, bem como a possibilidade de pré-concentração dos analitos, permitindo a determinação em concentrações a nível traço e *clean-up* das amostras para reduzir interferências (Niu *et al.*, 2018).

Há uma crescente demanda por métodos que permitam determinar concentrações cada vez menores de uma gama de compostos orgânicos presentes em diferentes matrizes, tais como aquosas, biológicas e alimentícias. Assim, para suprir essa demanda, observa-se a necessidade do constante desenvolvimento e aperfeiçoamento das técnicas de preparo de amostras.

Uma tendência nessa área é a utilização de fases extratoras alternativas em técnicas de microextração. A grande vantagem dessa abordagem é a possibilidade de utilizar fases extratoras com elevada capacidade de extração e específicas para um grupo de analitos, conferindo assim uma melhora na seletividade, exatidão e precisão, além de limites de detecção (LODs) e quantificação (LOQs) mais baixos para o método analítico. Outra vertente é com relação à possibilidade de aumentar a vida útil dos dispositivos de extração empregando fases extratoras com estabilidade térmica, química ou mecânica melhorada. Também, há a possibilidade de adequar os métodos aos preceitos da química analítica verde, através da utilização de fases extratoras renováveis, tais como os biossorventes.

Dessa forma, o foco desse trabalho foi explorar o uso de fases extratoras alternativas em técnicas de microextração com o intuito de superar algumas limitações encontradas. No primeiro trabalho foi observada a deficiência de fases extratoras comercialmente disponíveis para a técnica de DPX (Extração em Ponteira Descartável, do inglês *Disposable Pipette Extraction*) para a extração de compostos com porções mais polares em sua estrutura. Dessa

forma, o material  $\text{Si3Py}^+\text{Cl}^-$  foi sintetizado, caracterizado e aplicado na extração de disruptores endócrinos fenólicos de amostras de água de rio.

No segundo trabalho, foram sintetizados e caracterizados MILs (Líquidos Iônicos Magnéticos, do inglês *Magnetic Ionic Liquids*) para serem empregados como solventes extratores alternativos aos orgânicos clorados geralmente utilizados na técnica de DLLME (Microextração Líquido-Líquido Dispersiva, do inglês *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*), adequando o método aos preceitos da química analítica verde. Adicionalmente, foram exploradas as características dos MILs com o intuito de aumentar a seletividade do método e o fator de pré-concentração dos analitos. Vale ressaltar que nesse trabalho os MILs foram aplicados pela primeira vez na extração de compostos orgânicos de amostras complexas, no caso, foram determinados hormônios em urina humana.

No terceiro trabalho, foi explorada a utilização de uma nova classe de solventes introduzidos em 2013 na área de preparo de amostras, os SHSs (Solventes com Hidrofilicidade Comutável, do inglês *Switchable Hydrophilicity Solvents*). Eles foram empregados como fase extratora alternativa aos solventes tóxicos geralmente empregados em técnicas de extração e microextração para a determinação de contaminantes provenientes de embalagens alimentícias em amostras de água de coco. Com a utilização dos SHSs em conjunto com a técnica de HLLME (Microextração Líquido-Líquido Homogênea, do inglês *Homogeneous Liquid-Liquid Microextraction*) foi possível desenvolver um método rápido e mais ambientalmente amigável do que os métodos reportados na literatura para a análise de alimentos.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 PREPARO DE AMOSTRAS EM QUÍMICA ANALÍTICA

O desenvolvimento de um método analítico compreende várias etapas conhecidas como sequência analítica que consistem da definição do problema, da amostragem, do armazenamento e transporte, do preparo da amostra, da análise instrumental, da validação analítica e da avaliação estatística e tomada de decisões. Dentre essas etapas, o preparo da amostra é uma etapa crucial, pois pode acarretar nos maiores erros devido à contaminação e perdas de analito, além disso, geralmente é a etapa que demanda de mais tempo, de 60 a 85% do tempo total do procedimento analítico (Stashenko e Martínez, 2011; Borges *et al.*, 2015).

Na maioria dos casos ela é fundamental, pois, apesar do desenvolvimento da instrumentação analítica, normalmente os equipamentos ainda não conseguem operar diretamente com a matriz. Esse procedimento tem como objetivos: (a) extrair os analitos da matriz da amostra, diminuindo assim os interferentes; (b) transferir os analitos para uma solução compatível com a instrumentação analítica; e (c) pré-concentrar os analitos, característica importante principalmente quando os analitos estão presentes em concentrações a nível traço. Assim, a etapa de preparo de amostra é crucial para o sucesso do método analítico (Borges *et al.*, 2015; Carasek *et al.*, 2018; Zhou *et al.*, 2019).

Para a escolha da técnica de preparo de amostra mais adequada é necessário o conhecimento das propriedades químicas dos analitos e da fase extratora, bem como das propriedades do ambiente químico onde o analito se encontra, além da compatibilidade da técnica de extração com a instrumentação analítica (Borges *et al.*, 2015). Diversas técnicas de preparo de amostras têm sido desenvolvidas e aperfeiçoadas para se obter métodos cada vez mais precisos, exatos e com LODs e LOQs mais baixos. Além disso, pesquisas constantes são realizadas para desenvolver e/ou aplicar técnicas de preparo de amostras na extração de analitos presentes em amostras complexas, tais como, amostras biológicas (urina, sangue, saliva), amostras de águas residuais, alimentos, solo, dentre outras.

Também há uma tendência para o desenvolvimento de métodos que atendam aos princípios da química analítica verde. Nessa vertente, busca-se eliminar o uso de solventes tóxicos, reduzir o tempo de preparo da amostra, diminuir a energia empregada, reduzir custos, reduzir a geração de resíduos e automatizar os métodos analíticos (Galuszka *et al.*, 2013; Carasek *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2019; Maciel *et al.*, 2019).



As técnicas de preparo de amostras estão divididas em técnicas clássicas e técnicas de microextração. Hoje os estudos estão mais voltados para as técnicas de microextração devido às vantagens que apresentam, tais como: o baixo consumo de solvente e amostra, a menor geração de resíduo, a maior segurança oferecida ao analista, a alta eficiência de extração e a possibilidade de automação (Carasek *et al.*, 2018). Apesar de as técnicas de microextração serem uma alternativa interessante aos procedimentos clássicos de extração, esses ainda são muito empregados em laboratórios de rotina e aceitos em metodologias oficiais por muitas organizações.

## 2.2 TÉCNICAS CLÁSSICAS DE PREPARO DE AMOSTRAS

Dentre as técnicas clássicas de preparo de amostras, as mais difundidas são a LLE (Extração Líquido-Líquido, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*), a SLE (Extração Sólido-Líquido, do inglês *Solid-Liquid Extraction*) e a SPE (Extração em Fase Sólida, do inglês *Solid Phase Extraction*). Essas técnicas ainda são muito utilizadas em laboratórios de análise de rotina. Porém, apresentam as desvantagens de serem dispendiosas e utilizarem grandes quantidades de solventes orgânicos tóxicos, o que vai contra os preceitos da química verde (Carasek *et al.*, 2018; Maciel *et al.*, 2019).

A LLE é também conhecida como extração por solvente orgânico ou partição. É uma técnica empregada para o preparo de amostras líquidas ou solúveis. Nela ocorre a partição da amostra em duas fases imiscíveis (orgânica e aquosa). A eficiência de extração depende principalmente da afinidade do analito pelo solvente extrator. Uma das vantagens dessa técnica é a sua simplicidade, pois geralmente são utilizados funil de separação ou tubos de centrífuga na extração. Além disso, os solventes empregados estão disponíveis comercialmente em grau de pureza adequado. Contudo, essa técnica apresenta inúmeras desvantagens como: perdas de analitos que possuem grande afinidade com a água, formação de emulsões, necessidade de grande volume de amostra e de solventes orgânicos (geralmente esses solventes são tóxicos), difícil automação, entre outros (Queiroz *et al.*, 2001; Borges *et al.*, 2015).

Outra técnica de extração ainda muito difundida em laboratórios de química orgânica e analítica é a SLE utilizando *Soxhlet*, a qual consiste na passagem de um solvente orgânico por uma amostra sólida a fim de extrair os analitos que possuem afinidade com o solvente. Nesse sistema ocorre o refluxo do solvente. As principais desvantagens são os longos tempos

de extração, a utilização de grandes volumes de solventes orgânicos e a necessidade de uma etapa de secagem do solvente para concentrar os analitos (Carasek *et al.* 2018).

A SPE também pode ser considerada uma técnica de extração clássica. Ela foi introduzida no início dos anos 1970 e é uma das mais utilizadas no preparo de amostras ambientais, farmacêuticas e de alimentos. É uma técnica de separação sólido-líquido e está baseada nos mecanismos de adsorção, partição, troca iônica e exclusão. Dentre as principais forças químicas e físicas que atuam entre as moléculas do analito e do sorvente destacam-se as interações de Van der Waals entre as ligações carbono-hidrogênio do analito com os grupos funcionais da superfície da sílica, no caso de fase reversa. Em fase normal, as principais interações são entre os grupos polares do analito e da fase sólida por meio de ligação de hidrogênio, interações  $\pi$ - $\pi$ , dipolo-dipolo, dipolo-dipolo induzido e dipolo induzido-dipolo induzido. No modo troca iônica, as interações iônicas são responsáveis pela extração seletiva dos analitos (Jardim, 2010; Borges *et al.*, 2015).

A configuração mais comum da SPE consiste de cartuchos na forma de seringa de 1 a 6 mL, os quais contêm cerca de 50 a 500 mg de fase sólida e 40 a 60  $\mu$ m de tamanho de partícula, fixa no tubo através de dois filtros de tamanho de poros de 20  $\mu$ m. O procedimento de extração geralmente consiste de quatro etapas: (1) condicionamento ou ativação do sorvente; (2) introdução ou percolação da amostra e retenção do analito e às vezes de alguns interferentes; (3) limpeza para retirar os interferentes da matriz menos retidos que o analito; e (4) eluição e coleta do analito (Borges *et al.*, 2015).

As principais vantagens da SPE em comparação com as técnicas citadas anteriormente são o emprego de menores volumes de solventes orgânicos, ausência de emulsões, facilidade de automação e fator de concentração adequado para analitos em concentrações traço. Contudo, ela apresenta algumas desvantagens como o alto custo dos cartuchos, que geralmente são empregados uma única vez encarecendo a análise, além de gerar grande quantidade de resíduo. Outro inconveniente dessa técnica é o elevado tempo de extração (Borges *et al.*, 2015).

Tendo em vista os problemas relacionados com as técnicas de preparo de amostras convencionais, surgiram as técnicas de microextração que são baseadas nos conceitos de miniaturização e simplificação das técnicas de extração. Essas novas técnicas visam a redução ou a não utilização de solventes orgânicos, a não geração ou geração mínima de resíduos, a redução do volume de amostra e a automatização, indo ao encontro dos preceitos da química analítica verde (Carasek *et al.*, 2018; Oliveira *et al.*, 2008).

## 2.3 TÉCNICAS DE MICROEXTRAÇÃO

Dentre as técnicas de microextração, as mais difundidas são a SPME (Microextração em Fase Sólida, do inglês *Solid-Phase Microextraction*), a SBSE (Extração Sortiva em Barra de Agitação, do inglês *Stir-Bar Sorptive Extraction*), a BA $\mu$ E (Microextração em Barra Adsorptiva, do inglês *Bar Adsorptive Microextraction*), a DPX e a LPME (Microextração em Fase Líquida, do inglês *Liquid-Phase Microextraction*) que engloba várias técnicas, dentre elas a DLLME, a HLLME e a SDME (Microextração em Gota Única, do inglês *Single-Drop Microextraction*). Para este trabalho foram utilizadas três técnicas de microextração: a DPX, a DLLME e a HLLME.

### 2.3.1 Microextração Líquido-Líquido Dispersiva - DLLME

A LPME engloba uma variedade de técnicas que são essencialmente versões miniaturizadas da LLE destacando-se dentre elas a DLLME (Kokosa, 2015). Essa técnica foi proposta em 2006 por Rezaee e colaboradores (Rezaee *et al.*, 2006), é baseada na partição dos analitos entre duas fases imiscíveis, uma aquosa (amostra) e outra orgânica (solvente orgânico). A solubilização dos analitos nas fases depende da polaridade do sistema. Os analitos são geralmente apolares, apresentando maior afinidade pela fase orgânica apolar do que pela fase aquosa altamente polar, sendo o equilíbrio resultante representado pela equação 1, onde A é o analito (Borges *et al.*, 2015).



Em um caso ideal, a razão das atividades do analito A nas duas fases é uma constante independente da quantidade de A, e para uma dada temperatura a constante de equilíbrio ( $K_D$ ) é o coeficiente de partição, como representado na equação 2.

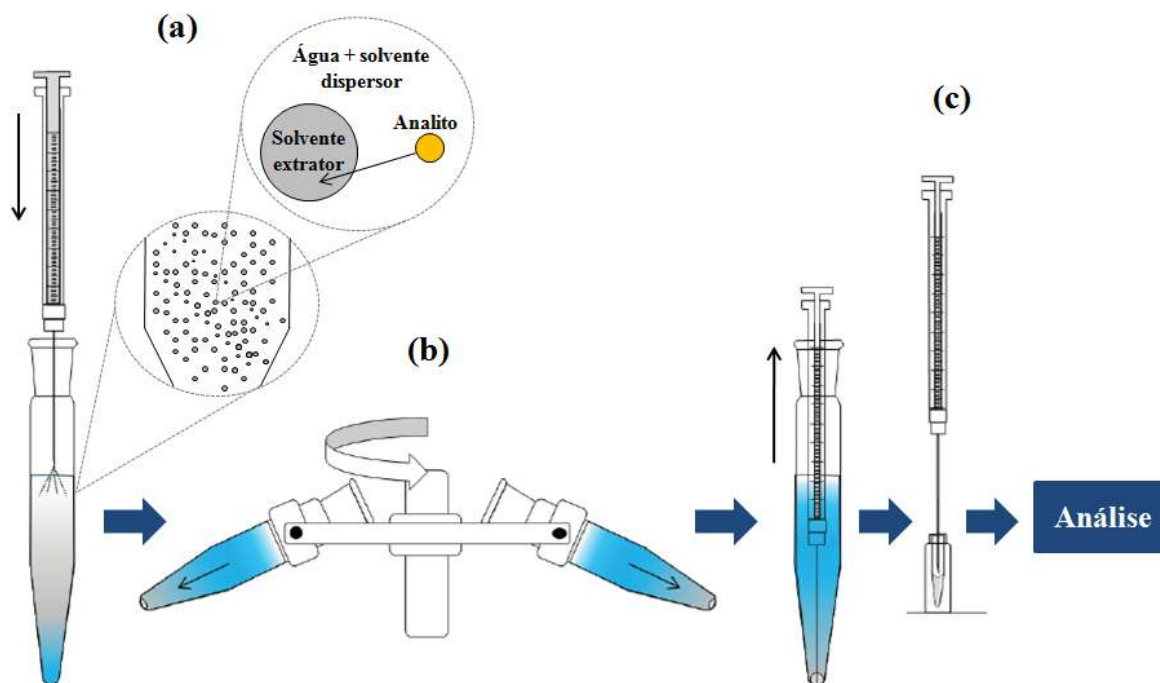
$$K_D = \frac{[A_{org}]}{[A_{aq}]} \quad \text{Equação (2)}$$

Após atingido o tempo necessário para a partição dos analitos, as fases são separadas. Alguns fatores afetam a polaridade relativa do sistema, tais como a concentração de sal, o pH da amostra e misturas de solventes solúveis ou parcialmente solúveis na fase aquosa. Se após

a extração, a concentração de analito na fase orgânica for próxima de 100%, a DLLME é considerada uma técnica de extração exaustiva. Se a transferência de analito entre a fase aquosa e orgânica for parcial, a DLLME é considerada uma técnica de extração baseada no equilíbrio de partição (Borges *et al.*, 2015).

O procedimento de DLLME é baseado em um sistema ternário de solventes, constituído de uma mistura de solvente extrator (imiscível na amostra aquosa) e solvente dispersor (miscível no solvente extrator e na amostra aquosa). Essa mistura é rapidamente introduzida na amostra com o auxílio de uma seringa, formando uma solução turva com microgotas que apresentam grande área superficial. Consequentemente, o equilíbrio é rapidamente alcançado e a extração é independente do tempo, melhorando assim consideravelmente a frequência analítica do método. As microgotas consistem no solvente extrator mais o analito já extraído. Após, é procedida a etapa de centrifugação, onde ocorre a sedimentação das microgotas formando uma fase sedimentada, a qual é retirada com o auxílio de uma seringa e então, é efetuada a determinação dos analitos pela técnica mais apropriada (Kokosa, J. M. *et al.*, 2009; Caldas *et al.*, 2011; Borges *et al.*, 2015; Campillo *et al.*, 2017). Na Figura 1 está apresentado um esquema que demonstra as etapas envolvidas em um típico procedimento de DLLME.

Figura 1 – Esquema do procedimento de DLLME. Em (a) injeção da mistura de solvente extrator e dispersor em uma amostra aquosa e formação de uma solução turva composta por microgotas; em (b) centrifugação para separação das microgotas e formação de uma fase sedimentada; e em (c) retirada da fase sedimentada e transferência para um *microvial* para posterior análise.



Fonte: Adaptado de (Caldas *et al.*, 2011).

A DLLME apresenta diversos parâmetros que precisam ser otimizados para que a eficiência de extração seja adequada. Uma das variáveis que mais influencia a extração em DLLME é o solvente extrator, que deve ser escolhido de acordo com a sua densidade, capacidade de extração dos analitos e adequação ao equipamento de quantificação (Borges *et al.*, 2015). Os solventes extratores mais empregados na técnica de DLLME clássica são os solventes clorados, tais como o clorofórmio, clorobenzeno e tetracloreto de carbono (Liang e Sang, 2008; Xiong *et al.*, 2009; Shokoufi e Hamdamali, 2010; Fernandez *et al.*, 2013; Fernandez *et al.*, 2014; Gardner *et al.*, 2015). Apesar desses solventes apresentarem boa capacidade de extração, é importante ressaltar sua toxicidade, o que representa riscos para o analista e ao meio ambiente. Além disso, apresentam alta volatilidade, o que pode acarretar em problemas de reprodutibilidade do método analítico. O volume de solvente extrator determina o fator de concentração da DLLME. Geralmente o sinal analítico aumenta com o aumento do volume de solvente extrator devido ao aumento do número de microgotas e assim, da eficiência de extração. Contudo, também ocorre o aumento do volume de fase sedimentada, resultando em um menor fator de concentração. Portanto, o volume ótimo de

solvente extrator é o que garante um alto fator de concentração ao mesmo tempo que gera um volume de fase sedimentada suficiente para a análise (Campillo *et al.* 2017).

A escolha do solvente dispersor deve ser feita com base na sua solubilidade tanto na fase orgânica quanto na fase aquosa. O volume de solvente dispersor também influencia a quantidade de fase sedimentada formada. A força iônica da solução aquosa influencia na separação das fases, uma vez que a adição de sal faz com que diminua a solubilidade do solvente dispersor na fase aquosa, aumentando assim o volume de fase sedimentada. O ajuste do pH do meio também é de suma importância, uma vez que é preferível que os analitos se encontrem na forma neutra para facilitar a partição dos mesmos nas microgotas de solvente extrator (Campillo *et al.* 2017).

As principais vantagens apresentadas pela DLLME são: o rápido equilíbrio de extração, o uso de pequenos volumes de solventes orgânicos e pequeno volume de amostra, a baixa geração de resíduo e as altas eficiências de extração. Porém, a DLLME na sua versão clássica apresenta a desvantagem de utilizar solventes orgânicos clorados que são escolhidos geralmente pela alta densidade que apresentam. Dentre eles os mais utilizados são: clorofórmio (utilizado em 18,6% dos artigos publicados), tetracloreto de carbono (15,1%), clorobenzeno (6,3%), tetracloroetileno (2,8%), diclorometano (2,8%), tetracloroetano (1,8%), tricloroetileno (1,6%), diclorobenzeno (0,8%), dicloroetano (0,6%), dibromoetano (0,6%) e tricloroetano (0,5%) (Campillo *et al.* 2017).

### 2.3.2 Microextração Líquido-Líquido Homogênea - HLLME

A HLLME é baseada em princípios similares aos da DLLME. Porém na HLLME, a fase orgânica entra em contato com a fase aquosa formando uma única fase, assim, não há formação de interface entre a fase orgânica e aquosa, o que fornece uma superfície de contato infinitamente grande para a extração (Cabuk *et al.*, 2014; Havlikova *et al.*, 2019).

A extração compreende duas etapas: primeiramente é promovida a completa miscibilidade das fases doadora (amostra) e receptora (fase orgânica); após, é realizada a separação das fases através da adição ou remoção de um reagente específico. Dessa forma, os analitos passam para um pequeno volume de solvente orgânico (Ahmar *et al.*, 2018).

Vários métodos têm sido empregados para a separação das fases na técnica de HLLME, como adição de sal para promover o efeito *salting-out* (Farajzadeh *et al.*, 2013; Akramipour *et al.*, 2016), sistemas com surfactantes perfluorados (Ghiasvand *et al.*, 2005) e formação de par iônico (Jamali *et al.*, 2007). Em 2013 foi proposto um sistema dependente do

pH (Ebrahimpour *et al.*, 2013). Para esse sistema o solvente deve ter solubilidade na fase aquosa dependente do pH e densidade menor que a da água. Por isso, a seleção do solvente de extração é restrita a poucos solventes orgânicos (Cabuk *et al.*, 2014).

Uma nova classe de solventes que possuem as características necessárias para serem empregados como fase extratora na técnica de HLLME é a dos SHSs. Eles têm ganhado atenção devido aos aspectos ambientalmente amigáveis que apresentam, pois são menos tóxicos que os solventes geralmente empregados em técnicas de extração (Jessop *et al.*, 2010; Vanderveen *et al.*, 2014). Eles comutam entre uma forma miscível e uma forma imiscível em solução aquosa, dependendo do pH do meio. A mudança de pH geralmente é realizada através da adição e remoção de CO<sub>2</sub> ou adição de um reagente específico, como por exemplo hidróxido de sódio.

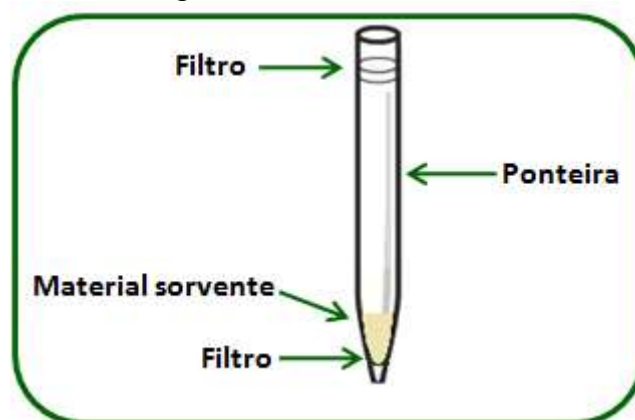
As principais vantagens da técnica de HLLME são: o rápido equilíbrio de extração, o que reduz o tempo de preparo da amostra; a simplicidade, ou seja, não é necessário utilizar nenhum aparato e/ou reagente especial; a boa eficiência de extração; o baixo custo; e o baixo consumo de amostra e solvente orgânico. Com a utilização de SHS o método também se torna mais ambientalmente amigável (Ebrahimpour *et al.*, 2013; Yazdanfar *et al.*, 2014; Ahmar *et al.*, 2018).

Os principais parâmetros que podem afetar a extração utilizando a técnica de HLLME e que devem ser avaliados são o tipo e o volume de solvente extrator, o volume de amostra, a adição de sal para promover o efeito *salting-out*, o tempo de extração, o reagente utilizado para promover a separação das fases, e a necessidade de utilizar um auxiliar para acelerar esse processo, o qual pode ser aquecimento ou congelamento (Ebrahimpour *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2016).

### 2.3.3 Extração em Ponteira Descartável – DPX

A DPX foi desenvolvida pelo Dr. William Brewer na Universidade da Carolina do Sul, EUA, em 2003, sendo uma modificação da SPE. O dispositivo de DPX consiste em uma ponteira com capacidade de 1 a 5 mL preenchida com material sorvente disperso entre dois filtros, como pode ser observado na Figura 2.

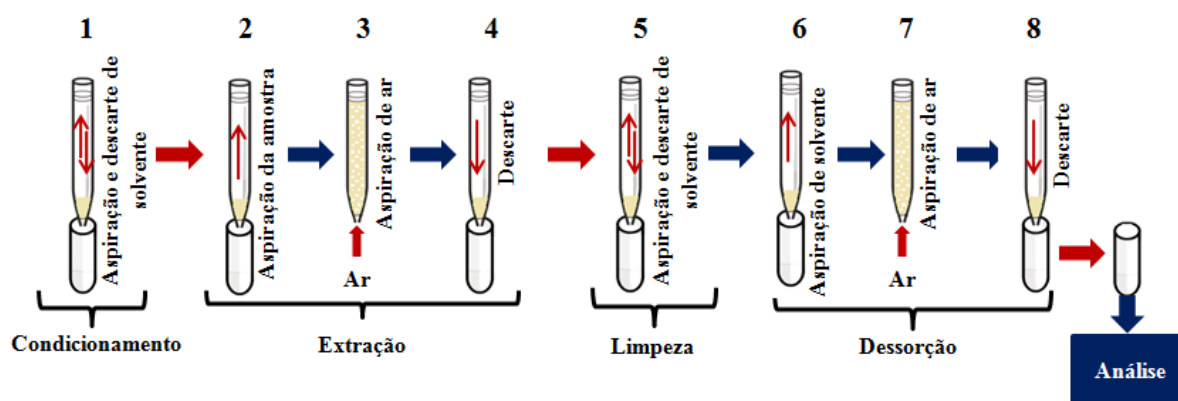
Figura 2 – Ponteira de DPX.



Fonte: Adaptado de (Brewer, 2003).

A DPX é baseada no mesmo princípio da SPE e apresenta algumas etapas semelhantes. A separação do analito da matriz ocorre através da afinidade do analito presente na amostra pela fase extratora presente na ponteira (fase sólida). Na Figura 3 estão apresentadas as etapas envolvidas na extração por DPX: (1) condicionamento da fase extratora para ativação dos sítios sorventes; (2) aspiração da amostra; (3) aspiração de ar para realização da mistura dinâmica entre amostra e fase extratora; (4) descarte da amostra; (5) limpeza para remoção de interferentes (etapa opcional); (6) aspiração de solvente para dessorção líquida do analito; (7) aspiração de ar para realizar a mistura dinâmica entre solvente e fase extratora; e (8) descarte do solvente em frasco para análise (Brewer, 2003; Bordin *et al.*, 2016).

Figura 3 – Etapas envolvidas na técnica de DPX. Em (1) condicionamento; (2) aspiração da amostra; (3) aspiração de ar; (4) descarte da amostra; (5) limpeza; (6) aspiração de solvente para dessorção líquida; (7) aspiração de ar; e (8) descarte do solvente em frasco para análise.



Fonte: Autoria própria (2019).



O modo como a fase extratora está dispersa dentro da ponteira, bem como a aspiração de ar, permitem uma mistura dinâmica da amostra com a fase extratora, levando a um rápido equilíbrio de sorção entre o analito e a fase sólida, que retém seletivamente o analito. Assim, a DPX apresenta vantagens sobre outras técnicas de microextração, tais como: extrações rápidas e de fácil execução, não necessitando de experiência prévia do analista; utilização de menores massas de fase extratora bem como pequenos volumes de amostra e solventes orgânicos, gerando menores quantidades de resíduo e contribuindo com a química verde. Sua configuração permite o fluxo bidimensional de solvente e amostra, além de fácil automação, resultando no aumento da frequência analítica; apresenta alta eficiência de extração e menor custo em comparação a SPE tradicional (Brewer, 2003; Borges *et al.*, 2015; Bordin *et al.*, 2016).

Os principais parâmetros que podem influenciar a extração por DPX são o tipo e a massa de fase extratora, o volume de amostra, o número de ciclos de extração, o tempo de extração, o tipo e volume do solvente de dessorção, o número de ciclos de dessorção, o tempo de dessorção, o pH e a força iônica da amostra.

Na extração por DPX a escolha da fase extratora deve ser feita de acordo com as características dos analitos. Diversas fases extradoras são vendidas comercialmente pela DPXLabs (DPX technologies, 2020), a qual disponibiliza informações sobre o emprego das ponteiras. Outra possibilidade, quando fases comerciais não estão disponíveis para uma aplicação específica, é adquirir ponteiras de DPX sem fase extratora (DPX-branco) e usar um material alternativo. Com relação à massa da fase extratora, o seu aumento pode proporcionar um aumento na extração dos analitos (Pawliszyn, 2009). Porém, é importante avaliar a capacidade da ponteira de DPX (geralmente 1 mL). Dessa forma, a massa deve ser compatível com o tamanho da ponteira de DPX para permitir a mistura dinâmica entre fase extratora e amostra aquosa contendo os analitos. Massas altas podem dificultar a mistura dinâmica reduzindo assim a eficiência de extração (Corazza *et al.*, 2017).

Na técnica de DPX um ciclo de extração compreende a aspiração da amostra, aspiração de ar, permanência da amostra na ponteira (tempo de extração) e descarte da amostra. Assim, pode-se realizar um ciclo de extração ou quantos forem necessários usando a mesma alíquota ou alíquotas novas da amostra. Quando alíquotas novas são inseridas, um volume maior de amostra é utilizado na extração e uma nova porção dos analitos fica disponível para interagir com a fase extratora, aumentando a pré-concentração dos analitos. Quando se utilizam alíquotas novas da amostra, a tendência é que os analitos sejam extraídos até a saturação da fase extratora (Corazza *et al.*, 2017).

Com relação à etapa de dessorção, um ciclo de dessorção compreende a aspiração do solvente de dessorção, aspiração de ar, permanência do solvente de dessorção na ponteira (tempo de dessorção) e coleta do solvente contendo os analitos em um frasco para análise. Nessa etapa é importante avaliar o solvente mais adequado, ou seja, com maior capacidade de romper a interação analito-fase extratora (Bordin *et al.*, 2016). Também é necessário avaliar o volume de solvente utilizado na dessorção, volumes pequenos resultam em uma maior pré-concentração dos analitos e, assim, melhores LODs e LOQs podem ser alcançados. Contudo, também podem prejudicar a precisão do método, uma vez que o volume pode ser insuficiente para a adequada dessorção dos analitos. Além disso, pode ser necessário mais de um ciclo de dessorção para romper a interação analito-fase extratora (Corazza *et al.*, 2017).

Na técnica de DPX os equilíbrios de extração e dessorção são rapidamente atingidos, sendo suficiente alguns segundos. Assim, os tempos de extração e dessorção podem ser otimizados variando de zero a alguns segundos. Além disso, alguns trabalhos reportados na literatura têm fixado o volume de amostra, o volume de solvente de dessorção, o tempo de extração e o tempo de dessorção (Guan *et al.*, 2010; Pena-Abaurrea *et al.*, 2013; Bordin *et al.*, 2014; Andersson *et al.*, 2016; Pinto *et al.*, 2017).

Outro parâmetro que deve ser considerado é o pH da amostra. O melhor pH depende do mecanismo de extração da fase sorvente. Em alguns casos é preferível que o analito esteja na forma neutra. Entretanto, algumas fases extratoras para DPX utilizam o mecanismo de troca aniônica ou catiônica para a extração, sendo necessário que o analito esteja na forma ionizada. Por fim, a força iônica da amostra aquosa também pode influenciar na extração, uma vez que a solubilidade de compostos orgânicos em água pode diminuir com o aumento da força iônica, facilitando a sua migração para a fase extratora (efeito *salting-out*). Esse efeito é observado principalmente para compostos polares e com média-polaridade (Kokosa, J. M.; *et al.*, 2009; Dias *et al.*, 2015).

Apesar das vantagens apresentadas pelas técnicas de microextração ainda busca-se um melhoramento dos métodos analíticos e isso pode ser realizado através do estudo de fases extratoras alternativas.

## 2.4 FASES EXTRATORAS ALTERNATIVAS EMPREGADAS EM MICROEXTRAÇÃO

Há uma crescente demanda para o melhoramento dos métodos analíticos com relação à diminuição da utilização de reagentes e geração de resíduos, bem como para a obtenção de

resultados confiáveis e adequados às legislações mais exigentes. Dessa forma, fases extratoras alternativas vêm sendo constantemente desenvolvidas e estudadas.

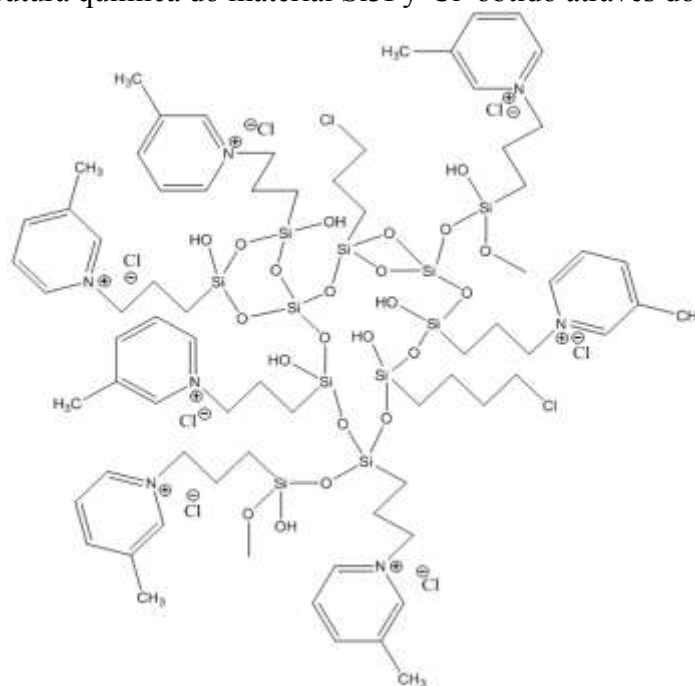
Dependendo da técnica de extração e do analito, os objetivos da busca dessas fases variam, como por exemplo: melhorar a seletividade do método; aumentar a capacidade sortiva; fornecer fases extratoras com melhores capacidades térmicas, químicas ou mecânicas e assim aumentar a vida útil dos dispositivos que as empregam; reduzir custos, pois muitas vezes as fases extratoras alternativas são rejeitos de outras atividades; aumentar a velocidade da análise, uma vez que o equilíbrio de extração pode ser atingido mais rapidamente com outro material; e adequar os métodos aos princípios da química verde (Augusto *et al.*, 2010).

Assim, nesse trabalho foi estudado o uso do material 3-n-propil(3-metilpiridínio)silsesquioxano ( $\text{Si3Py}^+\text{Cl}^-$ ) como fase extratora alternativa na técnica de DPX; e o uso dos solventes MILs e SHSs como fases extratoras alternativas nas técnicas de microextração DLLME e HLLME, respectivamente.

#### **2.4.1 Cloreto de 3-n-propil(3-metilpiridínio)silsesquioxano - $\text{Si3Py}^+\text{Cl}^-$**

O material  $\text{Si3Py}^+\text{Cl}^-$  foi inicialmente sintetizado e estudado para a adsorção de compostos metálicos, através do mecanismo de troca iônica (Magosso *et al.*, 2009). Em outro trabalho também foi explorada a sua capacidade de adsorção, sendo posteriormente aplicado na determinação eletroquímica de nitrito (Magosso *et al.*, 2010). Na Figura 4 está representada a estrutura química do composto sintetizado.

Figura 4 – Estrutura química do material  $\text{Si}_3\text{Py}^+\text{Cl}^-$  obtido através do método sol-gel.



Fonte: (Magosso *et al.*, 2009; Corazza *et al.*, 2017).

Como pode ser observado, esse material possui vários grupos que podem ser explorados para a extração de compostos orgânicos presentes em diversas matrizes, tais como grupos silanóis (Si-OH) que podem interagir fortemente com os analitos através de ligações de hidrogênio e grupos piridínicos, os quais podem interagir através de interações  $\pi$ - $\pi$  com os analitos que possuem anéis aromáticos em sua estrutura.

#### 2.4.2 Líquidos Iônicos – ILs

Líquidos Iônicos (ILs, do inglês *Ionic Liquids*) são uma classe de sais fundidos que apresentam ponto de fusão igual ou inferior a 100 °C (Welton, 1999; Zhao e Anderson, 2011). O primeiro IL foi sintetizado em 1914 por Paul Walden (Marcinkowska *et al.*, 2019). Geralmente são compostos por cátions orgânicos e ânions orgânicos ou inorgânicos. Eles possuem algumas propriedades físico-químicas que podem ser vantajosas incluindo pressão de vapor quase desprezível à temperatura ambiente, alta estabilidade térmica, propriedades de solvatação ajustáveis, viscosidade e condutividade variáveis e miscibilidade em diferentes solventes, além de não serem inflamáveis (Ho *et al.*, 2011).

Através da observação da estrutura dos analitos e das interações possíveis, a estrutura dos ILs pode ser moldada para que eles exibam propriedades de solvatação complementares aos compostos de interesse. Por exemplo, a presença de um grupo aromático na estrutura do

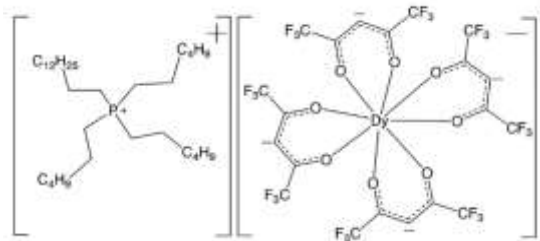
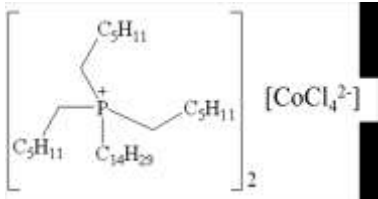
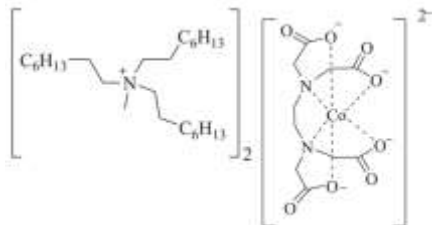
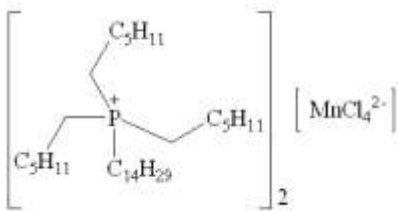
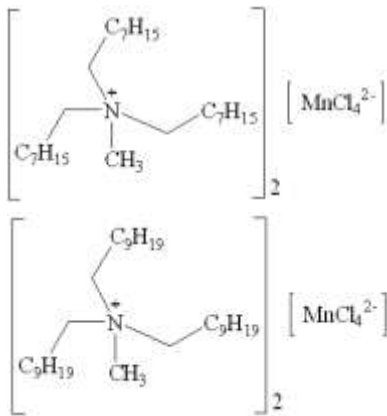
IL pode favorecer as interações  $\pi$ - $\pi$  com compostos que contenham anel aromático em sua estrutura. Isso oferece maior seletividade e LODs e LOQs mais baixos para o método analítico. É estimado que a possibilidade de combinações diferentes para a formação de ILs possa alcançar a ordem de  $10^{18}$  (Yao e Anderson, 2009; Ho *et al.*, 2014; Hantao *et al.*, 2016).

Os ILs tem sido amplamente aplicados na química analítica como fases estacionária em cromatografia e fases extratoras em técnicas de microextração baseadas em solventes, tais como DLLME, SDME, HF-LPME (Microextração em Fase Líquida com Fibra Oca, do inglês *Hollow-Fiber Liquid-Phase Microextraction*) (Zhang *et al.*, 2013; Socas-Rodriguez *et al.*, 2014) e em técnicas de extração baseadas em sorção, tais como SPE e SPME (Ho *et al.*, 2011; Fontanals *et al.*, 2012). Quando aplicados como fase estacionária para cromatografia podem produzir excelente eficiência de separação. Quando aplicados em técnicas de microextração podem aumentar a pré-concentração dos analitos e a seletividade do método (Ho *et al.*, 2014; Hantao *et al.*, 2016). Recentemente, uma nova classe de ILs conhecida como MILs tem sido objeto de atenção em inúmeras aplicações analíticas.

#### 2.4.2.1 Líquidos Iônicos Magnéticos – MILs

Os MILs respondem fortemente a um campo magnético externo devido a serem produzidos pela incorporação de um composto paramagnético na estrutura do cátion ou do ânion do IL. Para isso, geralmente são usados metais de transição, tais como cobalto, manganês, gadolínio e disprósio. Além disso, possuem as propriedades físico-químicas únicas e ajustáveis dos ILs (Clark *et al.*, 2016; Sajid *et al.*, 2019). Na Tabela 1 estão apresentados alguns exemplos de MILs.

Tabela 1 – Exemplos de MILs e suas estruturas.

MIL	Estrutura	Referência
<i>Trihexyltetradecylphosphonium</i> <i>Tetrakis(hexafluoroacetylaceto)dysprosate(III)</i>		(Hice <i>et al.</i> , 2020)
<i>Trihexyltetradecylphosphonium</i> <i>tetrachlorocobalt (II)</i>		(Feng <i>et al.</i> , 2020)
[Co(EDTA)] <i>methyltrioctylammonium</i>		(Branco <i>et al.</i> , 2011)
<i>Trihexyltetradecylphosphonium</i> <i>tetrachloromanganate (II)</i>		(Albo <i>et al.</i> , 2012)
<i>Tricaprylmethylammonium</i> <i>chloridetetrachloromanganate (II)</i>		(Sigma-Aldrich, 2020)

Fonte: Autoria própria (2020).

Antes da síntese do MIL algumas considerações sobre a sua estrutura devem ser feitas, pois algumas propriedades como suscetibilidade magnética, hidrofobicidade e viscosidade, podem afetar o seu emprego na extração de compostos presentes em amostras aquosas. A suscetibilidade magnética está relacionada com o momento magnético efetivo ( $\mu_{\text{eff}}$ ). Essa propriedade implica na remoção do MIL da solução, sendo principalmente devida ao ânion contendo o metal, mas podendo variar também com a mudança do cátion (Clark *et al.*, 2016; Sajid *et al.*, 2019).

A hidrofobicidade do MIL é uma propriedade importante quando os analitos estão presentes em amostras aquosas. Para que o MIL seja removido da amostra aquosa juntamente com o analito, através da aplicação de um campo magnético, ele não pode ser miscível em água. Assim, o seu cátion pode ser funcionalizado com grupos hidrofóbicos. Uma forma fácil e com bom custo benefício é funcionalizar o cátion do MIL a base de imidazólio com alquilas de cadeia longa e/ou aromáticas (Del Sesto *et al.*, 2008; Mehdi *et al.*, 2010; Brown *et al.*, 2013; Nacham *et al.*, 2015). Também é possível incorporar ânions fracamente coordenados e relativamente hidrofóbicos, além disso, pode-se introduzir um componente paramagnético no cátion e selecionar um ânion relativamente hidrofóbico (Sajid *et al.*, 2019).

Outra propriedade dos MILs que também influencia a sua aplicação em técnicas de preparo de amostras é a viscosidade, sendo que viscosidades baixas são preferidas para facilitar a mistura com a amostra e a transferência de massa em técnicas de extração. Modificações estruturais podem ser empregadas para ajustar a viscosidade (Yoshida e Saito, 2006).

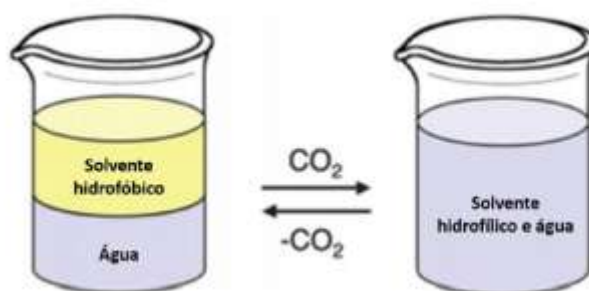
A síntese e aplicação desses materiais tem sido reportada usando diferentes íons, incluindo ferro (Clark *et al.*, 2015), manganês (Del Sesto *et al.*, 2008), cobalto (Peppel *et al.*, 2010), disprósio (Hice *et al.*, 2020) e gadolínio (Del Sesto *et al.*, 2008). No trabalho de Yu *et al.*, 2016, foi proposta a utilização de um MIL baseado em Mn ( $[\text{P}_{6,6,6,14}^+]_2[\text{MnCl}_4^{2-}]$ ) como solvente extrator para DLLME. Nessa abordagem, uma pequena quantidade de MIL combinado com um solvente dispersor foi introduzido em uma solução aquosa e, após a extração, a fase extratora foi recuperada com a ajuda de uma barra magnética. Essa abordagem possui características analíticas importantes, incluindo a sua simplicidade e velocidade, a não utilização de uma etapa de centrifugação e a alta estabilidade dos MILs hidrofóbicos em solução aquosa.

### 2.4.3 Solvente com Hidrofilicidade Comutável – SHS

A destilação é o método padrão para remover o solvente do produto final de quase qualquer processo químico que use solvente. A dependência da indústria é responsável pelo uso continuado e generalizado de solventes orgânicos voláteis, mesmo seus riscos sendo bem conhecidos. Assim, o uso de SHS como alternativa aos solventes orgânicos empregados na indústria foi reportado em 2010, onde foram usados para substituir o uso do hexano na extração do óleo da soja, dispensando assim a etapa de destilação (Jessop *et al.*, 2010).

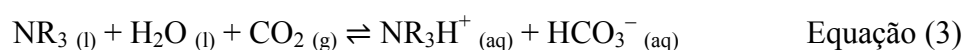
Para um composto ser considerado um SHS, ele deve ser capaz de comutar entre uma forma miscível e uma forma imiscível em solução aquosa dependendo da composição da solução ou do pH. Na Figura 5, está apresentado um exemplo genérico de um SHS. Inicialmente o SHS está na sua forma hidrofóbica, ou seja, imiscível em água, com a adição de CO<sub>2</sub>, o SHS passa para a sua forma hidrofílica, tornando-se solúvel em água, formando uma solução monofásica. Com a retirada do CO<sub>2</sub> do sistema, o SHS retorna para a sua forma hidrofóbica, formando uma solução bifásica. As aminas terciárias, aminas secundárias, aminas com grupo funcional incorporado, amidas e ácidos graxos podem possuir características de hidrofilicidade comutável (Jessop *et al.*, 2010).

Figura 5 – Comutação de um solvente com hidrofilicidade comutável através da adição e remoção de CO<sub>2</sub>.



Fonte: Adaptado de (Jessop *et al.*, 2010).

Para exemplificar melhor esse processo, na equação 3 está apresentado um exemplo de uma amina terciária com hidrofilicidade comutável. Em água e na presença de CO<sub>2</sub> ela é convertida através da protonação em um sal de amônio que é solúvel em água. Removendo o CO<sub>2</sub>, ela retorna para a sua forma hidrofóbica (desprotonada).





Em 2014, foram identificadas treze novas aminas secundárias e terciárias com comportamento de SHS que são de fácil aquisição e/ou síntese. No estudo, observou-se que as aminas que apresentaram comportamento de SHS possuíam Log  $K_{ow}$  entre 1,2 e 2,5 e pKa acima de 9,5. Essas propriedades são um guia para selecionar novos compostos com característica comutável (Vanderveen *et al.*, 2014).

A primeira utilização dos SHSs em técnicas de microextração foi reportada por Ebrahimpour *et al.* em 2013 para a determinação de clorofenóis em amostras de água por HPLC-UV. A técnica de microextração utilizada foi a HLPME (Microextração em Fase-Líquida Homogênea, do inglês *Homogeneous Liquid-Phase Microextraction*) e o SHS utilizado como solvente extrator foi o ácido octanóico. Na Tabela 2 estão apresentados alguns trabalhos reportados desde então, onde os SHSs foram utilizados em técnicas de microextração.

Tabela 2 – Aplicações dos solventes com hidrofiliçidade comutável em técnicas de microextração.

SHS	Analito	Matriz	Técnica de preparo da amostra	Técnica de quantificação	Referência
<i>N,N</i> -dimetilciclohexilamina (DMCHA)	HPAs	Água	Microextração Líquido-Líquido Homogênea baseada em Solvente com Hidrofiliçidade Comutável (SHS-HLLME)	Medida fluorimétrica e GC-MS	(Lasarte-Aragones <i>et al.</i> , 2015b)
<i>N,N</i> -dimetilciclohexilamina (DMCHA)	Herbicidas da classe das triazinas	Água	Microextração Líquido-Líquido Homogênea baseada em Solvente com Hidrofiliçidade Comutável (SHS-HLLME)	GC-MS	(Lasarte-Aragones <i>et al.</i> , 2015a)
Ácido hexanóico	Ofloxacina	Urina	Microextração em Fase Líquida baseada em Solvente Comutável Assistida por Efervescência (EA-SS-LPME)	HPLC-FLD	(Vakh <i>et al.</i> , 2016)
Ácido decanóico	Inseticidas piretróides	Água	Microextração Líquido-Líquido Dispersiva <i>on-site</i> baseada na Solidificação de Solvente Comutável ( <i>on-site</i> DLLME-SSS)	HPLC-UV	(Hu <i>et al.</i> , 2016)
Ácido nonanóico	Fluoroquinolonas	Camarão	Microextração baseada em Membrana com Solvente com Hidrofiliçidade Comutável (SHS-MME)	HPLC-FLD	(Pochivalov <i>et al.</i> , 2017)
Dipropilamina (DPA)	Compostos nitroaromáticos	Água	Microextração baseada em Solvente com Hidrofiliçidade Comutável (SHS-ME)	GC-FID	(Rameshgar <i>et al.</i> , 2017)
Dipropilamina (DPA)	Metanfetamina	Urina	Microextração Líquido-Líquido Homogênea baseada em Solvente com Hidrofiliçidade Comutável (SHS-HLLME)	GC-MS	(Shahvandi <i>et al.</i> , 2018)

SHS	Analito	Matriz	Técnica de preparo da amostra	Técnica de quantificação	Referência
<i>N,N</i> -dimetilciclohexilamina (DMCHA)	Bisfenol A, B, F, AF e Tetrabromobisfenol A	Leite, suco de laranja, bebida energética	Microextração Baseada em Solvente com Hidrofilicidade Comutável (SHS-BME)	HPLC-UV	(Wang <i>et al.</i> , 2018)
Dipropilamina (DPA)	Metadona e tramadol	Urina	Microextração Líquido-Líquido Homogênea baseada em Solvente com Hidrofilicidade Comutável (SHS-HLLME)	GC-FID	(Ahmar <i>et al.</i> , 2018)
<i>N,N</i> -dimetilciclohexilamina (DMCHA)	Fármacos	Urina, saliva e leite	Microextração Líquido-Líquido baseada em Solvente com Hidrofilicidade Comutável (SHS-LLME)	HPLC-DAD	(Hassan e Alshana, 2019)
Ácido decanóico	Vanádio	Água e alimento	Microextração Líquido-Líquido Homogênea baseada em Solvente com Hidrofilicidade Comutável e Microseringa ( $\mu$ S-SHS-HLLME)	ETAAS	(Naeemullah e Tuzen, 2019)

Fonte: Aatoria própria (2020).

SHS-HLLME: Microextração Líquido-Líquido Homogênea baseada em Solvente com Hidrofilicidade Comutável, do ingles *Switchable Hydrophilicity Solvent-based Homogenous Liquid-Liquid Microextraction*.

EA-SS-LPME: Microextração em Fase Líquida baseada em Solvente Comutável Assistida por Efervescência, do inglês *Effervescence-Assisted Switchable Solvent-Based Liquid Phase Microextraction*.

*on-site* DLLME-SSS: Microextração Líquido-Líquido Dispersiva *on-site* baseada na Solidificação de Solvente Comutável, do ingles *on-site Dispersive Liquid-Liquid Microextraction base on the Solidification of Switchable Solvent*.

SHS-MME: Microextração baseada em Membrana com Solvente com Hidrofilicidade Comutável, do ingles *Switchable Hydrophilicity Solvent Membrane-based Microextraction*.

SHS-ME: Microextração baseada em Solvente com Hidrofilicidade Comutável, do ingles *Switchable-Hydrophilicity Solvent-based Microextraction*.

SHS-BME: Microextração Baseada em Solvente com Hidrofilicidade Comutável, do ingles *Switchable Hydrophilicity Solvent-Based Microextraction*.

SHS-LLME: Microextração Líquido-Líquido baseada em Solvente com Hidrofilicidade Comutável, do ingles *Switchable Hydrophilicity Solvent Liquid-Liquid Microextraction*.

$\mu$ S-SHS-HLLME: Microextração Líquido-Líquido Homogênea com Solvente com Hidrofilicidade Comutável e Microseringa, do ingles *Switchable Hydrophilicity Solvent Microextraction syringe-based Homogenous Liquid-Liquid Microextraction*.

GC-MS: Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas, do inglês *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*.

GC-FID: Cromatografia Gasosa com Detector por Ionização de Chama, do inglês *Gas Chromatography-Flame Ionization Detector*.

HPLC-FLD: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Fluorescência, do inglês *High Performance Liquid Chromatography-Fluorescence Detector*.

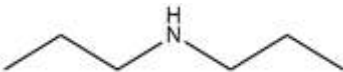
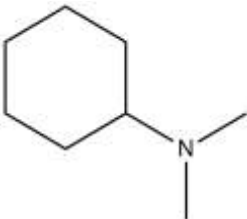
HPLC-UV: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Ultravioleta, do inglês *High Performance Liquid Chromatography-Ultraviolet detector*.

HPLC-DAD: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos, do inglês *High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detector*.

ETAAS: Espectroscopia de Absorção Atômica Eletrotérmica, do inglês *Electrothermal Atomic Absorption Spectroscopy*.

Como é possível observar na Tabela 2, para a extração de compostos básicos, a DPA e a DMCHA são os SHSs mais empregados como fases extratoras em técnicas de microextração. Assim, esses dois solventes foram selecionados para esse trabalho. As suas estruturas e algumas propriedades físico-químicas estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 – Estrutura e algumas propriedades físico-químicas dos SHSs empregados nesse trabalho (ChemAxion, 2020).

Composto	Estrutura	pKa	Log K <sub>ow</sub>
Dipropilamina (DPA)		10,77	1,57
N,N-dimetilciclohexilamina (DMCHA)		10,22	1,99

Fonte: Autoria própria (2020).

A DPA e a DMCHA são aminas secundária e terciária, respectivamente e possuem as características de pKa e Log K<sub>ow</sub> reportados por Vanderveen, *et al.*, 2014, para aminas com comportamento comutável. As vantagens de se empregar SHSs como solventes extratores em técnicas de microextração estão relacionadas aos seus aspectos ambientalmente amigáveis, pois são menos tóxicos que alguns solventes convencionais, além disso, são requeridos apenas alguns µL para as extrações (Vanderveen *et al.*, 2014).

A capacidade de comutação é de grande interesse para o preparo de amostra, pois é possível a formação de uma área de contato infinitamente grande entre amostra e solvente extrator, isso proporciona um rápido equilíbrio de extração. As extrações utilizando SHSs são simples e não requerem aparatos e nem reagentes especiais. Ademais, são solventes que apresentam baixo custo e são de fácil aquisição (Lasarte-Aragones *et al.*, 2015b).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

- Desenvolvimento de métodos empregando fases extratoras alternativas  $\text{Si3Py}^+\text{Cl}^-$ , MILs e SHSs nas técnicas de microextração, DPX, DLLME e HLLME para a determinação de disruptores endócrinos fenólicos em amostras de água de rio, hormônios estrógenos em amostras de urina humana e contaminantes provenientes de embalagens alimentícias em amostras de água de coco, respectivamente.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar e caracterizar o material  $\text{Si3Py}^+\text{Cl}^-$  para ser empregado como fase extratora alternativa na técnica de DPX para a extração de compostos disruptores endócrinos fenólicos de amostras de água de rio.

- Otimizar os principais parâmetros que influenciam a extração por DPX: massa de fase extratora, número de ciclos de extração, solvente de dessorção, número de ciclos de dessorção, pH e força iônica da amostra.

- Determinar e avaliar os principais parâmetros analíticos de mérito como limites de detecção e quantificação, coeficientes de correlação e faixa linear.

- Aplicar o procedimento de DPX- $\text{Si3Py}^+\text{Cl}^-$  otimizado em ensaios de recuperação e precisão para amostra de água de rio.

- Sintetizar e caracterizar MILs (tetracloro manganês (II) de trihexiltetradecil fosfônio e tetracloro manganês (II) Aliquat) para serem empregados como solventes extratores alternativos aos orgânicos clorados geralmente empregados na técnica de DLLME. Expandir a aplicabilidade dos MILs para amostras complexas, desenvolvendo um método mais “verde” para a extração de hormônios em amostras de urina humana.

- Otimizar os principais parâmetros que influenciam a extração por DLLME: tipo e volume de solvente extrator e dispersor, tempo de extração, pH e força iônica da amostra.

- Determinar e avaliar os principais parâmetros analíticos de mérito como limites de detecção e quantificação, coeficientes de determinação e faixa linear.

- Aplicar o procedimento desenvolvido DLLME/MIL otimizado em ensaios de recuperação e precisão para amostras de urina humana.

- Explorar a utilização de SHSs (dipropilamina e *N,N*-dimetilciclohexilamina) na técnica de HLLME, desenvolvendo um método rápido e mais “verde” para a extração de contaminantes provenientes de embalagens alimentícias em água de coco.
- Otimizar os principais parâmetros que influenciam a extração por SHS-HLLME: tipo e volume de SHS, volume de NaOH 10 mol L<sup>-1</sup> para separação das fases, tempo de extração e emprego de temperatura para auxiliar na separação das fases.
- Determinar e avaliar os principais parâmetros analíticos de mérito como limites de detecção e quantificação, coeficientes de correlação e faixa linear.
- Aplicar o procedimento desenvolvido SHS-HLLME otimizado em ensaios de recuperação e precisão para amostra de água de coco.
- Avaliar a robustez do método através do teste de Youden.
- Analisar amostras de água de coco contidas em embalagens alimentícias.

## 4 EMPREGO DE MATERIAL HÍBRIDO COMO FASE EXTRATORA ALTERNATIVA NA TÉCNICA DE EXTRAÇÃO EM PONTEIRA DESCARTÁVEL PARA O AUMENTO DA EFICIÊNCIA DE EXTRAÇÃO DE DISRUPTORES ENDÓCRINOS FENÓLICOS

### 4.1 INTRODUÇÃO

Compostos fenólicos, tais como o bisfenol A, o 4-*terc*-octilfenol, o 4-octilfenol, o 4-nonilfenol e o 17 $\alpha$ -etinilestradiol são utilizados em diferentes aplicações e são amplamente empregados na indústria química. Devido ao fato de não serem totalmente degradados nas estações de tratamento de efluentes, esses compostos têm sido encontrados em diferentes matrizes ambientais (Chen *et al.*, 2012; Nurulnadia *et al.*, 2014; Cui *et al.*, 2015; Omar *et al.*, 2016). A grande problemática em torno desses compostos se deve ao fato de eles serem disruptores endócrinos, ou seja, podem interferir no sistema endócrino de animais e humanos, causando disfunções no sistema reprodutor. Além disso, podem diminuir a atividade imunológica dos organismos e aumentar a incidência de câncer (Colborn *et al.*, 1993; Muller *et al.*, 2008; Wolff *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2017). Portanto, a presença desses contaminantes precisa ser monitorada em diferentes matrizes ambientais.

A determinação de compostos fenólicos é usualmente realizada através de técnicas cromatográficas, incluindo a cromatografia gasosa e a cromatografia líquida, acopladas a diferentes detectores. Contudo, devido à complexidade das matrizes ambientais e ao fato de que esses compostos geralmente são encontrados em baixas concentrações, a análise direta não é possível e técnicas de preparo de amostras adequadas precisam ser aplicadas antes da análise cromatográfica. Diversas técnicas de extração e microextração têm sido desenvolvidas e empregadas para a determinação de diversos compostos presentes em diferentes matrizes.

A SPE tem sido empregada para a extração de compostos fenólicos em água. Porém, essa técnica está associada a longos tempos de extração e ao uso de volumes relativamente grandes de solventes (Ribeiro *et al.*, 2007; Gadzala-Kopciuch *et al.*, 2008; Selvaraj *et al.*, 2014; Pernica *et al.*, 2015). Outras técnicas reportadas são a SPME (Stoichev *et al.*, 2008; Lopez-Darias *et al.*, 2010), a HF-LPME (Villar-Navarro *et al.*, 2013), a MSPE (Extração Magnética em Fase Sólida, do inglês *Magnetic Solid-Phase Extraction*) (Wang e Deng, 2016), a DLLME (Cunha e Fernandes, 2010; Lopez-Darias *et al.*, 2010) e a SDME (Lopez-Darias *et al.*, 2010).

A técnica de microextração empregada nesse trabalho foi a DPX, a qual é uma variação de SPE e possui algumas vantagens frente a outras técnicas de microextração, tais



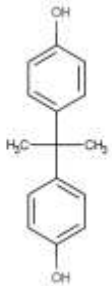
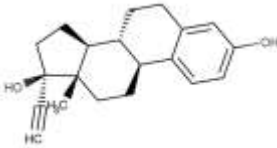
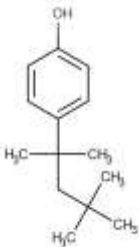
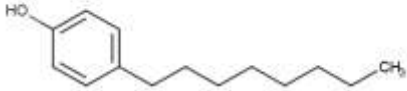
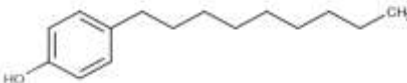
como: simplicidade de execução; extrações rápidas devido à mistura dinâmica entre a fase extratora sólida e a amostra líquida através da aspiração de ar; utilização de menores massas de fase extratora, utilização de menores volumes de amostra e solventes orgânicos, acarretando em uma menor geração de resíduos; e menor custo em comparação com a SPE (Bordin *et al.*, 2016).

A escolha da fase extratora que será empregada na técnica de DPX depende das características do analito e dos constituintes da matriz da amostra. Diversas ponteiros para DPX contendo diferentes fases extradoras estão disponíveis comercialmente e dependendo da fase extratora a DPX possui diferentes denominações, como: DPX-RP as ponteiros contêm o polímero estireno-divinilbenzeno e são indicadas para a extração de compostos apolares e pouco polares. DPX-WAX, as ponteiros contêm o polímero estireno-divinilbenzeno com amina secundária incorporada, podem atuar como trocadoras aniônicas fracas e são indicadas para a extração de ácidos fortes, como sulfatos. DPX-SCX as ponteiros contêm o polímero estireno-divinilbenzeno com uma fase estacionária sulfonada incorporada, podem atuar como trocadoras catiônicas fortes e são indicadas para a extração de compostos básicos. DPX-WCX as ponteiros contêm o polímero estireno-divinilbenzeno com uma fase estacionária de ácido carboxílico incorporado e são indicadas para a extração de bases fortes, como aminas quaternárias. DPX-SAX as ponteiros contêm o polímero estireno-divinilbenzeno com uma fase de amina quaternária incorporada e são indicadas para a extração de compostos ácidos. DPX-SI as ponteiros contêm sílica e podem ser usadas para a extração através de ligação de hidrogênio. DPX-C18 as ponteiros contêm sílica gel com uma carga de carbono de 18-22% e são indicadas para a limpeza rápida de amostras e remoção de interferentes da matriz (Kole *et al.*, 2011; Bordin *et al.*, 2016; DPX technologies, 2020).

As principais aplicações das ponteiros de DPX disponíveis comercialmente são para a extração de compostos apolares ou pouco polares, compostos ácidos e básicos e para procedimentos de *clean-up*. Assim, baseado na literatura disponível, observou-se que há a necessidade de estudos adicionais envolvendo a determinação de compostos com porções mais polares usando a DPX. Essa técnica de preparo de amostra permite o uso de materiais alternativos como fases extradoras, uma vez que está disponível comercialmente uma ponteiro sem fase extratora (DPX-branco). Nesse trabalho, o material Si3Py<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup> foi empregado pela primeira vez como fase extratora na técnica de DPX. Esse material possui grupos funcionais que podem interagir seletivamente com a porção mais polar dos analitos, sendo assim, as interferências da matriz podem ser diminuídas, diminuindo assim os LODs e LOQs do método.

O objetivo desse estudo foi propor uma nova fase extratora ( $\text{Si3Py}^+\text{Cl}^-$ ) para a análise de bisfenol A (BFA),  $17\alpha$ -etinilestradiol (EE2), 4-*terc*-octilfenol (4-*t*-OF), 4-octilfenol (4-OF) e 4-nonilfenol (4-NF) usando a DPX com técnica de extração. A estrutura dos analitos e algumas propriedades físico-químicas estão apresentadas na Tabela 4. As condições de extração foram avaliadas usando estratégias univariadas e multivariadas. Os parâmetros analíticos de mérito do método proposto foram determinados em amostras de água de rio e a separação/detecção foi realizada usando HPLC-FLD (cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência, do inglês *high performance liquid chromatography-fluorescence detector*). Ademais, foram estudadas as interações químicas entre o novo material extrator e os analitos.

Tabela 4 – Estrutura e algumas propriedades físico-químicas dos analitos selecionados para esse trabalho. Referência: (ChemAxon, 2020).

Composto	Estrutura química	pKa	Log $K_{ow}$
Bisfenol A		9,78	4,04
$17\alpha$ -etinilestradiol		10,33	3,90
4- <i>terc</i> -octilfenol		10,23	4,69
4-octilfenol		10,31	5,30
4-nonilfenol		10,30	5,74

Fonte: Autoria própria (2020).

## 4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.2.1 Reagentes e materiais

Os compostos fenólicos BFA (99%), EE2 (98%), 4-*t*-OF (97%), 4-OF (99%) e 4-NF (99,8%) foram obtidos da Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, EUA). Soluções padrões individuais na concentração de 1000 mg L<sup>-1</sup> foram preparadas em metanol (MeOH). Soluções trabalho contendo um mix dos analitos na concentração de 100 mg L<sup>-1</sup> foram preparadas em MeOH através da diluição adequada da solução trabalho. Ponteiras de plástico (1 mL, sem material extrator) foram adquiridas da DPX Labs (Columbia, SC, EUA). Acetonitrila (ACN) e MeOH foram adquiridos da JT Baker (Mallinckrodt, NJ, EUA). Água foi purificada em um sistema de água ultrapura (Mega Purity, Billerica, EUA). Ortosilicato de tetraetil (TEOS), etanol, cloropropiltrimetoxisilano (CPTS), tolueno e 3-metilpiridina foram obtidos da Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, EUA). Fosfato dibásico, ácido cítrico, ácido clorídrico e cloreto de sódio foram obtidos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Um mix de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (EPA 525 PAH mix B) foi obtido da Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, EUA), com 500 µg mL<sup>-1</sup> de cada composto em acetona.

### 4.2.2 Instrumentação e condições cromatográficas

A análise cromatográfica foi realizada em um cromatógrafo líquido Shimadzu Prominence LC 20AT series HPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japão) equipado com um detector de fluorescência (RF 20A series), com um loop de 20 µL e injetor manual Rheodyne 7725i (RohnertPark, CA, EUA). A separação cromatográfica foi realizada em modo reverso usando uma coluna C18 (ZORBAX Eclipse XDB<sup>®</sup>, 250 mm × 4,6 mm, 5 µm d.i, Agilent, CA, EUA). O volume de injeção foi 20 µL em um fluxo de 1 mL min<sup>-1</sup> da fase móvel no modo gradiente. A fase móvel foi composta de uma mistura de ACN (A) e água (B) nos seguintes gradientes: 0–5,5 min A 60% e B 40%; 5,5–7,5 min A 80% e B 20% mantido até 25 min; 25–26 min foi retornado à condição inicial e mantido até 30 min. Foi selecionado no detector de fluorescência o comprimento de onda de excitação de 277 nm e de emissão 307 nm. Os dados cromatográficos foram avaliados com o software LCsolution (Shimadzu, Kyoto, Japão).

### 4.2.3 Síntese da fase extratora

O material  $\text{Si3Py}^+\text{Cl}^-$  foi preparado pelo processo sol-gel segundo procedimento descrito em trabalho anterior (Magosso *et al.*, 2010). Brevemente, 8,2 mL de tetraetilortosilicato (TEOS 0,036 mol), 15 mL etanol e 3,2 mL de uma solução aquosa de ácido clorídrico ( $1 \text{ mol L}^{-1}$ ) foram misturados em um balão de fundo redondo. A solução resultante foi agitada por 2,5 h à temperatura ambiente ( $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Após, foram adicionados 11,2 g de 3-n-cloropropiltrimetoxisilano (CPTS 0,056 mol) e a solução foi agitada por 2 h à temperatura ambiente. A temperatura da solução foi aumentada para  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  e a mistura foi deixada em repouso durante 60 h em atmosfera ambiente até o processo de gelificação ocorrer. O sólido resultante foi lavado com etanol e então seco sob vácuo ( $133 \times 10^{-3} \text{ Pa}$ ) à temperatura ambiente. Em torno de 3 g do sólido obtido foram imersos em um balão de fundo redondo contendo uma solução preparada pela mistura de 5 mL de 3-metilpiridina pura e 15 mL de tolueno puro. A mistura foi aquecida na temperatura de refluxo do solvente durante aproximadamente 3 h. O sólido foi filtrado, lavado com etanol e seco por 2 h sob vácuo ( $133 \times 10^{-3} \text{ Pa}$ ) à temperatura ambiente. A estrutura química do composto sintetizado está apresentada na Figura 4 (seção 2.4.1 Cloreto de 3-n-propil(3-metilpiridínio)silsesquioxano –  $\text{Si3Py}^+\text{Cl}^-$ ).

### 4.2.4 Caracterização da fase extratora

O material  $\text{Si3Py}^+\text{Cl}^-$  foi extensamente caracterizado em trabalhos anteriores (Magosso *et al.*, 2009; Magosso *et al.*, 2010). Adicionalmente, para esse trabalho foram obtidas informações estruturais por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), usando um espectrômetro Varian 3100 (Santa Clara, CA, USA). O espectro de FTIR foi gerado com *pelets* de KBr. A morfologia do material  $\text{Si3Py}^+\text{Cl}^-$  foi avaliada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) usando um microscópio Hitachi TM 3030 (Tokyo, Japão).

### 4.2.5 Otimização do procedimento de DPX

Vários experimentos foram realizados para otimizar o procedimento de DPX. As extrações foram realizadas com 700  $\mu\text{L}$  de água ultrapura fortificada com os analitos na concentração de  $30 \mu\text{g L}^{-1}$  de cada analito. A etapa de dessorção foi realizada usando 200  $\mu\text{L}$

de solvente orgânico. O volume de amostra em cada ciclo de extração foi mantido constante em 700  $\mu\text{L}$  para permitir uma mistura dinâmica satisfatória entre a fase extratora e a amostra aquosa dentro da ponteira (capacidade de 1 mL). Para a etapa de dessorção, o volume de solvente orgânico foi mantido constante em 200  $\mu\text{L}$ . Com relação ao tempo de cada ciclo de extração/dessorção, esses foram fixados em 30 s. Esses parâmetros foram escolhidos e fixados baseados em estudos reportados previamente onde a DPX foi usada como técnica de preparo de amostras (Guan *et al.*, 2010; Pena-Abaurrea *et al.*, 2013; Bordin *et al.*, 2014; Andersson *et al.*, 2016; Pinto *et al.*, 2017). Parâmetros importantes relacionados com as etapas de extração e dessorção foram otimizados, incluindo a massa de fase extratora, tipo de solvente de dessorção, números de ciclos (aspiração/permanência/descarte) realizados nas etapas de extração e dessorção, pH da amostra e adição de sal, etapa de limpeza e estabilidade da fase extratora em solventes orgânicos. Estratégias univariadas e multivariadas foram empregadas e os dados experimentais obtidos através das otimizações multivariadas foram processados usando o software Statsoft Statistica 8.0 (Statsoft, EUA).

#### 4.2.5.1 Otimização da massa de fase extratora

Inicialmente foi avaliada a massa de material extrator que gerava a melhor eficiência de extração. Nessa otimização massas de 30, 50 e 70 mg de  $\text{Si3Py}^+\text{Cl}^-$  foram colocadas dentro da ponteira de DPX e as extrações foram realizadas em triplicatas de modo univariado.

#### 4.2.5.2 Otimização do solvente de dessorção

O solvente de dessorção foi otimizado usando MeOH, ACN, água e a mistura desses solventes de acordo com o planejamento *Simplex Lattice*, gerando 9 experimentos (incluindo a triplicata no ponto central) apresentados na Tabela 5. Os resultados foram expressos através da superfície ternária usando a média geométrica da área dos picos cromatográficos dos analitos. Nesse experimento foram usados 200  $\mu\text{L}$  de solvente orgânico com 5 ciclos de aspiração/permanência/descarte da mesma alíquota de solvente orgânico.

Tabela 5 – Matriz do planejamento *Simplex Lattice* para a otimização do solvente de dessorção.

<b>Experimento</b>	<b>H<sub>2</sub>O (%)</b>	<b>MeOH (%)</b>	<b>ACN (%)</b>
1	100	0	0
2	0	100	0
3	0	0	100
4	50	50	0
5	50	0	50
6	0	50	50
7	33	33	33
8	33	33	33
9	33	33	33

Fone: Autoria própria (2017).

#### 4.2.5.3 Otimização do número de ciclos de extração e dessorção

Antes da extração, a fase extratora foi condicionada aplicando 3 ciclos com MeOH:ACN (50:50, v/v) e 2 ciclos com água ultrapura. Para cada ciclo de extração, uma nova alíquota da amostra (700 µL) foi aspirada. Já para os ciclos de dessorção, foi utilizada a mesma alíquota (200 µL) de solvente orgânico. A otimização do número de ciclos de extração (de 1 a 7) e ciclos de dessorção (de 1 a 7) foi avaliada através do planejamento *Doehlert* com 9 experimentos (incluindo a triplicata no ponto central) conforme matriz apresentada na Tabela 6.

Tabela 6 – Matriz do planejamento *Doehlert* para o número de ciclos de extração e dessorção.

<b>Experimento</b>	<b>Número de ciclos de extração</b>	<b>Número de ciclos de dessorção</b>
1	1	4
2	3	1
3	3	7
4	4	4
5	4	4
6	4	4
7	6	1
8	6	7
9	7	4

Fonte: Autoria própria (2017).

#### 4.2.5.4 Otimização do pH da amostra e adição de sal

Foi avaliada a influência do pH da amostra (4, 5 e 6) e a adição de sal (0, 15 e 30% m/v de NaCl) na eficiência de extração. Essas variáveis foram estudadas usando procedimentos univariados em triplicata. Fosfato dibásico, ácido cítrico e solução aquosa de

ácido clorídrico ( $1 \text{ mol L}^{-1}$ ) foram usados para o ajuste do pH da amostra. Cloreto de sódio foi empregado para a avaliação da adição de sal na amostra.

#### 4.2.5.5 *Otimização da etapa de limpeza*

O procedimento de limpeza foi otimizado para evitar efeito de memória através da variação do número de ciclos e volume de solventes como a seguir: (a) 1 ciclo de 200  $\mu\text{L}$  de MeOH:ACN (50:50 v/v) + 2 ciclos de 200  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ ; (b) 2 ciclos de 200  $\mu\text{L}$  de MeOH:ACN (50:50 v/v) + 2 ciclos de 200  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ ; (c) 3 ciclos de 200  $\mu\text{L}$  de MeOH:ACN (50:50 v/v) + 2 ciclos de 200  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ ; e (d) 1 ciclo de 400  $\mu\text{L}$  de MeOH:ACN (50:50 v/v) + 1 ciclo de 400  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ . Para esse estudo foi utilizada uma abordagem univariada em duplicata.

#### 4.2.6 **Avaliação da estabilidade da fase extratora e eficiência de extração da DPX-Si3Py<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup> na extração de compostos fenólicos**

A estabilidade da fase extratora Si3Py<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup> foi avaliada através da execução de 15 procedimentos de extração completos (extração/dessorção/limpeza) usando a mesma porção da fase extratora e as condições otimizadas previamente. Os resultados foram expressos através da média geométrica da área dos picos cromatográficos dos analitos.

A eficiência de extração da fase extratora proposta (Si3Py<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>) foi comparada com uma fase comercialmente disponível para DPX – estireno-divinilbenzeno (DPX-RP). A DPX-RP foi escolhida, pois o estireno-divinilbenzeno contém anéis aromáticos na sua estrutura que podem interagir com os analitos através de interações  $\pi$ - $\pi$ . Para isso, a DPX-RP também foi otimizada e as condições obtidas foram: 6 ciclos de extração com 700  $\mu\text{L}$  de amostra em cada ciclo; 2 ciclos de dessorção com 200  $\mu\text{L}$  de ACN, pH da amostra ajustado em 6 e sem adição de sal. Para comparação cada DPX foi utilizada na sua condição otimizada. Além disso, foi utilizada água ultrapura fortificada com os analitos (BFA, EE2, 4-*t*-OF, 4-OF e 4-NF) na concentração de  $50 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Ademais, foi realizado um estudo para avaliar o comportamento da fase extratora na presença de possíveis compostos interferentes. Para esse estudo foram usados hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). Nesse estudo, foram adicionados  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  de HPAs e a resposta cromatográfica correspondente aos analitos foi monitorada e comparada com a resposta cromatográfica obtida na ausência desses compostos.

#### 4.2.7 Parâmetros analíticos de mérito

Os parâmetros analíticos de mérito foram determinados baseados no documento de orientação sobre o controle analítico da qualidade e dos procedimentos de validação de métodos fornecidos pela Comissão Europeia (European Commission, 2015). As curvas de calibração foram obtidas utilizando uma amostra de água de rio coletada no Rio Itajaí (Itajaí, Santa Catarina, Brasil), fortificadas com os analitos em seis níveis de concentração (1; 2; 5; 20; 50 e 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). As extrações foram realizadas em triplicatas usando a  $\text{DPX-Si}_3\text{Py}^+\text{Cl}^-$ . Os coeficientes de correlação foram calculados baseados nas curvas de calibração. A linearidade das curvas de calibração foi verificada usando a análise de variância (ANOVA). Os limites de quantificação (LOQs) foram adotados como sendo o primeiro nível de concentração da faixa linear e os limites de detecção (LODs) foram obtidos dividindo o LOQ por 3,3, baseado em estudos anteriores (Dias *et al.*, 2013; Merib *et al.*, 2016).

A exatidão e a precisão foram avaliadas através de extrações em uma amostra de água de rio fortificada com três níveis de concentração dos analitos (2; 20 e 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), em triplicata. A exatidão foi avaliada como sendo a porcentagem da recuperação relativa considerando o critério de aceitação de 70-120% (European Commission, 2015). Além disso, o teste *t-Student* foi aplicado em cada nível de concentração fortificada para avaliar se os resultados das recuperações apresentavam diferença estatística do valor de 100%. A precisão foi calculada baseada no desvio padrão relativo (RSD) e foi considerada a precisão abaixo de 20% como o critério de aceitação.

#### 4.2.8 Análise de amostras de água de rio

O método desenvolvido foi aplicado em amostras de água de rio coletadas em três rios de Santa Catarina, Brasil, nomeadas amostra A, B e C. A amostra A foi coletada no Rio Itajaí Açu (Navegantes), a amostra B foi coletada no rio São Francisco do Sul (São Francisco do Sul) e a amostra C foi coletada no Rio Cubatão (Palhoça). As amostras foram estocadas em frascos de vidro propriamente selados e mantidas sob refrigeração a 4 °C até a análise.

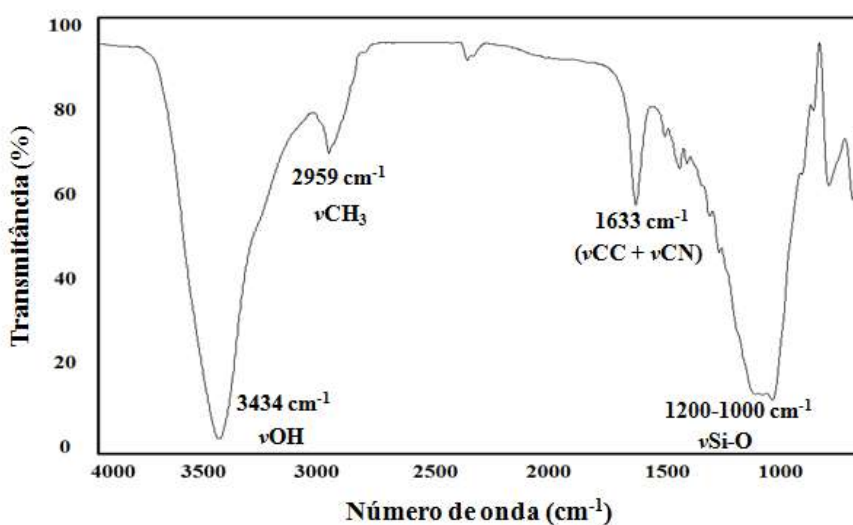


### 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 4.3.1 Caracterização da fase extratora Si3Py<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>

A fase extratora Si3Py<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup> foi extensamente caracterizada em trabalhos anteriores (Magosso *et al.*, 2009; Magosso *et al.*, 2010). Adicionalmente para esse trabalho, o material foi caracterizado por FTIR para avaliar os grupos funcionais da molécula, estando o espectro resultante apresentado na Figura 6. Uma banda larga em 3434 cm<sup>-1</sup> é atribuída ao estiramento do OH ( $\nu$ OH) do grupo silanol e da água adsorvida. A banda observada em 1633 cm<sup>-1</sup> é atribuída à vibração de estiramento do anel ( $\nu$ CC +  $\nu$ CN). Uma banda de média intensidade em 2959 cm<sup>-1</sup> está relacionada ao estiramento do grupo metil ( $\nu$ CH<sub>3</sub>). A banda entre 1000 e 1250 cm<sup>-1</sup> é correspondente ao estiramento SiO ( $\nu$ Si-O) das ligações Si-OH e Si-O-Si .

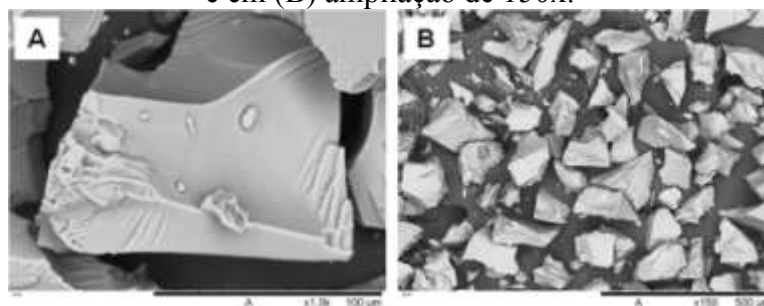
Figura 6 – Espectro de FTIR do material Si3Py<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>.



Fonte: Autoria própria (2017).

Para avaliar a superfície da fase extratora Si3Py<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>, micrografias em diferentes ampliações foram obtidas por MEV e estão mostradas na Figura 7. De acordo com as micrografias, foi obtido um material particulado, com partículas de diferentes tamanhos e formas. Além disso, o material se apresentou como um pó fino. Isto é de particular interesse para o procedimento de DPX, uma vez que a dispersão da fase extratora pode ser facilmente realizada, aumentando a transferência de massa dos analitos presentes na amostra para a fase extratora.

Figura 7 – Micrografias do material  $\text{Si}_3\text{Py}^+\text{Cl}^-$  obtidas por MEV. Em (A) ampliação de 1000x e em (B) ampliação de 150x.



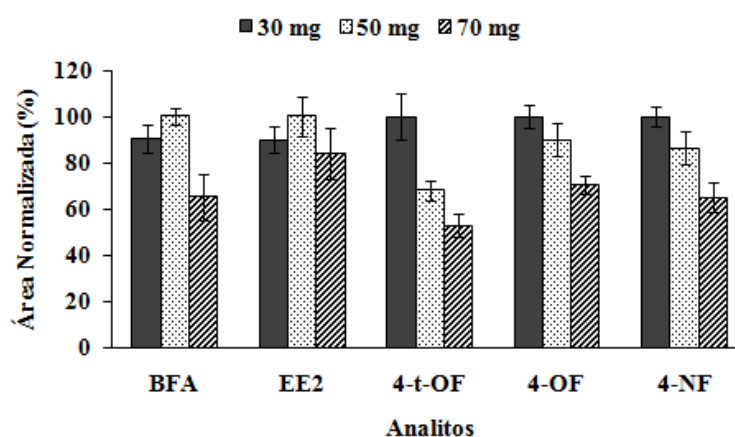
Fonte: Autoria própria (2017).

### 4.3.2 Otimização do procedimento de DPX

#### 4.3.2.1 Otimização da massa de fase extratora

A massa de fase extratora é um parâmetro importante no procedimento de DPX. O seu aumento pode proporcionar o aumento da massa de analito extraída (Pawliszyn, 2009). Contudo, ela deve ser compatível com o volume da ponteira de DPX (nesse caso, 1 mL) para permitir a mistura dinâmica entre a fase extratora e a amostra aquosa contendo os analitos (Bordin *et al.*, 2016). Na Figura 8 estão apresentadas as áreas normalizadas dos picos de cada analito usando 30, 50 e 70 mg de fase extratora na extração.

Figura 8 – Otimização da massa de  $\text{Si}_3\text{Py}^+\text{Cl}^-$  usada no procedimento de DPX para a extração de BFA, EE2, 4-*t*-OF, 4-OF e 4-NF.



Fonte: Autoria própria (2017).

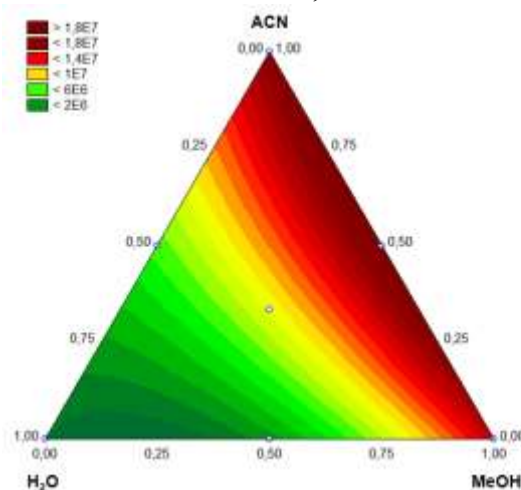
De acordo com o gráfico de barras, melhores eficiências de extração foram obtidas usando 30 e 50 mg de  $\text{Si}_3\text{Py}^+\text{Cl}^-$ . Isto provavelmente ocorreu porque com o aumento da massa

não foi obtida uma mistura dinâmica entre fase extratora e amostra, possivelmente devido à formação de pequenos aglomerados de fase extratora. Os resultados obtidos usando 30 e 50 mg de  $\text{Si3Py}^+\text{Cl}^-$  foram similares. Porém, no caso do 4-*t*-OF os resultados obtidos usando 30 mg foram em torno de 30% maiores do que os obtidos usando 50 mg. Assim, o uso de 30 mg de  $\text{Si3Py}^+\text{Cl}^-$  foi a condição selecionada para os próximos experimentos.

#### 4.3.2.2 Otimização do solvente de dessorção

O solvente utilizado para a dessorção líquida precisa ser capaz de romper a interação analito-fase extratora (Bordin *et al.*, 2016). Portanto, para garantir uma boa eficiência de dessorção, o melhor solvente (ou mistura de solventes) precisa ser determinado. Para alcançar a completa dessorção dos analitos da fase extratora  $\text{Si3Py}^+\text{Cl}^-$  foi utilizado um volume de 200  $\mu\text{L}$  de solvente de dessorção e foram empregados 5 ciclos de aspiração/permanência/liberação. Os experimentos foram realizados de acordo com a seção experimental e uma superfície resposta triangular (Figura 9) foi obtida usando a média geométrica das áreas dos picos cromatográficos dos analitos.

Figura 9 – Superfície resposta triangular obtida para a otimização do solvente de dessorção.  $R^2 = 0,9931$ .



Fonte: Autoria própria (2017).

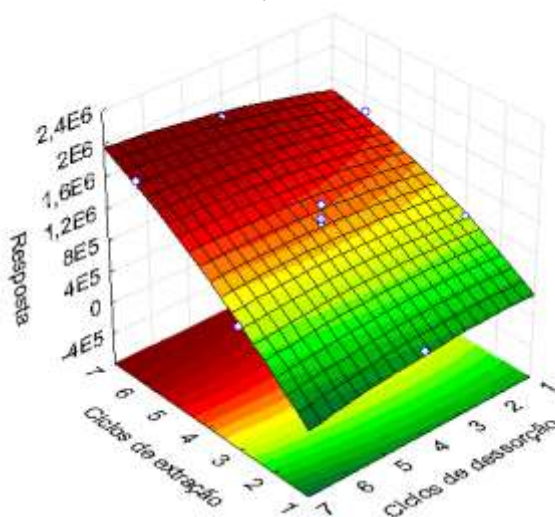
Como pode ser visto na Figura 9, os solventes orgânicos MeOH e ACN apresentaram uma capacidade de dessorção maior em comparação com a água. Isso possivelmente ocorreu por esses solventes serem menos polares que a água ( $\text{Log } K_{ow} \text{ ACN} = -0,17$ ;  $\text{Log } K_{ow} \text{ MeOH} = -0,52$ ; e  $\text{Log } K_{ow} \text{ H}_2\text{O} = -0,65$ ) (ChemAxon, 2020) e assim, possuírem polaridade mais

semelhante com a dos analitos. Além disso, também possuem estrutura mais semelhante, favorecendo a interação analito-solvente de dessorção. Assim, MeOH:ACN na proporção 50:50 (v/v) apresentou resultados mais satisfatórios para a dessorção dos analitos e essa proporção foi usada nos próximos experimentos.

#### 4.3.2.3 Otimização do número de ciclos de extração e dessorção

O número de ciclos das etapas de extração e dessorção também são parâmetros que devem ser avaliados no procedimento de DPX. Dessa forma, 1 a 7 ciclos de extração e dessorção foram avaliados e o tempo de cada ciclo foi fixado em 30 s. Os ciclos de extração foram realizados sempre usando uma nova alíquota de 700  $\mu\text{L}$  da amostra para aumentar a pré-concentração dos analitos. Os ciclos de dessorção foram realizados com a mesma alíquota de solvente orgânico (200  $\mu\text{L}$  de MeOH:ACN 50:50, v/v). Para a avaliação do número de ciclos de extração e dessorção foi utilizado o planejamento *Doehlert* com 9 experimentos (incluindo a triplicata no ponto central). A superfície resposta obtida utilizando a média geométrica das áreas dos picos cromatográficos para os analitos está mostrada na Figura 10.

Figura 10 – Superfície resposta obtida utilizando o planejamento *Doehlert* para o número de ciclos de extração *versus* o número de ciclos de dessorção para a DPX-Si3Py<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>.  $R^2 = 0,9719$ .



Fonte: Autoria própria (2017).

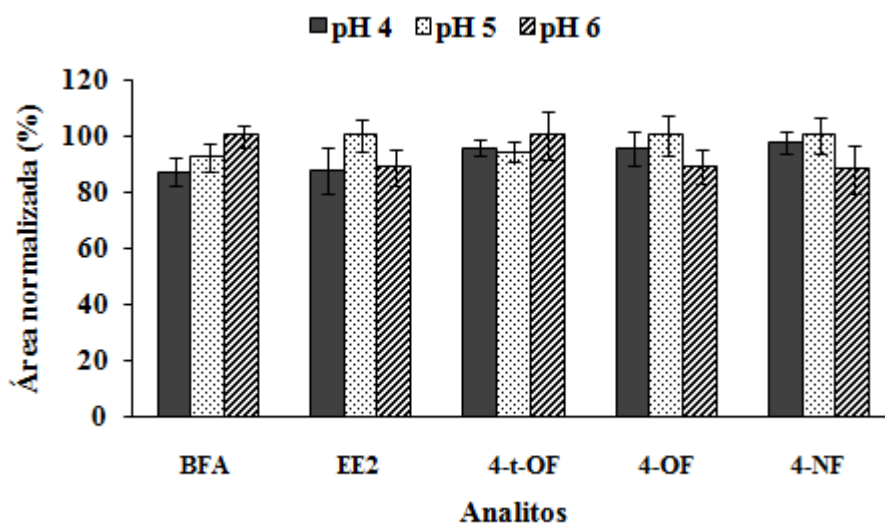
Como pode ser observado na Figura 10, a massa de analito extraída aumentou com o aumento o número de ciclos de extração. Isto se deve ao uso de uma nova alíquota de amostra em cada ciclo de extração, o que permitiu a inserção de uma nova porção de analito

disponível para ser extraído pela fase extratora. Esse perfil deve ser mantido até a saturação do material. As respostas para 5, 6 e 7 ciclos de extração são similares, logo, foram selecionados 5 ciclos de extração. Com relação ao número de ciclos de dessorção, pode ser observado que 2 ciclos permitiram uma dessorção satisfatória dos analitos. Portanto, 5 ciclos de extração e 2 ciclos de dessorção foram selecionados para os experimentos subsequentes.

#### 4.3.2.4 Otimização do pH da amostra e adição de sal

A eficiência de extração pode ser afetada pela forma que os analitos estão presentes na amostra aquosa, uma vez que o comportamento de extração para a forma dissociada difere da forma neutra (Cui *et al.*, 2015). Nesse caso, é preferível que os analitos estejam na forma neutra, pois isso permite uma maior interação com a fase extratora. Para espécies ácidas, o pH da amostra deve ser pelo menos 1,5 unidades menor que o pKa dos analitos (Carasek e Merib, 2015). Nesse estudo, os valores de pH avaliados foram 4, 5 e 6. Esses valores foram selecionados considerando que os compostos fenólicos em estudo são ácidos orgânicos fracos e seus pKas são 9,78; 10,33; 10,23; 10,31 e 10,30 para o BFA, EE2, 4-*t*-OF, 4-OF e 4-NF, respectivamente. Um gráfico de barras representando a área normalizada dos picos cromatográficos dos analitos é apresentado na Figura 11.

Figura 11 – Avaliação do pH da amostra para o BFA, EE2, 4-*t*-OF, 4-OF e 4-NF.

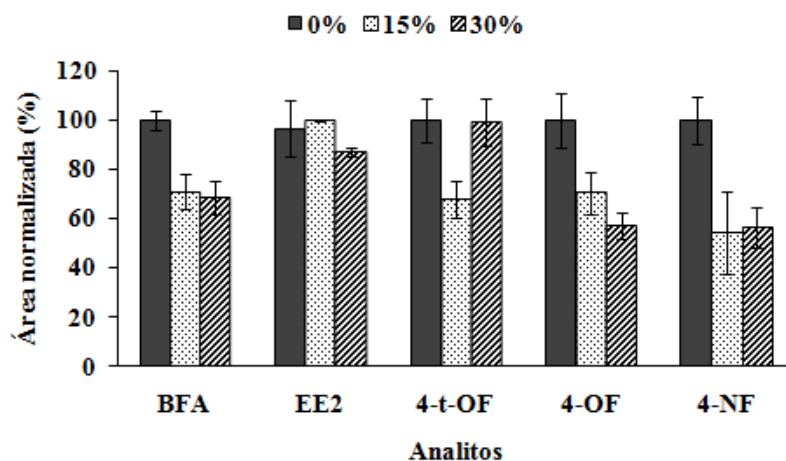


Fonte: Autoria própria (2017).

Resultados similares foram observados para todos os analitos em pH 4, 5 e 6. Portanto, o pH 6 foi selecionado para os próximos experimentos, pois esse pH é similar ao pH da água ultrapura e das amostras de água de rio.

Outro parâmetro que pode afetar a eficiência de extração na técnica de DPX é a adição de sal na amostra, uma vez que a sua adição aumenta a força iônica de amostras aquosas e assim, a solubilidade dos compostos orgânicos pode diminuir, facilitando a migração para a fase extratora (efeito *salting-out*). Esse efeito é observado principalmente para compostos polares e com média-polaridade (Kokosa *et al.*, 2009; Dias *et al.*, 2015). Outro efeito observado quando se utilizam altas concentrações de sal é precipitação do sal e formação de partículas que podem migrar para a fase extratora, bloqueando os sítios ativos. Assim, esses ficam menos disponíveis para interagir com os analitos. Além disso, com altas concentrações de sal, a amostra aquosa fica mais viscosa, dificultando a aspiração e a mistura dinâmica na técnica de DPX. Nesse estudo, concentrações de 0, 15 e 30% m/v de NaCl foram avaliadas e um gráfico de barras representando a área normalizada dos picos cromatográficos dos analitos é apresentado na Figura 12.

Figura 12 – Avaliação da adição de sal na amostra para o BFA, EE2, 4-*t*-OF, 4-OF e 4-NF.



Fonte: Autoria própria (2017).

Nesse estudo altas eficiências de extração foram obtidas sem a adição de NaCl. Isto foi devido provavelmente à relativa baixa polaridade apresentada pelos analitos ( $\log P \geq 3,90$ ) ocorrendo um efeito *salting-out* menos pronunciado. Além disso, o aumento da viscosidade da amostra com o aumento da concentração de sal pode ter influenciado na aspiração da amostra e na mistura dinâmica. Portanto, não foi utilizado sal nos experimentos subsequentes.

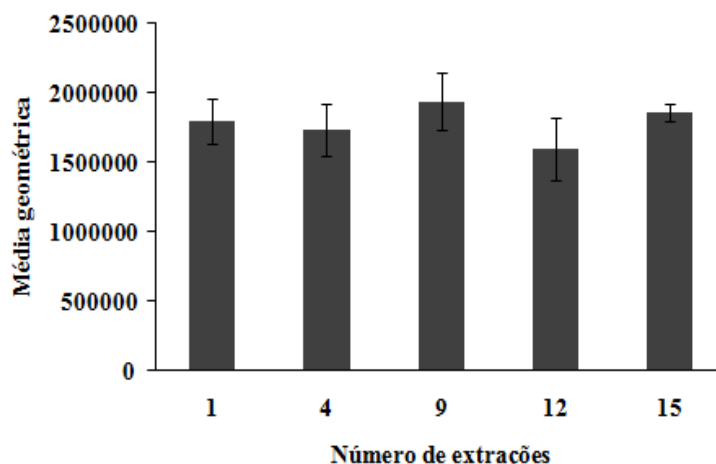
#### 4.3.2.5 *Otimização da etapa de limpeza*

Após a dessorção dos analitos, foi otimizado o procedimento de limpeza da fase extratora para que essa fosse empregada novamente em outras extrações. As otimizações consistiram em variar o número de ciclos e o volume de solventes empregados na limpeza, conforme descrito na seção experimental. Metanol:ACN (50:50, v/v) foi usado como solvente orgânico baseado na otimização do solvente de dessorção. Água ultrapura foi usada para remover o excesso de solvente orgânico e manter a fase extratora na mesma condição usada antes do procedimento de extração. O procedimento que promoveu a limpeza mais eficiente, ou seja, sem efeito de memória entre as extrações, consistiu em 3 ciclos com 200  $\mu\text{L}$  de MeOH:ACN (50:50, v/v) + 2 ciclos com 200  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ .

Após todas as etapas de otimização completadas, a condição experimental ideal foi identificada como: 30 mg de fase extratora; 5 ciclos de extração usando novas alíquotas da amostra (700  $\mu\text{L}$  cada alíquota) seguido de 2 ciclos de dessorção usando a mesma alíquota (200  $\mu\text{L}$  de MeOH:ACN 50:50, v/v); pH=6 e sem adição de sal.

#### **4.3.3 Avaliação da estabilidade da fase extratora e possíveis compostos interferentes para o material $\text{Si3Py}^+\text{Cl}^-$**

Para verificar a estabilidade da fase extratora proposta após sucessivas extrações, foram realizados 15 procedimentos de extração completos (extração/dessorção/limpeza) usando a mesma porção de fase extratora. Os resultados estão apresentados na Figura 13 e foram expressos através da média geométrica da área dos picos cromatográficos dos analitos após 1, 4, 9, 12 e 15 extrações.

Figura 13 – Avaliação da estabilidade da fase extratora Si3Py<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>.

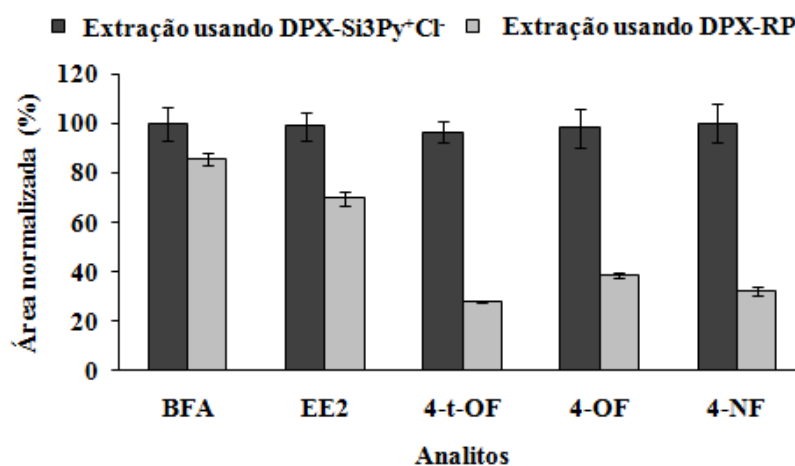
Fonte: Autoria própria (2017).

Foi observado que o material Si3Py<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup> extraiu quantidades similares de analito, o que forneceu importante evidência de que esse material pode ser reutilizado em pelo menos 15 extrações sem perda da eficiência, sendo adequado para a aplicação pretendida. Essa característica é muito atrativa, pois em algumas técnicas de preparo de amostras, como a SPE, os cartuchos são usados apenas uma vez.

A eficiência de extração do método desenvolvido usando a DPX-Si3Py<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup> foi comparada com a eficiência de extração da DPX-RP disponível comercialmente, a qual é composta de estireno-divinilbenzeno. Para essa comparação, o procedimento utilizando DPX-RP também foi otimizado. As melhores condições obtidas para a fase comercial foram: 6 ciclos de extração usando nova alíquota de 700 µL da amostra, 2 ciclos de dessorção usando 200 µL de ACN, pH da amostra ajustado em 6 e sem adição de sal. As extrações foram realizadas empregando as condições otimizadas para a DPX-Si3Py<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup> e para a DPX-RP, a comparação está apresentada na Figura 14.



Figura 14 – Comparação da eficiência de extração entre DPX-Si3Py<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup> e DPX-RP.

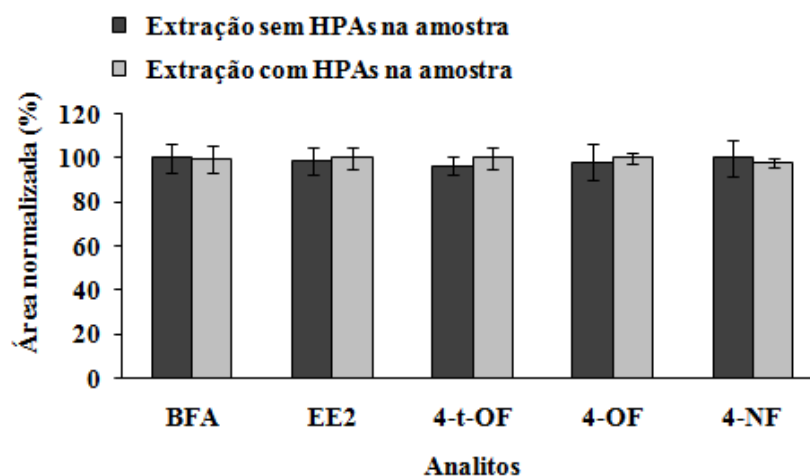


Fonte: Autoria própria (2017).

De acordo com a Figura 14, a DPX-Si3Py<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup> apresentou excelentes resultados para a extração de compostos fenólicos e exibiu uma eficiência de extração maior que a DPX-RP, principalmente para o 4-*t*-OH, 4-OH e 4-NF. Esse comportamento pode ser atribuído as diferentes estruturas químicas apresentadas por esses materiais extratores. A fase extratora estireno-divinilbenzeno (DPX-RP) possui anéis aromáticos que podem interagir com os analitos através de interações  $\pi$ - $\pi$ . Por outro lado, o material Si3Py<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup> possui grupos silanóis (Si-OH) que podem interagir fortemente com as porções mais polares dos analitos através de ligação de hidrogênio. Por essa razão, a eficiência de extração dos analitos estudados foi melhorada usando a DPX-Si3Py<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>. Assim, essa fase extratora é uma alternativa promissora para ser empregada na extração de compostos contendo grupos que permitam ligação de hidrogênio e interação  $\pi$ - $\pi$ .

Além disso, foi realizado um estudo com a DPX-Si3Py<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup> para verificar a influência de compostos potencialmente interferentes na extração dos compostos fenólicos em estudo. Para esse caso em particular, foram escolhidos HPAs, uma vez que esses compostos são contaminantes frequentemente encontrados em amostras de água (Dias *et al.*, 2013; Merib *et al.*, 2016) e são resistentes à degradação devido ao seu caráter lipofílico, podendo bioacumular em organismos vivos (Keyte *et al.*, 2013). Além disso, suas estruturas possuem anéis aromáticos que podem interagir com o Si3Py<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup> através de interações  $\pi$ - $\pi$ . Para essa avaliação, uma amostra de água foi fortificada com os analitos na concentração de 50  $\mu\text{g L}^{-1}$  e foi submetida ao procedimento de extração na presença de HPAs (concentração de 50  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) e na ausência de HPAs. As áreas normalizadas dos picos cromatográficos dos analitos foram comparadas e estão apresentadas na Figura 15.

Figura 15 – Resultados para a eficiência de extração de compostos fenólicos com e sem possíveis compostos interferentes.



Fonte: Autoria própria (2017).

Foi observado que a eficiência de extração para compostos fenólicos não foi afetada na presença de HPAs. Isto indica que essa fase extratora exibe um desempenho satisfatório mesmo na presença de outras classes de compostos presentes em amostras de água.

#### 4.3.4 Parâmetros analíticos de mérito

As curvas de calibração foram construídas em uma amostra de água de rio coletada no Rio Itajaí (Itajaí, Santa Catarina, Brasil) fortificada com os analitos em seis níveis de concentração (1; 2; 5; 20; 50 e 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) e aplicando as condições otimizadas para a DPX-Si3Py<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>. Os coeficientes de correlação (r) foram obtidos a partir das curvas de calibração. Os limites de quantificação (LOQs) foram adotados como sendo o primeiro nível de concentração da faixa linear e os limites de detecção (LODs) foram obtidos dividindo o LOQ por 3,3. Os parâmetros analíticos de mérito estão mostrados na Tabela 7.

Tabela 7 – Equação da reta, coeficientes de correlação, faixas lineares ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ), limites de detecção e quantificação ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) do método proposto usando a DPX-Si3Py<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>.

Análito	Equação da reta	r	Faixa linear ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LOD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LOQ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
BFA	$y = 86994x - 26154$	0,9973	1-100	0,30	1,0
EE2	$y = 64143x - 3434,7$	0,9982	1-100	0,30	1,0
4-t-OF	$y = 71005x - 69874$	0,9960	2-100	0,60	2,0
4-OF	$y = 64602x - 35490$	0,9960	1-100	0,30	1,0
4-NF	$y = 49502x - 22845$	0,9970	1-100	0,30	1,0

Fonte: Autoria própria (2017).

Na Tabela 7 é possível observar que os coeficientes de correlação variaram de 0,9960 para o 4-*t*-OF e 4-OF a 0,9982 para o EE2, o que indica uma boa correlação das variáveis *x* e *y*. Em relação ao BFA, EE2, 4-OF e 4-NF, os LODs e LOQs foram 0,30 e 1 µg L<sup>-1</sup>, respectivamente. Para o 4-*t*-OF os valores correspondentes foram 0,60 e 2 µg L<sup>-1</sup>. Além disso, foi verificada a linearidade das curvas de calibração usando a análise de variância (ANOVA), apresentada na Tabela 8.

Tabela 8 – Tabela ANOVA para a verificação da linearidade das curvas de calibração.

<b>BFA</b>					
	<b>GL</b>	<b>Soma dos Quadrados (SS)</b>	<b>Média dos Quadrados (MS)</b>	<b>F</b>	<b>Valor de p</b>
Regressão	1	9,70x10 <sup>13</sup>	9,70x10 <sup>13</sup>	5,18x10 <sup>3</sup>	9,82x10 <sup>-9</sup>
Residual	5	9,37x10 <sup>10</sup>	1,87x10 <sup>10</sup>		
<b>EE2</b>					
	<b>GL</b>	<b>Soma dos Quadrados (SS)</b>	<b>Média dos Quadrados (MS)</b>	<b>F</b>	<b>Valor de p</b>
Regressão	1	5,30x10 <sup>13</sup>	5,30x10 <sup>13</sup>	1,95x10 <sup>4</sup>	1,58x10 <sup>-8</sup>
Residual	4	1,09x10 <sup>10</sup>	2,72x10 <sup>9</sup>		
<b>4-<i>t</i>-OF</b>					
	<b>GL</b>	<b>Soma dos Quadrados (SS)</b>	<b>Média dos Quadrados (MS)</b>	<b>F</b>	<b>Valor de p</b>
Regressão	1	6,34x10 <sup>13</sup>	6,34x10 <sup>13</sup>	4,75x10 <sup>3</sup>	2,65x10 <sup>-7</sup>
Residual	4	5,34x10 <sup>10</sup>	1,33x10 <sup>10</sup>		
<b>4-OF</b>					
	<b>GL</b>	<b>Soma dos Quadrados (SS)</b>	<b>Média dos Quadrados (MS)</b>	<b>F</b>	<b>Valor de p</b>
Regressão	1	5,31x10 <sup>13</sup>	5,31x10 <sup>13</sup>	6,63x10 <sup>3</sup>	5,30x10 <sup>-9</sup>
Residual	5	4,01x10 <sup>10</sup>	8,02x10 <sup>9</sup>		
<b>4-NF</b>					
	<b>GL</b>	<b>Soma dos Quadrados (SS)</b>	<b>Média dos Quadrados (MS)</b>	<b>F</b>	<b>Valor de p</b>
Regressão	1	3,43x10 <sup>13</sup>	3,43x10 <sup>13</sup>	2,39x10 <sup>3</sup>	6,79x10 <sup>-8</sup>
Residual	5	7,19x10 <sup>10</sup>	1,44x10 <sup>10</sup>		

Fonte: Autoria própria (2017).

Como é possível observar, todas as curvas de calibração apresentaram um valor extremamente pequeno de *p*, indicando a boa correlação entre as variáveis independente e dependente. Também, foi observada uma boa relação linear, uma vez que o termo correspondente à regressão da média dos quadrados (MS regressão) é muito maior do que o termo residual da média dos quadrados (MS residual) (Barwick, 2003).

A recuperação relativa foi usada para avaliar a exatidão do método e o desvio padrão relativo (RSD) foi usado para avaliar a precisão do método em três diferentes níveis de

concentração dos analitos. Os valores das recuperações relativas e desvios padrões relativos estão mostrados na Tabela 9.

Tabela 9 – Resultados obtidos para concentração  $\pm$  intervalo de confiança ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ), recuperações relativas (%) e desvio padrão relativo (%) para os analitos em água de rio usando o procedimento de DPX-Si3Py<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup> otimizado (n=3).

<b>Analitos</b>	<b>Concentração fortificada (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</b>	<b>Concentração encontrada <math>\pm</math> intervalo de confiança (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</b>	<b>Recuperação relativa (%)</b>	<b>RSD (%)</b>
BFA	2	2,1 $\pm$ 0,26	105	12
	20	18,4 $\pm$ 0,13	88	7
	100	94,2 $\pm$ 2,9	94	3
EE2	2	1,7 $\pm$ 0,22	83	13
	20	18,5 $\pm$ 1,17	92	6
	100	98,3 $\pm$ 2,3	98	2
4- <i>t</i> -OF	2	2,3 $\pm$ 0,46	116	20
	20	18,9 $\pm$ 1,1	95	6
	100	103 $\pm$ 1,1	104	1
4-OF	2	1,9 $\pm$ 0,12	98	6
	20	17,8 $\pm$ 1,4	89	8
	100	96,5 $\pm$ 1,4	91	1
4-NF	2	1,9 $\pm$ 0,31	95	16
	20	18,4 $\pm$ 1,6	92	9
	100	95,5 $\pm$ 0,68	95	1

Fonte: Aatoria própria (2017).

Todos os analitos apresentaram recuperações relativas satisfatórias (83-116%) e precisões adequadas ( $\text{RSD} \leq 20\%$ ), estando de acordo com o guia de validação da Comissão Europeia (European Commission, 2015). Ademais, os resultados das recuperações relativas foram avaliados aplicando o teste *t-Student* (Tabela 10).

Tabela 10 – Avaliação da recuperação relativa em três níveis de concentração (2; 20 e 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) através do teste *t-Student*.

<b>BFA</b>						
	<b>2 <math>\mu\text{g L}^{-1}</math></b>		<b>20 <math>\mu\text{g L}^{-1}</math></b>		<b>100 <math>\mu\text{g L}^{-1}</math></b>	
	<b>Variável 1</b>	<b>Variável 2</b>	<b>Variável 1</b>	<b>Variável 2</b>	<b>Variável 1</b>	<b>Variável 2</b>
Média	2,100	2,000	17,599	20,000	94,611	100,000
Variância	0,068	0,000	1,701	0,000	4,713	0,000
Observações	3,000	3,000	3,000	3,000	3,000	3,000
Hipótese da diferença de média	0,000		0,000		0,000	
GL	2,000		2,000		2,000	
Start t (calculado)	0,662		-3,188		-4,299	
P (T<=t) uni-caudal	0,288		0,043		0,025	
t crítico uni-caudal	2,920		2,920		2,920	
P (T<=t) bi-caudal	0,576		0,086		0,050	
t crítico bi-caudal	4,303		4,303		4,303	
<b>EE2</b>						
	<b>2 <math>\mu\text{g L}^{-1}</math></b>		<b>20 <math>\mu\text{g L}^{-1}</math></b>		<b>100 <math>\mu\text{g L}^{-1}</math></b>	
	<b>Variável 1</b>	<b>Variável 2</b>	<b>Variável 1</b>	<b>Variável 2</b>	<b>Variável 1</b>	<b>Variável 2</b>
Média	1,532	2,000	18,431	20,000	97,995	100,000
Variância	0,050	0,000	1,363	0,000	2,833	0,000
Observações	3,000	3,000	3,000	3,000	3,000	3,000
Hipótese da diferença de média	0,000		0,000		0,000	
GL	2,000		2,000		2,000	
Start t (calculado)	-3,619		-2,327		-2,063	
P (T<=t) uni-caudal	0,034		0,073		0,088	
t crítico uni-caudal	2,920		2,920		2,920	
P (T<=t) bi-caudal	0,069		0,145		0,175	
t crítico bi-caudal	4,303		4,303		4,303	
<b>4-t-OF</b>						
	<b>2 <math>\mu\text{g L}^{-1}</math></b>		<b>20 <math>\mu\text{g L}^{-1}</math></b>		<b>100 <math>\mu\text{g L}^{-1}</math></b>	
	<b>Variável 1</b>	<b>Variável 2</b>	<b>Variável 1</b>	<b>Variável 2</b>	<b>Variável 1</b>	<b>Variável 2</b>
Média	2,495	2,000	18,936	20,000	103,207	100,000
Variância	0,190	0,000	1,226	0,000	1,718	0,000
Observações	3,000	3,000	3,000	3,000	3,000	3,000
Hipótese da diferença de média	0,000		0,000		0,000	
GL	2,000		2,000		2,000	
Start t (calculado)	1,965		-1,665		4,237	

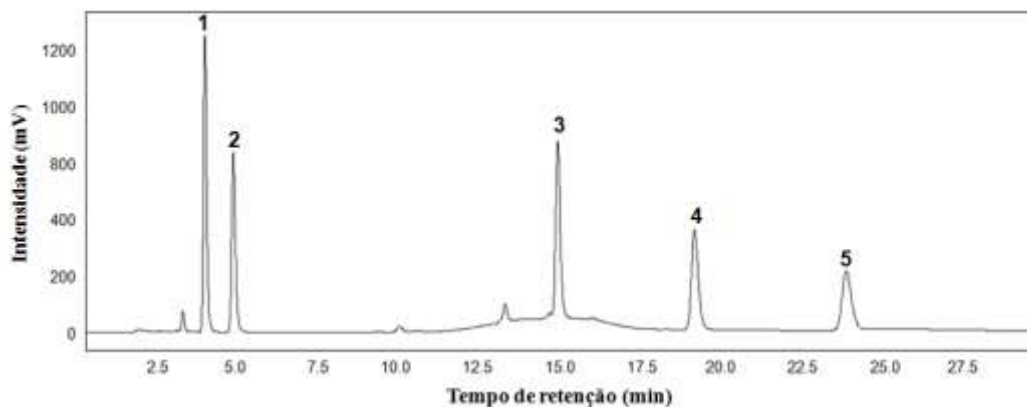
P (T<=t) uni-caudal	0,094		0,119		0,026	
t crítico uni-caudal	2,920		2,920		2,920	
P (T<=t) bi-caudal	0,188		0,238		0,051	
t crítico bi-caudal	4,303		4,303		4,302653	
<b>4-OF</b>						
	<b>2 µg L<sup>-1</sup></b>		<b>20 µg L<sup>-1</sup></b>		<b>100 µg L<sup>-1</sup></b>	
	<b>Variável 1</b>	<b>Variável 2</b>	<b>Variável 1</b>	<b>Variável 2</b>	<b>Variável 1</b>	<b>Variável 2</b>
Média	1,958	2,000	17,804	20,000	96,343	100,000
Variância	0,014	0,000	2,053	0,000	1,048	0,000
Observações	3,000	3,000	3,000	3,000	3,000	3,000
Hipótese da diferença de média	0,000		0,000		0,000	
GL	2,000		2,000		2,000	
Start t (calculado)	-0,604		-2,654		-6,188	
P (T<=t) uni-caudal	0,304		0,059		0,013	
t crítico uni-caudal	2,920		2,920		2,920	
P (T<=t) bi-caudal	0,607		0,117		0,025	
t crítico bi-caudal	4,303		4,303		4,303	
<b>4-NF</b>						
	<b>2 µg L<sup>-1</sup></b>		<b>20 µg L<sup>-1</sup></b>		<b>100 µg L<sup>-1</sup></b>	
	<b>Variável 1</b>	<b>Variável 2</b>	<b>Variável 1</b>	<b>Variável 2</b>	<b>Variável 1</b>	<b>Variável 2</b>
Média	1,898	2,000	18,395	20,000	95,311	100,000
Variância	0,096	0,000	2,672	0,000	0,306	0,000
Observações	3,000	3,000	3,000	3,000	3,000	3,000
Hipótese da diferença de média	0,000		0,000		0,000	
GL	2,000		2,000		2,000	
Start t (calculado)	-0,568		-1,700		-14,672	
P (T<=t) uni-caudal	0,314		0,116		0,002	
t crítico uni-caudal	2,920		2,920		2,920	
P (T<=t) bi-caudal	0,627		0,231		0,005	
t crítico bi-caudal	4,303		4,303		4,303	

Fonte: Autoria própria (2017).

A partir da avaliação do valor de P (T<=t) bi-caudal e do valor experimental é possível confirmar que as recuperações relativas não apresentaram diferença significativa do valor de recuperação 100%.

Na Figura 16 está apresentado um cromatograma obtido aplicando a DPX-Si3Py<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup> otimizada em uma amostra de água de rio fortificada com 100 µg L<sup>-1</sup> de cada analito.

Figura 16 – Cromatograma resultante da extração de uma amostra de água de rio fortificada com os analitos BFA, EE2, 4-*t*-OF, 4-OF e 4-NF na concentração de 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  utilizando o método proposto DPX-Si3Py<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>. Ordem de eluição: 1) BFA, 2) EE2, 3) 4-*t*-OF, 4) 4-OF e 5) 4-NF.



Fonte: Autoria própria (2017).

É possível observar uma boa separação dos analitos, além de um cromatograma sem interferências provenientes do material extrator e/ou da matriz da água de rio utilizada. A partir desses resultados, é possível concluir que o método desenvolvido utilizando a DPX-Si3Py<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup> apresenta boa confiabilidade e potencial para ser aplicado na extração dos compostos fenólicos em estudo de amostras de água de rio. Além disso, os resultados obtidos nesse estudo usando o método (DPX-Si3Py<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>) foram comparados com outros métodos reportados na literatura que analisaram os mesmos analitos. Essa comparação está apresentada na Tabela 11.

Tabela 11 – Comparação entre o método proposto DPX-Si3Py<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup> com outros métodos reportados na literatura para os mesmos analitos. Todos os estudos empregaram cromatografia líquida como técnica de separação e FLD ou MS/MS como detectores.

Método	Matriz	Faixa linear ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )					Tempo total de extração (min)	Referência
		BFA	EE2	4- <i>t</i> -OF	4-OF	4-NF		
Este estudo HPLC-FLD	Água de rio	1-100	1-100	2-100	1-100	1-100	3,50	
ILs-DLLME HPLC-FLD	Água ultrapura Água mineral Água residual	-	1,20-21 1,80-12 1,30-13	-	-	-	-	(Socas-Rodriguez <i>et al.</i> , 2014)
SPE-PTFE HPLC-FLD	Água de rio	-	-	-	10-355	15-529	-	(Zgola-Grzeskowiak e Grzeskowiak, 2011)
PPP-HF-LPME HPLC-FLD	Água de rio e água da torneira	-	-	-	0,50-200	0,50-200	2	(Chao <i>et al.</i> , 2013)
Microextração líquido-líquido dispersiva a base de líquido iônico controlado por temperatura HPLC-FLD	Amostras de água	1-100	-	-	3-300	1,50-150	20	(Zhou <i>et al.</i> , 2011)
VALLME HPLC-FLD	Água da torneira e água de rio	0,05-100	-	-	0,05-100	0,05-100	4	(Yiantzi <i>et al.</i> , 2010)
FPSE HPLC-FLD	Urina, amostras de água e efluente hospitalar		1-500				28	(Kumar <i>et al.</i> , 2014)



Método	Matriz	Faixa linear ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )					Tempo total de extração (min)	Referência
		BFA	EE2	4- <i>t</i> -OF	4-OF	4-NF		
DLLME HPLC-FLD	Amostras de água	2,50-250	2-125				-	(Liu <i>et al.</i> , 2011)
SPE HPLC-MS/MS	Leite humano	0,30-<100					-	(Ye <i>et al.</i> 2008)
SPE HPLC-MS/MS	Sérum	0,30-≤100					-	(Ye <i>et al.</i> , 2008)
LLE HPLC-MS/MS	Urina	0,20-50		0,20-50			21	(Zhang <i>et al.</i> , 2016)
HM-PAN nanofiber mat-based SPE HPLC-MS/MS	Amostras de água	0,05-20			0,1-20	0,1-20	-	(Li <i>et al.</i> , 2015)

Fonte: Autoria própria (2017).

SPE-PTFE - Extração em Fase Sólida-Politetrafluoroetileno, do inglês *Solid-Phase Extraction-Polytetrafluoroethylene*

PPP-HF-LPME - Microextração em Fase Líquida com Fibra Oca e Perfusão Empurra/Puxa, do inglês *Push/Pull Perfusion Hollow-Fiber Liquid-Phase Microextraction*

VALLME - Microextração Líquido-Líquido Assistida por Vortex, do inglês *Vortex-Assisted Liquid-Liquid Microextraction*

FPSE - "*Fabric Phase Sorptive Extraction*"

HM-PAN nanofiber mat-based SPE - Poliacrilonitrilo Modificado com Hidrazina nanofibra "mat" baseado em SPE, do inglês *Hydrazine-Modified Polyacrylonitrile nanofiber mat-based SPE*

De acordo com a Tabela 11, pode ser observado que o método proposto forneceu um tempo de extração curto (apenas 3,50 min) e ampla faixa linear (1-100  $\mu\text{g L}^{-1}$  para BFA, EE2, 4-OF e 4-NF e 2-100  $\mu\text{g L}^{-1}$  para o 4-*t*-OF), o que é uma vantagem para a análise de amostras que apresentam os analitos em uma ampla faixa de concentração. Também pode ser observado que o primeiro nível de concentração da faixa linear do método proposto é maior que os valores geralmente obtidos usando LC-MS/MS. Logo, esse instrumento analítico (LC-MS/MS) possui uma sensibilidade maior. Por outro lado, o primeiro nível de concentração da faixa linear obtido nesse estudo é comparável aos obtidos empregando o mesmo detector (detector de fluorescência). Assim, apesar da menor sensibilidade apresentada comparando com os instrumentos de LC-MS/MS, os resultados obtidos usando o método proposto são adequados para a determinação de compostos disruptores endócrinos fenólicos, além de utilizar instrumentação analítica associada a menores custos em comparação ao LC-MS/MS.

#### 4.3.5 Análise de amostras de água de rio

O método desenvolvido foi aplicado na extração de três amostras de água coletadas em rios do estado de Santa Catarina, Brasil: amostra A coletada no Rio Itajaí (Itajaí), amostra B coletada no Rio São Francisco do Sul (São Francisco do Sul) e amostra C coletada no Rio Cubatão (Palhoça). Bisfenol A, EE2 e 4-*t*-OF foram detectados em concentrações inferiores aos limites de quantificação para as amostras A, B e C. Os analitos 4-OF e 4-NF não foram detectados nas amostras avaliadas.

A Diretiva 2013/39/EU do Parlamento Europeu e do Conselho estabelece a média anual (AA – concentração total de todos os isômeros) e concentrações máximas permitidas (MACs) para OFs e NFs em águas superficiais. Para OFs a AA é 0,1  $\mu\text{g L}^{-1}$  e a MAC não é aplicável. Para NFs a AA é 0,3  $\mu\text{g L}^{-1}$  e a MAC é 2,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Não há legislação para os outros compostos em estudo (Europeia, 2013b). Baseado nessas informações, o LOD do método proposto é adequado para a análise de 4-NF. Em estudos previamente reportados na literatura a faixa linear para os mesmo compostos foi entre dezenas de  $\text{ng L}^{-1}$  e dezenas de  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Zgola-Grzeskowiak e Grzeskowiak, 2011; Chao *et al.*, 2013; Zhang, S. H. *et al.*, 2016). Assim, os LODs, LOQs e faixas lineares observadas nesse estudo são aceitáveis. As concentrações dos analitos encontradas em amostras de água analisadas em outros trabalhos foram 45,65  $\mu\text{g L}^{-1}$  para o 4-NF (Cui *et al.*, 2015), 1,03  $\mu\text{g L}^{-1}$  para o 4-NF e 0,81  $\mu\text{g L}^{-1}$  para o BFA (Chen *et al.*, 2012), 9,10  $\mu\text{g L}^{-1}$  para o 4-*t*-OF e 9,00  $\mu\text{g L}^{-1}$  para o 4-NF (Kartal *et al.*,

2015). Em alguns casos, os analitos não foram encontrados nas amostras (Chao *et al.*, 2013; Jia *et al.*, 2016; Liao *et al.*, 2016; Wang e Deng, 2016).

#### 4.4 CONCLUSÕES PARCIAIS

Uma nova fase extratora para a técnica de DPX composta pelo material  $\text{Si3Py}^+\text{Cl}^-$  foi aplicada na extração de compostos disruptores endócrinos fenólicos de amostras de água de rio. Essa fase extratora apresentou satisfatória estabilidade química frente aos solventes orgânicos ACN e MeOH empregados no procedimento proposto DPX- $\text{Si3Py}^+\text{Cl}^-$ , uma vez que pode ser utilizada em até 15 extrações sem perda da eficiência. Esse material também apresentou alta eficiência de extração para os compostos disruptores endócrinos fenólicos em estudo em comparação a uma fase extratora comercialmente disponível para DPX (estireno-divinilbenzeno – DPX-RP). O procedimento descrito também apresentou aspectos ambientalmente amigáveis e de alto rendimento, com tempo de extração curto (apenas 3,50 min), uso de pequenos volumes de solventes orgânicos (apenas 800  $\mu\text{L}$  de MeOH:ACN 50:50 v/v, incluindo o volume utilizado na etapa de limpeza da DPX- $\text{Si3Py}^+\text{Cl}^-$ ) e pequena massa de fase extratora (apenas 30 mg). Além disso, os parâmetros analíticos de mérito foram satisfatórios para a aplicação pretendida. O método apresentou faixas lineares comparáveis aos métodos que utilizam o mesmo detector (detector de fluorescência). Baseado nessas características, a fase extratora proposta oferece uma alternativa para a extração de analitos contendo grupos que podem interagir através de ligação de hidrogênio e interações  $\pi$ - $\pi$  com a fase extratora. Estudos futuros precisam ser realizados para avaliar o uso desse material em outras técnicas de extração e microextração. Também são necessários maiores estudos para avaliar o potencial desse material como fase extratora para compostos presentes em matrizes mais complexas, tais como, matrizes biológicas, alimentícias e águas residuais.

## **5 LÍQUIDOS IÔNICOS MAGNÉTICOS COMO FASE EXTRATORA VERSÁTIL PARA A RÁPIDA DETERMINAÇÃO DE HORMÔNIOS ESTRÓGENOS EM URINA HUMANA USANDO MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA E CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECTOR DE ARRANJO DE DIODOS**

### **5.1 INTRODUÇÃO**

Hormônios estrógenos desempenham várias funções no corpo humano, possuindo papel fundamental na diferenciação sexual e comportamental, regulação da função cardiovascular e formação dos ossos (Amandusson e Blomqvist, 2013; Kupcova e Reiffova, 2017). Um órgão alvo da ação dos hormônios estrógenos é o cérebro, uma vez que estudos indicam que esses hormônios podem estar relacionados com a termorregulação, memória, sobrevivência neuronal e transmissão da dor (Amandusson e Blomqvist, 2013). Além disso, hormônios estrógenos juntamente com progestágenos são a base dos contraceptivos orais, amplamente utilizados pelas mulheres para regular o ciclo reprodutivo, distúrbios menstruais e também para suplementar níveis insuficientes de estrogênios naturais. Essas moléculas podem ser classificadas como estrogênios endógenos (estrona, 17- $\beta$ -estradiol e estriol), estrogênios exógenos (17- $\alpha$ -etinilestradiol), progestogênios endógenos (progesterona) e progestogênios exógenos (19-noresterona e d(-)-norgestrel) (Almeida e Nogueira, 2015; Kupcova e Reiffova, 2017). A determinação desses compostos em urina é uma tarefa difícil, sendo de grande importância para o monitoramento de certas condições clínicas, como funções ovarianas e placentárias (Hanai, 1991). Além disso, em alguns casos, níveis elevados de estrogênios endógenos em amostras de urina podem estar associados ao câncer de mama (Maskarinec *et al.*, 2015).

Nos últimos anos, o monitoramento de estrógenos em água e amostras biológicas tem sido realizada principalmente por ensaios cromatográficos ou biológicos. Porém, as metodologias cromatográficas têm sido amplamente utilizadas devido à possibilidade de determinação simultânea. O uso da cromatografia líquida de alta performance tem sido preferido devido a sua versatilidade e a não necessidade de etapas de derivatização (Almeida e Nogueira, 2006). Contudo, em muitas aplicações é necessária uma etapa de preparo de amostra antes da análise instrumental.

O preparo de amostras clínicas e biomédicas geralmente é realizado através da desproteinização ou ultrafiltração da amostra, além do emprego de algumas técnicas de

extração como a LLE, SLE e/ou SPE (Hanai, 1991). Técnicas de microextração também têm sido usadas para a análise de matrizes biológicas complexas, como a urina, sendo uma ferramenta valiosa para esse tipo de análise.

Em relação a determinação de estrogênios em amostras de urina, algumas metodologias tem sido desenvolvidas baseadas na SPE (Wang *et al.*, 2013), UACPE (Extração em Ponto Nuvem Assistida por Ultrassom, do inglês *Ultrasond-Assisted Cloud-Point Extraction*) (Zou *et al.*, 2012), VA-DLLME-FOA (Microextração Líquido-Líquido Dispersiva Assistida por Vortex baseada em Ácido Orgânico Flutuante, do inglês *Vortex-Assisted Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Based on Floating Organic Acid*) (Wang *et al.*, 2015), BA $\mu$ E (Almeida e Nogueira, 2015), DLLME (Kupcova e Reiffova, 2017) e também SBSE (Almeida e Nogueira, 2006).

Dentre as técnicas de microextração, a DLLME foi selecionada para esse trabalho por apresentar a vantagem do rápido equilíbrio de partição devido à formação de microgotas com grande área superficial. Essa característica melhora consideravelmente a frequência analítica do método. Uma das variáveis que mais influencia a extração por DLLME é o solvente extrator. Os solventes extratores mais empregados são os solventes clorados, tais como o clorofórmio, clorobenzeno e tetracloreto de carbono (Liang e Sang, 2008; Xiong *et al.*, 2009; Shokoufi e Hamdamali, 2010; Fernandez *et al.*, 2013; Fernandez *et al.*, 2014; Gardner *et al.*, 2015). Apesar desses solventes apresentarem boa capacidade de extração, é importante ressaltar sua toxicidade que representa riscos para o analista e ao meio ambiente. Além disso, apresentam alta volatilidade, o que pode acarretar em problemas de reprodutibilidade do método analítico. Dessa forma, o uso de ILs como fase extratora em DLLME oferece uma série de vantagens em relação aos solventes orgânicos tradicionais. Estudos envolvendo ILs como fases extratoras em DLLME têm sido reportados para a determinação de pesticidas piretróides (Zhou *et al.*, 2008), compostos aromáticos (Yao e Anderson, 2009), inseticidas (Vazquez *et al.*, 2014), fármacos (Parrilla Vázquez *et al.*, 2013) e DNA (Li *et al.*, 2013), entre outros analitos orgânicos e inorgânicos em diferentes matrizes.

Uma subclasse de ILs que vem ganhando atenção é a dos MILs. Mais recentemente, MILs baseados em manganês foram reportados como solventes extratores para DLLME (Yu, *et al.*, 2016). Nessa abordagem, uma pequena quantidade de MIL combinado com um solvente dispersor foi introduzido em uma solução aquosa e, após a extração, a fase extratora foi recuperada com a ajuda de uma barra magnética. Essa abordagem possui características analíticas importantes, incluindo sua simplicidade, velocidade, a não utilização de uma etapa de centrifugação e a alta estabilidade dos MILs hidrofóbicos em solução aquosa.

Nesse trabalho foi reportado o procedimento analítico baseado na DLLME utilizando MILs como fase extratora para a rápida extração e determinação de estriol, estrona, 17- $\beta$ -estradiol e 17- $\alpha$ -etinilestradiol em urina humana usando MILs compatíveis com HPLC: tetracloro manganês (II) de trihexiltetradecil fosfônio ( $[P_{6,6,6,14}^+]_2[MnCl_4^{2-}]$ ) e tetracloro manganês (II) Aliquat ( $[Aliquat^+]_2[MnCl_4^{2-}]$ ), seguido da separação/detecção por HPLC-DAD. Os parâmetros que afetam a DLLME foram otimizados através de abordagens multivariadas e univariadas. Os parâmetros analíticos de mérito para cada analito foram determinados na condição otimizada. É importante ressaltar que poucos estudos têm sido conduzidos utilizando esses materiais em técnicas de microextração e, de acordo com uma extensa pesquisa na literatura, a DLLME utilizando MILs como fase extratora seguida da separação cromatográfica não foi previamente explorada para a análise de amostras biológicas complexas, tal como a urina.

## 5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

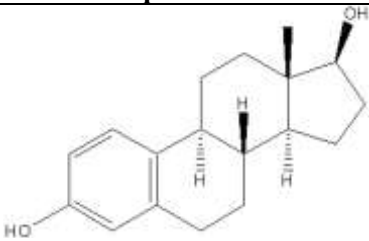
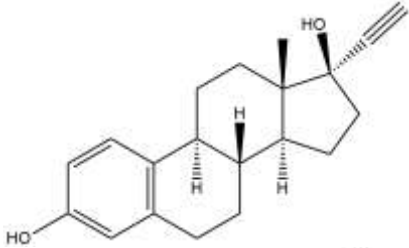
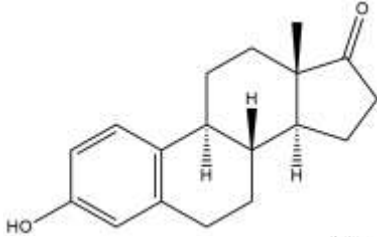
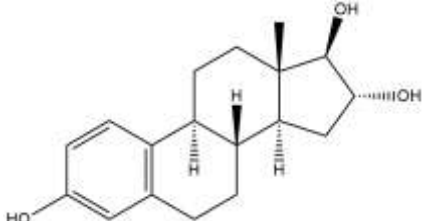
### 5.2.1 Reagentes e materiais

Os reagentes cloreto de trihexiltetradecil fosfônio  $[P_{6,6,6,14}^+][Cl^-]$  (97,7%), Aliquat<sup>®</sup> 336 (massa molar 404,16 g mol<sup>-1</sup>) e cloreto de manganês (II) tetrahidratado ( $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ ) (98,0%) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Padrões sólidos de estriol ( $\geq 97\%$ ), 17- $\beta$ -estradiol ( $\geq 98\%$ ), estrona ( $\geq 99\%$ ) e 17 $\alpha$ -etinilestradiol também foram obtidos da Sigma-Aldrich. Na Tabela 12 estão apresentadas as estruturas químicas, bem como algumas propriedades físico-químicas dos analitos selecionados para esse estudo.

Acetonitrila, MeOH e acetona grau HPLC foram obtidas da JT Baker (Mallinkrodt, EUA). Água ultrapura (18,2 M $\Omega$ cm) foi obtida a partir do sistema Mega Purity (Bellerica, EUA), ácido clorídrico e hidróxido de sódio utilizados para o ajuste do pH e cloreto de sódio utilizado para a avaliação do efeito da adição de sal na amostra foram obtidos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil).

Soluções padrão contendo os analitos na concentração de 250 mg L<sup>-1</sup> foram preparadas pela dissolução da massa apropriada dos padrões sólidos em MeOH. Soluções trabalho contendo todos os analitos nas concentrações de 1 e 0,1 mg L<sup>-1</sup> foram obtidas diluindo as soluções padrões em MeOH. Uma barra magnética de neodímio ( $B = 0,66$  T) foi adquirida da ImaShop (São Paulo, Brasil).

Tabela 12 – Estrutura e propriedades físico-químicas dos analitos selecionados para esse trabalho.

Analito	Estrutura química	pKa	Log K <sub>ow</sub>
17-β-estradiol		10,71 (Lewis e Archer, 1979)	3,94 (Almeida e Nogueira, 2006)
17-α-etinilestradiol		10,46 (Hurwitz e Liu, 1977)	4,12 (Almeida e Nogueira, 2006)
Estrona		10,34 (Hurwitz e Liu, 1977)	3,43 (Almeida e Nogueira, 2006)
Estriol		10,38 (Hurwitz e Liu, 1977)	2,45 (Virkyute <i>et al.</i> , 2010)

Fonte: Autoria própria (2018).

### 5.2.2 Instrumentação

Para a separação e detecção dos analitos foi usado um HPLC Agilent 1260 Infinity (Santa Clara, CA, EUA) equipado com uma bomba quaternária e detector de arranjo de diodos (DAD). O HPLC foi equipado com injetor manual Rheodyne com *loop* de 20 µL. A separação foi realizada em uma coluna C18 Phenomenex Gemini-NX (5,0 µm d.i., 4,6 mm × 250 mm). Para a eluição dos analitos foi utilizado um método gradiente iniciando com 65% da fase móvel A (água) e 35% da fase móvel B (ACN), a porcentagem da fase móvel B foi aumentada linearmente de 35 para 70% no período de 6 a 10 min, após foi retomada a condição inicial. O fluxo da fase móvel foi mantido constante em 1 mL min<sup>-1</sup>. Todos os analitos foram detectados no comprimento de onda de 200 nm e os dados cromatográficos foram analisados através do software Agilent OpenLab CDS System da Agilent Technologies.

Além disso, os MILs foram caracterizados usando um espectrofotômetro UV-Vis Varian Cary-50 (Varian Inc., Palo Alto, EUA).

### 5.2.3 Síntese e caracterização dos MILs

Os MILs foram sintetizados de acordo com trabalhos repostados anteriormente (Yu *et al.*, 2016; An *et al.*, 2017). Para a síntese do  $[P_{6,6,6,14}^+]_2[MnCl_4^{2-}]$ , uma massa de 1 equivalente de  $[P_{6,6,6,14}^+][Cl^-]$  foi misturada com 0,5 equivalentes de  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  em diclorometano. Essa mistura foi deixada reagir durante 24 h à temperatura ambiente sob agitação constante. Para a síntese do  $[Aliquat^+]_2[MnCl_4^{2-}]$ , uma massa de 1 equivalente de Aliquat<sup>®</sup> 336 foi misturada com 0,5 equivalentes de  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  em diclorometano e as mesmas condições de reação foram seguidas. Os produtos obtidos foram secos durante a noite a 70 °C em um forno de vácuo. Após a síntese, os MILs foram caracterizados por espectroscopia UV-Vis e a suscetibilidade magnética foi verificada com uma barra magnética. A completa caracterização dos MILs foi realizada em trabalhos anteriores (Yu *et al.*, 2016; An *et al.*, 2017).

### 5.2.4 Procedimento baseado na DLLME/MIL

Sob as condições otimizadas, uma mistura de solvente dispersor (5 µL de MeOH) e de MIL (5 mg de  $[P_{6,6,6,14}^+]_2[MnCl_4^{2-}]$ ) foi inserida em uma amostra de urina diluída com o pH ajustado em 6. Após, uma etapa de agitação manual foi realizada para facilitar a formação das microgotas na solução e a extração foi procedida por 90 s. Depois da extração, o MIL foi retirado da solução através do auxílio de uma barra magnética e a fase extratora contendo os analitos enriquecidos foi dessorvida em 20 µL de ACN antes da injeção no sistema de HPLC-DAD; portanto, o volume total injetado no *loop* do sistema de HPLC foi um pouco maior que 20 µL. Foi observado que a etapa de centrifugação não foi necessária devido à facilidade de retirar as microgotas de MIL da amostra usando a barra magnética. Assim, essa configuração oferece uma abordagem rápida baseada nas propriedades magnéticas dos MILs para a extração dos analitos. Uma visão geral do procedimento experimental utilizado para as extrações em amostras de urina é mostrada na Figura 17.



Figura 17 – Visão geral do procedimento de extração usando a abordagem baseada em DLLME/MIL.



Fonte: Adaptado de (Yu *et al.*, 2016).

### 5.2.5 Coleta das amostras

As amostras de urina foram coletadas de voluntários que participaram como autores desse trabalho com idades de 26 e 29 anos (uma mulher e um homem). Além disso, foi coletada uma amostra de urina de uma mulher grávida de 30 semanas (29 anos), a qual aceitou participar previamente dessa pesquisa, sem desconforto ou riscos relacionados aos procedimentos de doação voluntária. As amostras foram coletadas em frascos de PTFE, propriamente seladas e estocadas a 4° C. As amostras foram mantidas à temperatura ambiente (22° C) por 30 min antes das análises.

### 5.2.6 Otimização do procedimento de DLLME/MIL

As otimizações das condições de extração foram realizadas através de abordagens multivariadas e univariadas usando o MIL  $[P_{6,6,6,14}]_2[MnCl_4]^{2-}$ . Os dados obtidos a partir das abordagens multivariadas foram tratados usando o software Statistica 8.0 (STATSOFT, EUA). Para todas as otimizações, 75  $\mu$ L de urina foram diluídos para um volume final de 3 mL com água ultrapura (diluição 1:40 v/v), a urina diluída foi fortificada com os analitos na concentração de 400 ng mL<sup>-1</sup>. Primeiramente, o solvente dispersor foi otimizado através do planejamento *Simplex Lattice* utilizando ACN, MeOH, acetona e a mistura dos solventes, gerando 9 experimentos (incluindo a triplicata no ponto central), como apresentado na Tabela 13. A superfície resposta foi obtida utilizando a média geométrica da área dos picos cromatográficos dos analitos.

Tabela 13 – Matriz do planejamento *Simplex Lattice* para a otimização do solvente dispersor.

Experimento	ACN (%)	MeOH (%)	Acetona (%)
1	100	0	0
2	0	100	0
3	0	0	100
4	50	50	0
5	50	0	50
6	0	50	50
7	33	33	33
8	33	33	33
9	33	33	33

Fonte: Autoria própria (2018).

Após, foi realizado o planejamento fatorial completo  $2^4$  para fazer uma triagem das principais variáveis que podem influenciar a extração: tempo de extração (10-120 s), volume do solvente dispersor (5-20  $\mu\text{L}$ ), massa de MIL (5-20 mg) e concentração de NaCl (0-30%), gerando 16 experimentos, apresentados na Tabela 14. Nessa etapa, foram utilizadas as mesmas condições da otimização do solvente dispersor (quantidade de urina, água ultrapura e concentração dos analitos). Na última parte das otimizações, foram utilizadas abordagens univariadas para avaliar mais precisamente as condições ideais de tempo de extração e pH da amostra.

Tabela 14 – Matriz do planejamento fatorial completo  $2^4$  para a otimização das variáveis: massa de MIL, volume de solvente dispersor, tempo de extração e concentração de NaCl.

Experimento	Massa de MIL (mg)	Volume solvente dispersor ( $\mu\text{L}$ )	Tempo de extração (s)	Concentração NaCl (%)
1	20	20	10	0
2	5	5	120	0
3	5	5	10	30
4	20	5	120	30
5	20	20	120	0
6	5	5	10	0
7	5	20	120	30
8	20	20	120	30
9	20	5	10	30
10	20	5	120	0
11	5	20	10	0
12	5	5	120	30
13	20	20	10	30
14	5	20	10	30
15	5	20	120	0
16	20	5	10	0

Fonte: Autoria própria (2018).

### 5.2.7 Parâmetros analíticos de mérito e aplicação em amostras de urina humana

Curvas de calibração foram construídas fortificando uma amostra de urina nas concentrações de 5 a 500 ng mL<sup>-1</sup>. Os coeficientes de determinação foram obtidos a partir das curvas de calibração. Os limites de detecção (LODs) foram calculados reduzindo a concentração de analito até obter uma relação sinal-ruído de 3:1 e os limites de quantificação (LOQs) foram adotados como sendo o primeiro nível de concentração da faixa linear. A precisão do método foi avaliada através de ensaios intra-dia (n=3) em três níveis de concentração e inter-dia (n=9) em um nível de concentração. Os resultados da precisão foram expressos através do desvio padrão relativo em porcentagem (RSD, %). A exatidão do método foi avaliada em três amostras de urina nomeadas A, B e C, em três níveis de concentração. Os resultados da exatidão foram expressos através da recuperação relativa em porcentagem (RR, %).

As amostras de urina A, B e C foram coletadas de voluntários que aceitaram previamente contribuir com esse estudo. A amostra A foi coletada de um voluntário que não utiliza contraceptivos orais a base de estrogênio. A amostra B foi coletada de uma voluntária que faz ingestão regular de contraceptivo oral de baixa dosagem (ingestão de 0,03 mg de 17- $\alpha$ -etinilestradiol/dia). A amostra C foi coletada de uma voluntária com 30 semanas de gravidez.

Ademais, foi realizada uma estimativa do fator de enriquecimento (FE) dos analitos através da equação (4), onde foi obtido o sinal correspondente à injeção direta de uma amostra de urina diluída ( $S_{amostra}$ ) e o sinal correspondente ao procedimento de extração utilizando  $[P_{6,6,6,6,14}^+]_2[MnCl_4^{2-}]$  ( $S_{MIL}$ ) nas condições otimizadas. Nos dois casos as amostras de urina foram fortificadas com 500 ng mL<sup>-1</sup> de cada analito.

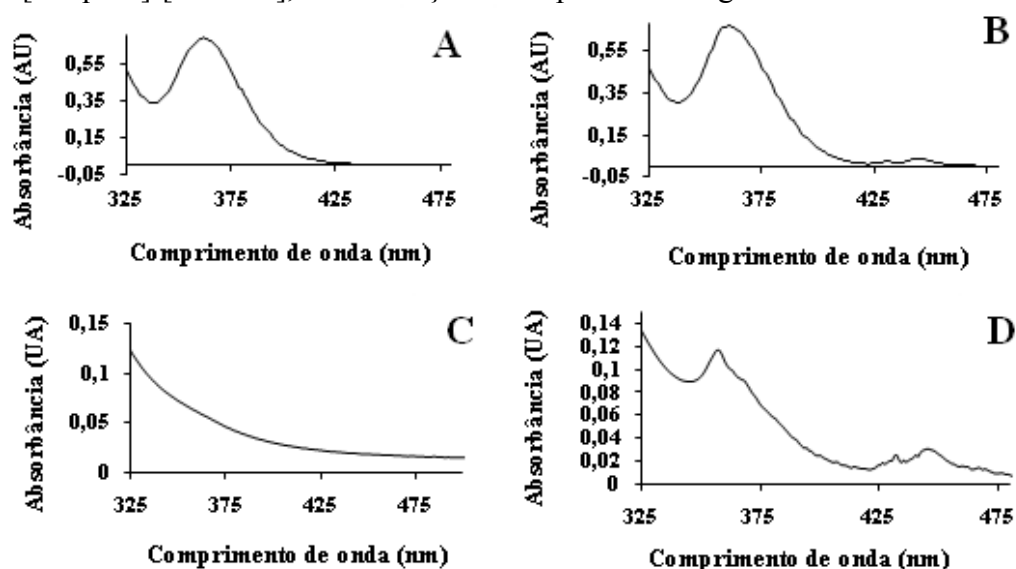
$$FE = \frac{S_{MIL}}{S_{amostra}} \quad \text{Equação (4)}$$

### 5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 5.3.1 Síntese e caracterização dos MILs

Os MILs foram sintetizados de acordo com o procedimento descrito na seção experimental. Após, foram caracterizados por espectroscopia UV-Vis. Os espectros obtidos para os ILs e após a síntese (MILs) estão apresentados na Figura 18.

Figura 18 – Em (A) espectro UV-Vis para o IL  $[P_{6,6,6,14}]^+[Cl]^-$  e em (B) espectro UV-Vis para o MIL  $[P_{6,6,6,14}]_2[MnCl_4]^{2-}$ , concentração das espécies:  $250\text{ mg mL}^{-1}$  em acetonitrila. Em (C) espectro UV-Vis para o IL  $[Aliquat]^+[Cl]^-$  e em (D) espectro UV-Vis para o MIL  $[Aliquat]_2[MnCl_4]^{2-}$ , concentração das espécies:  $70\text{ mg mL}^{-1}$  em acetonitrila.



Fonte: Autoria própria (2018).

Os resultados obtidos estão de acordo com trabalhos reportados anteriormente na literatura (Yu *et al.*, 2016), com absorção característica associada à incorporação do manganês na estrutura do IL (região de 425-465 nm), como pode ser observado na Figura 18 B e D.

#### 5.3.2 Otimização das condições de extração

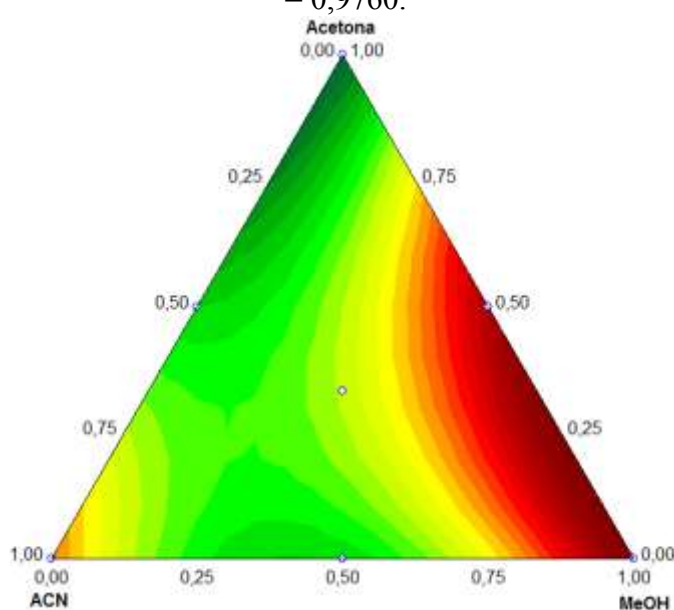
##### 5.3.2.1 Solvente Dispersor

Primeiramente, foi realizada a otimização do solvente dispersor para o procedimento de DLLME/MIL. Nessa etapa, os solventes ACN, MeOH, acetona e a mistura dos solventes

foram avaliados e a média geométrica correspondente às áreas dos picos cromatográficos dos analitos foram adotadas como resposta. A amostra de urina foi diluída e fortificada com a concentração de  $400 \text{ ng mL}^{-1}$  de cada analito. Na Figura 19 está apresentada a superfície ternária obtida para a otimização do solvente dispersor.

Figura 19 – Superfície ternária obtida para a otimização do solvente dispersor. Extrações realizadas em amostra de urina diluída (1:40 v/v) fortificada com  $400 \text{ ng mL}^{-1}$  de cada analito.

Os experimentos foram realizados usando  $20 \text{ mg}$  de  $[\text{P}_{6,6,6,14}^+]\text{MnCl}_4^{2-}$ ,  $5 \text{ }\mu\text{L}$  de solvente dispersor,  $120 \text{ s}$  de tempo de extração e a dessorção foi realizada em  $20 \text{ }\mu\text{L}$  de acetonitrila.  $R^2 = 0,9760$ .



Fonte: Autoria própria (2018).

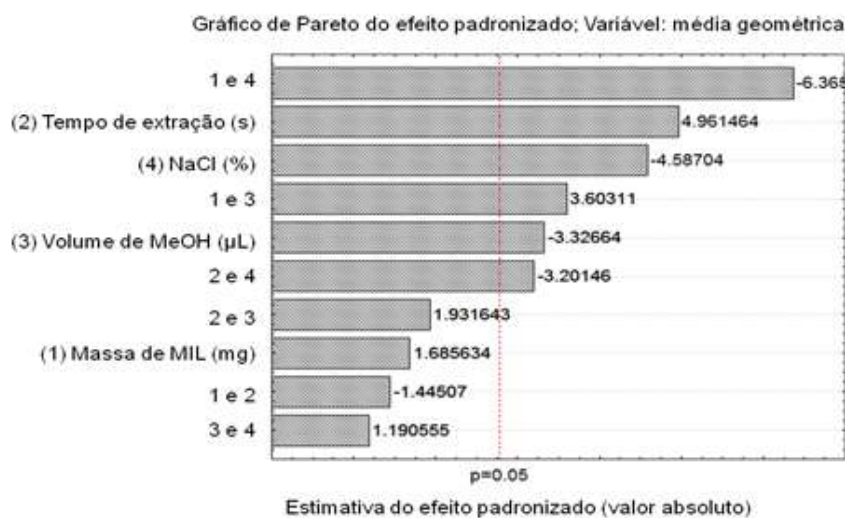
De acordo com a Figura 19, quando apenas ACN e acetona são usadas como solvente dispersor, a resposta cromatográfica não é satisfatória. Contudo, a mistura de acetona e MeOH apresentou melhor resposta quando a taxa de MeOH:acetona foi maior que 75:25 (v/v), com satisfatória resposta obtida quando a porcentagem de MeOH aumentou para 100%. Assim, MeOH foi escolhido como solvente dispersor para os próximos experimentos.

#### 5.3.2.2 Planejamento fatorial completo $2^4$

Um grande número de variáveis pode influenciar a extração usando DLLME. Nesse estudo, um planejamento fatorial completo  $2^4$  com 16 experimentos foi realizado para avaliar a influência do tempo de extração (10 – 120 s), volume de solvente dispersor (5 – 20  $\mu\text{L}$ ), massa de MIL (5 – 20 mg) e concentração de NaCl (0 – 30%, m/v). Todas as extrações foram

realizadas com amostra de urina diluída (1:40 v/v), fortificada com  $400 \text{ ng mL}^{-1}$  de cada analito e MeOH foi utilizado como solvente dispersor (anteriormente otimizado). Um gráfico de Pareto contendo o efeito das variáveis e as interações está apresentado na Figura 20.

Figura 20 – Gráfico de Pareto obtido para as variáveis: tempo de extração, concentração de NaCl, volume de MeOH e massa de MIL. Os experimentos foram realizados em amostra de urina diluída (1:40 v/v) fortificada com  $400 \text{ ng mL}^{-1}$  de cada analito. Dessorção realizada em  $20 \mu\text{L}$  de acetonitrila.  $R^2 = 0,9661$ .



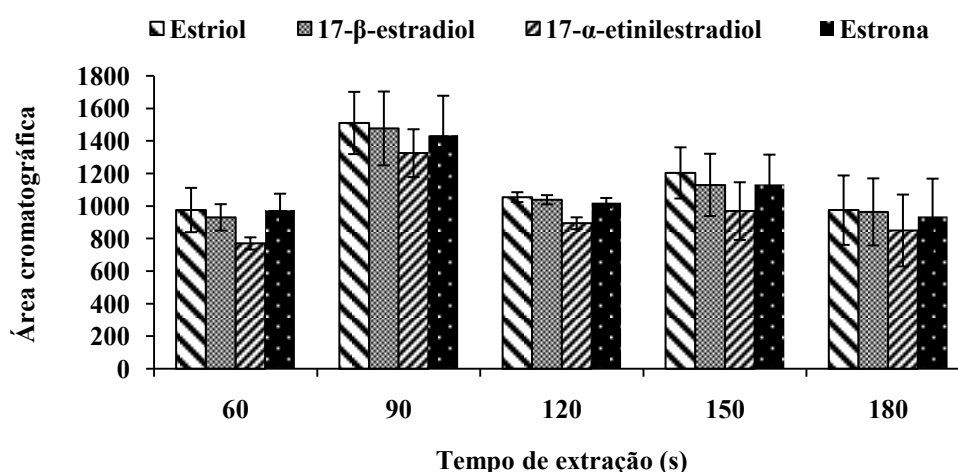
Fonte: Autoria própria (2018).

De acordo com o gráfico de Pareto, algumas variáveis e interações apresentaram influência significativa no procedimento de extração (nível de confiança de 95%). No caso do tempo de extração, essa variável exibiu significativo efeito com valor positivo indicando que longos tempos fornecem altas respostas cromatográficas. A concentração de NaCl e o volume de MeOH também exibiram influência significativa, no entanto, os valores negativos enfatizaram que as respostas cromatográficas mais elevadas foram obtidas usando volumes menores de MeOH e baixa concentração de NaCl. Baseado nesses resultados, os menores valores de concentração de NaCl (0%) e volume de MeOH ( $5 \mu\text{L}$ ) foram escolhidos como condição ótima para essas variáveis.

Mesmo apresentando um efeito positivo, a massa de MIL não apresentou uma influência significativa na resposta cromatográfica. Isso é explicado devido principalmente aos analitos exibirem coeficientes de partição relativamente grandes em meio hidrofóbico (Tabela 12). Nesse caso, a resposta cromatográfica obtida usando  $5 \text{ mg}$  de MIL foi estatisticamente similar à resposta obtida usando  $20 \text{ mg}$  de fase extratora na extração. Portanto, massas de  $5 \text{ mg}$  de MIL foram usadas para os próximos experimentos.

O tempo de extração apresentou efeito positivo significativo na eficiência de extração. Assim, uma otimização mais detalhada dessa variável foi realizada de forma univariada. Para isso, tempos de extração de 60, 90, 120, 150 e 180 s foram avaliados em triplicata e a resposta cromatográfica para cada analito está apresentada na Figura 21.

Figura 21 – Otimização univariada do tempo de extração para o procedimento DLLME/MIL usando 5  $\mu\text{L}$  de MeOH como solvente dispersor, 5 mg de fase extratora ( $[\text{P}_{6,6,6,14}]_2[\text{MnCl}_4^{2-}]$ ), 0% de NaCl e 400  $\text{ng mL}^{-1}$  de cada analito.



Fonte: Autoria própria (2018).

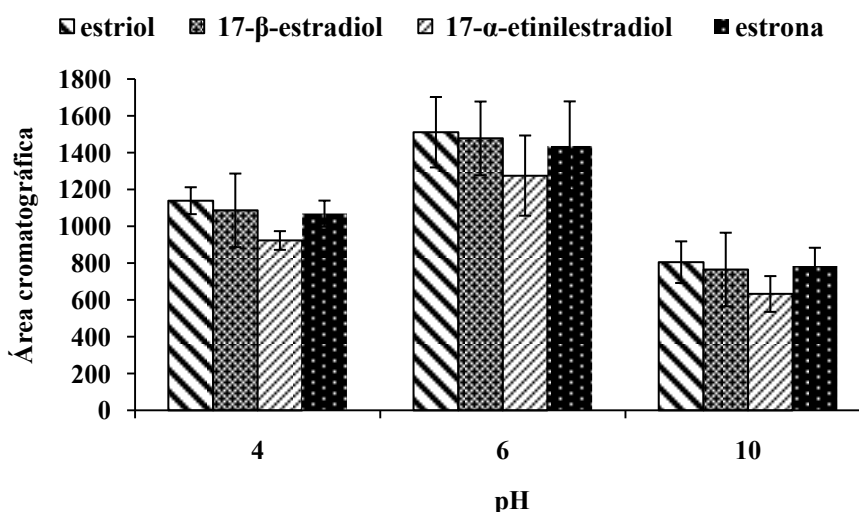
De acordo com a Figura 21, 60 s de extração não foram suficientes para alcançar a condição de equilíbrio. Aumentando o tempo de extração para 90 s, é possível observar que as áreas cromatográficas para todos os analitos aumentaram. Contudo, com tempos maiores, a resposta cromatográfica foi prejudicada. Assim, o tempo de extração de 90 s foi selecionado para os próximos experimentos. Tempos de extração curtos são uma característica do procedimento de DLLME, pois o equilíbrio é rapidamente alcançado devido a uma grande área superficial formada entre a fase extratora e a amostra.

### 5.3.2.3 Avaliação do pH da amostra

O pH da amostra pode influenciar significativamente na eficiência de extração dos analitos. A partição dos analitos da matriz da amostra para o solvente de extração depende fortemente da estrutura química dos analitos e, em geral, são obtidas eficiências de extração mais elevadas para os analitos na forma não ionizada em comparação com os compostos em forma ionizada (Kokosa *et al.*, 2009). Nesse trabalho, a otimização do pH foi realizada em

três valores de pH (4, 6 e 10) e os resultados obtidos são mostrados na Figura 22, cada pH foi avaliado em triplicata.

Figura 22 – Avaliação do pH da amostra usando 90 s de tempo de extração, 5  $\mu\text{L}$  de MeOH como solvente dispersor, 5 mg de  $[\text{P}_{6,6,6,14}^+]_2[\text{MnCl}_4^{2-}]$  como fase extratora, 0% de NaCl e 400  $\text{ng mL}^{-1}$  de cada analito.



Fonte: Autoria própria (2018).

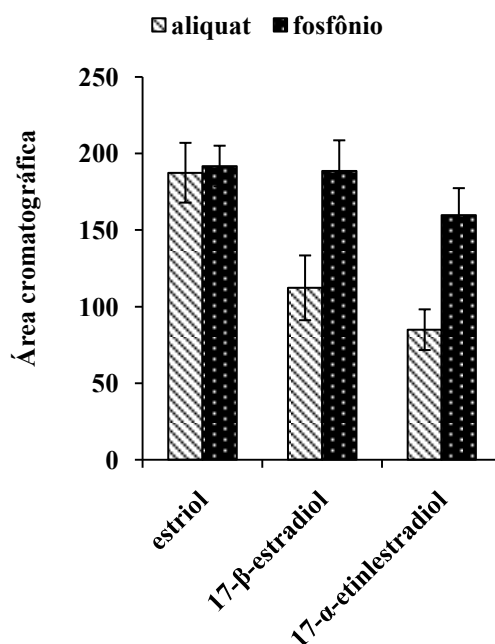
De acordo com a Figura 22, os melhores resultados foram obtidos em pH 6 para todos os analitos. Quando o pH foi modificado para 10, a resposta cromatográfica diminuiu significativamente, uma vez que nesse pH uma fração dos analitos começa a ser convertida nas suas formas ionizadas e, conseqüentemente, diminui a interação desses compostos com a fase extratora.

### 5.3.3 Comparação da eficiência de extração

As eficiências de extração obtidas utilizando os MILs  $[\text{P}_{6,6,6,14}^+]_2[\text{MnCl}_4^{2-}]$  e  $[\text{Aliquat}^+]_2[\text{MnCl}_4^{2-}]$  como solventes extratores foram comparadas. Nessa etapa, foi utilizada amostra de urina fortificada com 100  $\text{ng mL}^{-1}$  de cada analito, as extrações foram realizadas nas condições previamente otimizadas. As áreas dos picos cromatográficos para cada analito foram monitoradas e um gráfico de barras comparando os dois solventes extratores é mostrado na Figura 23. É importante ressaltar que as extrações que utilizaram o MIL  $[\text{Aliquat}^+]_2[\text{MnCl}_4^{2-}]$  exibiram um pico no mesmo tempo de retenção do último analito (estrone) e, devido a essa desvantagem, esse analito não foi incluído nessa comparação.



Figura 23 – Comparação da eficiência de extração entre  $[\text{Aliquat}^+]_2[\text{MnCl}_4^{2-}]$  e  $[\text{P}_{6,6,6,14}^+]_2[\text{MnCl}_4^{2-}]$  usando as condições de extração otimizadas e  $100 \text{ ng mL}^{-1}$  de cada analito.



Fonte: Autoria própria (2018).

Apesar da questão causada por um pico de interferência no mesmo tempo de retenção do analito estrona,  $[\text{Aliquat}^+]_2[\text{MnCl}_4^{2-}]$  apresentou uma eficiência de extração comparável ao  $[\text{P}_{6,6,6,14}^+]_2[\text{MnCl}_4^{2-}]$  para o estriol ( $\text{Log } K_{ow} = 2,45$ ). Porém, com relação aos outros analitos, o  $[\text{P}_{6,6,6,14}^+]_2[\text{MnCl}_4^{2-}]$  apresentou maior eficiência de extração, isso pode ser devido ao  $[\text{P}_{6,6,6,14}^+]_2[\text{MnCl}_4^{2-}]$  ser mais apolar que o  $[\text{Aliquat}^+]_2[\text{MnCl}_4^{2-}]$  e, assim, extrair melhor os analitos mais apolares ( $\text{Log } K_{ow}$  17-β-estradiol = 3,94;  $\text{Log } K_{ow}$  17-α-etinilestradiol = 4,12). Além disso, o sinal de fundo do cromatograma foi menor usando o  $[\text{P}_{6,6,6,14}^+]_2[\text{MnCl}_4^{2-}]$ . Baseado nesses resultados,  $[\text{P}_{6,6,6,14}^+]_2[\text{MnCl}_4^{2-}]$  foi escolhido para os estudos subsequentes envolvendo a determinação dos parâmetros analíticos de mérito.

### 5.3.4 Parâmetros analíticos de mérito e aplicação em amostras de urina humana

Os parâmetros analíticos de mérito foram determinados usando as condições experimentais previamente otimizadas. Os limites de detecção (LODs) foram calculados reduzindo a concentração de analito até obter uma relação sinal-ruído de 3:1 e os limites de quantificação (LOQs) foram adotados como sendo o primeiro nível de concentração da faixa linear para cada analito. Os parâmetros analíticos de mérito estão mostrados na Tabela 15.

Tabela 15 – Parâmetros analíticos de mérito para o método proposto DLLME/MIL usando o MIL  $[P_{6,6,6,14}^+ ]_2[MnCl_4^{2-}]$ .

Analito	Faixa Linear (ng mL <sup>-1</sup> )	Slope ± error	LOD <sup>a</sup> (ng mL <sup>-1</sup> )	LOQ <sup>b</sup> (ng mL <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	Precisão (intra-dia) <sup>c</sup> , n=3 (%)			Precisão (inter-dia) <sup>c</sup> , n=9 (%)
						5 ng mL <sup>-1</sup>	100 ng mL <sup>-1</sup>	500 ng mL <sup>-1</sup>	100 ng mL <sup>-1</sup>
Estriol	5 - 500	2,1112 ± 0,041	2	5	0,9985	19,5	13,3	11,7	15,4
17-β-estradiol	5 - 500	1,9086 ± 0,068	2	5	0,9949	4,7	17,7	8,3	16,9
17-α- etinilestradiol	5 - 500	1,6185 ± 0,024	2	5	0,9991	14,9	13,3	5,7	17,7
Estrona	5 - 500	1,9606 ± 0,012	2	5	0,9998	13,4	12,9	7,5	11,4

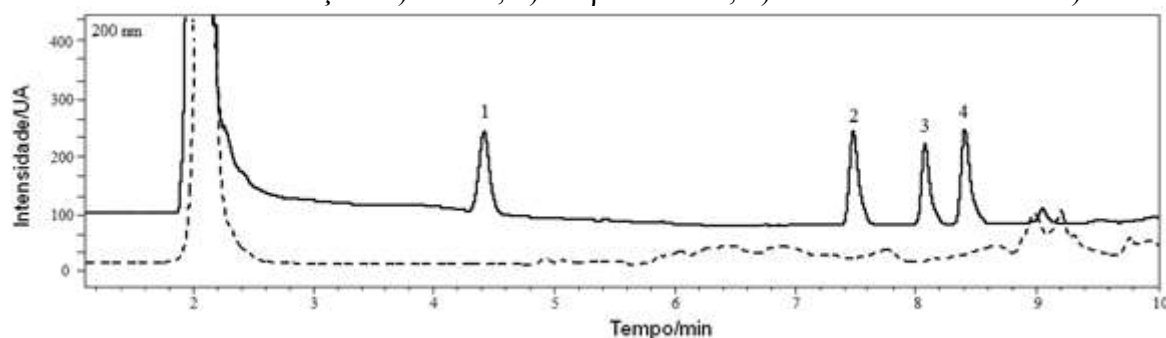
Fonte: Autoria própria (2018).

<sup>a</sup>LOD foi calculado avaliando a relação sinal:ruído (3:1).<sup>b</sup>LOQ adotado como o primeiro nível de concentração da faixa linear.<sup>c</sup>Precisão intra-dia e inter-dia foram calculadas baseadas no Desvio Padrão Relativo (RSD).

De acordo com a Tabela 15, os valores de LOD e o LOQ para todos os analitos foram 2 e 5 ng mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Os coeficientes de determinação (R<sup>2</sup>) variaram de 0,9949 para o 17-β-estradiol a 0,9998 para a estrona, demonstrando o ajuste do modelo. Os resultados obtidos para a precisão do método foram satisfatórios. Os valores referentes à precisão intra-dia (n=3) variaram de 4,7% para o 17-β-estradiol a 19,5% para o estriol. Os valores referentes à precisão inter-dia (n=9, obtidos em três dias na concentração de 100 ng mL<sup>-1</sup>) variaram de 11,4% para a estrona a 17,7% para o 17-α-etinilestradiol.

Os cromatogramas obtidos a partir da extração de uma amostra de urina sem fortificação e da extração de uma amostra de urina fortificada com 100 ng mL<sup>-1</sup> de cada analito usando o procedimento de DLLME/MIL com [P<sub>6,6,6,14</sub><sup>+</sup>]<sub>2</sub>[MnCl<sub>4</sub><sup>2-</sup>] como fase extratora estão apresentados na Figura 24.

Figura 24 – Cromatogramas obtidos a partir da extração de uma amostra de urina sem fortificação (linha tracejada) e a partir de uma amostra de urina fortificada com 100 ng mL<sup>-1</sup> de cada analito (linha sólida) usando a abordagem proposta DLLME/MIL nas condições otimizadas. Ordem de eluição: 1) estriol; 2) 17-β-estradiol; 3) 17-α-etinilestradiol e 4) estrona.



Fonte: Autoria própria (2018).

Com a finalidade de avaliar a aplicabilidade da metodologia proposta, amostras de urina coletadas de voluntários que aceitaram previamente contribuir com esse estudo foram analisadas. A amostra A foi coletada de um voluntário que não utiliza contraceptivos orais a base de estrogênio; a amostra B foi coletada de uma voluntária que faz ingestão regular de pílulas anticoncepcionais de baixa dosagem (ingestão de 0,03 mg de 17-α-etinilestradiol/dia); e a amostra C foi obtida de uma voluntária com 30 semanas de gravidez. A amostra C foi avaliada devido ao fato de que alguns dos hormônios estudados podem ser excretados na urina no período da gravidez. Além disso, alíquotas dessas amostras foram submetidas à avaliação da recuperação relativa dos analitos em três níveis de concentração (5, 100 e 500 ng mL<sup>-1</sup>). Os resultados referentes à recuperação relativa e RSD para essas determinações estão mostrados na Tabela 16.

Tabela 16 – Recuperação relativa e RSD dos analitos para as amostras A, B e C, n=3.

Analito	Amostra A			Amostra B			Amostra C		
	5 ng mL <sup>-1</sup> (%)	100 ng mL <sup>-1</sup> (%)	500 ng mL <sup>-1</sup> (%)	5 ng mL <sup>-1</sup> (%)	100 ng mL <sup>-1</sup> (%)	500 ng mL <sup>-1</sup> (%)	5 ng mL <sup>-1</sup> (%)	100 ng mL <sup>-1</sup> (%)	500 ng mL <sup>-1</sup> (%)
Estriol	93,4 ± 6,5	90,2 ± 13,3	106 ± 13,9	67,5 ± 5,1	69,3 ± 13,8	85,2 ± 16,6	103 ± 15,6	96,7 ± 3,3	103 ± 8,5
17-β-estradiol	102 ± 6,7	99,5 ± 19,8	110 ± 13,1	116 ± 5,9	74,1 ± 14,4	81,8 ± 17,1	83,1 ± 8,7	93,6 ± 11,2	115 ± 14,4
17-α- etinilestradiol	81,8 ± 15,1	91,5 ± 17,7	111 ± 12,8	97,3 ± 13,8	72,2 ± 14,3	70,9 ± 19,2	97,9 ± 19,9	97,1 ± 12,6	114 ± 13,0
Estrona	107 ± 9,8	94,9 ± 11,4	105 ± 11,7	109 ± 6,8	68,1 ± 12,7	72,3 ± 12,2	104 ± 16,8	90,9 ± 8,2	110 ± 10,1

Fonte: Autoria própria (2018).

Baseado na Tabela 16 é possível observar que o método alcançou resultados satisfatórios de exatidão e precisão, com recuperações relativas para os analitos variando de 67,5% a 115,6% e RSD variando entre 3,3 a 19,9%. As urinas A, B e C sem fortificação também foram analisadas e não foram detectados picos cromatográficos referentes aos analitos nas amostras A e B. Na amostra C, o pico correspondente ao estriol foi detectado, porém, a resposta cromatográfica para esse analito foi abaixo do LOQ. A presença desse composto está possivelmente associado à gravidez da voluntária, que influencia a liberação desse composto na urina (Neves-e-Castro, 1975). Portanto, a abordagem proposta DLLME/MIL oferece uma alternativa confiável para ser usada como uma ferramenta analítica para avaliar os analitos em matrizes biológicas complexas, como a urina.

Ainda, foi realizada uma estimativa do fator de enriquecimento (FE) dos analitos. O sinal obtido a partir da injeção direta de uma amostra de urina diluída ( $S_{amostra}$ ) foi comparado com o sinal obtido a partir da extração usando  $[P_{6,6,6,14}]_2[MnCl_4]^{2-}$  ( $S_{MIL}$ ) nas condições otimizadas e usando uma concentração de  $500 \text{ ng mL}^{-1}$  para cada analito. A equação (4) descrita no item 5.2.7 - Parâmetros analíticos de mérito e aplicação em amostras de urina humana, foi usada para avaliar os FEs para o procedimento de DLLME/MIL. Assim, os FEs para o estriol, 17- $\beta$ -estradiol, 17- $\alpha$ -etinilestradiol e estrona foram 33,4; 28,9; 29,5 e 30,9, respectivamente. De acordo com os resultados, o procedimento de DLLME/MIL forneceu significativo enriquecimento para os analitos em amostras de urina, com a resposta do cromatograma aumentando em torno de 30 vezes para todos os analitos, indicando uma satisfatória capacidade de pré-concentração da fase extratora baseada em MIL.

Além disso, foi realizada uma comparação entre esse estudo e outros previamente reportados na literatura, onde os mesmos compostos foram determinados em amostras de urina. Para a comparação foram selecionados os parâmetros analíticos de mérito de cada metodologia, incluindo a técnica de microextração, volume de solvente, faixa linear, e limites de detecção que estão incluídos na Tabela 17.

Tabela 17 – Comparação dos parâmetros analíticos de mérito para o procedimento de DLLME/MIL com dados da literatura.

Técnica de extração	Técnica de separação/determinação	Tempo de extração	Fase extratora	Faixa linear (ng mL <sup>-1</sup> )	Volume de solvente extrator (µL)	LOD (ng mL <sup>-1</sup> )	Referência
SBSE	HPLC-DAD	2 - 4 horas	PDMS	5-50	126	1	(Almeida e Nogueira, 2006)
UACPE	HPLC-DAD	1 hora	Tergitol TMN-6	5-1000	500	0,1-0,2	(Zou <i>et al.</i> , 2012)
DLLME	HPLC-UV	60 segundos	CCl <sub>4</sub>	1.000-250.000	600	250	(Kupcová e Reiffová, 2017)
DLLME/MIL	HPLC-DAD	90 segundos	[P <sub>6,6,6,14</sub> <sup>+</sup> ] <sub>2</sub> [MnCl <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ]	5-500	5 mg ≈ 8 µL	2	Este estudo

Fonte: Autoria própria (2018).

UACPE: Extração em ponto nuvem assistida por ultrassom, do inglês *ultrasond-assisted cloud-point extraction*

Baseado na Tabela 17, o método proposto forneceu parâmetros analíticos de mérito interessantes comparando com métodos anteriormente propostos. O uso de pequena quantidade de fase extratora (5 mg de MIL  $\approx$  8  $\mu$ L) e curto tempo de extração (90 s) sem etapa de centrifugação são características atrativas que enfatizam os aspectos ambientalmente amigáveis e de alto rendimento dessa metodologia analítica na análise de matrizes biológicas.

#### 5.4 CONCLUSÕES PARCIAIS

O método DLLME/MIL associado ao HPLC-DAD foi otimizado e aplicado com sucesso pela primeira vez na determinação de hormônios em amostras de urina. Esse estudo amplia a aplicabilidade desse promissor solvente extrator à matrizes biológicas e matrizes mais complexas, proporcionando uma alternativa rápida e confiável aos solventes convencionais geralmente utilizados nas abordagens de DLLME. Essa metodologia permitiu que as extrações fossem realizadas em tempos curtos (90 s) sem a necessidade de uma etapa de centrifugação. Além disso, as separações cromatográficas foram realizadas em 10 min, permitindo uma análises de alto rendimento. Os valores de LODs foram comparáveis aos valores reportados anteriormente usando outras técnicas de microextração que requerem tempos de extração mais longos. Ainda, foi obtido um desempenho analítico muito satisfatório quanto à precisão (ensaios intra e inter-dia), recuperações relativas e faixa linear dos analitos. As propriedades físico-químicas dos MILs incluindo hidrofobicidade, pressão de vapor negligenciável, estrutura química ajustável e facilidade de ser retirado da solução aquosa com o auxílio de uma barra magnética, demonstram que os MILs são uma ferramenta atrativa e que podem ser explorados como solventes extratores para inúmeras técnicas de extração/microextração. Adicionalmente, novos estudos focados na automatização podem melhorar os aspectos de alto rendimento e automatização das metodologias de extração utilizando os MILs como fases extratoras estáveis e eficientes.

## 6 EXPLORANDO O USO DE SOLVENTES COM HIDROFILICIDADE COMUTÁVEL COMO FASE EXTRATORA PARA DETERMINAÇÃO DE CONTAMINANTES PROVENIENTES DE EMBALAGENS ALIMENTÍCIAS EM ÁGUA DE COCO UTILIZANDO CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS

### 6.1 INTRODUÇÃO

O aumento da industrialização mudou os hábitos alimentares da população, e assim, os alimentos processados passaram a ser mais consumidos. Dessa forma, a indústria de embalagens alimentícias também se desenvolveu e hoje muitos materiais são usados na sua manufatura, tais como, plásticos, papel, tintas de impressão, revestimentos e adesivos.

As embalagens Tetra Pak<sup>®</sup> são muito utilizadas para armazenar diversos alimentos industrializados. Podem ser compostas de até sete camadas intercalando polietileno, alumínio e papel. Na camada de papel, são utilizadas tintas de impressão para imprimir o rótulo e as informações do produto, além de vernizes para o revestimento (Tetra Pak<sup>®</sup>, 2019).

Ainda, cada um desses materiais pode conter diversos compostos que são adicionados na manufatura, além de substâncias não intencionalmente adicionadas (NIAS, do inglês *Non-Intentionally Added Substances*), as quais são produtos de reações de degradação, bem como impurezas provenientes das matérias-primas (Nerin *et al.*, 2013). Assim, esses materiais entram em contato com o alimento e diversos compostos podem acabar migrando da embalagem para o alimento, causando contaminação e trazendo riscos à saúde do consumidor.

Dentre esses compostos estão os ésteres de ftalatos, tais como: o dimetil ftalato (DMF), o dietil ftalato (DEF), o dibutil ftalato (DBF), o benzil butil ftalato (BBF) e o di-n-octil ftalato (DNOF), os quais são usados como plastificantes para melhorar a flexibilidade e a durabilidade do plástico (Guo e Kannan, 2012). Esses compostos não são ligados quimicamente à cadeia polimérica, dessa forma, podem migrar facilmente do plástico para o ambiente em que se encontram.

A grande preocupação com relação a esses compostos é devido a eles serem considerados disruptores do sistema endócrino, podendo causar alterações no desenvolvimento fetal e sistema reprodutor (Environmental Protection Agency, 2012). Além disso, trabalhos reportados na literatura indicaram que esses compostos e seus metabólitos têm efeitos adversos no sistema reprodutivo principalmente de indivíduos do sexo masculino (Matsumoto *et al.*, 2008; Martino-Andrade e Chahoud, 2010). Foi encontrada uma associação



entre danos no DNA do esperma e exposição ao DEF (Duty *et al.*, 2003). Em 2012, oito ésteres de ftalatos, incluindo três selecionados para esse trabalho, o DBF, o BBF e o DNOF, foram adicionados à lista de produtos químicos preocupantes da Agência de Proteção Ambiental dos EUA (EPA) (Environmental Protection Agency, 2012).

Os alquilfenóis, tais como o 4-octilfenol (4-OF) e o 4-nonilfenol (4-NF) também podem ser encontrados em alimentos armazenados em embalagens alimentícias. Derivados de NF (nonilfenol), como por exemplo: surfactantes alquilfenóis etoxilados usados como agentes dispersantes ou estabilizantes em plásticos, borrachas e papel (Fernandes *et al.*, 2008); antioxidante tris(nonilfenol)fosfito usado como estabilizante de plásticos e borrachas (Votavova *et al.*, 2009); e sais de bário e cálcio de nonilfenol usados como estabilizadores de calor em plásticos (Votavova *et al.*, 2009), podem sofrer degradação, sendo o 4-NF um produto dessa reação.

A partir do trabalho de Guenther *et al.* (Guenther *et al.*, 2002), o qual analisou 60 amostras de alimentos de diferentes gêneros e constatou a presença de NF em todas as amostras, Loyo-Rosales *et al.* (Loyo-Rosales *et al.*, 2004), estudaram a presença de NF e OF (octilfenol) em água mineral engarrafada, uma vez que a fonte de ingestão diária desses compostos não é somente proveniente do alimento.

Para o estudo foram selecionadas amostras de água contidas em recipientes com diferentes composições de polímeros (PEAD - polietileno de alta densidade, PET - politereftalato de etileno e PVC - policloreto de vinila). Os autores analisaram sete amostras e encontraram NF em seis amostras e OF em cinco amostras. Esses estudos reforçam a possibilidade desses compostos estarem presentes em alimentos e bebidas armazenadas em embalagens alimentícias.

A relevância desses compostos está relacionada com os conhecidos efeitos adversos que exercem sobre o sistema endócrino de humanos e animais (Lee e Lee, 1996; Nagao *et al.*, 2001). Além disso, o NP está classificado como “substância perigosa prioritária” na Diretiva 2013/39/UE do Parlamento Europeu e do Conselho (União Europeia, 2013a).

Os fotoiniciadores de tinta UV, sendo a benzofenona (BZF) um dos mais utilizados, são empregados para catalisar a reação de polimerização para a cura de tintas sob luz ultravioleta. Assim, esses compostos podem estar presentes em plásticos e papéis usados na fabricação de embalagens alimentícias como um resíduo desse processo (Sanches-Silva *et al.*, 2009). Quando não há uma barreira efetiva, eles podem migrar da superfície para o interior da embalagem, através da transferência de massa, entrando em contato com o alimento (Zhang *et al.*, 2016). A BZF em particular é de grande preocupação, pois pode causar câncer, hipospádia

(malformação da uretra) e reação alérgica da pele (Rhodes *et al.*, 2007; Hsieh *et al.*, 2007; Cook e Freeman, 2001).

Dessa forma, a segurança alimentar relacionada aos compostos presentes em embalagens que podem migrar para o alimento é uma tendência, sendo cada vez mais cobrada pelos consumidores, agências e órgãos reguladores. Porém, somente na União Europeia foram estabelecidos regulamentos e diretivas específicas para materiais que entram em contato com o alimento; e, ainda são para um número restrito de materiais (plásticos, plásticos reciclados, cerâmicas, material ativo e inteligente e filme de celulose regenerada) (União Europeia, 1984; 2006; 2007; 2009; 2011). Além disso, apenas os materiais plásticos possuem uma lista de substâncias autorizadas (União Europeia, 2011). Assim, ainda existem muitos materiais empregados na fabricação de embalagens alimentícias que não possuem regulamentação de substâncias permitidas, ou seja, seguras para entrarem em contato com o alimento.

Para avaliar a presença desses compostos em alimento é possível adotar diferentes estratégias. Pode-se analisar o alimento, a embalagem alimentícia ou realizar testes de migração utilizando simulantes de alimentos (Sanchis *et al.*, 2017). O alimento é uma matriz complexa, além disso, os analitos que migram da embalagem para o alimento são encontrados em baixas concentrações. Assim, para monitorar esses contaminantes é necessário o emprego de uma etapa de preparo da amostra antes da análise instrumental com o objetivo de concentrar os analitos e remover os interferentes. Também são requeridos equipamentos com sensibilidade adequada. Nesse sentido, a cromatografia gasosa e a cromatografia líquida acopladas à espectrometria de massas têm sido muito empregadas (Casajuana e Lacorte, 2004; Fasano *et al.*, 2012; Amelin e Lavrukhina, 2017; Sanchis *et al.*, 2017).

Várias técnicas de preparo de amostra e *clean-up* têm sido utilizadas para adequar a amostra a análise instrumental. Dentre elas, as técnicas clássicas como a LLE e a SPE ainda são muito empregadas (Sanchis *et al.*, 2017). Contudo, a tendência é a utilização de técnicas de microextração devido às vantagens que apresentam em relação às técnicas clássicas.

Dentre as técnicas de microextração, as mais utilizadas para a extração de contaminantes de alimentos são a SPME (Zhang *et al.*, 2019; Znidarsic *et al.*, 2019), a DLLME (Galuch *et al.*, 2019) e a SBSE (Liu *et al.*, 2016). Porém, com exceção da SPME, essas técnicas geralmente usam solventes tóxicos como organoclorados ou necessitam de longos tempos para a extração. O método QuEChERS também é muito empregado para a análise de alimentos, porém, utiliza vários reagentes como sais, solventes orgânicos e ácidos, dependendo da configuração. Além disso, possui várias etapas envolvidas (Musarurwa *et al.*, 2019).

Assim, a HLLME é uma técnica de preparo de amostra promissora. Ela é baseada no fenômeno de separação de fases a partir de uma solução homogênea. Compreende duas etapas: primeiramente é realizada a completa miscibilidade da amostra e da fase orgânica, o que fornece uma superfície de contato infinitamente grande para a extração; após, é realizada a separação das fases através da adição ou remoção de um reagente específico. Assim, os analitos passam para um pequeno volume de solvente orgânico (Ahmar *et al.*, 2018).

As principais vantagens da HLLME são: o rápido equilíbrio de extração, o que reduz o tempo de preparo da amostra; a simplicidade, ou seja, não é necessário utilizar nenhum aparato e/ou reagente especial; a eficiência de extração; o baixo consumo de solvente orgânico, o que diminui a exposição do analista e a geração de resíduo; e o baixo custo (Ebrahimpour *et al.*, 2013; Yazdanfar *et al.*, 2014).

Vários métodos têm sido reportados para promover a separação de fases na técnica de HLLME. Em 2013, foi proposto um sistema dependente do pH (Ebrahimpour *et al.*, 2013). Para esse sistema o solvente deve ter solubilidade na fase aquosa dependente do pH e densidade menor que a da água. Por isso, a seleção do solvente de extração é restrita a poucos solventes orgânicos (Cabuk *et al.*, 2014).

Os solventes com hidrofiliabilidade comutável (SHSs) são considerados uma nova classe de solventes e têm ganhado atenção devido a atenderem as características necessárias para serem empregados como fase extratora na técnica de HLLME, aos aspectos ambientalmente amigáveis que apresentam, pois são menos tóxicos que os solventes geralmente empregados em técnicas de extração (Jessop *et al.*, 2010; Vanderveen *et al.*, 2014), possuem baixo custo, apresentam boa eficiência de extração e proporcionam extrações rápidas. Além disso, a mudança de pH para a comutação é realizada de forma fácil através da adição e remoção de CO<sub>2</sub> ou adição de um reagente específico, como o hidróxido de sódio.

Nesse trabalho foi proposto um método empregando SHSs como solventes extratores na técnica de HLLME para a extração de ésteres de ftalato, alquilfenóis e benzofenona de amostras de água de coco contidas em embalagens alimentícias. O método desenvolvido é uma alternativa aos métodos laboriosos, caros e que empregam grandes volumes de solventes orgânicos tóxicos, os quais geralmente são empregados na análise de alimentos. Os principais parâmetros que afetam o procedimento de SHS-HLLME foram otimizados de modo univariado e multivariado. Os parâmetros analíticos de mérito foram determinados, e após, foram analisadas seis amostras de água de coco adquiridas em supermercados de Florianópolis-SC.

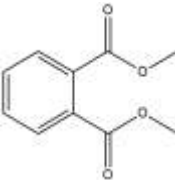
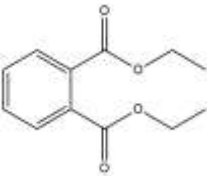
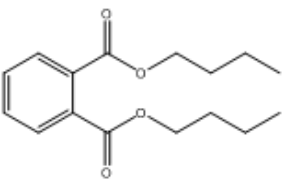
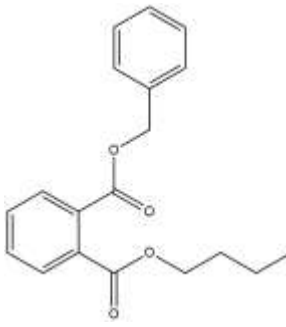
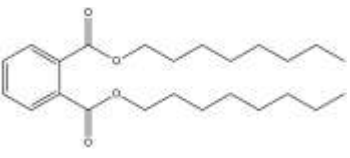
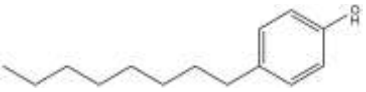

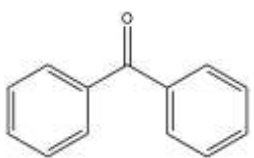
## 6.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 6.2.1 Reagentes e materiais

Padrões analíticos dos analitos 4-octilfenol (4-OF), 4-nonilfenol (4-NF), benzofenona (BZF) com pureza  $\geq 97\%$  foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, EUA). Mix ésteres de ftalato - EPA Phtalate Esters MIX 2 g L<sup>-1</sup> contendo dimetil ftalato (DMF), dietil ftalato (DEF) dibutil ftalato (DBF) benzil butil ftalato (BBF) e di-n-octil ftalato (DNOF) também foi obtido da Sigma-Aldrich. Na Tabela 18 estão apresentadas as estruturas químicas, algumas propriedades físico-químicas e as razões massa/carga ( $m/z$ ) monitoradas para a identificação e quantificação dos analitos. Como padrão interno (PI) foi utilizado o 2-etilhexil-4-dimetilaminobenzoato com grau de pureza 98% adquirido da Sigma-Aldrich. A partir dos padrões analíticos foram preparadas soluções padrões de concentração 1000 mg L<sup>-1</sup> em MeOH. Em seguida foi preparada uma solução de trabalho em MeOH contendo todos os analitos na concentração de 20 mg L<sup>-1</sup>. Além disso, foi preparada uma solução do PI em MeOH na concentração de 10 mg L<sup>-1</sup>. O PI foi utilizado na avaliação dos parâmetros analíticos de mérito e na análise das amostras e foi adicionado antes da etapa de extração na concentração de 10 µg L<sup>-1</sup>.

Metanol grau HPLC/GC foi adquirido da JT Baker (Mallinkrodt, EUA). Água ultrapura (18,2 MΩcm) foi obtida a partir do sistema Mega Purity (Bellerica, MA, EUA). Os solventes com hidrofiliabilidade comutável utilizados como fases extratoras: dipropilamina (DPA) e *N,N*-dimetilciclohexilamina (DMCHA) com 99% de pureza foram obtidos da Sigma-Aldrich. Ácido clorídrico P.A. e hidróxido de sódio utilizados para realizar a comutação dos SHSs foram obtidos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Um banho termostático Lab Companion modelo RW-0525G foi utilizado na etapa de aquecimento para a separação das fases.

Tabela 18 – Estrutura química, pKa, Log  $K_{ow}$ , temperatura de ebulição e razões  $m/z$  monitoradas para identificação e quantificação dos analitos. Os valores em negrito representam os fragmentos utilizados para a quantificação. Referência: (ChemAxon, 2020).

Analito	Estrutura química	pKa	Log $K_{ow}$	Temperatura de ebulição (°C)	$m/z$
DMF		-	1,98	282	<b>163/77/164/76/135</b>
DEF		-	2,69	295	<b>149/177/150/65/29</b>
DBF		-	4,63	340	<b>149/150/29/41/57</b>
BBF		-	5,03	370	<b>149/91/206/65/104</b>
DNOF		-	8,18	390	<b>149/279/43/57/150</b>
4-OF		10,31	5,30	280	<b>107/108/206/96/41</b>
4-NF		10,31	5,74	317	<b>107/220/108/77/221</b>
BZF		-	3,43	305	<b>105/77/182/51/50</b>

Fonte: Autoria própria (2020).

### 6.2.2 Instrumentação e condições cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas e equipado com injetor *split/splitless* modelo GC-MS QP2010 Plus (Shimadzu, Kyoto, Japão). As separações cromatográficas foram realizadas em uma coluna capilar ZB-5MS (Zebron, Torrance, CA, EUA) com dimensões de 30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$  d.i. O gás de arraste utilizado foi hélio ultrapuro na vazão constante de 1 mL  $\text{min}^{-1}$ . O programa de temperatura utilizado para o forno do cromatógrafo foi iniciado em 65 °C, sem tempo de permanência. Em seguida a temperatura foi aumentada até 160 °C em uma taxa de 20 °C  $\text{min}^{-1}$  sem tempo de permanência. Por fim, a temperatura foi aumentada até 310 °C em uma taxa de 15 °C  $\text{min}^{-1}$  e mantida por 2 min, totalizando 16,75 min de corrida cromatográfica. A temperatura do injetor foi mantida em 250 °C e o volume de injeção foi de 1  $\mu\text{L}$  no modo *splitless* com o auxílio de uma microseringa de 10  $\mu\text{L}$ .

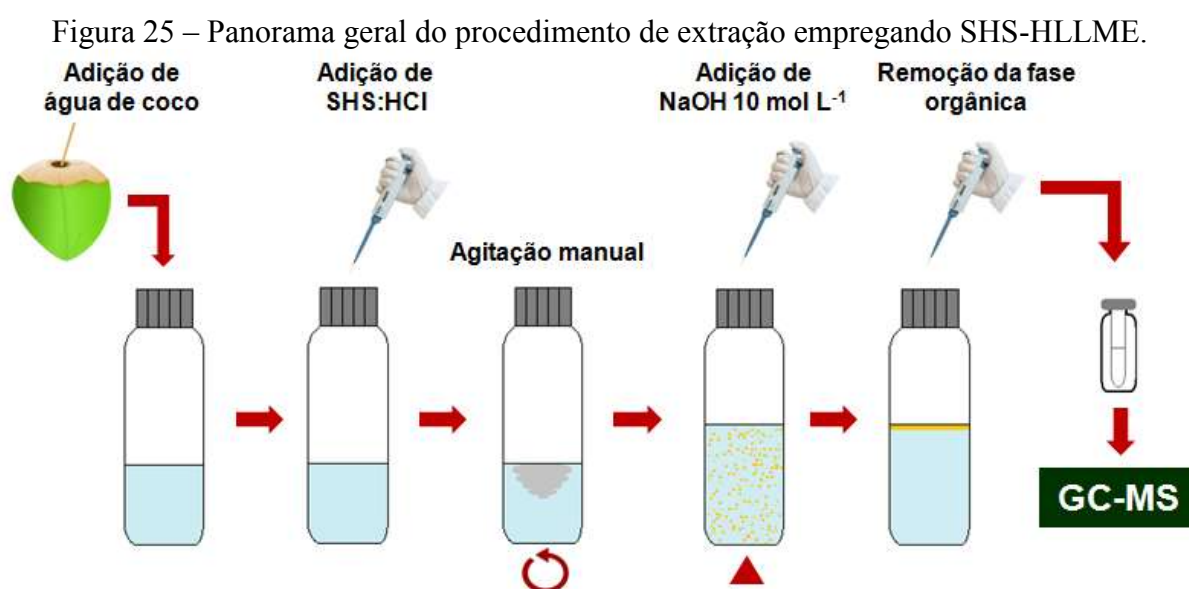
O espectrômetro de massas foi operado no modo de ionização por elétrons (EI) em 70 eV. A temperatura da fonte de íons foi fixada em 280 °C e da interface em 300 °C. Para a identificação dos analitos foram selecionadas cinco razões  $m/z$  de maior intensidade e para a quantificação foi selecionada a  $m/z$  de maior intensidade, segundo biblioteca de espectros de massas fornecidos pelo Instituto Nacional de Padronização e Tecnologia (NIST) e estão apresentadas na Tabela 18. A aquisição dos dados foi realizada através do *software* GC-Solution (Shimadzu).

### 6.2.3 Otimização do procedimento SHS-HLLME

Os principais parâmetros que podem influenciar a eficiência de extração utilizando o procedimento de SHS-HLLME foram otimizados. Inicialmente foram preparadas soluções de SHS e HCl na proporção DPA:HCl 6 mol  $\text{L}^{-1}$  (1:1) e DMCHA:HCl 12 mol  $\text{L}^{-1}$  (1:1). Em ambos os casos uma solução monofásica foi observada. Também foi preparada uma solução de NaOH 10 mol  $\text{L}^{-1}$ , a qual foi utilizada para promover a separação das fases orgânica e aquosa. As otimizações foram realizadas fortificando uma amostra de água de coco proveniente de embalagem alimentícia com 100  $\mu\text{g}$   $\text{L}^{-1}$  de cada analito. Foram adotadas estratégias univariadas e multivariadas. Os resultados obtidos a partir das estratégias multivariadas foram processados através do *software* STATISTICA 8.

O procedimento de extração consistiu em adicionar a amostra em um frasco de vidro com capacidade de 15 mL, em seguida foi adicionada uma mistura de SHS:HCl e procedida a

agitação manual para homogeneização (uma solução monofásica foi observada). Após, foi adicionado NaOH 10 mol L<sup>-1</sup> para promover a separação das fases (uma solução turva foi observada), nessa etapa a mistura foi colocada em um banho aquecido por alguns minutos para acelerar o processo de separação das fases e conseqüentemente a extração dos analitos (uma solução bifásica foi observada). Depois de separadas as fases, a fase orgânica contendo os analitos foi removida com uma micropipeta de 100 µL e transferida para um frasco com *insert* de vidro com capacidade de 250 µL e encaminhada para análise no GC-MS. Um panorama geral da extração está apresentado na Figura 25.



Fonte: Autoria própria (2019).

#### 6.2.3.1 Avaliação do tipo de SHS

Inicialmente foi avaliado o tipo de fase extratora de modo univariado. Foram selecionados dois solventes com hidrofiliabilidade comutável, o DMCHA e a DPA. As condições de extração foram fixadas em 5 mL de amostra, 800 µL da mistura SHS:HCl, 3 mL de NaOH 10 mol L<sup>-1</sup> para separação das fases, 70 °C de temperatura de aquecimento e 2 min de tempo de extração.

#### 6.2.3.2 Avaliação do volume de SHS e NaOH 10 mol L<sup>-1</sup>

A fase extratora foi adicionada na amostra juntamente com o HCl para que o SHS permanecesse na sua forma hidrofílica (grupo amina protonado), formando uma fase com a

solução aquosa e assim, proporcionasse uma grande superfície de contato para a extração (Ahmar *et al.*, 2018), o que facilita a transferência de massa de analito da amostra para a fase extratora, reduzindo o tempo de extração (Ezoddin *et al.*, 2016). Já o NaOH 10 mol L<sup>-1</sup> foi adicionado para que o SHS comutasse para a forma hidrofóbica (grupo amina desprotonado) e, assim, ocorresse a separação das fases. Como esse processo é dependente do pH do meio, um excesso de NaOH 10 mol L<sup>-1</sup> foi adicionado para garantir e acelerar a comutação. Assim, os parâmetros volume de SHS:HCl (1:1, v/v) (200 a 1000 µL) ou seja, volume de SHS (100 a 500 µL) e volume de NaOH 10 mol L<sup>-1</sup> (1 a 3 mL) foram avaliados simultaneamente através de um planejamento *Doehlert* com 9 experimentos (incluindo a triplicata no ponto central), como mostrado na Tabela 19. Esses experimentos foram realizados utilizando o SHS selecionado na avaliação anterior. Os resultados foram expressos através de uma superfície resposta utilizando a média geometria da área dos picos cromatográficos.

Tabela 19 – Matriz planejamento *Doehlert* para o volume de SHS:HCl (1:1) *versus* o volume de NaOH 10 mol L<sup>-1</sup>.

Experimento	Volume de SHS (µL)	Volume de NaOH 10 mol L <sup>-1</sup> (mL)
1	100	2
2	200	1
3	200	3
4	300	2
5	300	2
6	300	2
7	400	1
8	400	3
9	500	2

Fonte: Autoria própria (2019).

### 6.2.3.3 Planejamento Fatorial Completo 2<sup>3</sup>

Um planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup> foi realizado para fazer uma triagem dos principais parâmetros que podem influenciar a extração utilizando o procedimento de SHS-HLLME. Os parâmetros selecionados para esse experimento foram: volume de amostra (3 a 7 mL), temperatura necessária para a separação das fases (60 a 80 °C) e tempo de extração (2 a 5 min). Foram gerados 10 experimentos incluindo a duplicata do ponto central, conforme a matriz do planejamento que está apresentada na Tabela 20. Os resultados foram expressos através do gráfico de Pareto utilizando a média geométrica da área dos picos cromatográficos dos analitos.



Tabela 20 – Matriz do planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup>.

Experimento	Volume de amostra (mL)	Temperatura para separação das fases (°C)	Tempo de extração (min)
1	3	60	2
2	3	60	5
3	3	80	2
4	3	80	5
5	7	60	2
6	7	60	5
7	7	80	2
8	7	80	5
9	5	70	3,5
10	5	70	3,5

Fonte: Autoria própria (2019).

#### 6.2.3.4 Avaliação da temperatura para a separação das fases

A última otimização consistiu em avaliar a temperatura para a separação das fases de forma univariada e em triplicata. As temperaturas avaliadas foram 40, 50 e 60 °C, selecionadas de acordo com o resultado do planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup> descrito na seção anterior.

#### 6.2.4 Parâmetros analíticos de mérito

Para a construção das curvas de calibração foi utilizada água de coco natural (proveniente de coco verde) fortificada com os analitos em 7 níveis de concentração (0,5; 1; 5; 10; 15; 20 e 30 µg L<sup>-1</sup>) e foi adicionado padrão interno antes das extrações na concentração de 10 µg L<sup>-1</sup>. Os coeficientes de correlação (r) foram obtidos a partir das curvas de calibração. Os limites de quantificação (LOQs) foram adotados como sendo o primeiro nível de concentração da faixa linear e os limites de detecção (LODs) foram obtidos dividindo o LOQ por 3,3.

Para a avaliação da exatidão, precisão e robustez do método foi utilizada água de coco contida em embalagem alimentícia e foi adicionado padrão interno antes das extrações na concentração de 10 µg L<sup>-1</sup>. A exatidão foi obtida através de ensaios de recuperação em três níveis de concentração comum para todos os analitos (5, 15 e 30 µg L<sup>-1</sup>) e os resultados foram expressos através das recuperações relativas em porcentagem (RR%). A precisão do método foi avaliada através de ensaios intra-dia (n=3) em três níveis de concentração comum para todos os analitos (5, 15 e 30 µg L<sup>-1</sup>) e inter-dia (n=9) em um nível de concentração comum

para todos os analitos ( $15 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Os resultados foram expressos através do desvio padrão relativo em porcentagem (RSD%).

Também foi avaliada a robustez do método através do teste de Youden. Para isso foram selecionados 5 parâmetros que podem influenciar a extração pelo método proposto SHS-HLLME. O efeito dos parâmetros foram avaliados de forma simultânea através da variação para valores menores e maiores considerando a condição otimizada (valor nominal), totalizando 8 experimentos. Na Tabela 21 estão apresentados os parâmetros avaliados e as condições de variação e na Tabela 22 estão apresentados os experimentos realizados considerando a combinação dos parâmetros e variações.

Tabela 21 – Parâmetros avaliados, condição nominal e variações para o teste de Youden para avaliação da robustez do método.

Parâmetro	Condição Nominal	Menor Variação		Maior Variação	
P1 – Volume de amostra	3000 $\mu\text{L}$	a	2980 $\mu\text{L}$	A	3020 $\mu\text{L}$
P2 – Volume de SHS:HCl	200 $\mu\text{L}$	b	180 $\mu\text{L}$	B	220 $\mu\text{L}$
P3 – Volume de NaOH $10 \text{ mol L}^{-1}$	2000 $\mu\text{L}$	c	1980 $\mu\text{L}$	D	2020 $\mu\text{L}$
P4 – Temperatura separação das fases	50 $^{\circ}\text{C}$	d	48 $^{\circ}\text{C}$	E	52 $^{\circ}\text{C}$
P5 – Tempo de extração	120 s	e	110 s	F	130 s

Fonte: Autoria própria (2019).

Tabela 22 – Experimentos realizados considerando a combinação dos parâmetros (variação menor e maior) para o teste de Youden para avaliação da robustez do método.

Combinação dos parâmetros	Experimentos							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A/a	A	A	A	A	a	a	a	a
B/b	B	B	b	b	B	B	b	b
C/c	C	c	C	c	C	c	C	c
D/d	D	D	d	d	d	d	D	D
E/e	E	e	E	e	e	E	e	E

Fonte: Autoria própria (2019).

### 6.2.5 Análise de amostras de água de coco contidas em embalagens alimentícias

Seis amostras de água de coco foram adquiridas em supermercados de Florianópolis-SC, as amostras foram nomeadas como: A, B, C, D, E e F, todas estavam contidas em embalagens Tetra Pak<sup>®</sup> e não passaram por nenhum preparo prévio antes do procedimento de extração. As amostras foram submetidas ao procedimento SHS-HLLME otimizado e após foram analisadas em GC-MS.

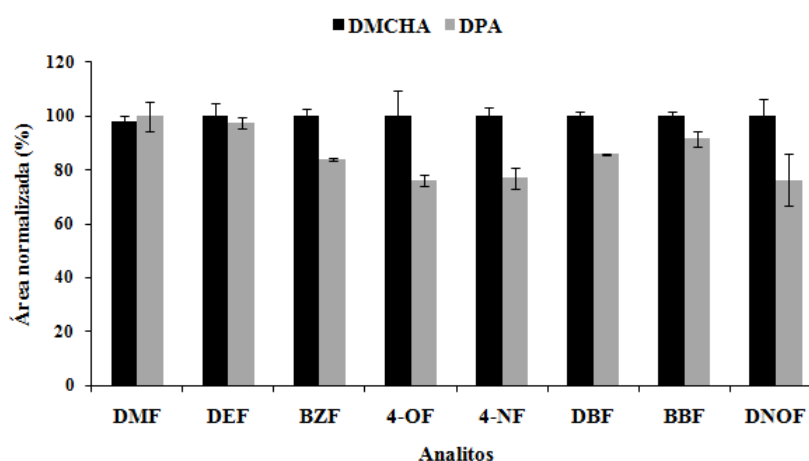
## 6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.3.1 Otimização do procedimento SHS-HLLME

#### 6.3.1.1 Avaliação do tipo de SHS

O tipo de fase extratora é um parâmetro importante e deve ser avaliado no desenvolvimento de um método analítico, pois a eficiência de extração depende da afinidade da fase extratora com os analitos. Para essa avaliação foram selecionados dois SHSs: a DMCHA e DPA. As eficiências de extrações foram comparadas através das áreas normalizadas dos picos cromatográficos dos analitos e estão apresentadas no gráfico de barras da Figura 26.

Figura 26 – Otimização univariada do tipo de solvente extrator no procedimento de SHS-HLLME utilizando DMCHA e DPA.



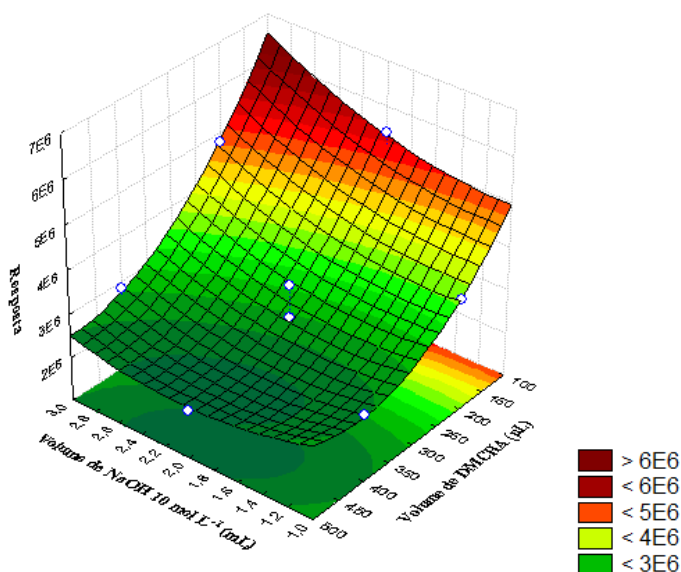
Fonte: Autoria própria (2019).

Como pode ser observado no gráfico de barras da Figura 26, a DMCHA apresentou uma eficiência de extração maior para os analitos mais apolares (BZF, 4-OF, 4-NF, DBF, BBF e DNOF). Para os demais analitos (DMF e DEF) a DMCHA e a DPA apresentaram respostas semelhantes. Esses resultados estão relacionados ao fato da DMCHA ser mais apolar do que a DPA ( $\text{Log } K_{ow} \text{ DMCHA} = 1,99$ ;  $\text{Log } K_{ow} \text{ DPA} = 1,57$ ). Assim, a DMCHA foi selecionada como fase extratora para os próximos experimentos.

### 6.3.1.2 Avaliação do volume de DMCHA e NaOH 10 mol L<sup>-1</sup>

O volume de solvente extrator pode influenciar na massa de analito extraída. Maiores volumes podem extrair maiores massas de analito. Porém, na técnica de HLLME, pode ocorrer a diluição do analito, uma vez que quase todo o volume de solvente extrator é recuperado no final para a análise. Com relação ao volume de NaOH 10 mol L<sup>-1</sup>, esse deve ser suficiente para deixar o meio básico e a DMCHA na sua forma hidrofóbica (desprotonada), separando assim as fases. Além disso, em meio básico os analitos e a DMCHA estão presentes na forma neutra, favorecendo a interação para a extração. Ainda, quanto maior o volume de NaOH 10 mol L<sup>-1</sup>, mais rápido ocorre o deslocamento do equilíbrio químico. Assim, foram avaliados volumes de 100 a 500 µL de DMCHA e volumes de 1 a 3 mL de NaOH 10 mol L<sup>-1</sup> através de um planejamento *Doehlert* com 9 experimentos (incluindo a triplicata do ponto central). A superfície obtida está apresentada na Figura 27.

Figura 27 – Superfície resposta obtida utilizando o planejamento *Doehlert* para o volume de DMCHA versus o volume de NaOH 10 mol L<sup>-1</sup>. R<sup>2</sup> = 0,9316.



Fonte: Autoria própria (2019).

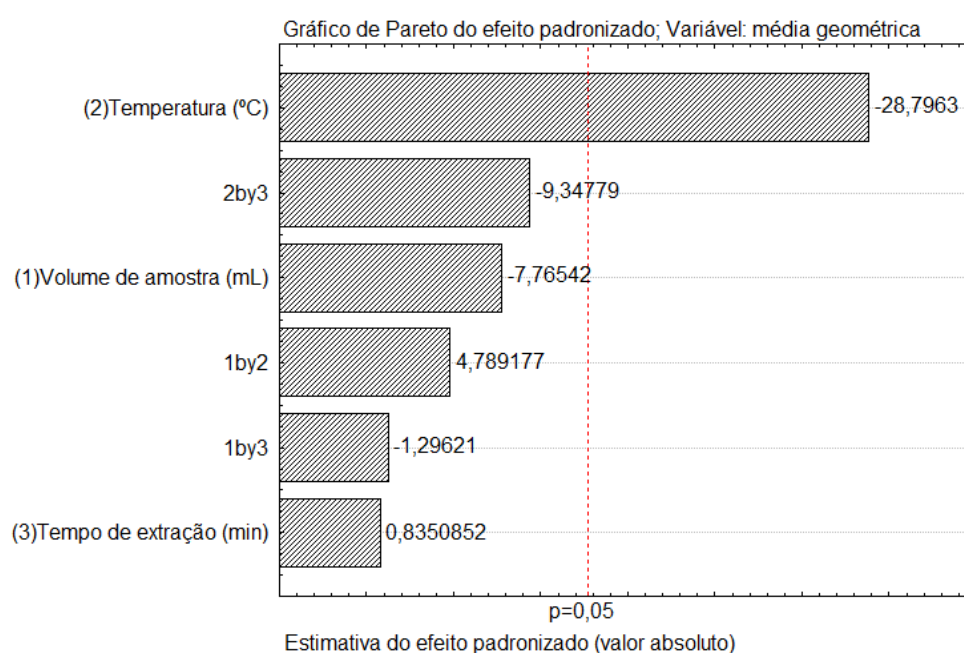
A partir da superfície de resposta obtida pode-se observar que menores volumes de DMCHA proporcionaram as melhores respostas cromatográficas. Isso pode ser devido a uma maior concentração dos analitos. É importante ressaltar que volumes menores que 100 µL não são práticos, devido à dificuldade de coletar o SHS da amostra no final da extração. Para o volume de NaOH 10 mol L<sup>-1</sup>, pode-se observar que maiores volumes proporcionaram as

melhores respostas cromatográficas. Contudo, foi selecionado a utilização de 2 mL de NaOH 10 mol L<sup>-1</sup>, pois nessa condição já ocorria a separação das fases com respostas cromatográficas satisfatórias, além disso, foi considerado o gasto de reagente. Assim, a condição definida a partir desse planejamento foi o uso de 100 µL de DMCHA como solvente extrator e 2 mL de NaOH 10 mol L<sup>-1</sup> para a separação das fases.

### 6.3.1.3 Planejamento Fatorial Completo 2<sup>3</sup>

Quando NaOH 10 mol L<sup>-1</sup> foi adicionado para promover a separação das fases foi observada a formação de um solução turva e não a separação em poucos segundos como alguns autores reportaram em trabalhos anteriores (Ahmar *et al.*, 2018; Rameshgar *et al.*, 2017; Shahvandi *et al.*, 2018), isso pode ser devido à complexidade da matriz água de coco. Assim, foi avaliado o aquecimento da amostra de 60 a 80 °C para acelerar a separação das fases. O tempo de extração foi avaliado de 2 a 5 min e o volume de amostra foi avaliado de 3 a 7 mL, gerando um planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup> para realizar um triagem e identificar quais desses parâmetros podem influenciar de forma significativa a eficiência de extração pelo método proposto SHS-HLLME. O gráfico de Pareto obtido a partir desse planejamento está apresentado na Figura 28.

Figura 28 – Gráfico de Pareto obtido para as variáveis: volume de amostra, temperatura para a separação das fases e tempo de extração. R<sup>2</sup> = 0,8570.



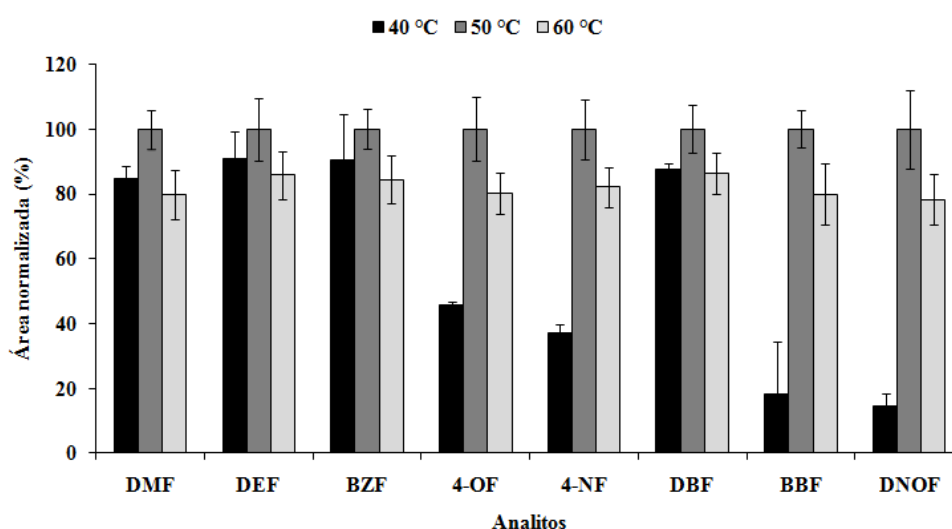
Fonte: Autoria própria (2019).

Como pode ser observado no gráfico de Pareto, somente a variável temperatura para a separação das fases apresentou influência na extração dos analitos, o sinal negativo indica que temperaturas menores favorecem a extração. Dessa forma, essa variável foi avaliada de forma univariada. Para a variável volume de amostra foi fixado o menor valor estudado conforme sinal negativo apresentado. Esses resultados estão de acordo com o trabalho de Ahmar *et al.*, 2018, onde foi observado que grandes volumes de amostra diminuem a massa de analito extraída. Para a variável tempo de extração foi fixado o menor valor estudado para aumentar a frequência analítica do método. Tempos de extração curtos são uma característica da HLLME devido à grande superfície de contato formada entre amostra e fase extratora, acelerando a transferência de massa de analito (Ahmar *et al.*, 2018; Ezoddin *et al.*, 2016). Assim, as condições retiradas desse planejamento foram: uso de 3 mL de amostra e 2 min de tempo de extração.

#### 6.3.1.4 Avaliação da temperatura para a separação das fases

A partir do gráfico de Pareto, a variável temperatura para a separação das fases apresentou influência na extração dos analitos para valores menores. Assim, essa variável foi avaliada de forma univariada em 40, 50 e 60 °C, em triplicata. Os resultados estão apresentados no gráfico de barras da Figura 29.

Figura 29 – Otimização univariada da temperatura para a separação das fases no procedimento de SHS-HLLME.



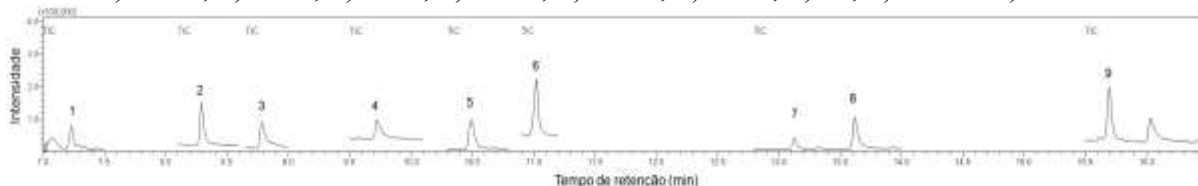
Fonte: Autoria própria (2019).

A partir do gráfico de barras é possível observar que a temperatura de 50 °C forneceu os melhores resultados. Com 40 °C a área dos picos cromatográficos decaiu significativamente para 4 analitos e na temperatura de 60 °C as áreas dos picos cromatográficos foram em média 10% menores para todos os analitos. Assim, a temperatura de 50 °C para a separação das fases foi selecionada como condição ótima.

Após a otimização das principais variáveis que podem influenciar a eficiência de extração empregando o método proposto SHS-HLLME, as condições selecionadas foram: 200 µL da mistura DMCHA:HCl 12 mol L<sup>-1</sup> (1:1, v/v) que corresponde a 100 µL de fase extratora DMCHA, 3 mL de amostra, 2 mL de NaOH 10 mol L<sup>-1</sup>, temperatura de 50 °C para separação das fases e 2 min de tempo de extração.

Na Figura 30 está mostrado um cromatograma no modo SIM da extração de uma amostra de água de coco natural fortificada com 30 µg L<sup>-1</sup> de cada analito e 10 µg L<sup>-1</sup> do padrão interno na condição otimizada.

Figura 30 – Cromatograma no modo SIM da extração de uma amostra de água de coco natural fortificada com 30 µg L<sup>-1</sup> de cada analito e 10 µg L<sup>-1</sup> do PI na condição otimizada. Analitos: 1) DMF, 2) DEF, 3) BZF, 4) 4-OF, 5) 4-NF, 6) DBF, 7) PI, 8) BBF e 9) DNOF.



Fonte: Autoria própria (2019).

### 6.3.2 Parâmetros analíticos de mérito

Após a otimização do procedimento proposto SHS-HLLME, os parâmetros analíticos de mérito foram determinados. Para isso foram construídas curvas de calibração utilizando água de coco natural (proveniente de coco verde) fortificada em diferentes níveis de concentração (0,5; 1; 5; 10; 15; 20 e 30 µg L<sup>-1</sup>). Na Tabela 23 estão apresentadas as equações lineares, as faixas lineares, os coeficientes de correlação (r) obtidos a partir das curvas de calibração e os limites de detecção (LODs) e quantificação (LOQs). O LOQ foi adotado como sendo o primeiro nível de concentração da faixa linear e o LOD foi definido como o LOQ dividido por 3,3.

Tabela 23 – Equação da reta, faixa linear, coeficiente de correção (r), limite de detecção e quantificação para o método proposto usando SHS-HLLME.

Analito	Equação Linear	Faixa Linear ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	r	LOD <sup>b</sup> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LOQ <sup>a</sup> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
DMF	$y = 0,0715x + 0,0223$	0,50-30,0	0,9972	0,15	0,50
DEF	$y = 0,1710x + 0,0146$	0,50-30,0	0,9986	0,15	0,50
BZF	$y = 0,1050x - 0,1978$	5,0-30,0	0,9969	1,5	5,0
4-OF	$y = 0,1653x - 0,4706$	5,0-30,0	0,9965	1,5	5,0
4-NF	$y = 0,1324x - 0,4603$	5,0-30,0	0,9942	1,5	5,0
DBF	$y = 0,2447x - 0,0111$	1,0-30,0	0,9915	0,30	1,0
BBF	$y = 0,0976x + 0,0784$	1,0-30,0	0,9963	0,30	1,0
DNOF	$y = 0,1324x - 0,0850$	1,0-30,0	0,9961	0,30	1,0

Fonte: Autoria própria (2019).

<sup>a</sup>LOQ adotado como o primeiro nível de concentração da faixa linear.

<sup>b</sup>LOD definido como o LOQ dividido por 3,3.

De acordo com a Tabela 23, os coeficientes de correlação obtidos foram satisfatórios variando de 0,9915 a 0,9986, indicando a boa correlação entre as variáveis x e y (Barwick, 2003). Os valores de LODs variaram de 0,15 para o DMF e o DEF a 1,5  $\mu\text{g L}^{-1}$  para a BZF, o 4-OF e o 4-NF e os valores de LOQs variaram de 0,50 para o DMF e o DEF a 5,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  para a BZF, o 4-OF e o 4-NF.

A exatidão e a precisão do método foram avaliadas fortificando água de coco contida em embalagem alimentícia e foi adicionado padrão interno antes das extrações na concentração de 10  $\mu\text{g L}^{-1}$ . A exatidão do método foi avaliada através da recuperação relativa em porcentagem (RR%) em três níveis de concentração comuns para os analitos. A precisão do método foi avaliada através do desvio padrão relativo em porcentagem (RSD%) a partir de ensaios intra-dia (n=3) em três níveis de concentração comuns para os analitos e inter-dia (n=9) em um nível de concentração comum para os analitos. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 24.



Tabela 24 – Recuperação relativa e precisões intra-dia e inter-dia para os analitos em água de coco contida em embalagem alimentícia utilizando o procedimento proposto SHS-HLLME otimizado.

Analito	Concentração da amostra ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Concentração adicionada ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Concentração encontrada menos concentração da amostra ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Recuperação Relativa (%) (n=3)	Precisão (RSD%)	
					Intra-dia (n=3)	Inter-dia (n=9)
DMF	0	5	5,7 $\pm$ 0,36	113	15	18
		15	14,9 $\pm$ 2,4	99	10	
		30	32,7 $\pm$ 9,3	109	7	
DEF	0,66	5	4,5 $\pm$ 0,22	90	7	14
		15	12,3 $\pm$ 2,1	82	2	
		30	33,4 $\pm$ 5,1	111	18	
BZF	<LOQ	5	5,1 $\pm$ 0,19	103	8	11
		15	19,5 $\pm$ 1,4	130	5	
		30	34,3 $\pm$ 3,2	114	17	
4-OF	<LOQ	5	6,4 $\pm$ 0,41	127	8	12
		15	14,8 $\pm$ 0,22	99	3	
		30	30,1 $\pm$ 3,9	100	13	
4-NF	<LOQ	5	5,9 $\pm$ 0,26	118	16	17
		15	14,1 $\pm$ 0,18	94	5	
		30	31,6 $\pm$ 3,5	105	10	
DBF	2,2	5	4,6 $\pm$ 0,67	92	15	13
		15	16,2 $\pm$ 3,2	108	5	
		30	28,2 $\pm$ 4,9	94	12	
BBF	0	5	5,3 $\pm$ 0,91	105	4	13
		15	16,3 $\pm$ 1,8	109	7	
		30	30,0 $\pm$ 0,25	100	8	
DNOF	3,4	5	5,8 $\pm$ 0,32	116	12	18
		15	13,1 $\pm$ 2,3	87	17	
		30	32,8 $\pm$ 3,6	109	18	

Fonte: Autoria própria (2019).

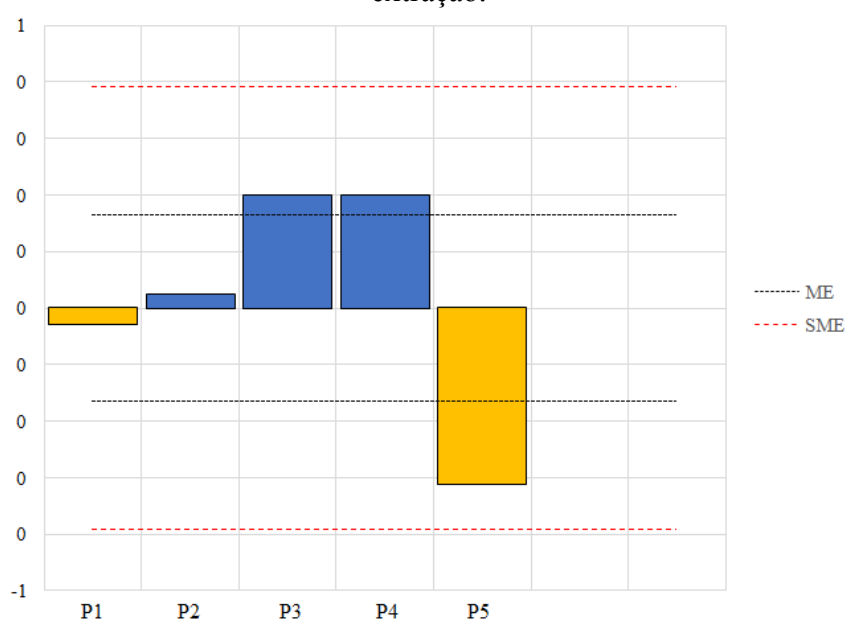
<sup>a</sup>Precisões intra-dia e inter-dia foram calculadas baseadas no desvio padrão relativo (RSD).

Como é possível observar na Tabela 24, as recuperações relativas variaram de 82 a 130%. Quase todos os analitos apresentaram recuperações relativas aceitáveis estando de acordo com o guia de validação de métodos da Associação dos Químicos Analíticos Oficiais (AOAC, do inglês *Association Official of Analytical Chemistry*). Somente a BZF e o 4-OF apresentaram recuperações maiores que a aceitável (120%). As precisões intra-dia e inter-dia foram menores que 18%, também estando de acordo com o guia de validação de métodos da AOAC (AOAC, 2016) Esses resultados enfatizam a aplicabilidade do método desenvolvido para o monitoramento de contaminantes provenientes de embalagens alimentícias em água de coco.

O teste de Youden foi realizado para avaliar a robustez do método desenvolvido. Para isso, foram feitas pequenas variações nos principais parâmetros que podem afetar a extração utilizando o procedimento de SHS-HLLME simulando uma aplicação de rotina (Mulholland e Waterhouse, 1988). As variações foram feitas para valores maiores e menores

do que as condições definidas na otimização. Os parâmetros e as variações foram: volume de amostra (2980 a 3020  $\mu\text{L}$ ), volume de DMCHA:HCl (180 a 220  $\mu\text{L}$ ), volume de NaOH 10 mol  $\text{L}^{-1}$  (1980 a 2020  $\mu\text{L}$ ), temperatura para a separação das fases (48 a 52  $^{\circ}\text{C}$ ) e tempo de extração (110 a 130 s). Os resultados foram expressos através do gráfico de Lenth apresentado na Figura 31.

Figura 31 – Gráfico de Lenth obtido para a avaliação da robustez do método proposto SHS-HLLME otimizado. Fatores: P1 – volume de amostra; P2 – volume de DMCHA:HCl; P3 – volume de NaOH 10 mol  $\text{L}^{-1}$ ; P4 – temperatura para a separação das fases; e P5 – tempo de extração.



Fonte: Autoria própria (2019).

Considerando que múltiplos efeitos foram avaliados, a margem de erro simultânea (SME) é a linha de referência e essa deve ser considerada para avaliar os resultados (Hund *et al.*, 2000; Bokor *et al.*, 2017). Dessa forma, é possível concluir que nenhum parâmetro excedeu esse limite, indicando que o método é robusto.

Adicionalmente, o método proposto SHS-HLLME foi comparado com outros métodos reportados na literatura que determinaram os mesmos analitos em matrizes alimentícias. A comparação está apresentada na Tabela 25.

Tabela 25 – Comparação entre o método proposto SHS-HLLME e outros métodos na literatura para os mesmos analitos em matrizes alimentícias.

Analitos	Matriz	Método de preparo	Técnica de quantificação	Faixa linear ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Volume de solvente	Tempo de extração	Referência
DMF, DEF, DBF, BBF, DNOF, BZF, 4-OF, 4-NF	Água de coco	SHS-HLLME	GC-MS	0,5 – 30 1,0 – 30 5,0 – 30	100 $\mu\text{L}$ SHS	2 min	Este trabalho
DMF, DEF, DBF, BBF	Leite, óleo e bebida engarrafada	MMI-SPE	GC-MS/MS	0,5 – 20 0,5 – 100	10 mL ACN + 15 mL Hexano + 3 mL AcEt	$\approx$ 35 min	(Lu <i>et al.</i> , 2018)
DMF, DEF, DBF, BBF, DNOF	Azeite de oliva	LEC	GC-MS	50 – 1000	10 mL ACN	$\approx$ 7 min	(Pereira <i>et al.</i> , 2019)
BZF	Simulante de alimento	LLE	SFC-PDA-MS/MS	0,81 – 40,12	4 mL de triclorometano + 200 mL MeOH	$\approx$ 2h e 24 min	(Zhang, Y. <i>et al.</i> , 2016)
NF, DMF, DEF, BBF	Leite integral	SPE	GC-MS	2,0 – 4000	80 mL MeOH + 72 mL diclorometano/hexano (4:1) + 12 mL AcEt	$\approx$ 50 min	(Casajuana e Lacorte, 2004)
DBF, BBF	Bebidas alcoólicas	IL-DLLME	HPLC-DAD	10 – 500 20 – 1000	160 $\mu\text{L}$ IL [ $\text{C}_8\text{MIM}$ ][ $\text{PF}_6$ ] + 1 mL etanol + 100 $\mu\text{L}$ MeOH	$\approx$ 5 min	(Fan <i>et al.</i> , 2014)
DMF, DEF, DBF, BBF, DNOF	Diversos alimentos	LLE QuEChERS SPE	LC-MS/MS	20 – 100*	Para LLE: 5 mL ACN Para QuEChERS: 30 mL ACN Para SPE: 20 mL ACN + 14 mL hexano	Para LLE: $\approx$ 3 min Para QuEChERS: $\approx$ 6 min Para SPE: $\approx$ 16 min	(Xu <i>et al.</i> , 2014)
4-OF, 4-NP, DMF, DEF, DBF, BBF, DNOP	Vegetais	SLE-SBSE	TD-GC-MS	0,1 – 5,0	11 mL MeOH	$\approx$ 4 horas	(Cacho <i>et al.</i> , 2012)
BZF	Simulante de alimento	LLE	GC-MS	5,4 – 100	20 mL hexano	$\approx$ 25 min	(Rubio <i>et al.</i> , 2019)

Fonte: Autoria própria (2019)

\*Expresso em  $\mu\text{g/Kg}$ , sendo 20  $\mu\text{g/Kg}$  o LOQ do método.

Como pode ser observado na Tabela 25, o método proposto SHS-HLLME apresentou vantagem com relação ao tempo de preparo de amostra, onde foram necessários somente 2 min para essa etapa. É importante ressaltar que nesse trabalho o tempo de extração foi definido a partir do momento que o NaOH 10 mol L<sup>-1</sup> foi adicionado na solução e o sistema colocado no banho de aquecimento até o momento em que a solução foi retirada do aquecimento. Outros métodos reportados apresentaram tempos de preparo de amostra de 3 min até 4 horas. Isso enfatiza os aspectos de alto rendimento do método proposto.

Também foi observada a utilização de um menor volume de solvente orgânico. No método proposto foram necessários somente 100 µL de DMCHA para realizar as extrações, enquanto outros métodos utilizaram vários mililitros de solventes orgânicos tóxicos como ACN, MeOH, hexano, acetato de etila, diclorometano e triclorometano. Isso enfatiza os aspectos ambientalmente amigáveis da metodologia desenvolvida, com redução do volume de solvente e geração de resíduo, além da utilização de um solvente menos tóxico.

Ademais, o método proposto apresentou o primeiro nível de concentração da faixa linear comparável e na maioria dos casos menor do que os métodos que determinaram os mesmos analitos. Somente os métodos de Cacho *et al.*, 2012 e Zhang, Y. *et al.*, 2016 apresentaram o primeiro nível de concentração da faixa linear menor. Dessa forma, o método é adequado para a aplicação pretendida e apresenta vantagens frente a outros métodos reportadas na literatura.

### **6.3.3 Análise de amostras de água de coco contidas em embalagens alimentícias**

O método proposto SHS-HLLME foi aplicado na análise de seis amostras de água de coco contidas em embalagem Tetra Pak<sup>®</sup> adquiridas em supermercados da cidade de Florianópolis-SC, nomeadas A, B, C, D, E e F. Na Tabela 26 estão apresentados os resultados para as análises.

Tabela 26 – Análise de amostras de água de coco contidas em embalagens alimentícias.

Analito	Amostras de água de coco, concentrações encontradas em ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )					
	A	B	C	D	E	F
DMF	-	-	-	-	-	-
DEF	-	-	0,66	<LOQ	1,60	2,06
BZF	-	-	<LOQ	-	-	-
4-OF	<LOQ	<LOQ	<LOQ	-	-	-
4-NF	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	-	-
DBF	-	-	2,16	1,76	3,42	1,98
BBF	-	-	-	-	-	-
DNOF	1,17	<LOQ	3,37	-	-	-

Fonte: Autoria própria (2019).

É possível observar que foi encontrado DEF nas amostras C, E e F; DBF foi encontrado nas amostras C, D, E e F; e DNOF foi encontrado nas amostras A e C. BZF, 4-OF e 4-NF foram encontrados abaixo do LOQ em algumas amostras e DMF e BBF não foram encontrados nas amostras. Portanto, é possível observar que cinco amostras apresentaram ao menos um analito e que a amostra B apresentou três analitos em concentrações abaixo do LOQ do método. Dessa forma é possível concluir que esses analitos podem estar presentes em alimentos contidos em embalagens alimentícias.

A presença desses analitos nas amostras indica uma contaminação que pode ser proveniente da migração dos analitos da embalagem para o alimento. Contudo, é importante destacar que a migração depende do tempo de armazenamento do alimento na embalagem e das condições de temperatura e de transporte em que a embalagem e o alimento foram submetidos, uma vez que esses fatores podem favorecer a migração. Apesar de a embalagem ser a fonte mais provável de contaminação, outras fontes devem ser levadas em consideração, que consistem em todas as etapas do processamento do alimento até chegar ao enchimento ou envase (Muncke, 2009).

Assim, tendo em vista os prejuízos causados por esses analitos à saúde humana, é de extrema importância o desenvolvimento de métodos analíticos com LODs e LOQs adequados para a análise e o monitoramento destes compostos em alimentos. Também, esperam-se mais regulamentações para assegurar a segurança alimentar e que métodos mais rápidos e ambientalmente amigáveis sejam escolhidos como ferramenta para preencher a deficiência existente na área de segurança alimentar.

#### 6.4 CONCLUSÕES PARCIAIS

Nesse trabalho foi explorada pela primeira vez a utilização de um solvente com hidrofiliabilidade comutável como fase extratora alternativa para a extração de ésteres de ftalatos (DMF, DEF, DBF, BBF e DNOP), alquilfenóis (4-OF e 4-NF) e benzofenona em amostras de água de coco contidas em embalagens alimentícias. O método proposto SHS-HLLME apresentou vantagens como extrações rápidas (apenas 2 min), pequeno volume de fase extratora (apenas 100  $\mu\text{L}$  de DMCHA) e uso de solvente menos tóxico como fase extratora alternativa aos solventes convencionalmente empregados em técnicas de extração. Isso enfatiza os aspectos de alto rendimento e ambientalmente amigáveis do método proposto. Além disso, o método apresentou LOQs satisfatórios variando de 0,5 a 5,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ . A exatidão variou de 82 a 130% e as precisões intra e inter-dia foram menores que 18% para todos os analitos, estando esses valores de acordo com o guia de validação de métodos da AOAC. Ainda, foi constatado pelo teste de Youden que o método é robusto. Dessa forma, o método SHS-HLLME se mostrou adequado para a aplicação pretendida e uma alternativa aos métodos laboriosos e que empregam grandes volumes de solventes orgânicos tóxicos geralmente utilizados na análise de alimentos. Através da análise de seis amostras de água de coco e constatação da presença de no mínimo um analito em cinco amostras, reforçou-se a necessidade do monitoramento desses compostos em alimentos através do desenvolvimento de métodos adequados. Além disso, a partir de uma extensa pesquisa constatou-se a necessidade de criação de mais regulamentações na área de segurança alimentar.

Com relação ao uso de SHSs como fases extradoras em microextração, pode-se concluir que ainda existe um amplo campo para ser explorado. Tanto com relação ao emprego de SHSs em diferentes técnicas de microextração, bem como para a análise de diferentes matrizes e analitos. Além disso, pode-se explorar a utilização de novos compostos com hidrofiliabilidade comutável e a automatização dos métodos desenvolvidos.

## 7 CONCLUSÃO FINAL E PERSPECTIVAS

Novas fases extratoras são uma alternativa promissora para contornar problemas apresentados pelas fases comerciais e/ou comumente empregadas em técnicas de extração e microextração. O material  $\text{Si3Py}^+\text{Cl}^-$  apresentou vantagens frente às fases comerciais para DPX, oferecendo uma alternativa para a extração de analitos contendo grupos que podem interagir através de ligação de hidrogênio e interações  $\pi$ - $\pi$  com a fase extratora. Esse material também apresentou alta eficiência de extração, satisfatória estabilidade química frente aos solventes orgânicos empregados (MeOH e ACN), tempo de extração curto (3,50 min) e uso de pequenos volumes de solventes orgânicos. Os parâmetros analíticos de mérito do método DPX- $\text{Si3Py}^+\text{Cl}^-$  foram comparáveis a outras metodologias reportadas para os mesmos analitos.

Com relação ao emprego de MILs como fase extratora, suas propriedades físico-químicas incluindo hidrofobicidade, pressão de vapor negligenciável, estrutura química ajustável e facilidade de ser retirado da solução aquosa com o auxílio de uma barra magnética, demonstraram que os MILs são uma ferramenta atrativa e que podem ser explorados como solventes extratores para inúmeras técnicas de extração/microextração. Além disso, apresentaram uma alternativa aos solventes orgânicos clorados geralmente empregados na técnica de DLLME. Essa metodologia também permitiu que as extrações fossem realizadas em tempos curtos (90 s) sem a necessidade de uma etapa de centrifugação. Os parâmetros analíticos de mérito do método proposto DLLME/MIL foram satisfatórios. Além disso, o método DLLME/MIL associado ao HPLC-DAD foi aplicado pela primeira vez na análise de amostras complexas, nesse caso, amostras de urina humana, ampliando a aplicabilidade desse promissor solvente extrator.

Com relação ao uso de SHSs como fases extratoras, esses foram aplicados na extração de possíveis contaminantes provenientes de embalagens alimentícias em água de coco. O método proposto SHS-HLLME apresentou vantagens sobre técnicas geralmente empregadas na análise de alimentos, com extrações rápidas (2 min), baixo custo, uso de pequeno volume de solvente extrator (100  $\mu\text{L}$ ) e uso de solvente menos tóxicos do que os solventes geralmente empregados em técnicas de extração para a análise de alimentos. Esses aspectos evidenciaram o desenvolvimento de um método mais ambientalmente amigável e de alto rendimento. Os parâmetros analíticos de mérito foram satisfatórios e o método proposto foi empregado para a análise de seis amostras de água de coco, sendo encontrado pelo menos um analito em cinco amostras. Isso demonstra a necessidade de desenvolver métodos

adequados para a análise e monitoramento de contaminantes em alimentos visando a segurança alimentar.

Diante do exposto, esse trabalho se destaca pela contribuição na área de química analítica e química analítica verde, uma vez que as fases extratoras alternativas proporcionaram o desenvolvimento de métodos mais ambientalmente amigáveis. Além da possibilidade de melhoramento da eficiência de extração utilizando fases com grupos funcionais e/ou polaridade ajustada para uma classe ou grupos de analitos. Nesse trabalho também foi demonstrada as inúmeras possibilidades de aplicação de diferentes materiais como fases extratoras alternativas, além da utilização em diferentes técnicas de microextração para a análise de diferentes classes de analitos em matrizes ambiental aquosa, biológica e alimentícia.

Como perspectiva temos que diferentes materiais podem ser explorados como fases extratoras alternativas em técnicas de extração e microextração para contornar problemas apresentados por fases convencionais, buscando sempre o desenvolvimento de metodologias mais ambientalmente amigáveis. Além disso, as fases extratoras estudadas nesse trabalho podem ser empregadas em outras técnicas de microextração como a BA $\mu$ E, a SDME, a TF-SPME, a HF-LLME, dentre outras. Ainda, os métodos desenvolvidos podem ser aplicados para outras matrizes e analitos. Por fim, pode-se estudar a automatização dos métodos propostos, uma vez que esse assunto é uma tendência na área de preparo de amostras.



## REFERÊNCIAS

- AHMAR, H. *et al.* Switchable Hydrophilicity Solvent-Based Homogenous Liquid-Liquid Microextraction (SHS-HLLME) combined with GC-FID for the quantification of methadone and tramadol. **Chromatographia**, v. 81, p. 1063-1070, 2018.
- AKRAMIPOUR, R. *et al.* Combination of counter current salting-out homogenous liquid-liquid extraction and dispersive liquid-liquid microextraction as a novel microextraction of drugs in urine samples. **Journal of Chromatography B**, v. 1012, p. 162-168, 2016.
- ALBO, J. *et al.* Separation performance of CO<sub>2</sub> through Supported Magnetic Ionic Liquid Membranes (SMILMs). **Separation and Purification Technology**, v. 97, p. 26-33, 2012.
- ALMEIDA, C.; NOGUEIRA, J. M. F. Determination of steroid sex hormones in water and urine matrices by stir bar sorptive extraction and liquid chromatography with diode array detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, p. 1303-1311, 2006.
- ALMEIDA, C.; NOGUEIRA, J. M. F. Determination of steroid sex hormones in real matrices by bar adsorptive microextraction (BA $\mu$ E). **Talanta**, v. 136, p. 145-154, 2015.
- AMANDUSSON, A.; BLOMQVIST, A. Estrogenic influences in pain processing. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 34, p. 329-349, 2013.
- AMELIN, V. G.; LAVRUKHINA, O. I. Food safety assurance using methods of chemical analysis. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 72, p. 1-46, 2017.
- AN, J.; RAHN, K. L.; ANDERSON, J. L. Headspace single drop microextraction versus dispersive liquid-liquid microextraction using magnetic ionic liquid extraction solvents. **Talanta**, v. 167, p. 268-278, 2017.
- ANDERSSON, M. *et al.* Simultaneous quantification of 11 cannabinoids and metabolites in human urine by liquid chromatography tandem mass spectrometry using WAX-S tips. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 408, p. 6461-6471, 2016.
- AOAC. **Official Methods of Analysis. Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements**, 2016.
- AUGUSTO, F. *et al.* New sorbents for extraction and microextraction techniques. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 2533-2542, 2010.
- BARWICK, V. J. Preparation of calibration curves: a guide to best practice. In: LGC (Ed.), 2003.
- BOKOR, I.; SDRAULIG, S.; SANAGOU, M. Robustness testing of an in-situ caesium extraction unit. **Journal of Environmental Radioactivity**, v. 178-179, p. 426-429, 2017.
- BORDIN, D. C. M. *et al.* A rapid assay for the simultaneous determination of nicotine, cocaine and metabolites in meconium using disposable pipette extraction and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). **Journal of Analytical Toxicology**, v. 38, p. 31-38, 2014.

BORDIN, D. C. M. *et al.* Disposable pipette tips extraction: fundamentals, applications and state of the art. **Journal of Separation Science**, v. 39, p. 1168-1172, 2016.

BORGES, K. B.; FIGUEIREDO, E. C.; QUEIROZ, M. E. C. **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos**. 1 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2015.

BRANCO, A.; BRANCO, L. C.; PINA, F. Electrochromic and magnetic ionic liquids. **Chemical Communications**, v. 47, p. 2300-2302, 2011.

BREWER, W. E. **Disposable pipette extraction**. Patente número 6.566.145 B2. EUA, 2003.

BROWN, P. *et al.* Dication magnetic ionic liquids with tuneable heteroanions. **Chemical Communications**, v. 49, p. 2765-2767, 2013.

CABUK, H.; KOKTURK, M.; ATA, S. pH-assisted homogeneous liquid-liquid microextraction using dialkylphosphoric acid as an extraction solvent for the determination of chlorophenols in water samples. **Journal of Separation Science**, v. 37, p. 1343-1351, 2014.

CACHO, J. I. *et al.* Determination of alkylphenols and phthalate esters in vegetables and migration studies from their packages by means of stir bar sorptive extraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1241, p. 21-27, 2012.

CALDAS, S. S. *et al.* Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 34, p. 1604-1617, 2011.

CAMPILLO, N. *et al.* Ten years of dispersive liquid-liquid microextraction and derived techniques. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 52, p. 267-415, 2016.

CARASEK, E.; MERIB, J. Membrane-based microextraction techniques in analytical chemistry: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 880, p. 8-25, 2015.

CARASEK, E.; MORÉS, L.; MERIB, J. Basic principles, recent trends and future directions of microextraction techniques for the analysis of aqueous environmental samples. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 19, p.1-18, 2018.

CASAJUANA, N.; LACORTE, S. New methodology for the determination of phthalate esters, bisphenol A, bisphenol A diglycidyl ether, and nonylphenol in commercial whole milk samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 3702-3707, 2004.

CHAO, Y. Y. *et al.* An on-line push/pull perfusion-based hollow-fiber liquid-phase microextraction system for high-performance liquid chromatographic determination of alkylphenols in water samples. **Analyst**, v. 138, p. 3271-3279, 2013.

CHEMAXON. Chemicalize, 2020. Instant Cheminformatics Solutions. Disponível em: <https://chemicalize.com/welcome>.

CHEN, W. L. *et al.* Ultra-high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry determination of feminizing chemicals in river water, sediment and tissue

pretreated using disk-type solid-phase extraction and matrix solid-phase dispersion. **Talanta**, v. 89, p. 237-245, 2012.

CHEN, Y. *et al.* Advanced materials for sample preparation in recent decade. **Trac Trends in Analytical Chemistry**, v. 120, p.1-14, 2019.

CLARK, K. D. *et al.* Magnetic ionic liquids in analytical chemistry: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 934, p. 9-21, 2016.

CLARK, K. D. *et al.* Extraction of DNA by Magnetic Ionic Liquids: Tunable Solvents for Rapid and Selective DNA Analysis. **Analytical Chemistry**, v. 87, p. 1552-1559, 2015.

COLBORN, T.; VOM SAAL, F. S.; SOTO, A. M. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. **Environmental Health Perspectives**, v. 101, p. 378-384, 1993.

COOK, N.; FREEMAN, S. Report of 19 cases of photoallergic contact dermatitis to sunscreens seen at the Skin and Cancer Foundation. **The Australasian Journal of Dermatology**, v. 42, p. 257-9, 2001.

CORAZZA, G. *et al.* A hybrid material as a sorbent phase for the disposable pipette extraction technique enhances efficiency in the determination of phenolic endocrine-disrupting compounds. **Journal of Chromatography A**, v. 1513, p. 42-50, 2017.

CUI, M. Y. *et al.* An etched stainless steel wire/ionic liquid-solid phase microextraction technique for the determination of alkylphenols in river water. **Talanta**, v. 132, p. 564-571, 2015.

CUNHA, S. C.; FERNANDES, J. O. Quantification of free and total bisphenol A and bisphenol B in human urine by dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) and heart-cutting multidimensional gas chromatography-mass spectrometry (MD-GC/MS). **Talanta**, v. 83, p. 117-125, 2010.

DEL SESTO, R. E. *et al.* Structure and magnetic behavior of transition metal based ionic liquids. **Chemical Communications**, p. 447-449, 2008.

DIAS, A. N. *et al.* A novel approach to bar adsorptive microextraction: cork as extractor phase for determination of benzophenone, triclocarban and parabens in aqueous samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 888, p. 59-66, 2015.

DIAS, A. N. *et al.* Cork as a new (green) coating for solid-phase microextraction: determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples by gas chromatography-mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 772, p. 33-39, 2013.

DPX technologies. 2020. Disponível em: <http://dpxtechnologies.com/>.

DUTY, S. M. *et al.* The relationship between environmental exposures to phthalates and DNA damage in human sperm using the neutral comet assay. **Environmental Health Perspectives**, v. 111, p. 1164-1169, 2003.

EBRAHIMPOUR, B.; YAMINI, Y.; ESRAFILI, A. Acid-induced homogenous liquid-phase microextraction: Application of medium-chain carboxylic acid as extraction phase. **Journal of Separation Science**, v. 36, p. 1493-1499, 2013.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Phthalates action plan**. United States of America, 2012.

EUROPEAN COMMISSION. **Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed**, 2015.

EZODDIN M, ABDI K, LAMEI N. Development of air assisted liquid phase microextraction based on switchable-hydrophilicity solvent for the determination of palladium in environmental samples. **Talanta**, v. 153, p. 247-252, 2016.

FAN, Y. Y.; LIU, S. H.; XIE, Q. L. Rapid determination of phthalate esters in alcoholic beverages by conventional ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction coupled with high performance liquid chromatography. **Talanta**, v. 119, p. 291-298, 2014.

FARAJZADEH, M. A.; SHEYKHIZADEH, S.; KHORRAM, P. Salting-out homogeneous liquid-liquid extraction in narrow-bore tube: Extraction and preconcentration of phthalate esters from water. **Journal of Separation Science**, v. 36, p. 939-946, 2013.

FASANO, E. *et al.* Migration of phthalates, alkylphenols, bisphenol A and di(2-ethylhexyl)adipate from food packaging. **Food Control**, v. 27, p. 132-138, 2012.

FENG, X. *et al.* Novel functionalized magnetic ionic liquid green separation technology coupled with high performance liquid chromatography: A rapid approach for determination of estrogens in milk and cosmetics. **Talanta**, v. 209, p. 120542, 2020.

FERNANDES, A. R.; ROSE, M.; CHARLTON, C. 4-Nonylphenol (NP) in food-contact materials: Analytical methodology and occurrence. **Food Additives and Contaminants**, v. 25, p. 364-372, 2008.

FERNANDEZ, P. *et al.* A rapid ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction followed by ultra-performance liquid chromatography for the simultaneous determination of seven benzodiazepines in human plasma samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 767, p. 88-96, 2013.

FERNANDEZ, P. *et al.* Optimization of ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction for ultra performance liquid chromatography determination of benzodiazepines in urine and hospital wastewater. **Analytical Methods**, v. 6, p. 8239-8246, 2014.

FONTANALS, N.; BORRULL, F.; MARCÉ, R. M. Ionic liquids in solid-phase extraction. **Trac Trends in Analytical Chemistry**, v. 41, p. 15-26, 2012.

GADZALA-KOPCIUCH, R.; FILIPIAK, A.; BUSZEWSKI, B. Isolation, purification and determination of 4-n-nonylphenol and 4-tert-octylphenol in aqueous and biological samples. **Talanta**, v. 74, p. 655-660, 2008.

GALUCH, M. B. *et al.* Determination of acrylamide in brewed coffee by dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) and ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). **Food Chemistry**, v. 282, p. 120-126, 2019.

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

GAMA, M. R. *et al.* An overview of the Brazilian contributions to Green Analytical Chemistry. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, p.1-33, 2019.

GARDNER, M. A. *et al.* Analysis of Fentanyl in Urine by DLLME-GC-MS. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 39, p. 118-125, 015.

GHIASVAND, A. R. *et al.* Homogeneous liquid-liquid extraction method for the selective separation and preconcentration of ultra trace molybdenum. **Talanta**, v. 66, p. 912-916, 2005.

GUAN, H. X. *et al.* Disposable pipette extraction for the analysis of pesticides in fruit and vegetables using gas chromatography/mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 1867-1874, 2010.

GUENTHER, K. *et al.* Endocrine disrupting nonylphenols are ubiquitous in food. **Environmental Science & Technology**, v. 36, p. 1676-1680, 2002.

GUO, Y.; KANNAN, K. Challenges encountered in the analysis of phthalate esters in foodstuffs and other biological matrices. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 404, p. 2539-2554, 2012.

HANAI, T. **Liquid chromatography in biomedical analysis**. 1ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1991. 295.

HANTAO, L. W.; TOLEDO, B. R.; AUGUSTO, F. Fases estacionárias de líquidos iônicos em cromatografia gasosa: fundamentos, avanços recentes e perspectivas. **Química Nova**, v. 39, p. 81-93, 2016.

HASSAN, M.; ALSHANA, U. Switchable-hydrophilicity solvent liquid-liquid microextraction of non-steroidal anti-inflammatory drugs from biological fluids prior to HPLC-DAD determination. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 174, p. 509-517, 2019.

HAVLIKOVA, M. *et al.* Critical evaluation of microextraction pretreatment techniques-Part 2: Membrane-supported and homogenous phase based techniques. **Journal of Separation Science**, v. 42, p. 303-318, 2019.

HICE, S. A. *et al.* Magnetic ionic liquids: interactions with bacterial cells, behavior in aqueous suspension, and broader applications. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 2020.

HO, T. D.; CANESTRARO, A. J.; ANDERSON, J. L. Ionic liquids in solid-phase microextraction: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 695, p. 18-43, 2011.

HO, T. D. *et al.* Ionic Liquids in Analytical Chemistry: Fundamentals, Advances, and Perspectives. **Analytical Chemistry**, v. 86, p. 262-285, 2014.

HSIEH, M. H. *et al.* In utero exposure to benzophenone-2 causes hypospadias through an estrogen receptor dependent mechanism. **Journal of Urology**, v. 178, p. 1637-1642, 2007.

HU, L. *et al.* Centrifuge-less dispersive liquid-liquid microextraction base on the solidification of switchable solvent for rapid on-site extraction of four pyrethroid insecticides in water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1472, p. 1-9, 2016.

HUND, E. *et al.* Comparison of several criteria to decide on the significance of effects in a robustness test with an asymmetrical factorial design. **Analytica Chimica Acta**, v. 404, p. 257-271, 2000.

HURWITZ, A. R.; LIU, S. T. Determination of aqueous solubility and pka values of estrogens. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 66, n. 5, p. 624-627, 1977.

JAMALI, M. R.; ASSADI, Y.; SHEMIRANI, F. Homogeneous liquid-liquid extraction and determination of cobalt, copper, and nickel in water samples by flame atomic absorption Spectrometry. **Separation Science and Technology**, v. 42, p. 3503-3515, 2007.

JARDIM, I. C. S. F. Extração em fase sólida: fundamentos teóricos e novas estratégias para preparação de fases sólidas. **Scientia Chromatographica**, v. 2, n. 1, p. 13-25, 2010.

JESSOP, P. G. *et al.* A solvent having switchable hydrophilicity. **Green Chemistry**, v. 12, p. 809-814, 2010.

JIA, Y. Q. *et al.* Thermo-responsive polymer tethered metal-organic framework core-shell magnetic microspheres for magnetic solid-phase extraction of alkylphenols from environmental water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1456, p. 42-48, 2016.

KARTAL, A. A. *et al.* Determination of chlorophenols and alkylphenols in water and juice by solid phase derivative extraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Analytical Letters**, v. 48, p. 408-423, 2015.

KEYTE, I. J.; HARRISON, R. M.; LAMMEL, G. Chemical reactivity and long-range transport potential of polycyclic aromatic hydrocarbons - a review. **Chemical Society Reviews**, v. 42, p. 9333-9391, 2013.

KOKOSA, J. M. Recent trends in using single-drop microextraction and related techniques in green analytical methods. **Trac Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 194-204, 2015.

KOKOSA, J. M.; PRZYJAZNY, A.; JEANNOT, M. A. **Solvent microextraction: theory and practice**. New Jersey, EUA: John Wiley & sons, 2009. 323.

KOLE, P. L. *et al.* Recent advances in sample preparation techniques for effective bioanalytical methods. **Biomedical Chromatography**, v. 25, p. 199-217, 2011.

KUMAR, R. *et al.* Efficient analysis of selected estrogens using fabric phase sorptive extraction and high performance liquid chromatography-fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1359, p. 16-25, 2014.

KUPCOVA, E.; REIFFOVA, K. Dispersive liquid-liquid microextraction as an effective preanalytical step for the determination of estradiol in human urine. **Journal of Separation Science**, v. 40, p. 2620-2628, 2017.

KUPCOVÁ, E.; REIFFOVÁ, K. Dispersive liquid-liquid microextraction as an effective preanalytical step for the determination of estradiol in human urine. **Journal of Separation Science**, v. 40, n. 12, p. 2620-2628, 2017..

LASARTE-ARAGONES, G. *et al.* Use of switchable hydrophilicity solvents for the homogeneous liquid-liquid microextraction of triazine herbicides from environmental water samples. **Journal of Separation Science**, v. 38, p. 990-995, 2015a.

LASARTE-ARAGONES, G. *et al.* Use of switchable solvents in the microextraction context. **Talanta**, v. 131, p. 645-649, 2015b.

LEE, P. C.; LEE, W. In vivo estrogenic action of nonylphenol in immature female rats. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 57, p. 341-348, 1996.

LENARDÃO, E. J. *et al.* "Green chemistry": os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. **Química Nova**, v. 26, p. 123-129, 2003.

LEWIS, K. M.; ARCHER, R. D. pKa values of estrone, 17 beta-estradiol and 2-methoxyestrone. **Steroids**, v. 34, p. 485-99, 1979.

LI, T. *et al.* Ionic liquids as solvents for in situ dispersive liquid-liquid microextraction of DNA. **Journal of Chromatography A**, v. 1272, p. 8-14, 2013.

LI, X. Q. *et al.* Novel sample preparation technique based on functional nanofiber mat for sensitive and precise determination of phenolic environmental estrogens in environmental water. **Analytical Methods**, v. 7, p. 5557-5564, 2015.

LIANG, P.; SANG, H. B. Determination of trace lead in biological and water samples with dispersive liquid-liquid microextraction preconcentration. **Analytical Biochemistry**, v. 380, p. 21-25, 2008.

LIAO, K. R. *et al.* Multiple monolithic fiber solid-phase microextraction based on a polymeric ionic liquid with high-performance liquid chromatography for the determination of steroid sex hormones in water and urine. **Journal of Separation Science**, v. 39, p. 566-575, 2016.

LIU, J. L. *et al.* Determination of estrogenic hormones in water samples using high performance liquid chromatography combined with dispersive liquid-liquid micro-extraction method based on solidification of floating organic drop and pre-column derivatization. **Fresenius Environmental Bulletin**, v. 20, p. 1075-1083, 2011.

LIU, R. M. *et al.* Barbell-shaped stir bar sorptive extraction using dummy template molecularly imprinted polymer coatings for analysis of bisphenol A in water. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 408, p. 5329-5335, 2016.

LIU, Y. H. *et al.* Occurrence, distribution and risk assessment of suspected endocrine-disrupting chemicals in surface water and suspended particulate matter of Yangtze River (Nanjing section). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 135, p. 90-97, 2017.

LOPEZ-DARIAS, J. *et al.* Dispersive liquid-liquid microextraction versus single-drop microextraction for the determination of several endocrine-disrupting phenols from seawaters. **Talanta**, v. 80, p. 1611-1618, 2010.

LOPEZ-DARIAS, J. *et al.* Utilization of a benzyl functionalized polymeric ionic liquid for the sensitive determination of polycyclic aromatic hydrocarbons; parabens and alkylphenols in waters using solid-phase microextraction coupled to gas chromatography-flame ionization detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 7189-7197, 2010.

LOYO-ROSALES, J. E. *et al.* Migration of nonylphenol from plastic containers to water and a milk surrogate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 2016-2020, 2004.

LU, C. X. *et al.* Computer-aided design of magnetic dummy molecularly imprinted polymers for solid-phase extraction of ten phthalates from food prior to their determination by GC-MS/MS. **Microchimica Acta**, v. 185, 2018.

MACIEL, E. V. *et al.* New materials in sample preparation: Recent advances and future trends. **Trac Trends in Analytical Chemistry**, v. 119, p.1-22, 2019.

MAGOSSO, H. A. *et al.* Adsorption of metal ions on novel 3-n-propyl(methylpyridinium)silsesquioxane chloride polymers surface. Study of heterogeneous equilibrium at the solid-solution interface. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, p. 744-752, 2009.

MAGOSSO, H. A.; LUZ, R. C. S.; GUSHIKEM, Y. Preparation and Properties of the Hybrid Material n-Propyl(3-methylpyridinium)silsesquioxane Chloride. Application in Electrochemical Determination of Nitrite. **Electroanalysis**, v. 22, p. 216-222, 2010.

MARCINKOWSKA, R. *et al.* Application of ionic liquids in microextraction techniques: Current trends and future perspectives. **Trac Trends in Analytical Chemistry**, v. 119, p.1-19, 2019.

MARTINO-ANDRADE, A. J.; CHAHOUD, I. Reproductive toxicity of phthalate esters. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 54, p. 148-157, 2010.

MASKARINEC, G. *et al.* Association of estrogen measurements in serum and urine of premenopausal women. **Biomarkers in Medicine**, v. 9, p. 417-24, 2015.

MATSUMOTO, M.; HIRATA-KOIZUMI, M.; EMA, M. Potential adverse effects of phthalic acid esters on human health: A review of recent studies on reproduction. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 50, p. 37-49, 2008.



MEHDI, H. *et al.* Hydrophobic ionic liquids with strongly coordinating anions. **Chemical Communications**, v. 46, p. 234-236, 2010.

MERIB, J. *et al.* Determination of compounds with varied volatilities from aqueous samples using a polymeric ionic liquid sorbent coating by direct immersion-headspace solid-phase microextraction. **Analytical Methods**, v. 8, p. 4108-4118, 2016.

MULHOLLAND, M.; WATERHOUSE, J. Investigation of the limitations of saturated fractional factorial experimental designs, with confounding effects for an HPLC ruggedness test. **Chromatographia**, v. 25, p. 769-774, 1988.

MULLER, M. *et al.* Chemical and biological analysis of endocrine-disrupting hormones and estrogenic activity in an advanced sewage treatment plant. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 27, p. 1649-1658, 2008.

MUNCKE, J. Exposure to endocrine disrupting compounds via the food chain: Is packaging a relevant source? **Science of the Total Environment**, v. 407, p. 4549-4559, 2009.

MUSARURWA H. *et al.* Recent developments and applications of QuEChERS based techniques on food samples during pesticide analysis. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 84, p. 103314, 2019.

NACHAM, O. *et al.* Synthetic Strategies for Tailoring the Physicochemical and Magnetic Properties of Hydrophobic Magnetic Ionic Liquids. **Chemistry of Materials**, v. 27, p. 923-931, 2015.

NAEEMULLAH; TUZEN, M. A new portable switchable hydrophilicity microextraction method for determination of vanadium in microsampling micropipette tip syringe system couple with ETAAS. **Talanta**, v. 194, p. 991-996, 2019.

NAGAO, T. *et al.* Reproductive effects of nonylphenol in rats after gavage administration: a two-generation study. **Reproductive Toxicology**, v. 15, p. 293-315, 2001.

NERIN, C. *et al.* The challenge of identifying non-intentionally added substances from food packaging materials: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 775, p. 14-24, 2013.

NEVES e CASTRO, M. The possible role of high estriol levels in pregnancy. **Medical Hypotheses**, v. 1, p. 132-134, 1975.

NIU, Z. *et al.* Recent advances in biological sample preparation methods coupled with chromatography, spectrometry and electrochemistry analysis techniques. **Trac Trends in Analytical Chemistry**, v. 102, p.123-146, 2018.

NURULNADIA, M. Y. *et al.* Accumulation of endocrine disrupting chemicals (EDCs) in the polychaete *Paraprionospio* sp. from the Yodo River mouth, Osaka Bay, Japan. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 186, p. 1453-1463, 2014.

OLIVEIRA, A. R. M. D. *et al.* Microextração em fase líquida (LPME): fundamentos da técnica e aplicações na análise de fármacos em fluidos biológicos. **Química Nova**, v. 31, p. 637-644, 2008.

OMAR, T. F. T. *et al.* Endocrine disrupting compounds (EDCs) in environmental matrices: review of analytical strategies for pharmaceuticals, estrogenic hormones, and alkylphenol compounds. **Trac Trends in Analytical Chemistry**, v. 85, p. 241-259, 2016.

PARRILLA VÁZQUEZ, M. M. *et al.* Ultrasound-assisted ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction coupled with liquid chromatography-quadrupole-linear ion trap-mass spectrometry for simultaneous analysis of pharmaceuticals in wastewaters. **Journal of chromatography A**, v. 1291, p. 19-26, 2013.

PAWLISZYN, J. **Handbook of solid phase microextraction**. Beijing: Chemical Industry Press of China, 2009.

PENA-ABAURREA, M.; DE LA TORRE, V. S. G.; RAMOS, L. Ultrasound-assisted extraction followed by disposable pipette purification for the determination of polychlorinated biphenyls in small-size biological tissue samples. **Journal of chromatography A**, v. 1317, p. 223-229, 2013.

PEPPEL, T. *et al.* Low-Viscosity Paramagnetic Ionic Liquids with Doubly Charged Co(NCS)(4) (2-) Ions. **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 49, p. 7116-7119, 2010.

PEREIRA, J.; SELBOURNE, M. D.; POCAS, F. Determination of phthalates in olive oil from European market. **Food Control**, v. 98, p. 54-60, 2019.

PERNICA, M. *et al.* Determination of alkylphenols in water samples using liquid chromatography-tandem mass spectrometry after pre-column derivatization with dansyl chloride. **Journal of chromatography A**, v. 1417, p. 49-56, 2015.

PINTO, M. A. L.; DE SOUZA, I. D.; QUEIROZ, M. E. C. Determination of drugs in plasma samples by disposable pipette extraction with C18-BSA phase and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 139, p. 116-124, 2017.

POCHIVALOV, A. *et al.* Switchable hydrophilicity solvent membrane-based microextraction: HPLC-FLD determination of fluoroquinolones in shrimps. **Analytica Chimica Acta**, v. 976, p. 35-44, 2017.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, v. 24, p. 68-76, 2001.

RAMESHGAR, J. *et al.* Switchable-hydrophilicity solvent-based microextraction combined with gas chromatography for the determination of nitroaromatic compounds in water samples. **Journal of Separation Science**, v. 40, p. 3114-3119, 2017.

REZAEI, M. *et al.* Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1116, p. 1-9, 2006.

RHODES, M. C. *et al.* Carcinogenesis studies of benzophenone in rats and mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 843-851, 2007.

RIBEIRO, C. *et al.* Development and validation of a HPLC-DAD method for determination of several endocrine disrupting compounds in estuarine water. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 30, p. 2729-2746, 2007.

RUBIO, L. *et al.* The behaviour of Tenax as food simulant in the migration of polymer additives from food contact materials by means of gas chromatography/mass spectrometry and PARAFAC. **Journal of Chromatography A**, v. 1589, p. 18-29, 2019.

SAJID, M. Magnetic ionic liquids in analytical sample preparation: A literature review. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 113, p.210-223, 2019.

SANCHES-SILVA, A. *et al.* Study of the Migration of Photoinitiators Used in Printed Food-Packaging Materials into Food Simulants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 9516-9523, 2009.

SANCHIS, Y.; YUSA, V.; COSCOLLA, C. Analytical strategies for organic food packaging contaminants. **Journal of Chromatography A**, v. 1490, p. 22-46, 2017.

SELVARAJ, K. K. *et al.* GC-MS determination of bisphenol A and alkylphenol ethoxylates in river water from India and their ecotoxicological risk assessment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 99, p. 13-20, 2014.

SHAHVANDI, S. K.; BANITABA, M. H.; AHMAR, H. Development of a new pH assisted homogeneous liquid-liquid microextraction by a solvent with switchable hydrophilicity: Application for GC-MS determination of methamphetamine. **Talanta**, v. 184, p. 103-108, 2018.

SHOKOUFI, N.; HAMDAMALI, A. Laser induced-thermal lens spectrometry in combination with dispersive liquid-liquid microextraction for trace analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 681, n. 1-2, p. 56-62, 2010.

Sigma-Aldrich. Aliquat 366. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/brazil.html>.

SOCAS-RODRIGUEZ, B. *et al.* Determination of estrogens in environmental water samples using 1,3-dipentylimidazolium hexafluorophosphate ionic liquid as extraction solvent in dispersive liquid-liquid microextraction. **Electrophoresis**, v. 35, p. 2479-2487, 2014.

STASHENKO, E. E.; MARTÍNEZ, J. R. Preparación de la muestra: un paso crucial para el análisis por GC-MS. **Scientia Chromatographica**, v. 3, p. 25-49, 2011.

STOICHEV, T. *et al.* Application of SPME to the determination of alkylphenols and bisphenol A in cyanobacteria culture media. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 391, p. 425-432, 2008.

Tetra Pak<sup>®</sup>. Packaging material for Tetra Pak carton packages. 2019. Disponível em: <https://www.tetrapak.com/packaging/materials>.

UNIÃO EUROPEIA. **Diretiva do Conselho relativa a aproximação das legislações dos Estados-membros respeitantes aos objectos cerâmicos destinados a entrar em contato com os generos alimentícios**. Jornal Oficial das Comunidades Europeias, 1984.

UNIÃO EUROPEIA. **Regulamento (CE) n° 282/2008 da comissão de 27 de Março de 2008 relativo aos materiais e objectos de plástico reciclado destinados a entrar em contacto com os alimentos e que altera o Regulamento (CE) n° 2023/2006**: Jornal Oficial da União Europeia, 2006.

UNIÃO EUROPEIA. **Directiva 2007/42/CE da comissão de 29 de Junho de 2007 respeitante aos materiais e objectos em película de celulose regenerada destinados a entrar em contacto com generos alimentícios**: Jornal Oficial da União Europeia, 2007.

UNIÃO EUROPEIA. **Regulamento (CE) n° 450/2009 da comissão de 29 de Maio de 2009 relativo aos materiais e objectos activos e inteligentes destinados a entrar em contacto com os alimentos**: Jornal Oficial da União Europeia, 2009.

UNIÃO EUROPEIA. **Regulamento (UE) n° 10/2011 da comissão de 14 de Janeiro de 2011 relativo aos materiais e objetos de matéria plástica destinados a entrar em contato com os alimentos**: Jornal Oficial da União Europeia, 2011.

UNIÃO EUROPEIA. **Diretiva 2013/39/UE do Parlamento Europeu e do Conselho que altera as Diretivas 2000/60/CE e 2008/105/CE no que respeita às substâncias prioritárias no domínio da política da água**. Jornal Oficial da União Europeia, 2013a.

UNIÃO EUROPEIA. **Diretiva 2013/39/UE do Parlamento Europeu e do Conselho que altera as Diretivas 2000/60/CE e 2008/105/CE no que respeita às substâncias prioritárias no domínio da política da água**. Jornal Oficial da União Europeia, 2013b.

VAKH, C. *et al.* A fully automated effervescence-assisted switchable solvent-based liquid phase microextraction procedure: Liquid chromatographic determination of ofloxacin in human urine samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 907, p. 54-59, 2016.

VANDERVEEN, J. R.; DURELLE, J.; JESSOP, P. G. Design and evaluation of switchable-hydrophilicity solvents. **Green Chemistry**, v. 16, p. 1187-1197, 2014.

VAZQUEZ, M. M. *et al.* Comparison of two ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction approaches for the determination of benzoylurea insecticides in wastewater using liquid chromatography-quadrupole-linear ion trap-mass spectrometry: evaluation of green parameters. **Journal of Chromatography A**, v. 1356, p. 1-9, 2014.

VILLAR-NAVARRO, M. *et al.* A novel application of three phase hollow fiber based liquid phase microextraction (HF-LPME) for the HPLC determination of two endocrine disrupting compounds (EDCs), n-octylphenol and n-nonylphenol, in environmental waters. **Science of the Total Environment**, v. 443, p. 1-6, 2013.

VIRKUTYTE, J.; VARMA, R. S.; JEGATHEESAN, V. **Treatment of micropollutants in water and wastewater**. London: IWA Publishing, 2010.

VOTAVOVA, L. *et al.* Migration of Nonylphenols from Polymer Packaging Materials into Food Simulants. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 27, p. 293-299, 2009.

WANG, H. X. *et al.* Rapid and sensitive analysis of phthalate metabolites, bisphenol A, and endogenous steroid hormones in human urine by mixed-mode solid-phase extraction,

dansylation, and ultra-performance liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, p. 4313-9, 2013.

WANG, P.; QIU, X.; YANG, Y. Determination of Estrogens in Human Urine by Vortex-Assisted Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Based on Floating Organic Acid Droplet Combined with High-Performance Liquid Chromatography-Fluorescence Detection. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 38, p. 640-646, 2015.

WANG, X.; DENG, C. Preparation of C18-functionalized magnetic polydopamine microspheres for the enrichment and analysis of alkylphenols in water samples. **Talanta**, v. 148, p. 387-392, 2016.

WANG, X. R. *et al.* Development of CO<sub>2</sub>-Mediated Switchable Hydrophilicity Solvent-Based Microextraction Combined with HPLC-UV for the Determination of Bisphenols in Foods and Drinks. **Food Analytical Methods**, v. 11, p. 2093-2104, 2018.

WELTON, T. Room-temperature ionic liquids. Solvents for synthesis and catalysis. **Chemical Reviews**, v. 99, p. 2071-2083, 1999.

WOLFF, M. S. *et al.* Environmental phenols and pubertal development in girls. **Environment International**, v. 84, p. 174-180, 2015.

XIONG, C. M. *et al.* Extraction and determination of some psychotropic drugs in urine samples using dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 49, p. 572-578, 2009.

XU, D. M. *et al.* Determination of 23 phthalic acid esters in food by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1324, p. 49-56, 2014.

YAO, C.; ANDERSON, J. L. Dispersive liquid-liquid microextraction using an in situ metathesis reaction to form an ionic liquid extraction phase for the preconcentration of aromatic compounds from water. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 395, p. 1491-1502, 2009.

YAZDANFAR, N.; YAMINI, Y.; GHAMBARIAN, M. Homogeneous Liquid-Liquid Microextraction for Determination of Organochlorine Pesticides in Water and Fruit Samples. **Chromatographia**, v. 77, p. 329-336, 2014.

YE, X. *et al.* Automated on-line column-switching HPLC-MS/MS method with peak focusing for measuring parabens, triclosan, and other environmental phenols in human milk. **Analytica Chimica Acta**, v. 622, p. 150-156, 2008.

YE, X. *et al.* Automated on-line column-switching HPLC-MS/MS method for measuring environmental phenols and parabens in serum. **Talanta**, v. 76, p. 865-871, 2008.

YIANTZI, E. *et al.* Vortex-assisted liquid-liquid microextraction of octylphenol, nonylphenol and bisphenol-A. **Talanta**, v. 80, p. 2057-2062, 2010.

YOSHIDA, Y.; SAITO, G. Z. Influence of structural variations in 1-alkyl-3-methylimidazolium cation and tetrahalogenoferrate(III) anion on the physical properties of the paramagnetic ionic liquids. **Journal of Materials Chemistry**, v. 16, p. 1254-1262, 2006.

YU, H.; MERIB, J.; ANDERSON, J. L. Faster dispersive liquid-liquid microextraction methods using magnetic ionic liquids as solvents. **Journal of Chromatography A**, v. 1463, p. 11-19, 2016.

ZGOLA-GRZESKOWIAK, A.; GRZESKOWIAK, T. Determination of alkylphenols and their short-chained ethoxylates in Polish river waters. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 91, p. 576-584, 2011.

ZHANG, P. *et al.* Application of ionic liquids for liquid-liquid microextraction. **Analytical Methods**, v. 5, p. 5376-5385, 2013.

ZHANG, S. H. *et al.* Determination of Bisphenol A, Tetrabromobisphenol A and 4-Tert-Octylphenol in Children and Adults Urine Using High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 44, p. 19-24, 2016.

ZHANG, X. F. *et al.* In Situ Real-Time Tracing of Organophosphorus Pesticides in Apples by Solid-Phase Microextraction with Developed Sampling-Rate Calibration Molecules. **Molecules**, v.24, p. 4444, 2019.

ZHANG, Y. *et al.* Evaluation of the migration of UV-ink photoinitiators from polyethylene food packaging by supercritical fluid chromatography combined with photodiode array detector and tandem mass spectrometry. **Polymer Testing**, v. 53, p. 276-282, 2016.

ZHAO, Q. C.; ANDERSON, J. L. Task-specific microextractions using ionic liquids. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 400, p. 1613-1618, 2011.

ZHOU, Q. *et al.* Temperature-controlled ionic liquid dispersive liquid phase micro-extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1177, p. 43-49, 2008.

ZHOU, Q.; GAO, Y.; XIE, G. Determination of bisphenol A, 4-n-nonylphenol, and 4-tert-octylphenol by temperature-controlled ionic liquid dispersive liquid-phase microextraction combined with high performance liquid chromatography-fluorescence detector. **Talanta**, v. 85, p. 1598-1602, 2011.

ZHOU, T. *et al.* Recent progress of selective adsorbents: From preparation to complex sample pretreatment. **Trac Trends in Analytical Chemistry**, v. 121, p. 115678, 2019.

ZNIDERSIC L.; MLAKAR A; PROSEN H. Development of a SPME-GC-MS/MS method for the determination of some contaminants from food contact material in beverages. **Food and Chemical Toxicology**, v. 134, p. 110829, 2019.

ZOU, Y. *et al.* Determination of estrogens in human urine by high-performance liquid chromatography/diode array detection with ultrasound-assisted cloud-point extraction. **Analytical Biochemistry**, v. 421, n. 2, p. 378-384, 2012.