



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

Heloisa Campos Comelli

**DETERMINAÇÃO DE MONOFTALATOS EM URINA HUMANA EMPREGANDO A
TÉCNICA DE EXTRAÇÃO EM PONTEIRA DESCARTÁVEL (DPX) E HPLC-DAD**

Florianópolis

2020

Heloisa Campos Comelli

**DETERMINAÇÃO DE MONOFTALATOS EM URINA HUMANA EMPREGANDO A
TÉCNICA DE EXTRAÇÃO EM PONTEIRA DESCARTÁVEL (DPX) E HPLC-DAD**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Química da Universidade Federal de Santa Catarina
para a obtenção do título de Mestre em Química.
Área de concentração: 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.

Comelli, Heloisa Campos

Determinação de monoftalatos em urina humana empregando a técnica de extração em ponteira descartável (DPX) e HPLC DAD / Heloisa Campos Comelli ; orientador, Eduardo Carasek da Rocha, 2020.

84 p.

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

Inclui referências.

1. Química. 2. Preparo de amostras. 3. Extração em ponteira descartável. 4. Ftalatos e monoftalatos. 5. Amostras biológicas. I. Rocha, Eduardo Carasek da . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Química. III. Título.

Heloisa Campos Comelli

**DETERMINAÇÃO DE MONOFTALATOS EM URINA HUMANA EMPREGANDO A
TÉCNICA DE EXTRAÇÃO EM PONTEIRA DESCARTÁVEL (DPX) E HPLC-DAD**

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

Prof. Dr. Gustavo Amadeu Micke
Instituição UFSC

Prof. Dr. Josias de Oliveira Merib
Instituição UFCSPA

Prof. Dr. Daniel Lázaro Gallindo Borges
Instituição UFSC

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

Prof. Dr. Marcus César Mandolesi Sá
Coordenador do Programa de Pós-Graduação

Prof. Dr. Eduardo Carasek da Rocha
Orientador

Florianópolis, 2020.

Este trabalho é dedicado à minha família, sobretudo aos meus queridos pais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço principalmente e em primeiro lugar aos meus pais José Ricardo e Mirian por estarem do meu lado em todas minhas decisões, sempre me incentivando a continuar estudando, me dando todo o suporte, amor, carinho e apoio nos momentos difíceis. Eu amo muito vocês e serei sempre grata por tudo que fizeram e ainda fazem por mim.

À toda a minha família, avós Edeli e Cesar, primos, tios, padinhos, por me apoiarem cada um da sua forma e por todo amor que sempre me deram. Em especial aos meus irmãos Beatriz e Cesar Henrique que foram muito prestativos doando uma parte essencial para a realização deste projeto, além de terem me dado força nos momentos difíceis e compartilhado comigo momentos de alegria. Eu amo todos vocês.

Ao Bruno por ter estado do meu lado durante todo o período do mestrado tanto nos momentos bons quanto nos ruins, me dando tranquilidade, apoio e coragem para enfrentar os problemas. À todos os meus amigos que de alguma forma também estiveram me apoiando nesta caminhada, principalmente a Natália, Sara, Graciany, Cleiton e Ana Maria que compartilharam comigo muitos momentos de alegria e também foram um ombro amigo para chorar nos dias tristes. Vocês fazem os meus dias serem melhores e mais leves, vou levar vocês no meu coração pra sempre.

Aos meus colegas do CroMaas, pelas risadas, momentos de descontração e principalmente por toda a ajuda profissional que em alguns momentos também foi pessoal, em especial ao Lucas Morés, Ricardo e Camila, a ajuda de vocês foi essencial para que a realização deste trabalho fosse possível. Lucas, muito obrigada por ter me dado um abraço no momento que eu mais precisei, por ter me ensinado tanto no decorrer desse projeto e pelas correções na dissertação. Camila, que foi praticamente minha coorientadora, eu sou imensamente grata por toda a ajuda, suporte e ensinamentos que tive contigo.

Ao meu orientador, Eduardo Carasek da Rocha, por ter me aceito como aluna em seu laboratório me fornecendo todo o suporte e ensinamentos para a realização deste trabalho.

Aos professores membros da banca examinadora deste trabalho, Gustavo Amadeu Micke, Josias de Oliveira Merib e Daniel Lázaro Gallindo Borges por aceitarem fazer parte da banca e contribuírem com críticas e sugestões a esse projeto.

À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e ao Programa de Pós-graduação pela estrutura, todas as oportunidades e pelo ensino público e de qualidade. Foi na UFSC que eu adquiri toda a minha formação acadêmica superior.

Aos docentes do Departamento de Química da UFSC, por todo conhecimento compartilhado, vocês contribuíram para a minha formação tanto no período de graduação como também nesta fase do mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudos até mesmo no período de pandemia, me permitindo ter dedicação exclusiva ao programa de pós-graduação em química e desenvolver este trabalho.

Aos voluntários que doaram amostras de urina e todas as pessoas que de alguma forma colaboraram e contribuíram na execução deste projeto e estiveram comigo ao longo destes 2 anos.

Muito obrigada a todos!

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo.”

Albert Einstein

RESUMO

Nesse estudo, foi proposto a utilização da técnica de extração em ponteiras descartáveis (DPX) juntamente a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector por arranjo de diodos (HPLC-DAD) para a determinação de monoftalatos, um dos produtos de biotransformação dos ftalatos, em urina humana. Os produtos de biotransformação eleitos como analitos para serem estudados nesse trabalho foram o monometil ftalato (MMP), monobutil ftalato (MBP), monobenzil ftalato (MBzP) e mono-(2-etilhexil) ftalato (MEHP). As ponteiras utilizadas para realizar as extrações desses compostos, adquiridas comercialmente, possuem capacidade de 1 mL e contêm em seu interior 20 mg de material sorvente constituído de estireno-divinilbenzeno (DPX-RP), um material polimérico com características apolares. As otimizações dos principais parâmetros que afetam a eficiência do método proposto foram realizadas através de planejamentos experimentais univariados e multivariados. As amostras de urina foram diluídas a uma razão de 10 vezes em pH 2,0 e submetidas por 5 minutos à centrifugação a 3000 rpm. As condições ótimas do procedimento de extração foram 7 ciclos, cada um com 700 μL de amostra diluída de urina, seguido de uma etapa intermediária de lavagem do extrato composta por 2 ciclos com 300 μL de água ultrapura. Para a etapa de dessorção, a condição ótima foi obtida com 1 ciclo de 225 μL de acetonitrila. O método também passou por uma etapa de validação, no qual foi alcançado um bom desempenho analítico com coeficientes de correlação linear entre 0,9905 para o MMP e 0,9987 para o MBzP. Os limites de detecção (LOD) variaram entre 3,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o MBzP e 7,6 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os demais analitos, enquanto os limites de quantificação (LOQ) variaram entre 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o MBzP e 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os demais analitos. A precisão do método foi verificada por meio dos desvios padrões relativos (RSD%) de ensaios intradia ($n=3$) e interdia ($n=9$), enquanto a exatidão foi averiguada através de ensaios de recuperação relativa em amostras de urina de dois voluntários diferentes. As recuperações relativas variaram de 83% a 108% para a amostra 1 e entre 90% a 120% para amostra 2, a precisão intradia foi de 0,3% a 12,0% e a interdia entre 9,9% e 15,6%. O tempo total necessário para o procedimento de extração é cerca de 5 minutos para cada amostra e a corrida cromatográfica é de 20 minutos, o que pode ser caracterizado como um método rápido e eficiente para análises de monoftalatos em urina humana.

Palavras-chave: Ftalatos, Monoftalatos, Urina humana, DPX, DPX-RP, HPLC-DAD.

ABSTRACT

In this study, it was proposed the use of disposable pipette extraction technique (DPX) with high performance liquid chromatography coupled to a diode array detection (HPLC-DAD) for the determination of monophthalates, one of the phthalate metabolites, in human urine. The phthalate metabolites elected as analytes to be studied in this work were the monomethyl phthalate (MMP), monobutyl phthalate (MBP), monobenzyl phthalate (MBzP) and mono-(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP). The tips used to extract these compounds, commercially acquired, have a capacity of 1 mL and contain 20 mg of sorbent material composed of styrene-divinylbenzene (DPX-RP), a polymeric material with nonpolar characteristics. The optimizations of the main parameters that affect the efficiency of the proposed method were performed through univariate and multivariate experimental designs. The urine samples were diluted 10 times in pH 2,0 and submitted for 5 minutes to centrifugation at 3000 rpm. The optimum conditions of the extraction procedure were 7 cycles, each with 700 μL of diluted urine sample, followed by an intermediate step of clean-up the extract consisting of 2 cycles with 300 μL of ultrapure water. For the desorption step, the optimal condition was obtained with 1 cycle of 225 μL of acetonitrile. The method also went through a validation step, in which a good analytical performance was achieved with linear correlation coefficients between 0,9905 for MMP and 0,9987 for MBzP. The limits of detection (LOD) varied between 3,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ for MBzP and 7,6 $\mu\text{g L}^{-1}$ for the other analytes, while the limits of quantification (LOQ) ranged between 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ for MBzP and 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ for the other analytes. The precision of the method was verified by means of the relative standard deviations (RSD%) of intraday ($n = 3$) and interday ($n = 9$) tests, while the accuracy was verified through relative recovery tests on urine samples from two different volunteers. The relative recoveries ranged from 83% to 108% for sample 1 and between 90% to 120% for sample 2, the intraday precision was from 0,3% to 12,0% and the interday between 9,9% and 15,6%. The total time required for the extraction procedure is about 5 minutes for each sample and the chromatographic run is 20 minutes, which can be characterized as a fast and efficient method for analysis of monophthalates in human urine.

Keywords: Phthalate, Monophthalate, Human urine, DPX,DPX-RP, HPLC-DAD.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Fórmula estrutural geral dos ftalatos, onde R e R' podem ser dois radicais alquil ou um radical alquil e outro aril..... | 23 |
| Figura 2. Esquema de biotransformação (Fase I e II) dos ftalatos no organismo dos seres humanos..... | 26 |
| Figura 3. Ftalatos e seus respectivos produtos de biotransformação selecionados para esse estudo..... | 27 |
| Figura 4. Exemplos de cartuchos para SPE disponíveis comercialmente..... | 34 |
| Figura 5. Etapas envolvidas no preparo de amostra por SPE..... | 35 |
| Figura 6. Esquema da extração manual por DPX..... | 37 |
| Figura 7. Etapas do procedimento de extração utilizando a técnica de DPX..... | 39 |
| Figura 8. Estrutura polimérica do estireno-divinilbenzeno, utilizado como sorvente na ponteira de DPX-RP..... | 41 |
| Figura 9. Cromatograma da separação de uma solução padrão contendo os quatro monoftalatos acompanhados em 210 nm. | 53 |
| Figura 10. Comparativo entre os cromatogramas obtidos após o preparo de amostra por DPX acompanhados em 210 nm: sem nenhum ciclo de lavagem (preto), com 2 ciclos (rosa), 5 ciclos (azul) e 8 ciclos (verde) de lavagem..... | 55 |
| Figura 11. Gráfico de barras resultante da otimização do número de ciclos de lavagem do extrato (*Condições: 3,5 mL de urina ajustada em pH 3,0 e fortificada com 300 µg L ⁻¹ dos analitos, extração com 5 ciclos de 700 µL, lavagem do extrato com 300 µL e dessorção de 5 ciclos com 200 µL de solvente ACN:MeOH 50:50 (v/v)). | 56 |
| Figura 12. Superfície triangular resultante da otimização do solvente de dessorção (*Condições: 3,5 mL de urina ajustada em pH 3,0 e fortificada com 300 µg L ⁻¹ dos analitos, extração com 5 ciclos de 700 µL, lavagem do extrato com 2 ciclos de 300 µL de água ultrapultrapura e dessorção com 5 ciclos de 200 µL de diferentes solventes). | 57 |

| | |
|--|----|
| Figura 13. Superfície resposta resultante da otimização do número de ciclos e volume de solvente na etapa de dessorção (*Condições: 3,5 mL de urina ajustada em pH 3,0 e fortificada com 300 µg L ⁻¹ dos analitos, extração com 5 ciclos de 700 µL, lavagem do extrato com 2 ciclos de 300 µL de água ultrapura e dessorção com número de ciclos e volume de acetonitrila variados). | 59 |
| Figura 14. Gráfico de barras resultante da otimização do volume de solvente de dessorção (*Condições: 3,5 mL de urina ajustada em pH 3,0 e fortificada com 300 µg L ⁻¹ dos analitos, extração com 5 ciclos de 700 µL, lavagem do extrato com 2 ciclos de 300 µL de água ultrapura e dessorção com 1 ciclo de volumes variados de acetonitrila)..... | 60 |
| Figura 15. Superfície resposta resultante da otimização do número de ciclos e volume de amostra na etapa de extração (*Condições: Urina ajustada em pH 3,0 e fortificada com 300 µg L ⁻¹ dos analitos, extração com número de ciclos e volume de amostra variáveis, lava lavagem do extrato com 2 ciclos de 300 µL de água ultrapura e dessorção com 1 ciclo de 225 µL de acetonitrila)..... | 61 |
| Figura 16. Gráfico de barras resultante da otimização do pH da amostra (*Condições: 4,9 mL de urina ajustada com valores variados de pH e fortificada com 300 µg L ⁻¹ dos analitos, extração com 7 ciclos de 700 µL, lavagem do extrato com 2 ciclos de 300 µL de água ultrapura e dessorção com 1 ciclo de 225 µL de acetonitrila)..... | 62 |
| Figura 17. Gráfico resultante da otimização do número de ciclos de limpeza (*Condições: 4,9 mL de urina ajustada em pH 2,0 e fortificada com 300 µg L ⁻¹ dos analitos, extração com 7 ciclos de 700 µL, lavagem do extrato com 2 ciclos de 300 µL de água ultrapura e de dessorção com 1 ciclo de 225 µL de acetonitrila). | 63 |
| Figura 18. Gráfico de barras resultante da otimização da diluição da urina (*Condições: 4,9 mL de urina ajustada em pH 2,0 e fortificada com 300 µg L ⁻¹ dos analitos, extração com 7 ciclos de 700 µL, lavagem do extrato com 2 ciclos de 300 µL de água ultrapura e de dessorção com 1 ciclo de 225 µL de acetonitrila). | 64 |
| Figura 19. Gráfico de Lenth obtido para análise da robustez do método. (*Fatores: A/a: Volume de urina; B/b: pH da amostra; C/c: Volume de amostra; D/d: Ciclos de extração; E/e: Ciclos de lavagem; F/f: Volume de solvente; G/g: Ciclos de dessorção). | 69 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Estrutura molecular e algumas propriedades físico-químicas dos analitos estudados nesse trabalho. | 28 |
| Tabela 2. Ponteiras de DPX contendo diferentes fases extratoras disponíveis comercialmente com suas respectivas aplicações. | 40 |
| Tabela 3. Trabalhos reportados na literatura utilizando a técnica de DPX no preparo de amostra. | 42 |
| Tabela 4. Gradiente otimizado para realizar a separação cromatográfica dos quatro monoftalatos estudados. | 46 |
| Tabela 5. Razão entre os solventes de dessorção para o planejamento de superfície triangular (pontos 5, 7 e 9 como centrais). | 48 |
| Tabela 6. Planejamento Doehlert para otimização do número de ciclos e volume de solvente da etapa de dessorção (pontos 3, 6 e 9 centrais). | 48 |
| Tabela 7. Planejamento Doehlert para otimização do número de ciclos e volume de amostra da etapa de extração (pontos 3, 6 e 9 centrais). | 49 |
| Tabela 8. Relação entre as condições nominais e variações dos parâmetros analisados para realização do teste de Youden. | 51 |
| Tabela 9. Combinação entre os parâmetros na condição nominal e na variação selecionada. | 52 |
| Tabela 10. Amostras analisadas fornecidas por doadores em anonimato. | 52 |
| Tabela 11. Tempos de retenção dos analitos obtidos na separação cromatográfica monitorada em 210nm. | 54 |
| Tabela 12. Limites de detecção e quantificação, faixa linear de trabalho, coeficiente de correlação e as equações lineares das curvas de calibração para os 4 analitos. | 66 |

| | |
|---|----|
| Tabela 13. Resultados obtidos através de ensaios de recuperação para a avaliação da exatidão e precisões intradia e interdia do método desenvolvido. | 67 |
| Tabela 14. Resultados obtidos nas análises de urina humana utilizando o método proposto (*ND: não detectado; < LOQ: inferior ao limite de quantificação). | 70 |
| Tabela 15. Comparação entre o método proposto e outros previamente reportados na literatura. Todos os estudos utilizaram urina como amostra. | 72 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN – Acetonitrila, do inglês Acetonitrile.

ANSDM – Microextração dupla com solvente não orgânico aprimorada por NH_4PF_6 , do inglês NH_4PF_6 -enhanced, nonorganic solvent, dual microextraction.

AOAC – Associação de Químicos Analíticos Oficiais, do inglês Association of Official Analytical Chemists.

BBzP – Butil benzil ftalato, do inglês Butyl benzyl phthalate.

C18 – Octadecilsilano, do inglês Octadecylsilane.

DAD – Detector por arranjo de diodos, do inglês Diode array detector.

DBP – Dibutil ftalato, do inglês Dibutyl phthalate.

DEHP – Di-(2-etilhexil) ftalato, do inglês Di-(2-ethylhexyl) phthalate.

DEP – Dietil ftalato, do inglês Diethyl phthalate.

DPX – Extração em ponteira descartável, do inglês Disposable pipette extraction.

DPX-RP – Extração em ponteira descartável com fase reversa, do inglês Reverse phase disposable pipette extraction.

DPX-CX – Extração em ponteira descartável com fase de troca catiônica, do inglês Cationic change disposable pipette extraction.

DPX-WAX – Extração em ponteira descartável com fase de troca aniônica, do inglês Anionic change disposable pipette extraction.

DPX-WCX – Extração em ponteira descartável com fase de troca catiônica, do inglês Cationic change disposable pipette extraction.

DPX-Si – Extração em ponteira descartável com fase de silício, do inglês Silicon phase disposable pipette extraction.

DPX-SC – Extração em ponteira descartável vazia, do inglês Empty disposable pipette extraction.

DPX-Blank – Extração em ponteira descartável branca, do inglês Blank disposable pipette extraction.

D-SPE – Extração em fase sólida dispersiva, do inglês Dispersive solid phase extraction.

EPA – Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, do inglês United States Environmental Protection Agency.

GC-ECD – Cromatografia gasosa com detector por captura de elétrons, do inglês Gas chromatographic with electron capture detector.

GC-FID – Cromatografia gasosa com detector por ionização de chama, do inglês Gas chromatography with flame ionization detector.

GC-MS – Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, do inglês Gas chromatography – mass spectrometry.

GC-MS/MS – Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas em tandem, do inglês Gas chromatography – mass spectrometry/mass spectrometry.

HCl – Ácido clorídrico, do inglês Chloridric acid.

HF-LPME – Microextração em fase líquida suportada com fibra oca, do inglês Hallow fiber liquid-phase microextraction.

HPLC-DAD – Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos, do inglês High performance liquid chromatography with diode array detection.

HPLC-FLD – Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência, do inglês High performance liquid chromatography with fluorescence detection.

IL-DLLME – Microextração líquido-líquido dispersiva baseada em líquidos iônicos, do inglês Ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction.

In-syringe DLLME – Microextração líquido-líquido dispersiva em seringa, do inglês In-syringe dispersive liquid-liquid microextraction.

LC-MS/MS – Cromatografia líquida-espectrometria de massa em tandem, do inglês Liquid chromatography-tandem mass spectrometry.

LC-UV – Cromatografia líquida com detecção ultravioleta, do inglês Liquid chromatography with ultraviolet detection.

LLE – Extração líquido-líquido, do inglês Liquid-liquid extraction.

LOD – Limite de detecção, do inglês Limit of detection.

LOQ – Limite de quantificação, do inglês Limit of quantification.

MBP – Monobutil ftalato, do inglês Monobutyl phthalate.

MBzP – Monobenzil ftalato, do inglês Monobenzyl phthalate.

ME – Margem de erro, do inglês *Margin of error*.

MEHP – Mono-(2-etilhexil) ftalato, do inglês Mono-(2-ethylhexyl) phthalate.

MeOH – Metanol, do inglês Methanol.

MMP – Monometil ftalato, do inglês Monomethyl phthalate.

NaOH – Hidróxido de sódio, do inglês Sodium hydroxide.

OSPAR – Convenção de Oslo e Paris, do inglês Oslo and Paris Convention.

PVC – Policloreto de vinila, do inglês polyvinyl chloride.

QuEChERS – Rápido, Fácil, Barato, Efetivo, Robusto, Seguro, do inglês Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe.

R – Coeficiente de correlação linear, do inglês Linear correlation coefficient.

R² – Coeficiente de determinação, do inglês Coefficient of determination.

RP – Fase Reversa, do inglês Reverse Phase.

RSD – Desvio Padrão Relativo, do inglês Relative Standard Deviation.

SME – Margem de erro simultânea, do inglês *Simultaneous margin of error*.

SPE – Extração em fase sólida, do inglês Solid phase extraction.

WWF – Fundo Mundial da Natureza, do inglês World Wildlife Fund.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 19 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 21 |
| 2.1 Contaminantes emergentes..... | 21 |
| 2.1.1 Ftalatos..... | 23 |
| 2.2 Preparo de amostras biológicas..... | 30 |
| 2.3 Extração em ponteira descartável..... | 36 |
| 3 OBJETIVOS..... | 44 |
| 3.1 Objetivo geral | 44 |
| 3.2 Objetivos específicos..... | 44 |
| 4 MATERIAIS E MÉTODOS | 45 |
| 4.1 Materiais e reagentes..... | 45 |
| 4.2 Amostras de urina | 45 |
| 4.3 Instrumentação cromatográfica..... | 46 |
| 4.4 Otimizações da técnica de extração em ponteiras descartáveis | 47 |
| 4.4.1 Condições fixadas inicialmente..... | 47 |
| 4.4.2 Otimização do número de ciclos de lavagem do extrato | 47 |
| 4.4.3 Otimização do solvente de dessorção | 47 |
| 4.4.4 Otimização do número de ciclos e volume de solvente de dessorção | 48 |
| 4.4.5 Otimização do número de ciclos e volume de amostra na etapa de extração | 49 |
| 4.4.6 Otimização do pH da amostra | 49 |
| 4.4.7 Otimização da etapa de limpeza | 50 |
| 4.4.8 Otimização do grau de diluição da amostra..... | 50 |
| 4.5 Validação do método desenvolvido | 50 |
| 4.5.1 Parâmetros analíticos de mérito..... | 50 |
| 4.5.2 Teste de robustez..... | 51 |
| 4.6 Aplicação do método proposto | 52 |

| | |
|--|-----------|
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES..... | 53 |
| 5.1 Separação cromatográfica | 53 |
| 5.2 Otimizações da técnica de extração em ponteiras descartáveis | 54 |
| 5.2.1 Otimização do número de ciclos de lavagem do extrato | 54 |
| 5.2.2 Otimização do solvente de dessorção | 56 |
| 5.2.3 Otimização do número de ciclos e volume de solvente de dessorção | 58 |
| 5.2.4 Otimização do número de ciclos e volume de amostra na etapa de extração | 60 |
| 5.2.5 Otimização do pH da amostra | 62 |
| 5.2.6 Otimização da etapa de limpeza | 63 |
| 5.2.7 Otimização do grau de diluição da amostra | 64 |
| 5.2.8 Condições otimizadas da técnica de extração em ponteiras descartáveis | 65 |
| 5.3 Validação do método desenvolvido | 65 |
| 5.3.1 Parâmetros analíticos de mérito | 65 |
| 5.3.2 Teste de robustez..... | 68 |
| 5.4 Aplicação do método proposto | 70 |
| 5.5 Comparação do método proposto com outros métodos reportados na literatura..... | 70 |
| 6 CONCLUSÃO..... | 73 |
| 7 REFERÊNCIAS..... | 74 |
| | |
| APÊNDICE A – Tabela ANOVA referente à otimização do número de ciclos e volume de solvente na etapa de dessorção. | 84 |
| | |
| APÊNDICE B – Gráfico dos valores previstos vs. observados referente à otimização do número de ciclos e volume de solvente na etapa de dessorção. | 84 |
| | |
| APÊNDICE C – Tabela ANOVA referente à otimização do número de ciclos e volume de amostra na etapa de extração. | 85 |
| | |
| APÊNDICE D – Gráfico dos valores previstos vs. observados referente à otimização do número de ciclos e volume de amostra na etapa de extração. | 85 |

1 INTRODUÇÃO

Contaminantes emergentes podem ser definidos como uma gama de substâncias presente no ambiente em sua maioria por ação antrópica que desempenham uma potencial ou real ameaça para a saúde ou o próprio ambiente, porém, não se encontram incluídos em programas de monitoramento de rotina ou possuem uma legislação específica para seu controle (SIDDIQUE; KUBWABO; HARRIS, 2016). Essa classe de substâncias pode ser advinda de uma série de fontes como medicamentos, produtos cosméticos, conservantes de alimentos, tintas, e entrar em contato com os seres humanos por diversas vias como contato dérmico, ingestão direta, além de forma indireta pelo contato com água ou ar contaminados (MONTAGNER; VIDAL; ACAYABA, 2017).

Por conta da falta de elucidação a respeito dos riscos que essas substâncias promovem e a frequente exposição dos seres vivos aos contaminantes emergentes a demanda de seu estudo e análise vem crescendo com o passar do tempo (GOULART, 2017). Nesse cenário surgiu a descoberta de que uma série de contaminantes emergentes possuíam em comum sua atuação como desreguladores endócrinos, além de estudos que demonstram uma atividade carcinogênica e mutagênica por parte desses compostos, podendo desencadear doenças como o câncer de mama (SIDDIQUE; KUBWABO; HARRIS, 2016).

Diante desse fato, existe um interesse no desenvolvimento de métodos capazes de detectar, identificar e quantificar a presença de desreguladores endócrinos como ftalatos em matrizes biológicas para possibilitar o monitoramento e elucidar a ação desses compostos no corpo humano.

Os ftalatos quando absorvidos pelo corpo humano são biotransformados em seu monoésteres correspondente, também conhecidos como monoftalatos, passando a estar presentes em diferentes matrizes como sangue, urina, saliva ou até mesmo leite materno, tornando possível a análise e detecção desses analitos a partir dessas amostras biológicas (GUO; WU; KANNAN, 2011).

A urina demonstra-se uma boa matriz biológica para análise, pois é coletada de forma não invasiva e está disponível em grandes volumes. Porém, por se tratar de uma matriz complexa, a urina possui muitos interferentes que prejudicam a realização de análise direta para detecção de compostos presentes no meio. Sendo assim, uma etapa de preparo de amostra, anterior à etapa de análise, torna-se necessária. Essa etapa, além de possibilitar uma

limpeza da amostra, evitando o desenvolvimento de danos ao instrumento analítico utilizado, também isola o analito, deixando-o livre de interferentes para as etapas subsequentes.

Com o objetivo de desenvolver um método baseado em preparo de amostra que seja aliado a química verde, oferecendo menos riscos ao meio ambiente e produção de resíduos, a extração em ponteira descartável (DPX, do inglês *Disposable pipette extraction*) demonstra-se uma técnica vantajosa devido à utilização de pouco solvente orgânico. Desse modo, propõe-se o uso da técnica de DPX juntamente com um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de díodos (HPLC-DAD) no desenvolvimento de um método analítico capaz de detectar e quantificar os níveis de quatro monoftalatos, sendo esses os monometil ftalato (MMP), monobutil ftalato (MBP), monobenzil ftalato (MBzP) e mono-(2-etilhexil) ftalato (MEHP), em amostras de urina humana.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Contaminantes emergentes

O desenvolvimento científico ocorrido nas últimas décadas, possibilitado majoritariamente pelos avanços no campo da química sintética, provocou um impacto significativo nas atividades humanas e no estilo de vida da população. Porém, ocasionou também, um aumento exponencial no surgimento de novos produtos farmacêuticos, de cuidados pessoais e domésticos (NAWAZ; SENGUPTA, 2019). Segundo o Fundo Mundial da Natureza (WWF, do inglês *World Wildlife Fund*), entre 1930 e 2000, a produção global de produtos químicos sintéticos aumentou de 1 milhão para 400 milhões de toneladas por ano, e apesar de alguns desses produtos químicos trazerem benefícios significativos para a sociedade, outras substâncias sintéticas estão prejudicando tanto a vida selvagem quanto a da população, não existindo ainda conhecimento suficiente sobre seus efeitos em termo de um longo prazo (WWF, 2020).

Como resultado desse crescimento dos produtos químicos sintéticos, uma variedade de compostos químicos que anteriormente não eram detectados e, portanto, não possuem regulamentação específica, passaram a disseminar-se no meio ambiente e atingir os recursos hídricos através do fluxo de resíduos industriais e domésticos (NAWAZ; SENGUPTA, 2019; A.; LIMA, 2018). Esses produtos químicos em questão incluem uma gama de compostos variados empregados para diversos fins, como plastificantes, produtos farmacêuticos e de cuidados pessoais, drogas de abuso, esteróides e hormônios naturais ou sintéticos, pesticidas, surfactantes, dentre outros compostos químicos que são denominados pela comunidade científica como contaminantes de interesse emergente (LA FARRÉ *et al.*, 2008; A.; LIMA, 2018; MARTÍN-POZO *et al.*, 2019).

Contaminantes emergentes são definidos como quaisquer produtos químicos sintéticos ou de origem natural, ou até mesmo microorganismos que não estão incluídos nos programas de monitoramento ambiental, porém, possuem um potencial de difundirem-se e prejudicarem o meio ambiente, provocando efeitos adversos conhecidos ou suspeitos, tanto ecológicos quanto para saúde humana (ROSENFELD; FENG, 2011). Em longo prazo, uma substância é classificada como contaminante emergente baseando-se em três critérios: a persistência da substância em questão no meio ambiente, ou seja, sua estabilidade química, que resulta em um tempo de meia-vida longo; sua lipofilicidade, ocasionando uma bioconcentração e possível biomagnificação na cadeia alimentar; e os efeitos potencialmente

nocivos no âmbito ecotoxicológico ou humano desse composto (SMITAL, 2008; NAWAZ; SENGUPTA, 2019).

A principal ameaça dessa classe de substâncias reside no fato de que não há um estudo completo a respeito da toxicologia ambiental e humana da maior parte desses compostos. Existe ainda a questão de que muitos contaminantes emergentes não são, ou até mesmo, não existe a possibilidade de serem detectados em sistemas municipais de água. Ressalta-se ainda que, a passagem desses contaminantes por sistemas de tratamento de água potável, possivelmente ocasionam a geração de subprodutos cujas propriedades químicas ainda não foram determinadas, sendo essa falta de conhecimento um perigo iminente (ROSENFELD; FENG, 2011). Além disso, a remoção completa não pode ser assegurada pelos métodos de tratamento biológicos empregados atualmente em estações de tratamento de esgoto (LA CRUZ *et al.*, 2012).

Todos os fatores mencionados favorecem a entrada desses contaminantes nos ambientes aquáticos, e dependendo de suas propriedades físico-químicas ou se os mesmos estão disponíveis em sua forma original ou metabolizada, esses compostos podem estar presentes em sua forma livre, dissolvidos em meio aquoso, ou ainda ligados à matéria orgânica particulada em suspensão, além de apresentarem capacidade de bioacumular em animais marinhos que posteriormente podem ser consumidos pelo ser humano (INOSTROZA *et al.*, 2017; TLILI *et al.*, 2012; NEFF *et al.*, 1984). Essa exposição dos contaminantes emergentes no ambiente aquático pode causar efeitos adversos na fertilidade, reprodução e até mesmo na própria sobrevivência dos organismos aquáticos, e, portanto, podem afetar populações e ecossistemas (BOLONG *et al.*, 2009; INOSTROZA *et al.*, 2017).

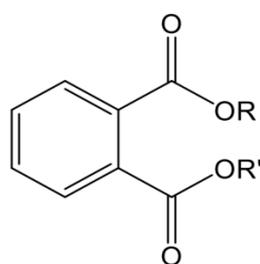
No caso do ser humano, a principal via de exposição aos contaminantes emergentes ocorre a partir da ingestão de alimentos ou bebidas contaminados ocasionando bioacumulação e biomagnificação (BOLONG *et al.*, 2009). Além dos animais marinhos que podem ser fonte de alimento, esses contaminantes também foram encontrados em água de irrigação para culturas e posteriormente, nas próprias plantas alimentícias (A.; LIMA, 2018). Em termos de saúde humana os contaminantes emergentes tendem a afetar principalmente o sistema endócrino desregulando a produção hormonal, fato que ocasiona distúrbios nos sistemas reprodutor, neurológico e imunológico, doenças cardiovasculares e até mesmo o desenvolvimento de câncer (BARRIOS-ESTRADA *et al.*, 2018; SMITAL, 2008; BILA *et al.*, 2007; BOLONG *et al.*, 2009).

Sendo assim, ressalta-se que os contaminantes emergentes são compostos potencialmente perigosos, mesmo em níveis muito baixos de concentração, devido a dois fatores que são a grande influência que eles desempenham sobre órgãos vivos e sua alta persistência ambiental. Por esse motivo, a investigação sobre os contaminantes emergentes está em expansão e é incentivada, tanto pela necessidade de progresso em encontrar o método apropriado para o tratamento de águas residuais e desenvolvimento de métodos analíticos para o monitoramento ambiental dessa classe de substâncias, bem como pela grande atenção que a questão da desregulação endócrina tem recebido desde as últimas décadas (A.; LIMA, 2018; BOLONG *et al.*, 2009).

2.1.1 Ftalatos

Uma classe de analitos pertencentes ao grupo dos contaminantes emergentes são os ftalatos, também denominados de ésteres do ácido ftálico (ácido 1,2-benzenodicarboxílico). A estrutura molecular geral dos ftalatos, representada na Figura 1, consiste em um anel benzênico com dois grupos ésteres que podem ou não ser iguais (FARAHANI *et al.*, 2016). Seus meta-isômeros são nomeados de isoftalatos, os para-isômeros denominados de tereftalatos, enquanto os orto-isômeros são conhecidos pela nomenclatura genérica de ftalatos (LIANG *et al.*, 2008).

Figura 1. Fórmula estrutural geral dos ftalatos, onde R e R' podem ser dois radicais alquil ou um radical alquil e outro aril.



Fonte: FARAHANI *et al.* (2016).

Os ftalatos são amplamente utilizados como plastificantes, com o intuito de melhorar a flexibilidade, transparência, durabilidade e longevidade de polímeros rígidos durante a produção comercial de itens plásticos, podendo em alguns casos chegar a representar até 50% do peso total do item (LAMPEN *et al.*, 2003; FARAHANI *et al.*, 2016; PEIJNENBURG,

2008). O mais utilizado para essa finalidade é o di-(2-etilhexil) ftalato (DEHP), o principal plastificante usado na produção de PVC (policloreto de vinila) por conta do seu baixo custo (GUO; WU; KANNAN, 2011).

Apesar de 90% da produção mundial de ftalatos ser empregada como plastificantes, essa classe de compostos, principalmente os de baixo peso molecular, também são amplamente utilizados nos setores de produtos cosméticos e de cuidados pessoais, onde são aplicados como intensificadores de penetração na pele, agentes antiespumantes, dispersantes, emulsificantes, emolientes, umectantes e solventes para manter a cor e o perfume em vários produtos consumíveis, como é o caso do dietilftalato (DEP), dibutil ftalato (DBP) e do butilbenzil ftalato (BBzP) (PEIJNENBURG, 2008; SIDDIQUE; KUBWABO; HARRIS, 2016; FARAHANI *et al.*, 2016; GUO; WU; KANNAN, 2011; KOO; LEE, 2004). Além dessas aplicações, propriedades dos ftalatos como os seus baixos pontos de fusão e altos pontos de ebulição também os tornam compostos muito úteis como fluidos de transferência de calor (PEIJNENBURG, 2008).

Estima-se que, desde que foram introduzidos no mercado, há quase 75 anos, a produção mundial de ftalatos é de 3,5 milhões de toneladas/ano e atualmente, mais de 80% de todos os plastificantes são ftalatos (SIDDIQUE; KUBWABO; HARRIS, 2016). Dessa forma, devido à sua ampla aplicabilidade e volume de produção, os ftalatos podem ser encontrados em diversos produtos tais como tintas, roupas impermeáveis, perfumes, esmaltes de unha, desodorantes, cremes hidratantes, no recobrimento de medicamentos, em brinquedos infantis, equipamentos médicos e até mesmo na embalagem de alguns produtos alimentícios (PEIJNENBURG, 2008; BILA *et al.*, 2007; LAMPEN *et al.*, 2003; KOO; LEE, 2004; ESTILL *et al.*, 2019).

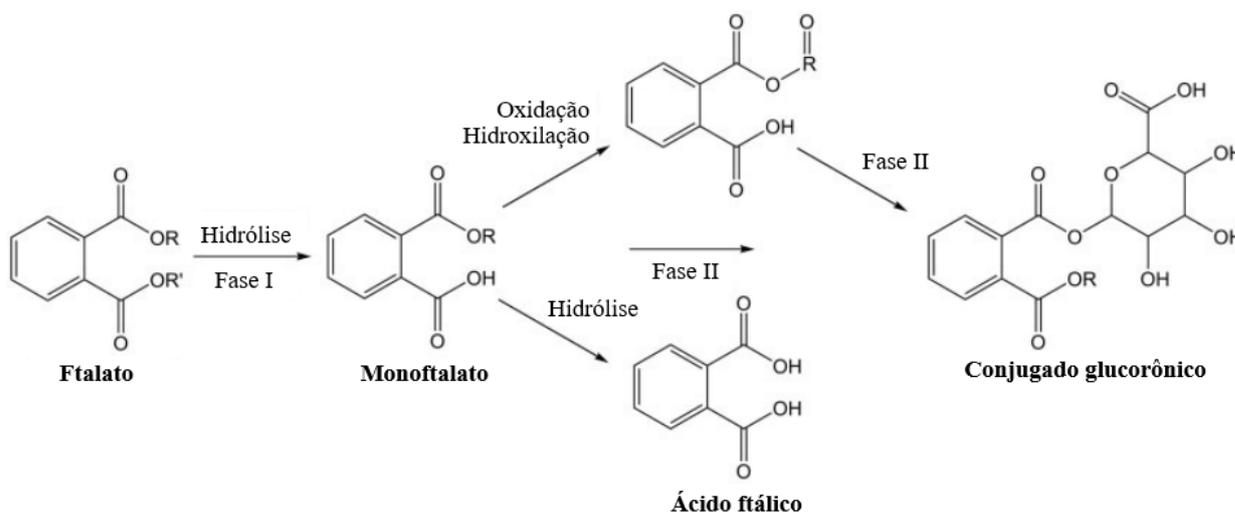
No caso da utilização dessa classe de compostos como plastificantes é comum facilmente ocorrer sua lixiviação, como no caso de embalagens de alimentos em que se observa a migração dos ftalatos para o alimento contido no interior da embalagem, ou ainda, é possível ocorrer a evaporação desses ftalatos para o ar ambiente. Essas formas de liberação destes compostos das superfícies poliméricas ocorrem pelo fato de que a maioria não está quimicamente ligada ao polímero, sendo mais provável especialmente sob condições de alta exposição superficial e temperaturas quentes, como no caso de materiais de construção externos, nos quais podem se difundir no ar, apesar da pressão de vapor bastante baixa (SIDDIQUE; KUBWABO; HARRIS, 2016; LAMPEN *et al.*, 2003; PEIJNENBURG, 2008).

Embora várias forças atrativas mantenham os ftalatos firmemente dentro da matriz polimérica, para que a migração ocorra a uma taxa baixa, as organizações de alguns países, como os membros da União Européia, preocupam-se com possíveis efeitos adversos em bebês, e proibiram a utilização dessa classe de compostos em produtos para crianças (PEIJNENBURG, 2008). Isso porque estudos científicos investigam a hipótese de que alguns produtos contendo ftalatos podem afetar a saúde se colocados na boca por crianças muito pequenas, embora alguns autores considerem que os riscos associados à exposição oral em produtos infantis não foram confirmados (BILA *et al.*, 2007).

Desse modo, evidencia-se que os ftalatos podem atingir o meio ambiente de diversas formas como no caso de perdas durante os processos de fabricação, sendo por emissões atmosféricas, efluentes da água, resíduos sólidos e lixiação dos produtos finais, conforme mencionado anteriormente, fazendo com que essas substâncias já tenham sido encontradas em diversas amostras como chorume de aterros sanitários, poeira de residências, águas superficiais e de subsolo, lodo de esgoto, sedimentos e diversos alimentos, considerando-se um dos principais contaminantes ambientais de água, alimentos e solo (BILA *et al.*, 2007; PEIJNENBURG, 2008; LAMPEN *et al.*, 2003).

A ingestão de água e alimentos contaminados é considerada uma das principais fontes de exposição do ser humano aos ftalatos, porém, ela também pode ocorrer por inalação e exposição cutânea, perdurando durante toda a vida do indivíduo (PEIJNENBURG, 2008). Quando absorvidos pelo organismo humano, seja por qualquer uma das formas citadas, os ftalatos são rapidamente hidrolisados em seus respectivos monoésteres, também conhecidos como monoftalatos, em uma etapa denominada biotransformação de fase I. Essa reação de hidrólise para a geração do monoéster de ftalato é catalisada por lipases encontradas principalmente na saliva e no intestino, consistindo basicamente na conversão de um dos grupos éster presente na molécula para um ácido carboxílico. Esses monoftalatos formados podem também ser sequencialmente modificados via oxidação, hidroxilação ou hidrólise, gerando produtos oxidativos e ácido ftálico. Alguns desses monoftalatos e produtos oxidativos podem ainda sofrer uma biotransformação de fase II, na qual reagindo com o ácido glucurônico formam-se seus respectivos conjugados glucurônicos. Todas essas etapas de biotransformação estão representadas na Figura 2 (SIDDIQUE; KUBWABO; HARRIS, 2016; VANDENTORREN *et al.*, 2011; WARNER *et al.*, 2019).

Figura 2. Esquema de biotransformação (Fase I e II) dos ftalatos no organismo dos seres humanos.



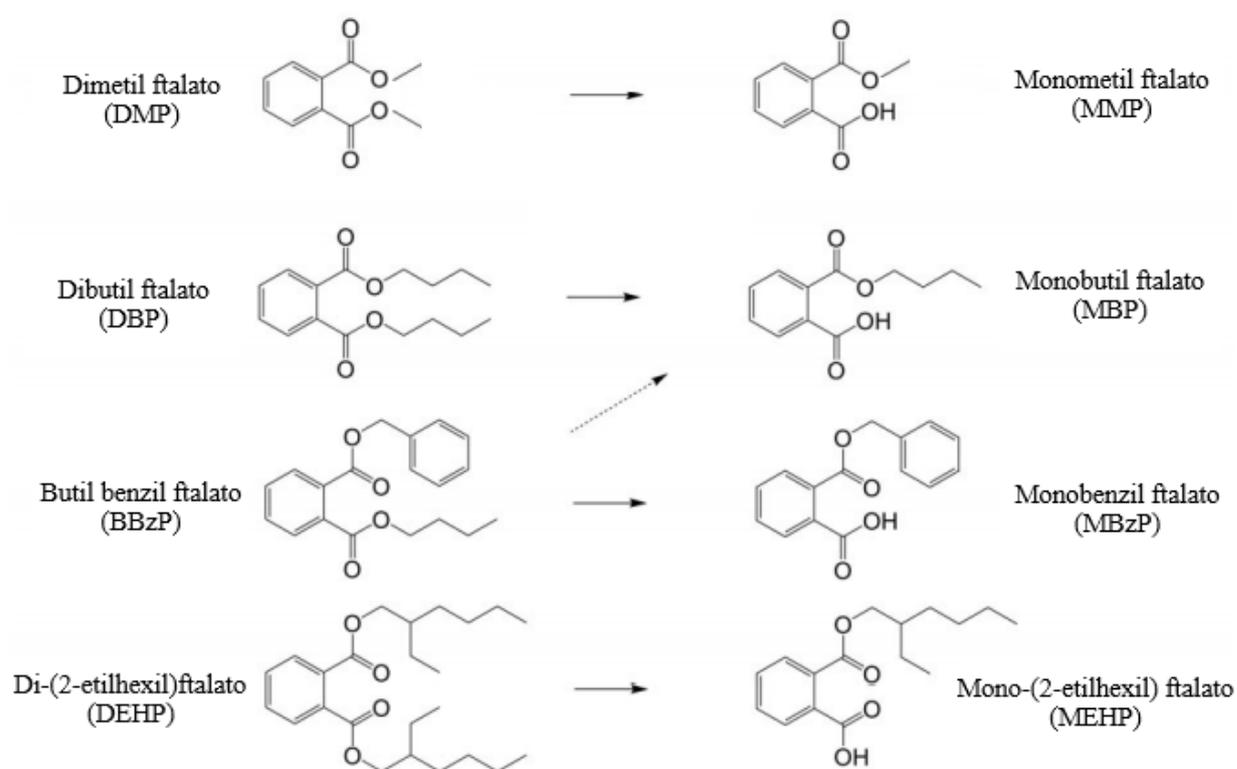
Fonte: Adaptado de WARNER *et al.* (2019).

Normalmente, essa primeira fase do metabolismo dos ftalatos seria uma forma de desintoxicação do corpo humano, porém, estudos *in vitro* e *in vivo* demonstram que os ftalatos tornam-se mais biologicamente ativos quando hidrolisados em seus respectivos monoftalatos, sendo esses os principais responsáveis por causar efeitos tóxicos (FREDERIKSEN; SKAKKEBAEK; ANDERSSON, 2007; WARNER *et al.*, 2019). Além de essa reação ocorrer facilmente no corpo humano, os ftalatos também são hidrolisados em monoftalatos no meio ambiente, aumentando a exposição aos seus produtos de biotransformação mais tóxicos e apesar de possuírem vida curta em sistemas biológicos, sua onipresença em diversos produtos de consumo e matrizes ambientais provocam diariamente uma exposição constante e inevitável a esses compostos através de múltiplas fontes (WARNER *et al.*, 2019; BILA *et al.*, 2007).

Desse modo, uma boa forma de se realizar o monitoramento da exposição aos ftalatos é através do rastreamento de seus produtos de biotransformação biologicamente mais ativos, ou seja, seus respectivos monoftalatos. Para esse estudos foram selecionados quatro analitos utilizados como biomarcadores dos principais ftalatos empregados na indústria atualmente, sendo esses, o monometil ftalato (MMP) que é um marcador da exposição ao dimetil ftalato (DMP), o monobutil ftalato (MBP) que é um marcador tanto da exposição humana ao dibutil ftalato (DBP) quanto ao butil benzil ftalato (BBzP), o monobenzil ftalato (MBzP) que é um segundo marcador da exposição ao BBzP e o mono-(2-etilhexil) ftalato

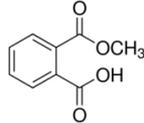
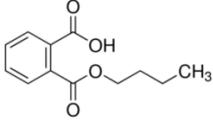
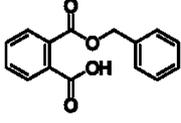
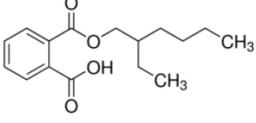
(MEHP) é um marcador da exposição ao di-(2-etilhexil) ftalato (DEHP), conforme demonstrado na Figura 3 (JÖNSSON *et al.*,2005; WARNER *et al.*, 2019). Algumas as propriedades dos analitos selecionados nesse estudo, juntamente com suas respectivas estruturas moleculares, estão contidas na Tabela 1, destacando-se o caráter ácido e a baixa polaridade dos monoftalatos selecionados.

Figura 3. Ftalatos e seus respectivos produtos de biotransformação selecionados para esse estudo.



Fonte: Adaptado de WARNER *et al.* (2019).

Tabela 1. Estrutura molecular e algumas propriedades físico-químicas dos analitos estudados nesse trabalho.

| Analito | Nomenclatura IUPAC | Estrutura molecular | pKa | Log P | Referência |
|-----------------------------------|---|--|------|-------|-------------------|
| Monometil ftalato (MMP) | Ácido 2-(metoxicarbonil) benzoico |  | 3,08 | 1,13 | CHEMSPIDER, 2019 |
| Monobutil ftalato (MBP) | Ácido 2-(butoxicarbonil) benzoico |  | 3,08 | 2,96 | CHEMICALIZE, 2019 |
| Monobenzil ftalato (MBzP) | Ácido 2-(benziloxycarbonil) benzoico |  | 3,08 | 3,36 | CHEMICALIZE, 2019 |
| Mono-(2-etilhexil) ftalato (MEHP) | Ácido 2-(2-etilhexoxicarbonil) benzoico |  | 3,08 | 4,66 | CHEMICALIZE, 2019 |

Estudos indicam que a toxicidade dos ftalatos está relacionada com a manifestação de efeitos estrogênicos ou antiandrogênicos, também chamados de desreguladores endócrinos (JÖNSSON *et al.*, 2005). A desregulação endócrina pode ocorrer pelo aumento ou diminuição da produção de alguns hormônios, interferindo na sinalização hormonal para tecidos saudáveis ou ainda quando a substância em questão perturba o sistema endócrino seja imitando, bloqueando ou interferindo na função do hormônio (BARRIOS-ESTRADA *et al.*, 2018; BOLONG *et al.*, 2009; VANDENTORREN *et al.*, 2011).

Apesar dos ftalatos apresentarem menor potência na atividade carcinogênica que os estrogênios endógenos, essas substâncias são alvo de preocupação em virtude de apresentarem persistência no ambiente, resistirem à degradação química ou enzimática e apresentarem capacidade de acumular em tecidos adiposos. Devido a esses fatores, o papel dos ftalatos no desenvolvimento de cânceres dependentes de hormônios esteróides, como é o caso do câncer de mama, devem ser considerados (SIDDIQUE; KUBWABO; HARRIS, 2016; BILA *et al.*, 2007).

Pesquisas realizadas em animais demonstraram que a exposição ao dibutil ftalato (DBP), butil benzil ftalato (BBzP) e di-(2-etilhexil) ftalato (DEHP) durante o período gestacional, lactacional ou puberatal provoca toxicidade testicular, além de dados sugerirem que a exposição de ratos adultos a BBzP e DBP ser a causadora de anormalidades hormonais reprodutivas, atrofia testicular e redução da produção de espermatozóides (JÖNSSON *et al.*, 2005). Alguns ftalatos, especialmente DBP, foram identificados também como sendo tóxicos para algumas plantas em áreas de ventilação restrita (PEIJNENBURG, 2008).

Esses estudos *in vivo* indicam que os ftalatos são substâncias cancerígenas para animais e podem causar efeitos como morte fetal, malformações, lesão testicular, lesão hepática e principalmente, toxicidade reprodutiva em animais de laboratório, demonstrando que a exposição a esses compostos pode causar toxicidade tanto no período de desenvolvimento do indivíduo quanto na reprodução, incluindo efeitos como diabetes e disfunção sexual. Reporta-se ainda que a exposição durante o desenvolvimento do feto e nos primeiros anos de infância parece ser o período de maior sensibilidade aos efeitos nocivos dos ftalatos (PEIJNENBURG, 2008; VANDENTORREN *et al.*, 2011).

Com base em ensaios e estudos realizados *in vitro* e *in vivo* é possível concluir que a exposição do ser humano aos ftalatos possivelmente aumenta o risco de incidência de câncer de mama, próstata e testicular, além de alguns defeitos dos órgãos reprodutivos masculinos, dentre outros sintomas, além do fato de que esses riscos agravam-se com ingestão contínua dessas substâncias (SIDDIQUE; KUBWABO; HARRIS, 2016; JÖNSSON *et al.*, 2005; FARAHANI *et al.*, 2016). Tendo em vista essa toxicidade iminente dos ftalatos, várias agências, como a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA), os classificaram como poluentes prioritários (FARAHANI *et al.*, 2016). Segundo as legislações dos Estados Unidos, três ftalatos, o DBP, BBzP e DEHP, estão inseridos na Lista Prioritária de Substâncias Perigosas de 2005 e o DMP, DBP, e DEHP estão incluídos na lista de 188 poluentes perigosos do ar (EPA, 2007). A Convenção de Oslo e Paris para proteção do meio marinho no Atlântico Nordeste (OSPAR) também incluiu o DBP e o DEHP na lista de produtos químicos prioritários de interesse (PEIJNENBURG, 2008).

Ainda de acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) o valor limite preventivo de dose referência de ftalatos é de 20 mg/Kg de peso corporal por dia, enquanto, segundo a União Européia a ingestão diária tolerável é de 37 mg/Kg de peso corporal (PEIJNENBURG, 2008). Baseando-se nesses níveis de tolerância e o fato de que a exposição humana a essa classe de substâncias ocorre de forma constante e

diária, o desenvolvimento de métodos para monitoramento da exposição aos ftalatos torna-se importante, podendo ser realizado através da análise de diversas amostras biológicas como saliva, urina ou o próprio sangue. Devido ao fato dos ftalatos sofrerem hidrólise no organismo humano, gerando seus respectivos monoftalatos biologicamente mais ativos e rapidamente excretados dessa forma na urina, esse fluido corporal demonstra-se uma boa alternativa de amostra adequada para realizar-se a avaliação de exposição a esses compostos (VANDENTORREN *et al.*, 2011).

2.2 Preparo de amostras biológicas

A utilização de urina em análises toxicológicas e de exposição apresenta algumas vantagens frente às demais alternativas de amostras biológicas, como a facilidade e praticidade envolvidas no processo de coleta das amostras, sendo o único fluido corporal humano que pode ser obtido de maneira não invasiva e em grandes volumes para análise. Sob congelamento, apresenta alta estabilidade, permitindo ser armazenada durante longos períodos sem que a amostra sofra comprometimento. Os fatores mencionados contribuem para custos mais baixos de coleta e redução do desconforto do indivíduo, além de proporcionar aumento da frequência de respostas em estudos de biomonitoramento, visto que, várias amostras podem facilmente ser obtidas durante diferentes períodos ao longo do dia, favorecendo um acompanhamento constante (BORDIN *et al.*, 2015; OLSZOWY; BUSZEWSKI, 2014; WANG *et al.*, 2018; SAUDE; SYKES, 2007).

Por ser a principal via de eliminação de substâncias, a urina é geralmente alvo de investigação de metabólitos ou produtos de biotransformação. Pelo fato de ser uma matriz que fornece a medida da exposição interna do indivíduo à determinada substância sem sofrer alterações por transferências diretas do meio de exposição externo, podendo ocorrer com amostras biológicas não convencionais como cabelo e unha, a urina representa uma boa opção de matriz para abordagens metabólicas em análises de biomonitoramento, toxicológicas e de diagnóstico (BORDIN *et al.*, 2015; LAURIDSEN *et al.*, 2007). A utilização desta matriz apresenta benefícios por possuir um número menor de interferentes em comparação a outras matrizes biológicas como o sangue. Na realidade, a urina consiste basicamente em um ultrafiltrado do sangue formado pelos rins, composto em cerca de 95% por água. Porém, apesar da grande proporção de água em sua composição, a urina ainda consiste em uma matriz complexa devido à presença tanto de substâncias químicas orgânicas, como ureia,

ácido úrico e creatinina, quanto de inorgânicas, como íons cloreto e sódio, além outras espécies, justamente por consistir na principal via de eliminação de substâncias, que variam de acordo com a dieta e hábitos de cada indivíduo (BORDIN *et al.*, 2015).

A complexidade e presença de diversas substâncias na urina que podem atuar como interferentes em uma separação cromatográfica, ou até mesmo causar danos nos equipamentos cromatográficos, juntamente com o alto conteúdo de sais inorgânicos dissolvidos, variações entre diferentes lotes, as amplas faixas de pH e força iônica, que variam de acordo com o nível de desidratação e dos hábitos alimentares do sujeito, tornam a injeção direta da amostra no equipamento analítico inviável (MAFRA *et al.*, 2018). Sendo assim, o preparo de amostras demonstra-se necessário e é uma etapa crucial para análises químicas e biológicas, principalmente em casos nos quais os analitos se encontram em concentrações muito baixas, na ordem $\mu\text{g L}^{-1}$ e/ou ng L^{-1} (FUMES *et al.*, 2015). O preparo de amostra é uma das fases que integra o desenvolvimento de um procedimento analítico, que usualmente ocorre de forma cíclica e é composto basicamente pelas etapas de amostragem; armazenamento e transporte da amostra; preparo de amostra; separação, identificação e quantificação; validação analítica e por fim avaliação estatística e tomada de decisões que levam ao recomeço do ciclo (CHEN *et al.*, 2008).

Os principais propósitos relacionados ao preparo de amostra são a pré-concentração do analito a fim de aumentar a sensibilidade, isolar o composto de interesse da matriz, promovendo a remoção de componentes presentes na amostra que atuam como interferentes nas etapas posteriores de separação e detecção, e adequar os analitos para separação instrumental, quando necessário, convertendo-o para sua forma mais detectável por meio de derivatização. Atualmente, melhorias nas colunas cromatográficas e na cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), em geral, muitas vezes tornam procedimentos de derivatização desnecessários (CHEN *et al.*, 2008; LAAKS; JOCHMANN; SCHMIDT, 2011; NOVÁKOVÁ; VLČKOVÁ, 2009). Sendo assim, a etapa de preparo de amostra visa minimizar a complexidade da amostra antes da introdução no instrumento cromatográfico, facilitando as separações dos analitos alvos de outros componentes na coluna analítica, antes de serem introduzidos no detector (FUMES *et al.*, 2015). Como resultado, além dessa etapa auxiliar melhorando a separação e detecção dos analitos, ela também reduz a necessidade e tempo de manutenção dos instrumentos e conseqüentemente, o custo da análise (CHEN *et al.*, 2008).

Por muitos anos o preparo de amostras foi considerado menos importante que a separação e detecção, porém, à medida que a química analítica se desenvolveu, essa etapa gradualmente tornou-se uma parte importante da análise, sendo frequentemente a etapa mais longa em um procedimento analítico. O preparo de amostra pode ocupar até 80% do tempo de uma análise e é capaz de afetar quase todas as etapas posteriores do procedimento analítico sendo, portanto, fundamental para a identificação inequívoca, confirmação e quantificação dos analitos (LAAKS; JOCHMANN; SCHMIDT, 2011; CHEN *et al.*, 2008; NOVÁKOVÁ; VLČKOVÁ, 2009). Desde o procedimento de amostragem até a análise dos dados, todas as etapas podem apresentar erros que comprometam a qualidade do resultado analítico final, porém, o preparo da amostra é a que apresenta maior probabilidade de causar problemas e dificuldades, como gerar erros na quantificação devido a perda de analito, provocando baixa reprodutibilidade e baixos rendimentos de extração, consumo de tempo, custo e contaminação dos equipamentos (FUMES *et al.*, 2015; PATTERSON *et al.*, 2013).

A seleção da técnica de preparo de amostra mais adequada é o principal fator para se obter resultados confiáveis e exatos. Tal escolha depende de diversos fatores como, das características tanto dos analitos envolvidos no procedimento quanto da matriz em que se encontram, e da interação analito-matriz, demandando uma otimização adequada dos parâmetros que exercem influência sob essa interação, com a finalidade de se atingir a eficiência de extração máxima do método utilizado (PATTERSON *et al.*, 2013; BORDIN *et al.*, 2015; JARDIM, 2010). Com relação à matriz, devem ser levados em consideração o seu estado físico, o volume de amostra disponível, os conteúdos de matéria orgânica e o pH. Quanto aos analitos, devem ser avaliadas suas propriedades físicas e químicas como massa molar, carga elétrica, polaridade, volatilidade, pKa, as propriedades que permitam a sua detecção e suas concentrações na matriz (JARDIM, 2010). Muitos protocolos de preparo de amostras em métodos bioanalíticos ainda são baseados em técnicas clássicas simples, como extração líquido-líquido (LLE, do inglês *Liquid-liquid extraction*) e extração em fase sólida (SPE, do inglês *Solid phase extraction*) (LAAKS; JOCHMANN; SCHMIDT, 2011; NOVÁKOVÁ; VLČKOVÁ, 2009).

A extração líquido-líquido (LLE) foi uma das primeiras técnicas desenvolvidas de preparo de amostras e continua sendo amplamente utilizada na análise biológica de amostras até os dias atuais. A LLE baseia-se na transferência dos analitos de interesse de uma matriz líquida para outra fase líquida imiscível através da diferença de solubilidade do analito nas duas fases. A forma mais clássica da LLE é realizada manualmente em funil de separação

para a extração de analitos de uma amostra biológica ou ambiental aquosa, utilizando um solvente orgânico apolar ou pouco polar. Uma agitação branda é realizada para promover a mistura das fases, que, após um período de repouso, se separam novamente, e a fase orgânica passa a conter uma porção dos analitos com base no coeficiente de partição octanol-água. No entanto, alguns fatores como, a formação de emulsões, necessidade de repetição do procedimento de extração para enriquecimento suficiente, utilização de grandes volumes tanto de amostra quanto de solventes orgânicos tóxicos que, conseqüentemente, geram grandes volumes de resíduos, tornam a LLE uma técnica de preparo de amostras cara, demorada e prejudicial ao meio ambiente (CHEN *et al.*, 2008; NOVÁKOVÁ; VLČKOVÁ, 2009).

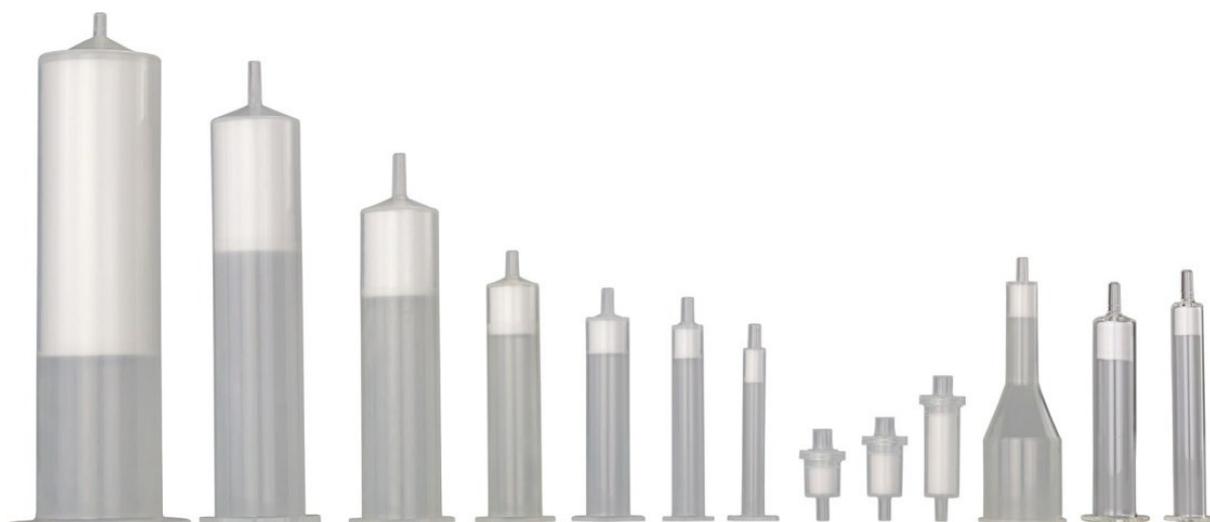
A extração em fase sólida (SPE) foi desenvolvida em 1976 com o intuito de superar as desvantagens apresentadas pela LLE e atualmente consiste no método mais popular de preparo de amostra, sendo amplamente aplicada em análises de rotina. Existem diversas vantagens de se utilizar a SPE em comparação a LLE clássica, uma delas está no menor consumo de solventes orgânicos e conseqüentemente, geração de volumes reduzidos de resíduos tóxicos. No entanto, ainda está distante de ser considerada uma técnica de extração verde. Alguns outros benefícios da técnica são não ocorrência de emulsões, menor tempo de preparo, facilidade de automação do método, altas porcentagens de recuperação do analito, boa capacidade para aumentar seletivamente e pré-concentração do analito, além da disponibilidade comercial de muitos equipamentos e materiais sorventes para SPE (NOVÁKOVÁ; VLČKOVÁ, 2009; JARDIM, 2010; FUMES *et al.*, 2015).

A SPE é usada principalmente no preparo de amostras líquidas para extração de analitos semi-voláteis ou não voláteis, mas também pode ser aplicada para sólidos pré-extraídos em solventes. O princípio da técnica consiste no particionamento dos analitos a serem extraídos entre o material sorvente, que é a fase sólida, e uma fase líquida, que é a amostra. Esses analitos devem ter maior afinidade pela fase sólida do que pela matriz da amostra. Os sorventes, ou fases extratoras, empregados nessa técnica são similares aos utilizados em cromatografia líquida em coluna, conseqüentemente, os mecanismos de separação também são similares. Adsorção, partição, troca iônica e exclusão são os principais mecanismos de interação envolvidos, associados a processos químicos, físicos e mecânicos que atuam durante a separação (NOVÁKOVÁ; VLČKOVÁ, 2009; JARDIM, 2010).

A SPE clássica é realizada em cartuchos compostos por um material sorvente acondicionado em seringas de polipropileno. Os formatos mais populares possuem capacidade de 3 e 5 mL contendo em seu interior 500 mg do material sorvente. Entretanto, atualmente

existe uma tendência para o desenvolvimento de novos formatos e tamanhos que demandem menores volumes de solvente e massas de fase extratora, como é o caso de seringas de 1 mL com 100 mg de sorvente que está se tornando popular. Alguns fabricantes também introduziram no mercado cartuchos ainda menores, contendo 10, 25 e 50 mg de sorvente (MAJORS, 2001). A Figura 4 apresenta alguns exemplos de cartuchos utilizados na SPE disponíveis comercialmente.

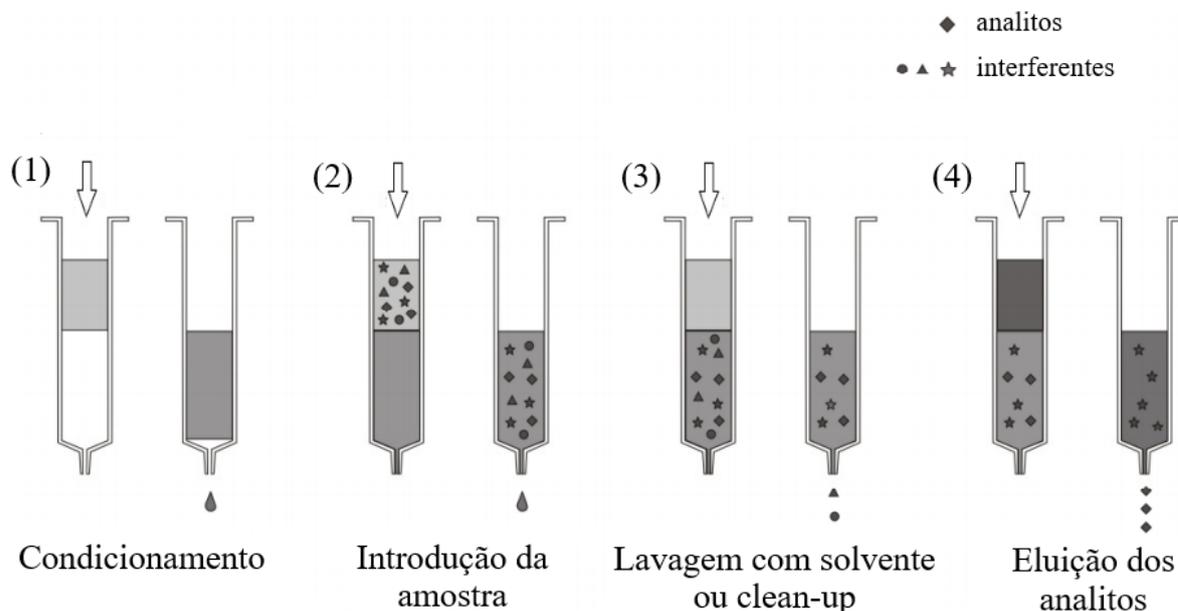
Figura 4. Exemplos de cartuchos para SPE disponíveis comercialmente.



Fonte: MACHEREY-NAGEL (2020).

Os principais procedimentos da SPE, divididos em 4, conforme demonstrado na Figura 5, consistem em: (1) condicionamento do da fase sorvente com solvente adequado; (2) introdução da amostra para que ocorra a retenção dos analistas; (3) limpeza do extrato com solvente adequando para retirada de possíveis interferentes retidos, etapa conhecida como lavagem com solvente ou clean-up e por fim, (4) eluição dos analitos com outro solvente adequado (JARDIM, 2010).

Figura 5. Etapas envolvidas no preparo de amostra por SPE.



Fonte: Adaptado de JARDIM (2010).

Os cartuchos de SPE convencionais são facilmente manipulados utilizando vácuo, no entanto, existe uma dificuldade de se controlar a vazão, além de ser necessário cuidado para impedir que a coluna seque antes da aplicação da amostra. Outra desvantagem da técnica é o consumo de tempo ainda considerado longo, uso de uma quantidade relativamente grande de solvente orgânico, alto custo, pois os cartuchos de SPE são fabricados apenas para uso único, além da baixa reprodutibilidade algumas vezes observada entre diferentes lotes de cartuchos comerciais e eventualmente, a dificuldade em selecionar o sorvente adequado para a aplicação desejada (NOVÁKOVÁ; VLĚKOVÁ, 2009).

Apesar das vantagens obtidas com a SPE em relação à LLE, abordagens convencionais de preparo de amostras ainda exigem muito consumo de tempo, grandes volumes de amostra e solventes, além de muitas vezes demandarem de extrações repetidas para enriquecimento suficiente do extrato e etapas de concentração por evaporação ou destilação, consistindo em muitas etapas que as tornam laboriosas e propensas a perdas de analitos. Além dessas desvantagens, existe ainda o interesse econômico, visto que, os solventes orgânicos de alta pureza utilizados nessas técnicas são caros, geralmente tóxicos e prejudiciais ao meio ambiente e quantidades substanciais de resíduos de solventes devem ser manuseadas (NOVÁKOVÁ; VLĚKOVÁ, 2009; LAAKS; JOCHMANN; SCHMIDT, 2011).

Esses fatores combinados com o aumento da sensibilidade dos instrumentos analíticos estimularam um avanço das técnicas de preparo de amostra, permitindo o uso de menores quantidades de amostra. Conseqüentemente, a massa de fase extratora necessária, o volume de solvente utilizado e de resíduos gerados, bem como o tempo de análise requerido também são reduzidos (NOVÁKOVÁ; VLČKOVÁ, 2009; FUMES *et al.*, 2015). Desse modo, as tendências atuais das técnicas de preparo de amostra são a miniaturização, simplificação dos processos, redução do custo, automação e obtenção de uma melhor capacidade de extração dos analitos aumentando a seletividade, recuperação, reprodutibilidade e linearidade do método (CHEN *et al.*, 2008; LAAKS; JOCHMANN; SCHMIDT, 2011; SZULTKA *et al.*, 2014; BORDIN *et al.*, 2015). As técnicas de microextração representam, por esse motivo, uma parte importante do preparo de amostras moderno, e apesar de serem muito diversas, todas compartilham uma característica comum que é o fato da quantidade da fase de extratora ser pequena em comparação com o volume da amostra (LAAKS; JOCHMANN; SCHMIDT, 2011). Dentre as diversas microtécnicas disponíveis atualmente as baseadas no uso de materiais sorventes são de longe as mais utilizadas, como é o caso da técnica de extração em ponteiras descartáveis (DPX) (FUMES *et al.*, 2015).

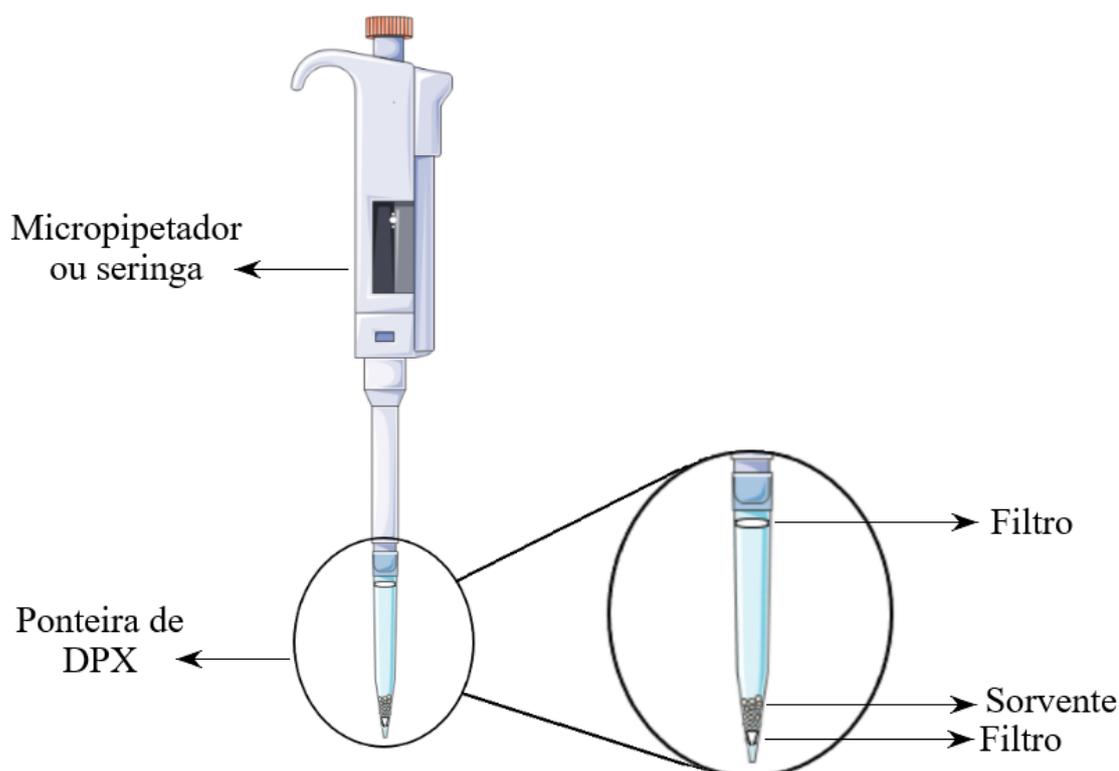
2.3 Extração em ponteira descartável

A técnica de extração em ponteiras descartáveis, (DPX, do inglês *Disposable pipette extraction*) foi desenvolvida no ano de 2003 pelo Dr. William Brewer da Universidade da Carolina do Sul, EUA, sob o número de patente US6566145 B2 (BREWER, 2003). A técnica pode ser considerada uma variante da SPE e da extração em fase sólida dispersiva (D-SPE, do inglês *Dispersive solid phase extraction*), uma importante etapa do método QuEChERS (do inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*). A vantagem da DPX frente às essas técnicas está na utilização de menor massa de fase extratora, redução no consumo de solventes e a promoção de uma rápida extração dos analitos em soluções, além de dispensar a utilização de vácuo, empregando ponteiras descartáveis em vez de cartuchos ou tubos de ensaio. Diferente da D-SPE, que é utilizada apenas na sorção de interferentes do método QuEChERS, a DPX permite a sorção e dessorção dos analitos (PINTO; QUEIROZ, 2015). Outra vantagem da técnica de DPX é a mobilidade das partículas da fase extratora que permite uma rápida mistura e equilíbrio com a amostra durante a agitação. Desse modo, o

analito pode ser extraído em menos tempo e desorvido com menos solvente, removendo a necessidade de uma etapa de concentração separada (BREWER, 2003).

A técnica consiste basicamente em uma ponteira de pipeta padrão, usualmente de 1 ou 5mL, contendo dois filtros, um posicionado na parte superior e outro na parte inferior da ponteira, entre os quais a fase extratora é mantida. O filtro inferior tem como finalidade proporcionar uma barreira permeável que permita a passagem livre dos fluídos em qualquer direção, porém, reter a fase extratora. O filtro superior impede a passagem de qualquer material sólido ou fluído para o interior do micropipetador, evitando a contaminação e perda do material sorvente por retenção. A ponteira de DPX é facilmente acoplada a um micropipetador ou seringa, conforme demonstrado na Figura 6, para realização do procedimento (PINTO; QUEIROZ, 2015; CORAZZA *et al.*, 2017). O contato máximo e a mistura completa entre a fase extratora e a amostra são realizados sob agitação manual ou por vortex, vertendo o conteúdo repetidamente, ou, a forma mais comum, aspirando ar para o interior da pipeta. Essa mistura dinâmica entre a amostra e o material sorvente promove um rápido equilíbrio entre as fases e conseqüentemente, uma adsorção eficiente e rápida do analito (BREWER, 2003; MAFRA *et al.*, 2018).

Figura 6. Esquema da extração manual por DPX.



Fonte: Autoria própria.

O procedimento padrão da técnica de DPX, representado pela Figura 7, é baseado nos mesmos princípios além de possuir algumas etapas semelhantes à SPE tradicional, consistindo em 4 etapas básicas denominadas de condicionamento, extração, lavagem ou *clean-up* e por fim, dessorção (BORDIN *et al.*, 2016).

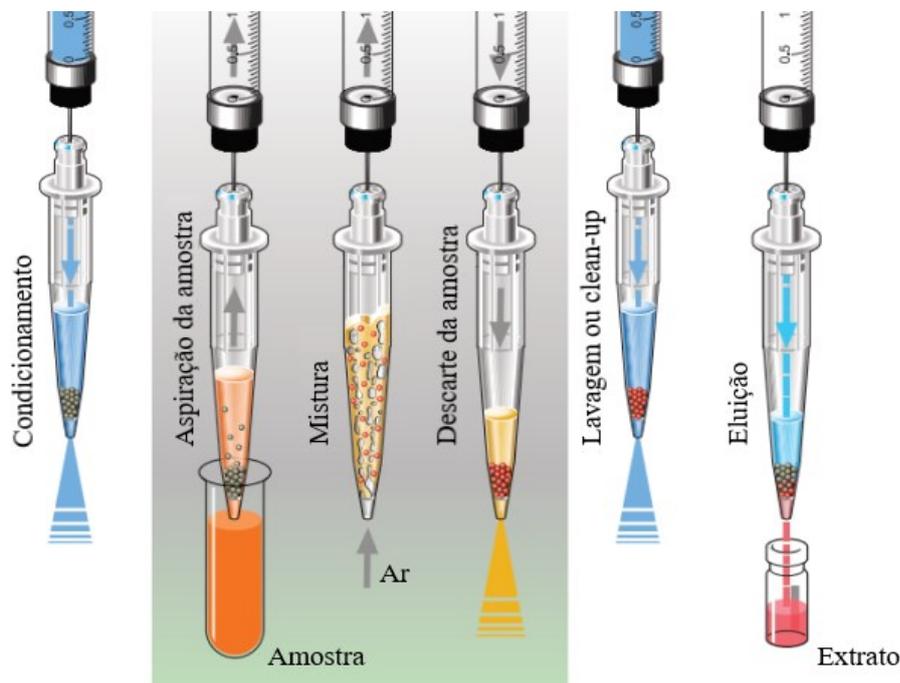
Primeiramente é realizado o condicionamento da fase extratora através da aspiração de solvente apropriado, ou uma combinação de solventes, juntamente com ar para aumentar a área de contato do material com o solvente. Esse procedimento é realizado para ativar os sítios de ligações do material sorvente, permitindo a interação molecular apropriada entre a fase extratora e o analito presente na amostra. Após o solvente de condicionamento ser expelido da ponteira, o material está apto para a extração dos analitos (PINTO *et al.*, 2015; BORDIN *et al.*, 2016; CORAZZA *et al.*, 2017).

A etapa de extração é realizada através da aspiração da amostra juntamente com ar para o interior da ponteira. Esse procedimento é necessário para que se promova uma mistura dinâmica entre o sorvente e a amostra, gerando um equilíbrio de sorção, responsável pela extração dos analitos de interesse, antes contidos na matriz. Em sequência, a amostra é descartada do interior da ponteira, que encontra-se apta para a realização dos demais procedimentos (PINTO *et al.*, 2015; BORDIN *et al.*, 2016; CORAZZA *et al.*, 2017).

A etapa de lavagem (*clean-up*) consiste em um procedimento opcional realizando entre a extração e dessorção, com o intuito de remover possíveis interferentes presentes na amostra. Essa lavagem ocorre através da aspiração de um ou mais solventes apropriados juntamente com ar, que posteriormente são descartados. A seleção desse solvente para a etapa de limpeza é realizada considerando a interação química estabelecida entre sorvente e analito e a estrutura química dos prováveis interferentes da matriz (PINTO *et al.*, 2015; BORDIN *et al.*, 2016; CORAZZA *et al.*, 2017).

Por fim, a última etapa é a eluição dos analitos alvo, realizada através da aspiração de um solvente ou mistura de solventes, utilizado para romper a interação sorvente-analito. O analito desorve da fase extratora e migra para o solvente de eluição. O solvente utilizado nessa fase deve ser escolhido de acordo com o tipo e a natureza química do analito e do sorvente. Após esse procedimento o extrato obtido pode ser injetado diretamente no instrumento analítico ou evaporado e reconstituído para posterior análise utilizando uma técnica analítica adequada, com o intuito de alcançar uma maior detectabilidade analítica (PINTO *et al.*, 2015; BORDIN *et al.*, 2016; CORAZZA *et al.*, 2017).

Figura 7. Etapas do procedimento de extração utilizando a técnica de DPX.



Fonte: Adaptado de GUAN *et al.* (2009).

O ato de sucção de uma fase líquida juntamente com ar para o interior da ponteira de DPX, seguido da expulsão desse líquido, é denominado de “ciclo”. A aspiração de ar durante esse processo é importante para garantir a distribuição do sorvente no interior da ponteira e permite a mistura dinâmica com o solvente, levando a um rápido equilíbrio entre as fases (BORDIN *et al.*, 2016). Por se tratar de uma fase sólida dispersa, a fase extratora permite uma boa área de contato e conseqüentemente uma extração eficiente. Outra vantagem da técnica é a possibilidade de utilizarem-se fases extratoras alternativas, como os biossorventes, ampliando a aplicabilidade da técnica (MAFRA *et al.*, 2018).

A primeira ponteira de DPX disponível comercialmente foi fundamentada na cromatografia clássica, composta por partículas C18, incorporadas com polímeros, como fase extratora. Desde então, similar ao que ocorreu com os cartuchos SPE tradicionais, novas ponteiros contendo diferentes materiais sorventes com mecanismos de interação distintos e específicos para cada grupo de analitos, como hidrofóbico, troca iônica e afinidade, foram introduzidas no mercado conforme apresentado na Tabela 2 (PINTO *et al.*, 2015; CHAVES *et al.*, 2015). Apesar de as ponteiros de DPX disponíveis comercialmente possuírem poucas opções de fases extratoras aplicadas principalmente na extração de compostos não polares e medicamentos ácidos e básicos, além de procedimentos de limpeza, a comercialização da

DPX-Blank permite o desenvolvimento de materiais alternativos mais seletivos como fase sorvente sendo, por exemplo, para analitos polares (CORAZZA *et al.*, 2017).

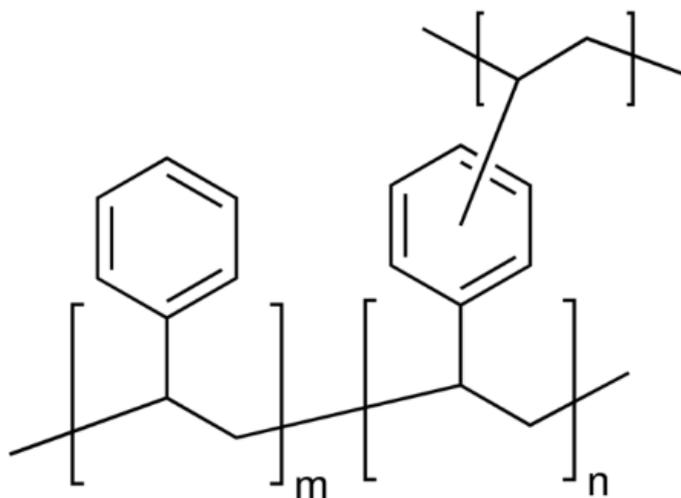
Tabela 2. Ponteiras de DPX contendo diferentes fases extratoras disponíveis comercialmente com suas respectivas aplicações.

| Tipo de ponteira | Tipo de fase extratora | Aplicação |
|-------------------------|---------------------------------------|--|
| DPX-C18 | C18 (20% de sílica gel) | Remoção de interferentes presentes na matriz |
| DPX-RP | Estireno-divinilbenzeno | Adsorção de compostos apolares e pouco polares. (Ex.: pesticidas) |
| DPX-CX | Grupos ácido sulfônico | Adsorção de compostos básicos (Ex.: drogas de caráter básico) |
| DPX-WAX | Grupos poliamino | Interação com compostos ácidos (Ex.: drogas e metabólitos) |
| DPX-WCX | Grupos policarboxilato | Adsorção de compostos básicos (Ex: especialmente aminoglicosídeos) |
| DPX-Si | Sílica gel | Limpeza (clean-up) de amostras ambientais |
| DPX-SC | Vazia ou com areia (lavada com ácido) | Coleta de amostras sólidas |
| DPX-Blank | Vazia | Desenvolvimento de métodos |

Fonte: Adaptado de PINTO *et al.* (2015).

Com base nas propriedades dos analitos selecionados para esse estudo juntamente com o resultado de alguns testes qualitativos realizados, a ponteira utilizada para o desenvolvimento do método foi a do tipo DPX-RP, cuja fase extratora contida no interior da ponteira, de acordo com a Tabela 2, consiste em estireno-divinilbenzeno, um copolímero com características hidrofóbicas que desempenha mecanismos de fase reversa, portanto, essa é a razão da sigla RP (do inglês *Reverse phase*) (GUAN *et al.*, 2010).

Figura 8. Estrutura polimérica do estireno-divinilbenzeno, utilizado como sorvente na ponteira de DPX-RP.



Fonte: SIGMA-ALDRICH (2020).

O mecanismo de retenção exercido pelo estireno-divinilbenzeno contido nas ponteiras de DPX-RP é baseado em interações hidrofóbicas, semelhantes às observadas em colunas de fase reversa para HPLC, e interações π - π com os anéis aromáticos presentes em sua estrutura, conforme representado na Figura 8. Em virtude da sua natureza hidrofóbica, o sorvente interage com os analitos através das forças de Van der Waals, e a presença de anéis aromáticos nas estruturas dos monoftalatos aumentam a retenção desses compostos na fase extratora através da realização de interações π - π com o material sorvente (GUAN *et al.*, 2010; RAHMAN *et al.*, 2017).

A técnica de DPX é muito utilizada em procedimentos de limpeza, entretanto, na área de preparo de amostras, também vem sendo aplicada em análises forenses, ambientais, de resíduos alimentares na extração de compostos não polares e medicamentos ácidos e básicos. O emprego da técnica como preparo de amostra vem crescendo devido às suas grandes vantagens mencionadas que explicam a sua aplicação para a determinação de diferentes analitos, especialmente pesticidas na área ambiental e drogas de abuso, nas análises forenses. Os métodos reportados na literatura empregando a técnica DPX, associada às técnicas analíticas como GC, HPLC, LC-MS/MS e GC-MS comprovam a seletividade, alta detectabilidade analítica e linearidade adequada para análises de amostras biológicas e ambientais (PINTO *et al.*, 2015; BORDIN *et al.*, 2016; CORAZZA *et al.*, 2017). A Tabela 3

apresenta alguns exemplos de métodos reportados na literatura utilizando DPX como técnica de preparo de amostra nos últimos anos.

Tabela 3. Trabalhos reportados na literatura utilizando a técnica de DPX no preparo de amostra.

| Analito | Matriz | Técnica analítica | Tipo de material sorvente | Referência |
|-------------------------------------|-------------------|--------------------------|---|---------------------------------|
| Pesticidas | Frutas e vegetais | GC-ECD | DPX-RP | GUAN <i>et al.</i> , 2010. |
| Cocaína e nicotina | Mecônio | GC-MS | DPX-CX | BORDIN <i>et al.</i> , 2014. |
| Fármacos | Plasma sanguíneo | LC-MS/MS | C18 com albumina de soro bovino | PINTO <i>et al.</i> , 2017. |
| Creatinina | Urina | LC-UV | DPX-RP e DPX-C18 | FERNANDES <i>et al.</i> , 2018. |
| Desreguladores endócrinos fenólicos | Água de rio | HPLC-FLD | Cloreto de 3- n- propil (3-metilpiridínio) silsesquioxano (Si3Py ⁺ Cl ⁻) | CORAZZA <i>et al.</i> , 2017. |
| Fármacos | Urina | HPLC-DAD | Cortiça | MAFRA <i>et al.</i> , 2018. |
| Pesticidas | Água potável | HPLC-DAD | DPX-WAX | CORAZZA <i>et al.</i> , 2019. |
| Contaminantes fecais | Sedimentos | GC-MS | DPX-Si | MORELLI <i>et al.</i> , 2020. |

Através da Tabela 3 é possível perceber que existe uma ampla aplicabilidade para a técnica de DPX, sendo possível utilizá-la em uma variedade de matrizes para a análise de diversos compostos e a possibilidade de utilização de materiais alternativos como fase

extratora, amplificando ainda mais seu campo de aplicação (PINTO *et al.*, 2015; MAFRA *et al.*, 2018). Porém, até o momento, não foram reportados na literatura trabalhos que se propõe a determinar produtos de biodegradação dos ftalatos empregando como preparo de amostra a técnica de DPX. A maioria dos métodos desenvolvidos recentemente utiliza técnicas como DLLME e HF-LPME, que além dos procedimentos padrões das técnicas, também envolvem etapas de derivatização e hidrólise, fazendo com que o tempo total de preparo da amostra chegue a até mais de 2 horas (FERNANDEZ *et al.*, 2017; CERQUEIRA, 2018; YE *et al.*, 2020). Tendo isso em vista, o presente trabalho propõe desenvolver um método mais rápido e simples para a determinação dos monoftalatos em amostras de urina.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Desenvolver e aplicar um método analítico eficiente para determinação de monometil ftalato (MMP), monobutil ftalato (MBP), monobenzil ftalato (MBzP) e mono(-2-etilhexil) ftalato (MEHP) em amostras de urina utilizando a técnica de extração em ponteira descartável (DPX) com a separação e detecção dos analitos por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de arranjo de diodos (HPLC - DAD).

3.2 Objetivos específicos

- Otimização da separação e detecção dos analitos com um gradiente de solvente no HPLC-DAD.
- Otimização os parâmetros da técnica de DPX divididos em:
 - Número de ciclos, tipo ou mistura e volume de solvente para a etapa de dessorção;
 - Número de ciclos de lavagem do extrato;
 - Volume da amostra e número de ciclos para a etapa de extração;
 - Grau de diluição e pH da amostra;
 - Otimização da etapa de limpeza entre cada experimento.
- Determinação dos parâmetros analíticos de mérito do método desenvolvido tais como: limite de quantificação (LOQ), limite de detecção (LOD), faixa linear de trabalho e coeficiente de correlação linear (R).
- Determinação da exatidão do método através das recuperações relativas dos analitos e a precisão por meio de ensaios intradia e interdia.
- Avaliação da robustez do método através do teste de Youden e análise do gráfico de Lenth.
- Aplicação do método desenvolvido em amostras de urina de voluntários.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais e reagentes

Para o desenvolvimento do método proposto foram utilizados os padrões monometil ftalato (MMP), monobutil ftalato (MBP), monobenzil ftalato (MBzP) e mono-(2-etilhexil) ftalato (MEHP) (97%), todos adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Uma solução de trabalho foi preparada com uma mistura de cada analito em concentração de 10 mg L⁻¹ em acetonitrila (ACN) e utilizada durante a otimização da diluição da urina e construção das curvas de calibração. Outra solução trabalho contendo apenas os analitos MMP, MBP e MBzP em concentração de 10 mg L⁻¹ foi utilizada nas demais etapas de otimização do método. A acetonitrila (ACN) de grau cromatográfico (99,9%) e o metanol (MeOH) (99,95%) foram adquiridos da J.T. Baker (Mallinckrodt, NJ, EUA), o ácido orto-fosfórico (85%) da Neon e a água ultrapura foi obtida a partir de um sistema de purificação de água (Mega Purity, Billerica, EUA). Para o controle de pH das amostras utilizou-se ácido clorídrico (HCl) adquirido na Qhemis e hidróxido de sódio (NaOH) da Mallinckrodt. As extrações foram realizadas com ponteiros descartáveis de 1 mL do tipo DPX-RP 20 mg (DPX Labs, Columbia, SC, EUA) em poços de polipropileno de 2 mL e a dessorção foi realizada em frascos de vidro de 1 mL. Para etapa de centrifugação foi utilizada uma centrífuga da Centribio.

4.2 Amostras de urina

A utilização da amostra biológica urina para o desenvolvimento desse estudo foi aprovada pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Santa Catarina com o número 00913718.3.0000.0121. Para a realização de todos os ensaios foram empregadas amostras de urina de diferentes voluntários coletadas em frascos de vidro âmbar de 40 mL e mantidas sob refrigeração até o momento de sua manipulação. As amostras foram utilizadas em temperatura ambiente com a adição direta dos analitos. O pH das amostras foi ajustado, inicialmente com o valor fixado em 3,0 e posteriormente otimizado. Sequencialmente foi realizada uma etapa de centrifugação a 3000 rpm durante 5 minutos, com o intuito de promover uma separação de sedimentos, como células ou tecidos fragmentados, materiais sólidos suspensos e parte das proteínas presentes nas amostras (OLSZOWY; BUSZEWSKI, 2014).

4.3 Instrumentação cromatográfica

As análises foram desenvolvidas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência, modelo LC 20 AT da Shimadzu (Kyoto, Japão), equipado com um detector de arranjo de diodos, modelo SPD-M20A, com loop de 20 μL e injetor manual Rheodyne 7725i (Rohnert Park, CA, EUA). Uma coluna de fase reversa C18 (250 mm de comprimento x 4,6 mm de diâmetro interno e diâmetro de partícula de 5 μm) da Phenomenex (EUA) foi empregada para as separações cromatográficas. O fluxo de fase móvel foi de 1 mL min^{-1} empregado no modo gradiente, utilizando acetonitrila com 0,05% de ácido orto-fosfórico (A) e água ultrapura com 0,05% de ácido orto-fosfórico (B) nas seguintes condições: 65% da fase móvel B de 0,00 a 3,00 minutos; de 3,00 a 11,50 minutos a fase móvel B foi reduzida para 20%; de 11,50 a 12,00 minutos a fase móvel B foi reduzida para 0% e esta composição foi mantida de 12 a 14,70 minutos; de 14,70 a 15 minutos a fase móvel B foi elevada para 65% e por fim, de 15 a 20 minutos a condição inicial foi retomada, conforme registrado na Tabela 4. O comprimento de onda usado para as detecções foi ajustado em 210 nm para todos os quatro analitos. O software do LC solution (Shimadzu, Kyoto, Japão) foi utilizado para avaliar os dados obtidos. Uma microsseringa Hamilton (Reno, Nevada, EUA) de 100 μL foi utilizada para injeção manual no cromatógrafo.

Tabela 4. Gradiente otimizado para realizar a separação cromatográfica dos quatro monoftalatos estudados.

| Canal A (%) | Canal B (%) | Tempo (min) |
|-------------|-------------|-------------|
| 35 | 65 | 0,01 |
| 35 | 65 | 3,00 |
| 80 | 20 | 10,00 |
| 100 | 0 | 11,00 |
| 100 | 0 | 14,00 |
| 35 | 65 | 15,00 |
| 35 | 65 | 20,00 |

4.4 Otimizações da técnica de extração em ponteiras descartáveis

4.4.1 Condições fixadas inicialmente

Todas as otimizações foram realizadas com amostras de urina contendo $300 \mu\text{g L}^{-1}$ dos analitos, com exceção do teste de diluição em que essas concentrações variaram antes da amostra ser submetida à diluição. Os ensaios foram realizados utilizando novas alíquotas para os ciclos das etapas de condicionamento, extração e limpeza da fase extratora e uma mesma alíquota para os ciclos de dessorção. O condicionamento das ponteiras foi realizado com 2 ciclos de $300 \mu\text{L}$ de metanol. Inicialmente, para a etapa de extração, o volume de amostra foi mantido em $700 \mu\text{L}$ com 5 ciclos de extração, seguido de 5 ciclos de lavagem do extrato com $300 \mu\text{L}$ de água ultrapura. A etapa de dessorção foi realizada com 5 ciclos de $300 \mu\text{L}$ de solvente ACN:MeOH 50:50 (v/v) e por fim, a ponteira foi submetida a uma etapa de limpeza com 4 ciclos de $300 \mu\text{L}$ de acetonitrila. Porém, alguns desses parâmetros foram selecionados para o estudo e otimizados, portanto, algumas condições foram alteradas ao longo do trabalho.

4.4.2 Otimização do número de ciclos de lavagem do extrato

Devido à elevada concentração de impurezas presentes em amostras de urina, algumas podem permanecer no extrato. Com a finalidade de eliminar esse problema, foi proposto e otimizado uma etapa opcional dos procedimentos tradicionais de DPX que consiste na lavagem do extrato. Por se tratar de uma amostra aquosa, foi selecionado como solvente para essa etapa a água ultrapura, e com o intuito de observar a influência dessa limpeza na qualidade dos resultados, realizou-se uma otimização univariada, em triplicata, dos ciclos de lavagem variando entre 2, 5 e 8 ciclos.

4.4.3 Otimização do solvente de dessorção

A seleção do melhor solvente, ou melhor proporção entre uma mistura de solventes, foi obtida por meio de um planejamento *simplex lattice*, totalizando 9 experimentos. Foram avaliados como solventes, o metanol, acetonitrila e água ultrapura em pH 8,0; sendo as proporções estudadas entre eles apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5. Razão entre os solventes de dessorção para o planejamento de superfície triangular (pontos 5, 7 e 9 como centrais).

| Experimento | Água ultrapura (%) | Metanol (%) | Acetonitrila (%) |
|--------------------|---------------------------|--------------------|-------------------------|
| 1 | 100 | 0 | 0 |
| 2 | 0 | 50 | 50 |
| 3 | 0 | 100 | 0 |
| 4 | 0 | 0 | 100 |
| 5 (C) | 33,3 | 33,3 | 33,3 |
| 6 | 50 | 50 | 0 |
| 7 (C) | 33,3 | 33,3 | 33,3 |
| 8 | 50 | 0 | 50 |
| 9 (C) | 33,3 | 33,3 | 33,3 |

4.4.4 Otimização do número de ciclos e volume de solvente de dessorção

Para a otimização completa da etapa de dessorção foram realizados nove experimentos a partir de um planejamento Doehlert, no qual o número de ciclos de dessorção foi variado na faixa de 1 a 9 ciclos e o volume de solvente selecionado de acordo com a otimização anterior foi variado de 150 a 300 μL , conforme demonstrado na Tabela 6.

Tabela 6. Planejamento Doehlert para otimização do número de ciclos e volume de solvente da etapa de dessorção (pontos 3, 6 e 9 centrais).

| Experimento | Número de ciclos | Volume de solvente (μL) |
|--------------------|-------------------------|--|
| 1 | 1 | 225 |
| 2 | 3 | 150 |
| 3 (C) | 5 | 225 |
| 4 | 7 | 150 |
| 5 | 9 | 225 |
| 6 (C) | 5 | 225 |
| 7 | 7 | 300 |
| 8 | 3 | 300 |
| 9 (C) | 5 | 225 |

4.4.5 Otimização do número de ciclos e volume de amostra na etapa de extração

Na etapa de extração foram selecionados o volume de amostra e número de ciclos como parâmetros para determinar as melhores condições de extração. Foi utilizado o planejamento Doehlert, no qual, o número de ciclos de extração foi avaliado entre 3 a 7 e o volume de amostra foi variado entre 300 a 700 μL , conforme mostrado na Tabela 7.

Tabela 7. Planejamento Doehlert para otimização do número de ciclos e volume de amostra da etapa de extração (pontos 3, 6 e 9 centrais).

| Experimento | Número de ciclos | Volume de amostra (μL) |
|-------------|------------------|-------------------------------------|
| 1 | 3 | 500 |
| 2 | 4 | 300 |
| 3 (C) | 5 | 500 |
| 4 | 6 | 700 |
| 5 | 7 | 500 |
| 6 (C) | 5 | 500 |
| 7 | 6 | 300 |
| 8 | 4 | 700 |
| 9 (C) | 5 | 500 |

4.4.6 Otimização do pH da amostra

Tendo em vista que os analitos interagem melhor com a fase extratora quando estão em sua forma molecular, além do fato de que amostras de urina têm propriedades variáveis de acordo com o indivíduo e outros fatores como metabolismo e dieta, uma forma de padronizar essas amostras foi proposta a partir do controle do pH. Sendo assim, foi realizada uma otimização de forma univariada, em triplicata, do pH da amostra, variando esse parâmetro em 2,0; 3,0 e 4,0. Esses valores foram selecionados por estarem em torno do pK_a dos analitos que é de 3,08 além de estarem dentro da faixa suportada pela coluna utilizada.

4.4.7 Otimização da etapa de limpeza

Entre duas extrações utilizando uma mesma ponteira de DPX é importante garantir uma limpeza adequada da fase extratora para que se forneçam as mesmas condições iniciais para todas as extrações realizadas. Desse modo, a etapa de limpeza foi otimizada de forma univariada, em triplicata, variando-se o número de ciclos de limpeza entre 1 e 6 ciclos, utilizando 300 μL do solvente que forneceu melhor resposta na etapa de otimização do solvente de dessorção.

4.4.8 Otimização do grau de diluição da amostra

Com o intuito de mitigar o efeito de matriz e a presença de interferentes no extrato, foi realizada a análise da influência do grau de diluição da urina sobre o método. Para esse estudo, a diluição da amostra foi otimizada de forma univariada, em triplicata, variando o fator de diluição entre 5, 10 e 20 vezes, resultando em uma concentração final de 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ de todos analitos, totalizando 9 experimentos.

4.5 Validação do método desenvolvido

4.5.1 Parâmetros analíticos de mérito

Os parâmetros analíticos de mérito do método proposto foram obtidos por meio de curvas de calibração para cada um dos quatro analitos na matriz urina, utilizando-se todas as condições anteriormente otimizadas da etapa de preparo de amostra. As curvas de calibração foram contituídas com amostras de urina diluídas em um fator de 10 vezes, fortificadas em 5 níveis de concentração, cada nível realizado em triplicata. Por meio das curvas de calibração obtiveram-se os outros parâmetros de mérito: faixa linear de trabalho, coeficiente de correlação linear (R), limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ). Os valores de LOQ foram definidos como, o primeiro ponto da faixa linear das curvas de calibração de cada analito, enquanto os LOD foram definidos como os respectivos valores de LOQ de cada analito dividido por 3,3. Para os valores de LOQ foram aceitos apenas os resultados obtidos em triplicata que apresentaram desvio padrão relativo (RSD) inferior a 20%.

Para avaliar a exatidão do método proposto realizaram-se ensaios de recuperação em três níveis de fortificação, em triplicata, para cada analito em amostras de urina de dois voluntários. A precisão do método também foi verificada através de recuperações realizadas

em triplicata, por meio dos valores de desvio padrão relativo (RSD) obtidos, sendo aceitos valores de até 20%. A precisão intra-dia foi avaliada em três níveis diferentes de fortificação, em triplicata, todas realizadas no mesmo dia. Enquanto no caso da precisão inter-dia, esta foi verificada em apenas um nível de fortificação, porém, realizada em 3 dias diferentes, todos em triplicata (RIBANI et al., 2004).

4.5.2 Teste de robustez

A robustez de método analítico é compreendida como a suscetibilidade que o mesmo tem a pequenas mudanças nas condições experimentais (KARAGEORGOU; SAMANIDOU, 2014). Nesse trabalho, a robustez da metodologia proposta foi avaliada através do método de Youden, realizando-se alterações em algumas condições do preparo de amostra otimizado.

Foram selecionados 7 parâmetros, sendo eles os volumes de urina adicionado na diluição, de amostra e de solvente de dessorção; o pH da amostra; e os números de ciclos de extração, de lavagem e de dessorção. Esses parâmetros foram utilizados em suas condições nominais (condições estabelecidas no preparo de amostra otimizado) e aplicando-se uma pequena variação nesses valores, conforme apresentado na Tabela 8.

Tabela 8. Relação entre as condições nominais e variações dos parâmetros analisados para realização do teste de Youden.

| Parâmetro | Condição nominal | | Variação | |
|---------------------|------------------|---|----------|---|
| Volume de urina | 490 µL | A | 510 µL | a |
| pH da amostra | 2,0 | B | 2,2 | b |
| Volume de amostra | 700 µL | C | 720 µL | c |
| Ciclos de extração | 7 | D | 8 | d |
| Ciclos de lavagem | 2 | E | 3 | e |
| Volume de solvente | 225 µL | F | 250 µL | f |
| Ciclos de dessorção | 1 | G | 2 | g |

Subsequentemente à seleção dos parâmetros e das variações a serem aplicadas, realizou-se uma combinação entre ambos, conforme representado na Tabela 9, totalizando 8 experimentos. Todos esses ensaios foram realizados em urina fortificada com 200 µg L⁻¹ de

cada analito. A partir desse método construiu-se o gráfico de Lenth com a finalidade de avaliar se os parâmetros exercem uma influência significativa sobre os resultados.

Tabela 9. Combinação entre os parâmetros na condição nominal e na variação selecionada.

| Efeito | Experimento | | | | | | | |
|--------|-------------|---|---|---|---|---|---|---|
| | 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 |
| F/f | F | f | f | F | F | f | f | F |
| G/g | G | g | g | G | g | G | G | g |

4.6 Aplicação do método proposto

Após o devido desenvolvimento e validação, o método proposto foi aplicado para a análise de amostras de urina de quatro indivíduos, doadas voluntariamente, conforme identificado na Tabela 10.

Tabela 10. Amostras analisadas fornecidas por doadores em anonimato.

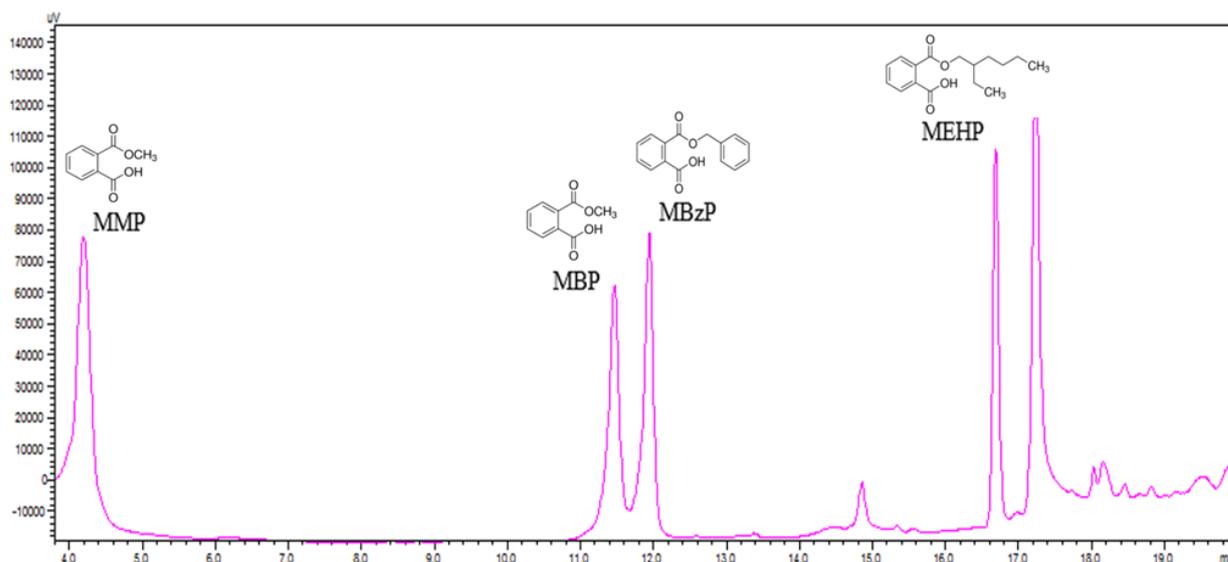
| | Amostra A | Amostra B | Amostra C | Amostra D |
|--------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Idade | 23 | 56 | 56 | 23 |
| Sexo | Feminino | Feminino | Masculino | Feminino |

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Separação cromatográfica

Primeiramente, antes das otimizações propostas para a etapa de extração aplicando a técnica de DPX, foi realizada a otimização da separação cromatográfica dos quatro analitos a partir de uma solução trabalho de 10 mg L^{-1} preparada em acetonitrila. A condição escolhida foi a aplicação de um gradiente de solvente entre acetonitrila e água ultrapura, ambas fases acidificadas com ácido orto-fosfórico, conforme descrito previamente na seção 4.3, totalizando 20 minutos de corrida cromatográfica. A separação cromatográfica dos analitos está apresentada na Figura 9.

Figura 9. Cromatograma da separação de uma solução padrão contendo os quatro monoftalatos acompanhados em 210 nm.



Por meio do cromatograma comprova-se que foi possível obter uma boa separação dos analitos nas condições selecionadas com os respectivos tempos de retenção apresentados na Tabela 11.

Tabela 11. Tempos de retenção dos analitos obtidos na separação cromatográfica monitorada em 210nm.

| Analito | Tempo de retenção (min) |
|----------------------------|--------------------------------|
| Monometil ftalato | 4,2 |
| Monobutil ftalato | 11,5 |
| Monobenzil ftalato | 11,9 |
| Mono-(2-etilhexil) ftalato | 16,7 |

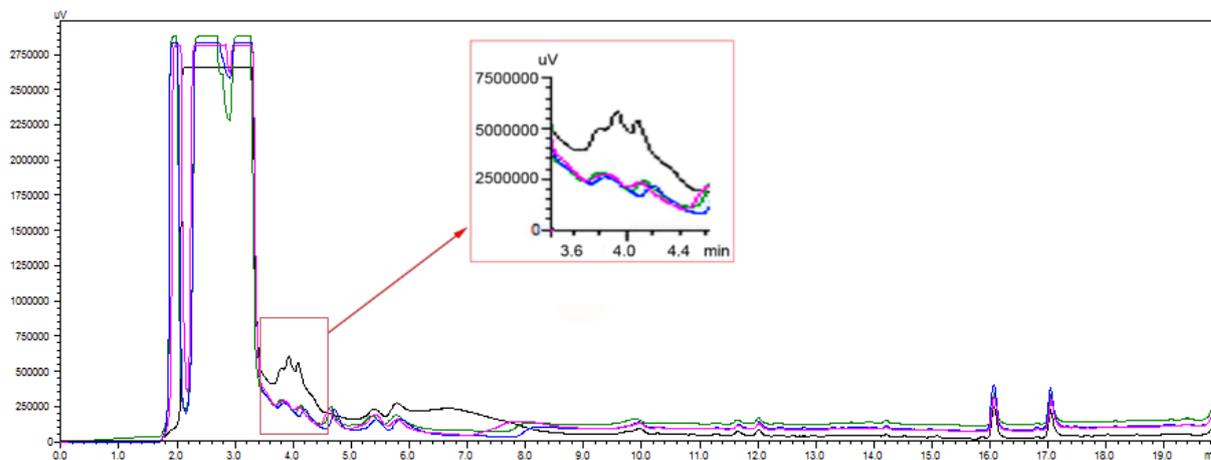
5.2 Otimizações da técnica de extração em ponteiras descartáveis

Para a realização de todos os procedimentos de otimização foram utilizadas amostras de urina fornecidas por voluntários, insentas dos analitos estudados. Todas as amostras foram primeiramente fortificadas a uma concentração de $300 \mu\text{g L}^{-1}$ de todos analitos, anteriormente aos demais procedimentos de controle de pH, centrifugação e etapas das otimizações que as amostras foram submetidas.

5.2.1 Otimização do número de ciclos de lavagem do extrato

Através do cromatograma de coloração preta contido na Figura 10, é possível identificar a presença de impurezas remanescentes no extrato após a realização do preparo de amostras por DPX. Principalmente no intervalo de tempo entre 3,6 e 4,4 minutos foram detectados interferentes com tempos de retenção muito próximos ao analito de interesse, dificultando a correta identificação e integração do pico referente ao primeiro analito, o monometil ftalato que possui um tempo de retenção de 4,2 minutos. Com o intuito de eliminar essas impurezas presentes no extrato final foi proposta uma etapa adicional de lavagem com solvente entre as etapas de extração e dessorção do procedimento de preparo de amostras por DPX.

Figura 10. Comparativo entre os cromatogramas obtidos após o preparo de amostra por DPX acompanhados em 210 nm: sem nenhum ciclo de lavagem (preto), com 2 ciclos (rosa), 5 ciclos (azul) e 8 ciclos (verde) de lavagem.

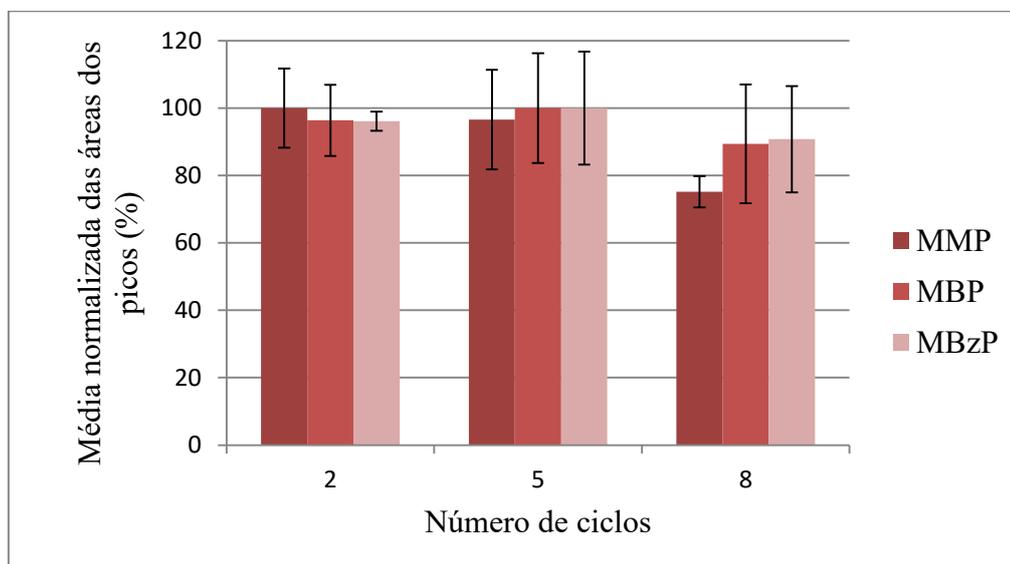


Inicialmente realizou-se um teste qualitativo avaliando a utilização de água ultrapura e uma solução de ácido fórmico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ como solventes e a utilização de uma única alíquota ou novas alíquotas para cada um dos 5 ciclos de lavagem fixados. Selecionando-se a água utrapura e modo de ciclos com novas alíquotas como melhor alternativa, prosseguiu-se a otimização univariada, em triplicata, avaliando 2, 5 e 8 ciclos de lavagem.

Com os resultados adquiridos foi possível estabelecer um comparativo entre os cromatogramas dos extratos resultantes do preparo de amostra por DPX sem a etapa intermediária de lavagem, com também aos extratos submetidos a 2, 3 e 8 ciclos de lavagem, conforme apresentado na Figura 10. Observa-se que principalmente para o primeiro analito, MMP, no tempo de retenção por volta de 4,2 minutos, os resultados são significativamente diferentes após a etapa de lavagem do extrato. No cromatograma sem ciclos de lavagem do extrato não foi possível obter a área do pico do MMP de forma precisa e livre de interferentes. Em contrapartida, nos cromatogramas com ciclos de lavagem variando de 2 a 8 observam-se cromatogramas mais limpos e com menor número interferentes oriundos da urina, tornando possível a visualização do sinal dos picos, principalmente do MMP, de forma mais clara.

Com os dados obtidos na otimização, através das médias normalizadas das áreas dos picos cromatográficos de cada analito produziu-se também um gráfico de barras apresentado na Figura 11, a fim de realizar-se um comparativo a respeito do numero de ciclos de lavagem estudado fornece a melhor resposta para a extração dos analitos.

Figura 11. Gráfico de barras resultante da otimização do número de ciclos de lavagem do extrato (*Condições: 3,5 mL de urina ajustada em pH 3,0 e fortificada com $300 \mu\text{g L}^{-1}$ dos analitos, extração com 5 ciclos de $700 \mu\text{L}$, lavagem do extrato com $300 \mu\text{L}$ e dessorção de 5 ciclos com $200 \mu\text{L}$ de solvente ACN:MeOH 50:50 (v/v)).



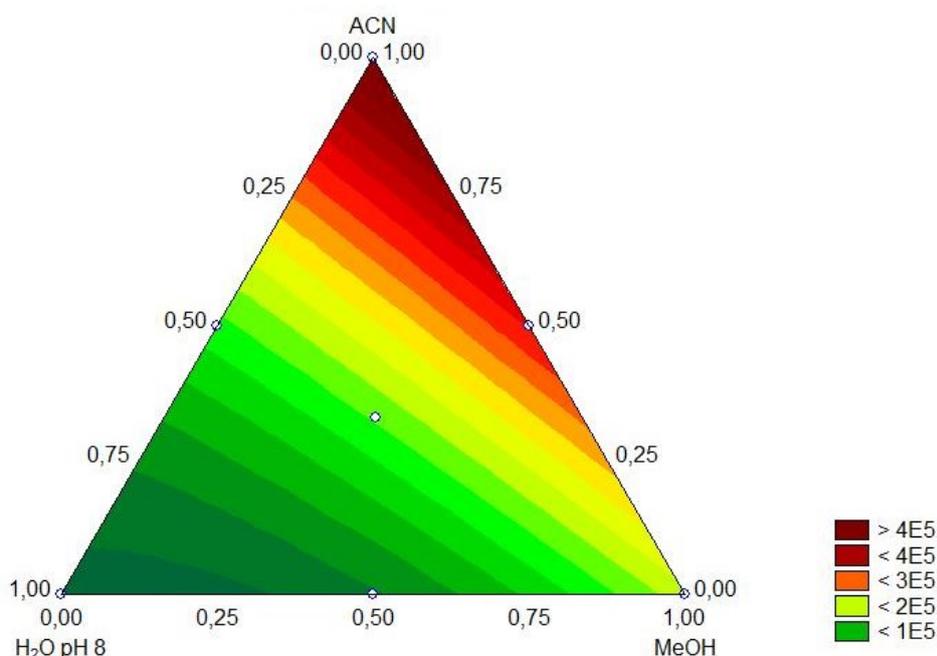
A partir dos resultados apresentados na Figura 11 é possível perceber diferentes respostas apresentadas entre 2 a 8 ciclos. Como demonstrado na Figura 10, o monometil ftalato foi analito mais afetado pelas impurezas remanescentes no extrato antes da etapa de lavagem. Para esse analito 2 ciclos forneceu a melhor resposta, enquanto, para o monobutil ftalato e o monobenzil ftalato, 5 ciclos forneceram uma resposta superior à 2 ciclos. Porém, além dessa diferença entre os resultados não ser tão significativa, os desvios padrões relativos dos resultados obtidos com 5 ciclos de lavagem são mais significativos que os desvios intrínsecos nas barras de erros para 2 ciclos de lavagem, tornando seus resultados menos precisos. Levando-se em consideração a precisão dos resultados obtida com 2 ciclos de lavagem ser superior, além de um menor número de ciclos favorecer a frequência analítica do método, 2 ciclos de lavagem foram adotados como condição compromisso entre os 3 analitos sem afetar de maneira significativa a extração com a ponteira de DPX.

5.2.2 Otimização do solvente de dessorção

Avaliou-se a eficiência da dessorção líquida de três solventes distintos por meio de um planejamento de superfície triangular, *simplex lattice*. Os solventes testados foram a acetonitrila, metanol e água ultrapura em pH 8,0; selecionados de acordo com a

compatibilidade com o instrumento do HPLC. Foram realizados 9 experimentos e utilizando a média geométrica das áreas dos picos cromatográficos foi gerada a superfície apresentada na Figura 12, construída a partir de uma função quadrática com coeficiente de determinação (R^2) igual a 0,9967, obtida como resultado dessa otimização, o que representa um resultado bastante satisfatório para esse tipo de superfície resposta.

Figura 12. Superfície triangular resultante da otimização do solvente de dessorção (*Condições: 3,5 mL de urina ajustada em pH 3,0 e fortificada com $300 \mu\text{g L}^{-1}$ dos analitos, extração com 5 ciclos de $700 \mu\text{L}$, lavagem do extrato com 2 ciclos de $300 \mu\text{L}$ de água ultrapultrapura e dessorção com 5 ciclos de $200 \mu\text{L}$ de diferentes solventes).



Conforme os resultados apresentados na Figura 12 é possível afirmar que a acetonitrila desempenhou uma maior eficiência de dessorção líquida dos analitos, visto que, existe uma predominância da coloração vermelho escuro em torno da região correspondente a 100% desse solvente. Essa coloração representa a região com o maior valor obtido da média geométrica das áreas dos picos dos analitos, ou seja, com a acetonitrila foi obtida uma maior concentração de analitos dessorvidos da fase extratora, o que representa uma dessorção mais eficiente. Assim sendo, a acetonitrila foi escolhida como o solvente da etapa de dessorção líquida para ser utilizado ao longo do restante do trabalho. Baseando-se na polaridade dos solventes selecionados para o estudo entende-se que, a acetonitrila por possuir menor

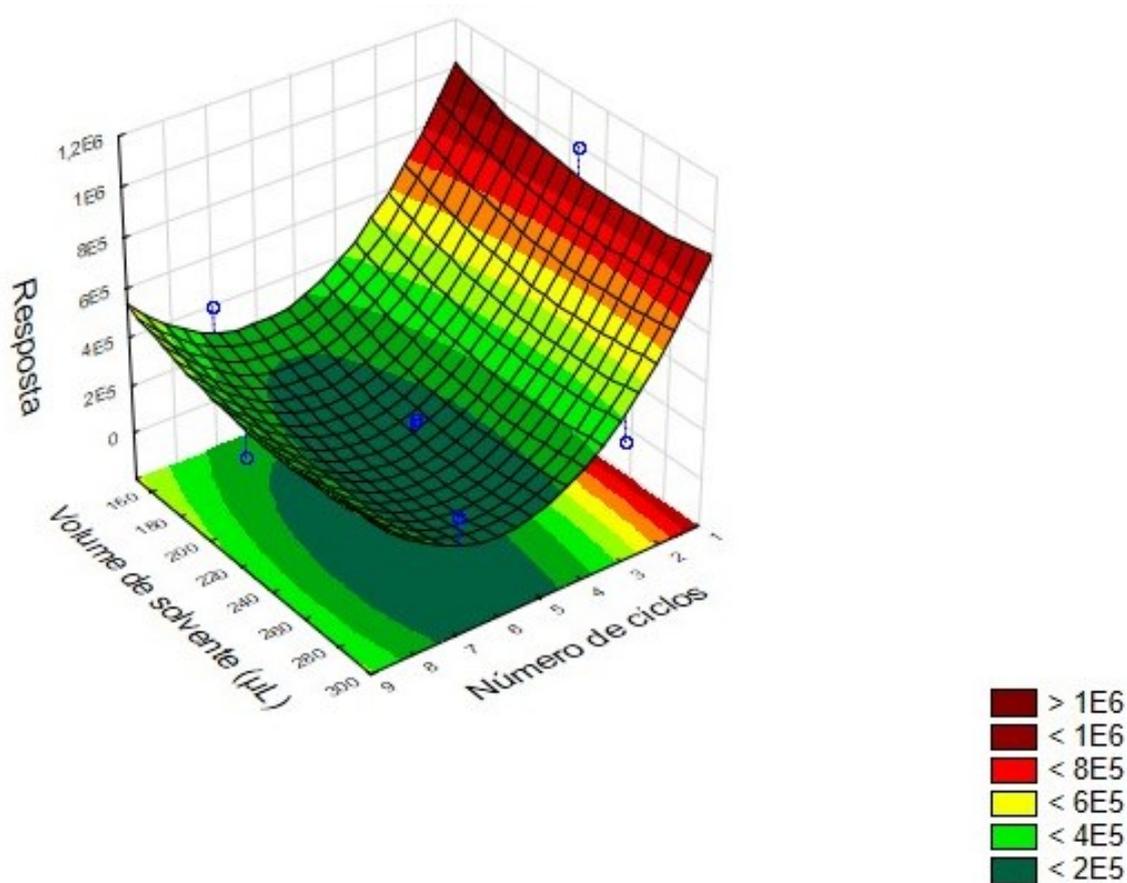
polaridade dentre os três apresentou características mais similares aos analitos que, em sua maioria, possuem baixa polaridade, com valores de log P variando entre 1,13 a 4,66; conforme apresentado anteriormente na Tabela 1 (CHEMICALIZE, 2019; CHEMSPIDER, 2019).

5.2.3 Otimização do número de ciclos e volume de solvente de dessorção

Utilizou-se o planejamento multivariado Doehlert entre a variação do número de ciclos, de 1 a 9 ciclos, e do volume de solvente, de 150 a 300 μL , na etapa de dessorção. Através da média geométrica das áreas dos picos cromatográficos foi gerada a superfície apresentada na Figura 13, obtida por meio de uma função quadrática com coeficiente de determinação (R^2) igual a 0,84944, demonstrando uma correlação adequada entre os dados e modelo proposto. Essa correlação também pode ser comprovada pela tabela ANOVA apresentada no Apêndice A e o gráfico de valores preditos vs. observados contido no Apêndice B.

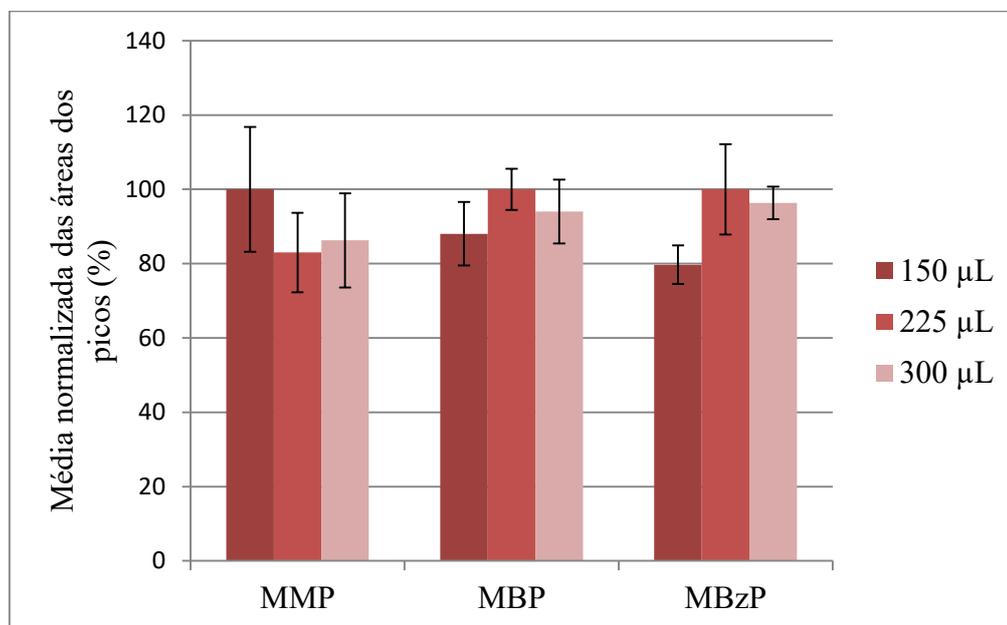
Por meio da Figura 13 observa-se que, na região estudada, a superfície tende para um máximo de acordo com a redução no número de ciclos de dessorção, diferente do volume de solvente que não demonstrou influência tão significativa na resposta máxima, visto que, a faixa com 1 ciclo de extração compreende a região de coloração vermelho intenso para todos os valores de volume de solvente. Desse modo, 1 ciclo de dessorção foi fixada como condição ótima nesse trabalho, enquanto para o volume de solvente, optou-se por realizar um novo estudo com o intuito de averiguar com mais detalhes essa variável.

Figura 13. Superfície resposta resultante da otimização do número de ciclos e volume de solvente na etapa de dessorção (*Condições: 3,5 mL de urina ajustada em pH 3,0 e fortificada com $300 \mu\text{g L}^{-1}$ dos analitos, extração com 5 ciclos de $700 \mu\text{L}$, lavagem do extrato com 2 ciclos de $300 \mu\text{L}$ de água ultrapura e dessorção com número de ciclos e volume de acetonitrila variados).



Posteriormente ao planejamento multivariado Doehlert realizou-se uma otimização univariada, em triplicata, modificando apenas o volume de acetonitrila utilizado na etapa de dessorção entre 150, 225 e $300 \mu\text{L}$. Utilizando as médias normalizadas das áreas dos picos cromatográficos obteve-se o gráfico de barras apresentado na Figura 14.

Figura 14. Gráfico de barras resultante da otimização do volume de solvente de dessorção (*Condições: 3,5 mL de urina ajustada em pH 3,0 e fortificada com $300 \mu\text{g L}^{-1}$ dos analitos, extração com 5 ciclos de $700 \mu\text{L}$, lavagem do extrato com 2 ciclos de $300 \mu\text{L}$ de água ultrapura e dessorção com 1 ciclo de volumes variados de acetonitrila).



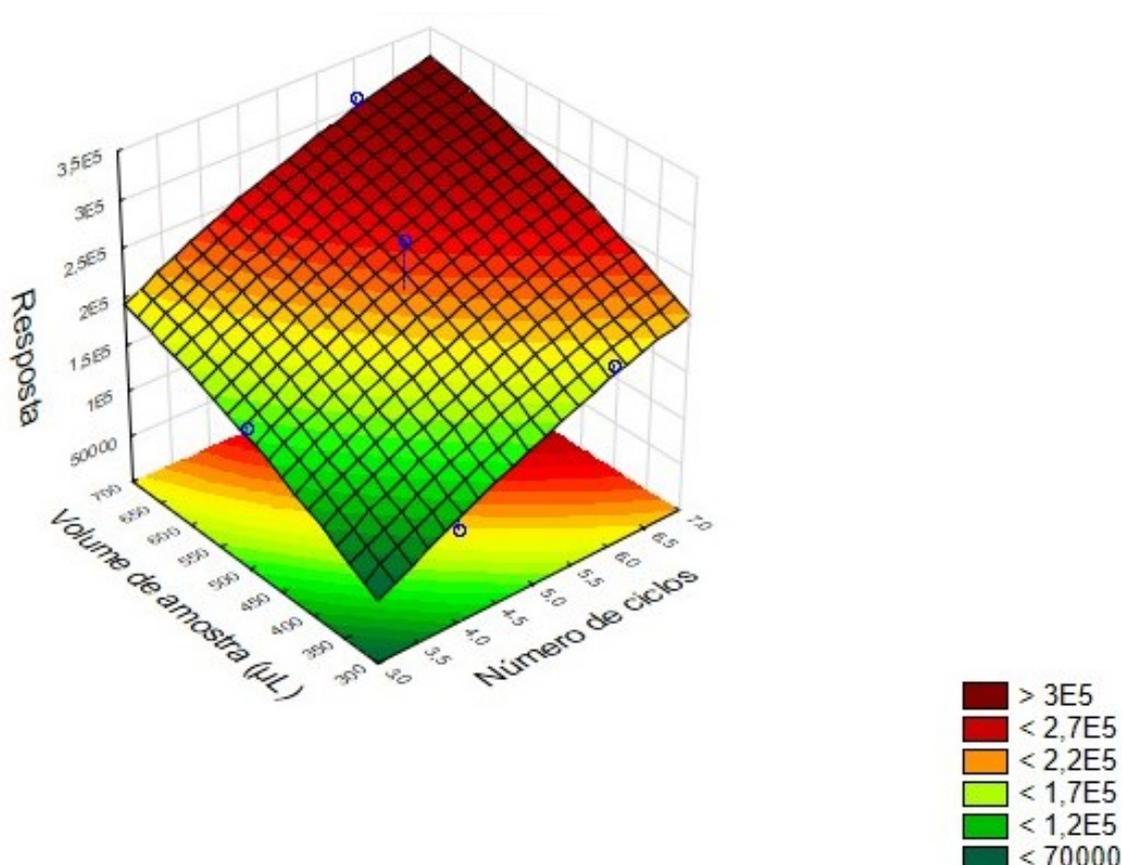
Através do gráfico de barras obtido observa-se que, o volume intermediário estudado de $225 \mu\text{L}$ apresentou as melhores respostas tanto para o monobutil ftalato quanto para o monobenzil ftalato, porém, o resultado foi diferente para o monometil ftalato que exibiu uma melhor dessorção quando utilizou-se o menor volume estudado, de $150 \mu\text{L}$. Apesar dessa variação observada nos resultados o volume de acetonitrila selecionado como condição compromisso entre os analitos foi $225 \mu\text{L}$, pois consiste na condição ótima para a maioria dos analitos. Além desse fato, para o caso do monometil ftalato, apesar de não ser o volume com maior resposta é a condição com uma menor barra de erro, ou seja, com o menor desvio padrão entre os resultados e consequentemente maior precisão. Portanto, a condição selecionada como ótima para etapa de dessorção foi 1 ciclo com $225 \mu\text{L}$ de acetonitrila.

5.2.4 Otimização do número de ciclos e volume de amostra na etapa de extração

Para avaliar a influência do número de ciclos, variado de 3 a 7, e do volume de amostra, variado de 300 a $700 \mu\text{L}$, sob a eficiência da etapa de extração da técnica de DPX, utilizou-se o planejamento multivariado Doehlert. A média geométrica das áreas dos picos cromatográficos obtidos em cada experimento foi utilizada para produzir a superfície resposta

contida na Figura 15, uma função quadrática com coeficiente de determinação (R^2) igual a 0,86368, comprovando uma correlação adequada entre os dados e o modelo proposto. Essa correlação também pode ser confirmada pela tabela ANOVA apresentada no Apêndice C e o gráfico de valores preditos vs. observados contido no Apêndice D.

Figura 15. Superfície resposta resultante da otimização do número de ciclos e volume de amostra na etapa de extração (*Condições: Urina ajustada em pH 3,0 e fortificada com 300 $\mu\text{g L}^{-1}$ dos analitos, extração com número de ciclos e volume de amostra variáveis, lava lavagem do extrato com 2 ciclos de 300 μL de água ultrapura e dessorção com 1 ciclo de 225 μL de acetonitrila).



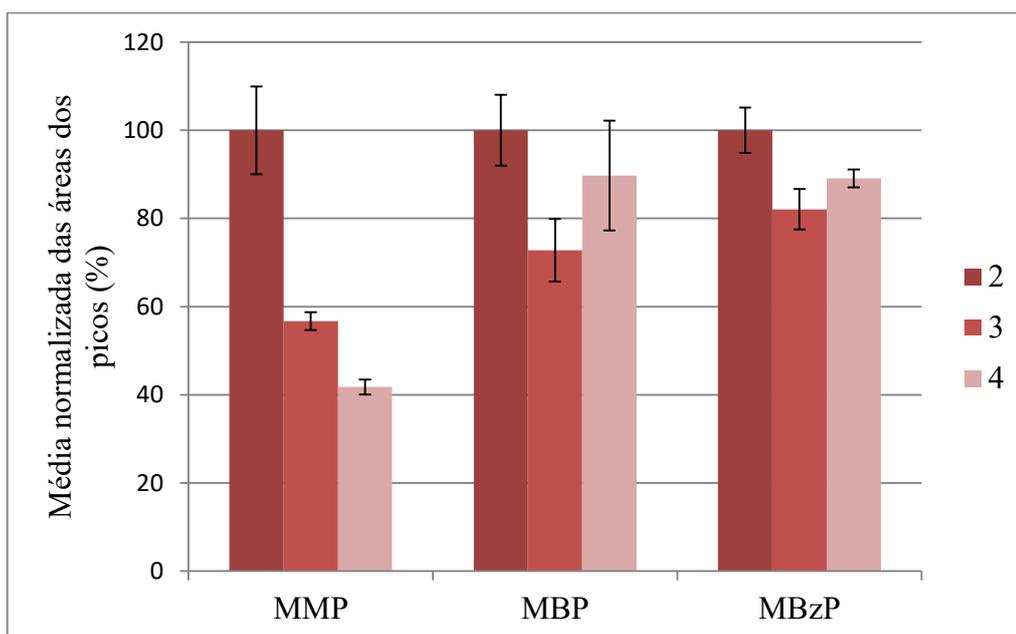
Conforme demonstrado na Figura 15 a superfície tende para uma máxima resposta à medida que são aumentados tanto o número de ciclos quanto o volume de amostra utilizado na etapa de extração. O ponto de 7 ciclos com 700 μL de amostra na superfície representa um resultado excelente para a região estudada, visto que, a intercepção dessas duas condições está localizada em uma região com coloração vermelho intenso. A presença dessa coloração indica

que as condições em questão forneceram valores mais elevados de média geométrica, sendo, portanto, 7 ciclos com 700 μL de amostra selecionados para etapa de extração.

5.2.5 Otimização do pH da amostra

Com a finalidade de avaliar o efeito do pH sobre a eficiência do processo de extração foi realizado um planejamento univariado, em triplicata, analisando 3 diferentes valores de pH, sendo esses, 2,0; 3,0 e 4,0. A partir das médias normalizadas das áreas dos picos cromatográficos obteve-se o gráfico de barras apresentado na Figura 16.

Figura 16. Gráfico de barras resultante da otimização do pH da amostra (*Condições: 4,9 mL de urina ajustada com valores variados de pH e fortificada com $300 \mu\text{g L}^{-1}$ dos analitos, extração com 7 ciclos de 700 μL , lavagem do extrato com 2 ciclos de 300 μL de água ultrapura e dessorção com 1 ciclo de 225 μL de acetonitrila).



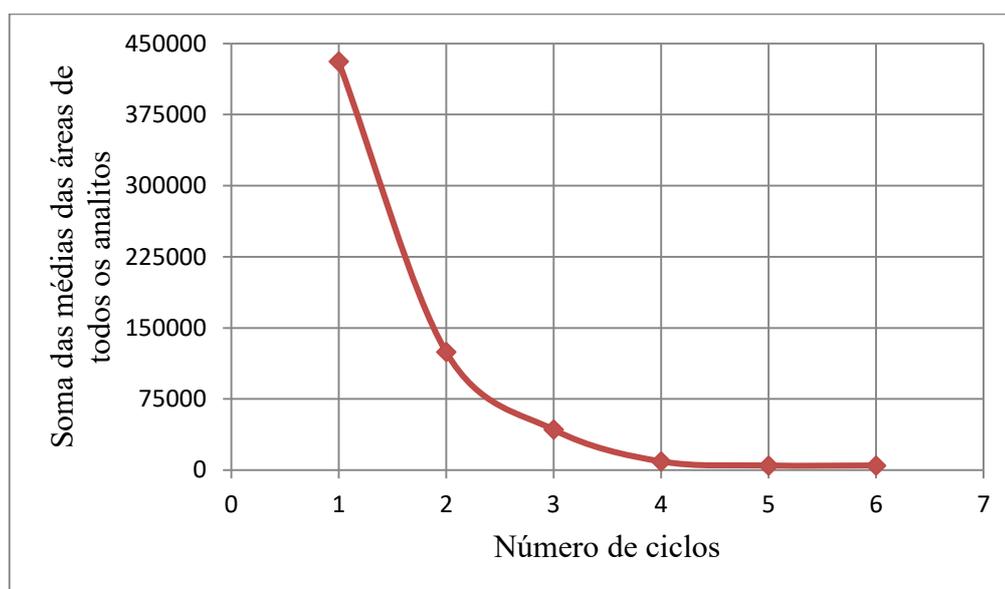
Através do gráfico de barras é possível perceber que extrações em que as amostras estavam com o pH ajustado em 2,0 forneceram as melhores respostas. Esses resultados podem ser compreendidos pelo fato de que nesse valor de pH os analitos de interesse do trabalho encontram-se na sua forma neutra, condição mais favorável para que ocorra interação entre os mesmos e a fase extratora utilizada na DPX, como também, com a fase estacionária da coluna cromatográfica. Acredita-se também que, extrações com amostra em pH 2,0 forneceram uma melhor resposta por conta da provável chance de que o pH final do extrato nessas condições,

dentre as estudadas, foi o que mais se assemelhou com o valor do pH utilizado nas fases móveis durante a corrida cromatográfica. Portanto, para as demais etapas desse trabalho o pH a amostra foi fixado no valor de 2,0.

5.2.6 Otimização da etapa de limpeza

A necessidade de se realizar uma etapa de limpeza da fase extratora entre cada preparo de amostra com a DPX, a fim de evitar possíveis erros provocados por efeito de memória quando se reutiliza uma mesma ponteira, foi avaliada por meio de uma otimização do número de ciclos de limpeza. Cada ciclo de limpeza foi realizado a partir de uma nova alíquota contendo 300 μL do mesmo solvente selecionado na etapa de otimização do solvente de dessorção. Cada experimento foi realizado em triplicata e a partir das médias dessas triplicatas construiu-se um gráfico apresentado na Figura 17 que indica o número de ciclos de acetonitrila necessários para observar a ausência de sinal analítico.

Figura 17. Gráfico resultante da otimização do número de ciclos de limpeza (*Condições: 4,9 mL de urina ajustada em pH 2,0 e fortificada com 300 $\mu\text{g L}^{-1}$ dos analitos, extração com 7 ciclos de 700 μL , lavagem do extrato com 2 ciclos de 300 μL de água ultrapura e de dessorção com 1 ciclo de 225 μL de acetonitrila).



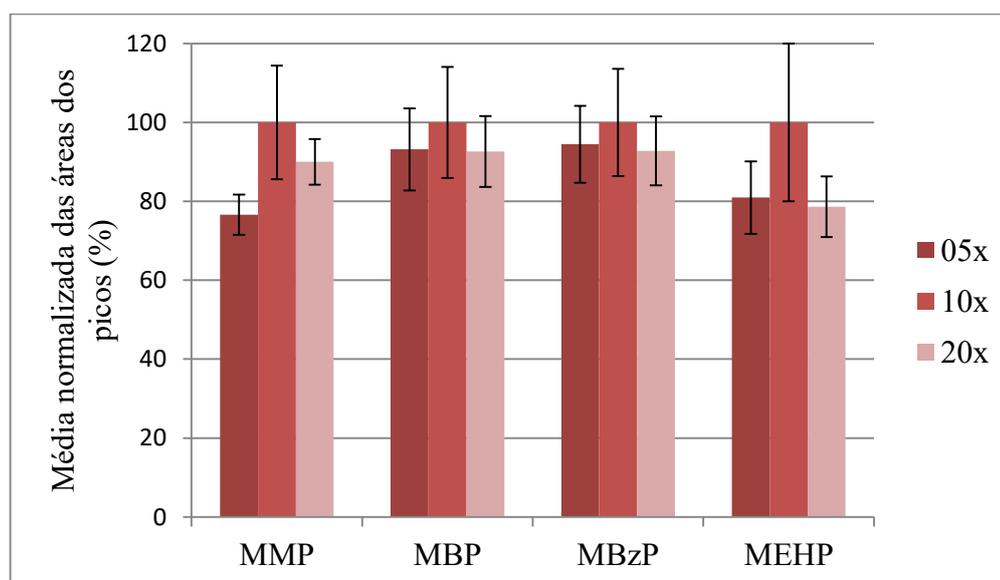
De acordo com os resultados obtidos e apresentados na Figura 17 a realização de 5 ciclos de limpeza demonstrou-se suficiente para restabelecer a condição inicial da fase extratora, ou seja, essa limpeza foi eficaz para promover a retirada quase total de analitos e resíduos da extração anterior, evitando possíveis efeitos de memória, e condicionar os sítios

ativos do material extrator para um novo ciclo de extração. Desse modo, 5 ciclos utilizando novas alíquotas com 300 μL de acetonitrila foram fixados para realizar a limpeza e condicionamento da fase extratora contida na ponteira de DPX.

5.2.7 Otimização do grau de diluição da amostra

Visto que a urina é uma matriz que possui não apenas uma constituição como também propriedades que variam de acordo com alguns fatores como dieta e o próprio metabolismo do indivíduo, foi realizado um estudo para identificar o melhor fator de diluição suficiente para eliminar possíveis efeitos de matriz ou a presença de interferentes remanescentes no extrato. Nessa otimização foram testados três níveis de diluição em triplicata, sendo esses 5, 10 e 20 vezes. A partir das médias normalizadas das áreas dos picos cromatográficos obtidos para cada nível de diluição, construiu-se o gráfico de barras apresentado na Figura 18 utilizado para realizar a análise dos resultados obtidos.

Figura 18. Gráfico de barras resultante da otimização da diluição da urina (*Condições: 4,9 mL de urina ajustada em pH 2,0 e fortificada com 300 $\mu\text{g L}^{-1}$ dos analitos, extração com 7 ciclos de 700 μL , lavagem do extrato com 2 ciclos de 300 μL de água ultrapura e de dessorção com 1 ciclo de 225 μL de acetonitrila).



Como demonstrado pelo gráfico de barras, para todos os analitos, o nível intermediário de diluição de 10 vezes apresentou as melhores respostas. Acredita-se que esse resultado pode ser explicado pelo fato da urina possivelmente possuir alguns componentes

que competem com os sítios ativos da fase extratora contida na ponteira de DPX causando desse modo, respostas inferiores para o nível de diluição de 5 vezes, enquanto que, para o nível de diluição de 20 vezes algumas propriedades e componentes da urina que favorecem a extração dos analitos encontram-se demasiadamente diluídos ou alterados provocando dessa forma também, respostas inferiores as observadas para a o nível de diluição intermediário. Portanto, para o desenvolvimento desse método foi estabelecido uma diluição da urina de 10 vezes como melhor alternativa para o preparo da amostra.

5.2.8 Condições otimizadas da técnica de extração em ponteiras descartáveis

Inicialmente realizou-se um pré-tratamento da amostra, no qual, 490 μL de amostra de urina foram diluídas com a adição de 4,410 μL de água ultrapura, totalizando um volume final de 4,9 mL. Essa alíquota foi submetida a um ajuste do pH no valor de 2,0 e em sequência a um processo de centrifugação a 3000 rpm durante o período 5 minutos para separação dos sólidos suspensos presentes na amostra. Para a etapa de extração foram realizados 7 ciclos, nos quais cada ciclo de extração consistia na aspiração de 700 μL do sobrenadante da amostra com a subsequente aspiração de ar, responsável por promover a mistura dinâmica no interior da ponteira de DPX, e descarte de todo o conteúdo para a realização do próximo ciclo. Na etapa de lavagem do extrato foram realizados 2 ciclos, cada um com 300 μL de água ultrapura utilizando-se sempre novas alíquotas para cada ciclo. Para etapa de dessorção líquida foi escolhido como solvente a acetonitrila, realizada em apenas 1 ciclo com a aspiração de 300 μL do solvente juntamente com ar e expiração de todo o conteúdo do interior da ponteira em um vial para realizar-se a injeção de 20 μL desse extrato no HPLC a fim de ocorrer a separação cromatográfica. Por fim a ponteira é submetida à etapa de limpeza realizada em 5 ciclos, cada qual com novas alíquotas de 300 μL de acetonitrila.

5.3 Validação do método desenvolvido

5.3.1 Parâmetros analíticos de mérito

Tendo todas as otimizações sido concluídas, realizou-se a validação do método proposto no presente trabalho por meio da obtenção de curvas de calibração utilizando urina como matriz em duas faixas lineares de trabalho diferentes que variam de acordo com o analito, conforme representado na Tabela 12.

Tabela 12. Limites de detecção e quantificação, faixa linear de trabalho, coeficiente de correlação e as equações lineares das curvas de calibração para os 4 analitos.

| Analito | LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$) | LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$) | Faixa linear de trabalho ($\mu\text{g L}^{-1}$) | R | Equação linear |
|----------------|--|--|---|----------|-----------------------|
| MMP | 7,6 | 25 | 25 – 300 | 0,9915 | $y = 630,5x - 509,6$ |
| MBP | 7,6 | 25 | 25 – 300 | 0,9990 | $y = 557,6x + 1331,7$ |
| MBzP | 3,0 | 10 | 10 – 300 | 0,9995 | $y = 851,2x - 41,6$ |
| MEHP | 7,6 | 25 | 25 - 300 | 0,9959 | $y = 330,7x - 1173,3$ |

É possível perceber, a partir da Tabela 9, que os coeficientes de correlação linear obtidos para todos os quatro analitos foram satisfatórios, estando todos os valores iguais ou superiores a 0,9905 indicando uma boa correlação linear da curva de calibração para cada analito estudado. Os limites de detecção apresentaram valores entre $3,0 \mu\text{g L}^{-1}$ para o MBzP a $7,6 \mu\text{g L}^{-1}$ para os demais analitos. Já os limites de quantificação variaram de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ para o MBzP a $25 \mu\text{g L}^{-1}$ para os demais analitos.

Com o intuito de avaliar a precisão e exatidão do método proposto foram realizados ensaios de recuperação em duas amostras de urina fornecidas por dois voluntários diferentes, identificadas como amostra 1 e amostra 2. Nessas, foram adicionadas concentrações diferentes dos analitos em três níveis, conforme demonstrado na Tabela 13. Os experimentos foram realizados em triplicata em cada um dos três níveis de fortificação.

Tabela 13. Resultados obtidos através de ensaios de recuperação para a avaliação da exatidão e precisões intradia e interdia do método desenvolvido.

| Analito | Nível de fortificação ($\mu\text{g L}^{-1}$) | Recuperação relativa amostra 1(%) (n=3) | Recuperação relativa amostra 2(%) (n=3) | Precisão intradia (RSD, %) (n = 3) | Precisão interdia (RSD, %) (n=9) |
|----------------|--|--|--|---|---|
| MMP | 25 | 95 | 90 | 9,1 | - |
| | 150 | 83 | 94 | 9,2 | 15,6 |
| | 300 | 92 | 102 | 3,5 | - |
| MBP | 25 | 104 | 106 | 5,2 | - |
| | 150 | 102 | 118 | 10,6 | 11,2 |
| | 300 | 102 | 109 | 8,8 | - |
| MBzP | 25 | 105 | 106 | 0,3 | - |
| | 150 | 98 | 116 | 7,0 | 10,4 |
| | 300 | 98 | 108 | 9,0 | - |
| MEHP | 25 | 98 | 119 | 12,0 | - |
| | 150 | 98 | 120 | 9,9 | 9,9 |
| | 300 | 108 | 110 | 10,7 | - |

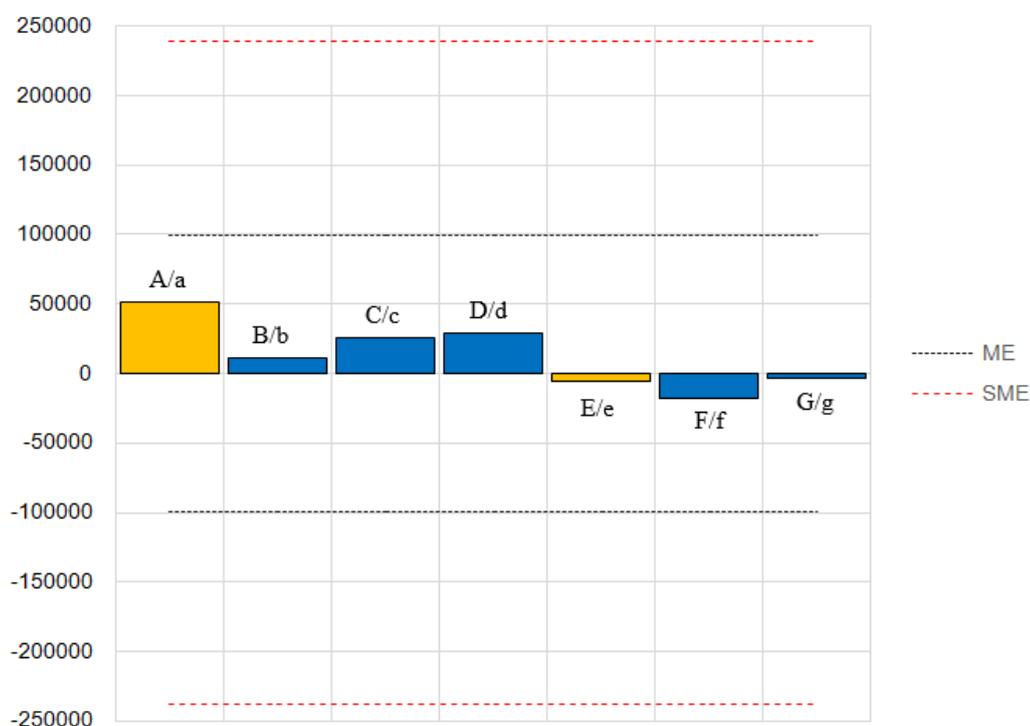
Conforme apresentado na Tabela 13 é possível identificar que a exatidão do método, avaliada por meio da recuperação relativa, variou de 83 a 108% para a amostra 1 e entre 90 a 120% para a amostra 2. De acordo com a Associação dos Químicos Analíticos Oficiais (AOAC, do inglês *Association of Official Analytical Chemists*) valores de porcentagem de recuperação relativa entre 40 e 120% para concentrações até $1 \mu\text{g L}^{-1}$ são aceitáveis para avaliar a exatidão de um método (AOAC, 2016). Por terem sido empregadas concentrações superiores, alguns valores obtidos nas recuperações relativas do método proposto estão fora da faixa aceita pela AOAC, porém, considera-se aceitável por tratar-se de um método que utiliza microextração, como também, devido à complexidade da matriz manipulada.

Com relação à avaliação da precisão do método, essa foi realizada a partir do desvio padrão relativo (RSD, do inglês *Relative Standard Deviation*). No caso dos ensaios intradia os valores de RSD variaram de 0,3 a 10,7% e os interdia compreenderam uma faixa de 9,9 a 15,6%, resultados considerados satisfatórios e que estão de acordo com os valores de precisão aceitos que devem ser inferiores a 20%. Desse modo, com base nos resultados obtidos, o método analítico desenvolvido nesse trabalho demonstrou-se válido para a faixa linear de trabalho utilizada para todos os analitos estudados.

5.3.2 Teste de robustez

Uma das maneiras de se avaliar a robustez de uma metodologia desenvolvida é através do teste de Youden. Nesse teste foram selecionados 7 parâmetros anteriormente otimizados no método, sendo esses, os volumes de urina adicionado na diluição, de amostra e de solvente de dessorção; o pH da amostra; e os números de ciclos de extração, de lavagem e de dessorção. Os parâmetros e seus respectivos valores selecionados foram tratados de acordo com as Tabelas 8 e 9 da Seção 4.5.2, obtendo-se as combinações fatoriais e os efeitos entre eles. A partir da média geométrica das áreas de cada um dos analitos, para os 8 experimentos realizados, construiu-se o gráfico de Lenth apresentado na Figura 19.

Figura 19. Gráfico de Lenth obtido para análise da robustez do método (*Fatores: A/a: Volume de urina; B/b: pH da amostra; C/c: Volume de amostra; D/d: Ciclos de extração; E/e: Ciclos de lavagem; F/f: Volume de solvente; G/g: Ciclos de dessorção).



Como é possível observar na Figura 19, o gráfico de Lenth possui linhas tracejadas, identificadas como a margem de erro (ME) e a margem de erro simultânea (SME). Essas margens de erro atuam como linhas de referência utilizadas para avaliar a influência das variações dos fatores nas respostas obtidas. A ME é utilizada quando se deseja avaliar apenas um fator por vez, de forma isolada. Caso aplicada como parâmetro quando mais de um fator está em análise, a margem de erro pode dar um resultado falso positivo. Nessas situações, como é o caso do presente trabalho, como o teste foi aplicado para sete fatores, é mais adequado analisar a SME juntamente com a ME, reduzindo dessa forma a chance de se obterem resultados falsos positivos ou falsos negativos (LEONARDI *et al.*, 2015).

. Quando os fatores são avaliados de forma simultânea, efeitos que não excedem a faixa de SME não apresentam uma significância sobre a robustez do método, ou seja, não interferem nos resultados quando sofrem pequenas variações. Em contra partida, efeitos que excedem a SME são considerados significativos, indicando que a robustez e as respostas do método são modificadas de forma expressiva quando esses fatores são submetidos a pequenas variações. Portanto, conforme pode ser constatado pela Figura 19, nenhum efeito excede a ME nem a SME, desse modo, pequenas mudanças no procedimento experimental não

influenciaram no resultado global da extração dos analitos, sendo possível afirmar que o método proposto é robusto.

5.4 Aplicação do método proposto

Após todas as etapas de otimização e validação do método de preparo de amostras proposto para análise de ftalatos em urina, o método foi aplicado nas amostras de urina de quatro voluntários que previamente concordam em participar deste estudo. Os resultados obtidos após a análise dessas amostras são apresentados na Tabela 14.

Tabela 14. Resultados obtidos nas análises de urina humana utilizando o método proposto (*ND: não detectado; < LOQ: inferior ao limite de quantificação).

| Analito | Amostra A | Amostra B | Amostra C | Amostra D |
|----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| MMP | ND | ND | ND | ND |
| MBP | < LOQ | ND | ND | < LOQ |
| MBzP | < LOQ | ND | ND | < LOQ |
| MEHP | < LOQ | ND | < LOQ | < LOQ |

Conforme é possível observar na Tabela 14, enquanto o monometil ftalato não foi detectado em nenhuma das quatro amostras dentro dos limites de do método proposto. O monobutil ftalato e o monobenzil ftalato foram detectados em duas amostras de urina, porém, não em concentração suficiente para ser quantificado, semelhante ao mono-(2-etilhexil) ftalato, presente em três das amostras em concentrações suficientes apenas para uma detecção confiável.

5.5 Comparação do método proposto com outros métodos reportados na literatura

O método proposto nesse trabalho foi comparado com outras metodologias reportadas na literatura utilizadas para a determinação de produtos de biotransformação de ftalatos em amostras de urina, conforme está apresentado na Tabela 11. É possível identificar que o método desenvolvido nesse trabalho utiliza menores volumes de amostra de urina em relação aos outros métodos, além de utilizar também baixos volumes de solvente orgânico, contribuindo, desse modo, para a geração de uma baixa quantidade de resíduos.

Outro fator importante de ser analisado é o tempo total de preparo de amostra desde a sua coleta, que também é relativamente menor em comparação aos outros métodos. Enquanto o método desenvolvido é realizado em poucas etapas e grande parte do tempo consumido está nos 5 minutos de centrifugação, resultando em uma boa frequência analítica, enquanto outros métodos demandam um maior número de etapas que podem envolver reações de hidrólise e derivatização. Esse é o caso dos métodos que utilizam GC-MS ou GC-MS/MS como instrumento de separação cromatográfica, podendo levar até mais de 3 horas para o preparo da amostra ser concluído.

Com relação às faixas lineares de trabalho obtidas pelo método desenvolvido nesse trabalho, observa-se que essas são amplas e foram alcançados níveis de concentração relativamente inferiores à boa parte dos métodos apresentados na Tabela 15 para o primeiro ponto das curvas de calibração, como também concentrações superiores para o último ponto da curva em comparação a alguns métodos. Apesar de também terem sido atingidos valor de faixas lineares de trabalho próximos ou com uma abrangência inferior a outros métodos em alguns casos, deve ser levado em consideração o volume de amostra e o instrumento de separação e detecção utilizados em cada método.

Tabela 15. Comparação entre o método proposto e outros previamente reportados na literatura. Todos os estudos utilizaram urina como amostra.

| Analitos | Preparo de amostra | Instrumentação | Volume de urina | Tempo total | Faixa linear ($\mu\text{g.L}^{-1}$) | Referência |
|-----------------------|---------------------------|-----------------------|------------------------|--------------------|---|--|
| MMP, MBP, MBzP e MEHP | DPX | HPLC-DAD | 490 μL | > 5 minutos | 25 – 300 10 – 300 (MBzP) | Esse trabalho WU <i>et al.</i> , 2016 |
| MBzP e MEHP | ANSDM | HPLC-DAD | 1 mL | >12,7 minutos | 2 – 1000 | SARGAZI <i>et al.</i> , 2017 |
| MEHP | in-syringe DLLME | GC-FID | 1 mL | > 15 minutos | 20 – 3000 | CERQUEIRA, 2018 |
| MMP, MBP, MBzP e MEHP | HF-LPME | GC-MS | 1,4 mL | >2,5 horas | Variáveis de 5 – 60 até 40 – 160 | FERNANDEZ <i>et al.</i> , 2017 |
| MMP, MBP, MBzP e MEHP | HF-LPME | GC-MS | 16 mL | > 2,8horas | Variáveis de 20 – 100 até 20 – 1000 | YE <i>et al.</i> , 2020 |
| MBzP e MEHP | Novo tipo de IL-DLLME | HPLC-DAD | 1 mL | > 35,4 minutos | 2 – 500 | ELLIANI <i>et al.</i> , 2020 |
| MBP e MEHP | SPME | GC-MS/MS | 0,5 mL | > 3,17 horas | 1 – 250 e 5 – 250 | |

6 CONCLUSÃO

O método proposto nesse trabalho demonstrou êxito na detecção e quantificação dos respectivos produtos de biotransformação dos ftalatos (monometil ftalato, monobutil ftalato, monobenzil ftalato e mono-(2-etilhexil) ftalato). O tempo total para a execução do preparo de amostra desenvolvido é baixo, cerca de 5 minutos, o que contribui para a frequência analítica do método. A utilização de pequenos volumes de amostra e solventes orgânicos proporciona a geração de uma pequena quantidade de resíduos, o que vai de encontro com os princípios da química analítica verde.

Os parâmetros analíticos de mérito obtidos apresentaram valores aceitos pelas normas de validação, como coeficientes de correlação linear superiores a 0,9904 para todos os analitos estudados, ensaios de recuperação realizados em amostras de urina de duas voluntárias diferentes que apresentaram valores entre 83 e 120%, precisões intradia que variaram de 0,3 a 10,7% e interdia de 9,9 a 15,6%.

De maneira geral, o método proposto foi devidamente otimizado e validado, demonstrando que a utilização da técnica de extração em ponteiras descartáveis (DPX) destacou-se como uma alternativa rápida, simples e eficiente, podendo ser utilizada em análises de rotina. Desse modo, o método desenvolvido tem capacidade para ser utilizado na identificação e quantificação dos analitos estudados como forma de monitoramento da exposição aos seus respectivos ftalatos correspondentes.

7 REFERÊNCIAS

A., Carmalin Sophia; LIMA, Eder C. Removal of emerging contaminants from the environment by adsorption. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, [s.l.], v. 150, p. 1-17, abr. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.12.026>.

AOAC/ Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis: Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. AOAC International: Maryland, 2016.

BARRIOS-ESTRADA, Carlos *et al.* Emergent contaminants: Endocrine disruptors and their laccase-assisted degradation - A review. **Science Of The Total Environment**, [s.l.], v. 612, p. 1516-1531, jan. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.013>.

BILA, Daniele Maia *et al.* Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e conseqüências. **Química Nova**, [s.l.], v. 30, n. 3, p. 651-666, jun. 2007. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422007000300027>.

BOLONG, N. *et al.* A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal. **Desalination**, [s.l.], v. 239, n. 1-3, p. 229-246, abr. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.desal.2008.03.020>.

BORDIN, Dayanne Cristiane Mozaner; ALVES, Marcela Nogueira Rabelo; CAMPOS, Eduardo Geraldo de; MARTINIS, Bruno Spinosa de. Disposable pipette tips extraction: fundamentals, applications and state of the art. **Journal Of Separation Science**, [s.l.], v. 39, n. 6, p. 1168-1172, 25 fev. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jssc.201500932>.

BORDIN, Dayanne Cristiane Mozaner et al. Técnicas de preparo de amostras biológicas com interesse forense. **Scientia Chromatographica**, [s.l.], v. 7, n. 2, p.125-143, 2015.GN1 Genesis Network. <http://dx.doi.org/10.4322/sc.2015.022>.

BORDIN, Dayanne C. Mozaner; ALVES, Marcela N. R.; CABRICES, Oscar G.; CAMPOS, Eduardo G. de; MARTINIS, Bruno Spinosa de. 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, n. 1, p. 31-38, 22 nov. 2013. <https://doi.org/10.1093/jat/bkt092>.

BREWER, William. Disposable pipette extraction. Google Patents, 20 mai. 2003.

CERQUEIRA, Gabriela Dias. **Determinação de plastificantes e seus metabólitos em urina e saliva por HF-LPME-GC/MS para estudos de exposição odontológica.** 2018. 98 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2018. Disponível em: https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/SFSA-AY6NCP/1/disserta__o_gabriela_final_v1.pdf. Acesso em: 17 mar. 2019.

CHAVES, Andréa R. et al. The development of a new disposable pipette extraction phase based on polyaniline composites for the determination of levels of antidepressants in plasma samples. **Journal of Chromatography A**, [s.l.], v. 1399, p. 1-7, 19 jun. 2015. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.04.027>.

CHEMICALIZE. **Calculate properties, search chemical data, and draw molecules online.** Disponível em: <https://chemicalize.com/welcome#/calculation>. Acesso em: 18 jun. 2019.

CHEMSPIDER. **Monomethylphthalate.** Disponível em: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.19207.html?rid=8a5d4ba6-cc9e-4ef0-bdf0-ace62dbecfa0>. Acesso em: 18 jun. 2019.

CHEN, Yi; GUO, Zhenpeng; WANG, Xiaoyu; QIU, Changgui. Sample preparation. **Journal Of Chromatography A**, [s.l.], v. 1184, n. 1-2, p. 191-219, mar. 2008. Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.10.026>.

CORAZZA, Gabriela 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**, [s.l.], v. 1513, p.42-50, set. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2017.07.050>.

CORAZZA, Gabriela; MERIB, Josias; CARMO, Sângela N. do; MENDES, Leila D.; CARASEK, Eduardo. Assessment of a Fully Optimized DPX-Based Procedure for the Multiclass Determination of Pesticides in Drinking Water Using High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection. **Journal of Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 30, n. 6, p. 1211-1221, 23 mai. 2019. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). <http://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20190016>.

ELLIANI, Rosangela *et al.* A rapid method for the quantification of urinary phthalate monoesters: a new strategy for the assessment of the exposure to phthalate ester by solid :phase microextraction with gas chromatography and tandem mass spectrometry. **Journal Of Separation Science**, [s.l.], p. 1-13, 15 jun. 2020. Wiley.<http://dx.doi.org/10.1002/jssc.202000316>.

EPA. **Phthalates**: TEACH Chemical Summary. 25 p., 10 out. 2007. Disponível em:<https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPDF.cgi/P100BNSK.PDF?Dockey=P100BNSK.PDF>. Acesso em: 17 jun. 2020.

ESTILL, Molly; HAUSER, Russ; NASSAN, Feiby L.; MOSS, Alan; KRAWETZ, Stephen A.. The effects of di-butyl phthalate exposure from medications on human sperm RNA among men. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 9, n. 1, p. 1-13, 27 ago. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-48441-5>.

FARAHANI, Abolfazl *et al.* In Tube Ultrasonic and Air Assisted Liquid-Liquid Microextraction-Gas Chromatography-Mass Spectrometry Determination: a novel method for the determination of phthalate esters in aqueous samples. **Journal Of The Brazilian Chemical Society**, [s.l.], v. 28, n. 6, p. 967-974, 2016. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). <http://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20160247>.

FERNANDES, Aline R.; SOUZA, Paulo S. de; OLIVEIRA, Anselmo E. de; CHAVES Andréa R. A New Method for the Determination of Creatinine in Urine Samples Based on Disposable Pipette Extraction. **Journal of Brazilian Chemical Society**, [s.l.], v. 29, n. 4, p. 695-700, 2018. <http://dx.doi.org/http://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20170187>.

FERNANDEZ, Miriany A. Moreira *et al.* Hollow fiber liquid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry method to analyze bisphenol A and other plasticizer metabolites. **Journal Of Chromatography A**, [s.l.], v. 1481, p. 31-36, jan. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2016.12.043>.

FREDERIKSEN, Hanne; SKAKKEBAEK, Niels E.; ANDERSSON, Anna-maria. Metabolism of phthalates in humans. **Molecular Nutrition & Food Research**, [s.l.], v. 51, n. 7, p. 899-911, jul. 2007. Wiley. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200600243>.

FUMES, Bruno Henrique; SILVA, Meire Ribeiro; ANDRADE, Felipe Nascimento; NAZARIO, Carlos Eduardo Domingues; LANÇAS, Fernando Mauro. Recent advances and future trends in new materials for sample preparation. **Trac Trends In Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 71, p. 9-25, set. 2015. Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.011>.

GUAN, Hongxia; BREWER, William E.; GARRIS, Sherry T.; CRAFT, Chanin; MORGAN, Stephen L.. Multiresidue Analysis of Pesticides in Fruits and Vegetables Using Disposable Pipette Extraction (DPX) and Micro-Luke Method†. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [s.l.], v. 58, n. 10, p. 5973-5981, 26 maio 2010. American Chemical Society (ACS). <https://doi.org/10.1021/jf903448w>.

GUAN, Hongxia; BREWER, William E.; GARRIS, Sherry T.; MORGAN, Stephen L.. Disposable pipette extraction for the analysis of pesticides in fruit and vegetables using gas chromatography/mass spectrometry. **Journal Of Chromatography A**, [s.l.], v. 1217, n. 12, p. 1867-1874, mar. 2010. Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.01.047>.

GUAN, Hongxia; BREWER, William E.; MORGAN, Stephen L.; STUFF, John R.; WHITECAVAGE, Jacqueline A.; FOSTER, Fred D.. Automated Multi-Residue Pesticide Analysis in Fruits and Vegetables by Disposable Pipette Extraction (DPX) and Gas Chromatography/Mass Spectrometry. **GERSTEL**, [s.l.], 8 p., 2009. Disponível em: <http://www.gerstel.de/pdf/p-gc-an-2009-01.pdf>.

GUO, Ying; WU, Qian; KANNAN, Kurunthachalam. Phthalate metabolites in urine from China, and implications for human exposures. **Environment International**, [s.l.], v. 37, n. 5, p.893-898, jul. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2011.03.005>.

GOULART, Franciele de Almeida Brehm. **CONTAMINANTES EMERGENTES EM UM PAÍS EMERGENTE**: Estudo de caso no Rio Barigui. 2017. 141 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Ambientais, Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2017. Disponível em: <http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/2862/1/CT_PPGCTA_M_Goulart%2C%20Franciane%20de%20Almeida%20Brehm_2017.pdf>. Acesso em: 06 nov. 2018.

INOSTROZA, Pedro A. *et al.* Chemical activity and distribution of emerging pollutants: insights from a multi-compartment analysis of a freshwater system. **Environmental**

Pollution, [s.l.], v. 231, p. 339-347, dez. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2017.08.015>.

JARDIM, Isabel Cristina Sales Fontes. Extração em fase sólida: Fundamentos teóricos e novas estratégias para preparação de fases sólidas. **Scientia Chromatographica**, [s.l.], v. 2, n.1, p. 13-25, 2010.

JÖNSSON, Bo A.g. et al. Urinary Phthalate Metabolites and Biomarkers of Reproductive Function in Young Men. **Epidemiology**, [s.l.], v. 16, n. 4, p.487-493, jul. 2005. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/01.ede.0000164555.19041.01>.

KARAGEORGOU, Eftichia; SAMANIDOU, Victoria. Youden test application in robustness assays during method validation. **Journal Of Chromatography A**, [S.L.], v. 1353, p. 131-139, ago. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2014.01.050>.

KOO, Hyun Jung; LEE, Byung Mu. ESTIMATED EXPOSURE TO PHTHALATES IN COSMETICS AND RISK ASSESSMENT. **Journal Of Toxicology And Environmental Health, Part A**, [s.l.], v. 67, n. 23-24, p. 1901-1914, dez. 2004. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/15287390490513300>.

LAAKS, Jens; JOCHMANN, Maik A.; SCHMIDT, Torsten C.. Solvent-free microextraction techniques in gas chromatography. **Analytical And Bioanalytical Chemistry**, [s.l.], v. 402, n. 2, p. 565-571, 5 nov. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5511-4>.

LACRUZ, N. de *et al.* Degradation of 32 emergent contaminants by UV and neutral photofenton in domestic wastewater effluent previously treated by activated sludge. **Water Research**, [s.l.], v. 46, n. 6, p. 1947-1957, abr. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2012.01.014>.

LAFARRÉ, Marinel; PÉREZ, Sandra; KANTIANI, Lina; BARCELÓ, Damià. Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment. **Trac Trends In Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 27, n. 11, p. 991-1007, dez. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2008.09.010>.

LAMPEN, Alfonso; ZIMNIK, Susan; NAU, Heinz. Teratogenic phthalate esters and metabolites activate the nuclear receptors PPARs and induce differentiation of F9 cells. **Toxicology And Applied Pharmacology**, [s.l.], v. 188, n. 1, p.14-23, abr. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0041-008x\(03\)00014-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0041-008x(03)00014-0).

LAURIDSEN, Michael; HANSEN, Steen H.; JAROSZEWSKI, Jerzy W.; CORNETT, Claus. Human Urine as Test Material in¹H NMR-Based Metabonomics: recommendations for sample preparation and storage. **Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 79, n. 3, p. 1181-1186, fev. 2007. American Chemical Society (ACS). <https://doi.org/10.1021/ac061354x>.

LEONARDI, F.; VESCHETTI, M.; TONNARINI, S.; CARDELLINI, F.; TREVISI, R.. A step towards accreditation: a robustness test of etching process. **Applied Radiation And Isotopes**, [S.L.], v. 102, p. 93-97, ago. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apradiso.2015.05.002>.

LIANG, Da-wei *et al.* Phthalates biodegradation in the environment. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [s.l.], v. 80, n. 2, p. 183-198, ago. 2008. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-008-1548-5>.

MACHEREY-NAGEL. **SPE columns and cartridges**. Disponível em: <https://www.mn-net.com/chromatography/solid-phase-extraction-spe/spe-columns-information/>. Acesso em: 07 jul. 2020.

MAFRA, Gabriela *et al.* Expanding the applicability of cork as extraction phase for disposable pipette extraction in multiresidue analysis of pharmaceuticals in urine samples. **Journal Of Chromatography B**, [s.l.], v. 1103, n. 10102, p.159-166, dez. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.10.021>.

MAJORS, Ronald E.. New Designs and Formats in Solid-Phase Extraction Sample Preparation. **LC*GC Europe**[s.l.], p. 2-6, dez. 2001.

MARTÍN-POZO, Laura; ALARCÓN-GÓMEZ, Blanca de; RODRÍGUEZ-GÓMEZ, Rocío; GARCÍA-CÓRCOLES, María Teresa; ÇIPA, Morsina; ZAFRA-GÓMEZ, Alberto. Analytical methods for the determination of emerging contaminants in sewage sludge samples. A review. **Talanta**, [s.l.], v. 192, p. 508-533, jan. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2018.09.056>.

MONTAGNER, Cassiana C.; VIDAL, Cristiane; ACAYABA, Raphael. Contaminantes emergentes em matrizes aquáticas do Brasil: cenário atual e aspectos analíticos, ecotoxicológicos e regulatórios. **Química Nova**, [s.l.], p.1094-1110, 11 jul. 2017. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170091>.

MORELLI, Diogo Cherem; MENDES, Leila Dorácio; CARASEK, Eduardo; MADUREIRA, Luiz Augusto Santos. Ultrasound-assisted and disposable pipette extraction for the determination of faecal contaminants in sediment samples by GC-MS. **International Journal Of Environmental Analytical Chemistry**, [s.l.], p. 1-12, 24 jun. 2020. Informa UK Limited.<https://doi.org/10.1080/03067319.2020.1782393>.

NAWAZ, Tabish; SENGUPTA, Sukalyan. Contaminants of Emerging Concern: occurrence, fate, and remediation. **Advances In Water Purification Techniques**, [s.l.], p. 67-114, 2019. Elsevier.<http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-814790-0.00004-1>.

NEFF, Jerry M. *et al.* Bioaccumulation of organic micropollutants from sediments and suspended particulates by aquatic animals. **Fresenius' ZeitschriftFürAnalytischeChemie**, [s.l.], v. 319, n. 2, p. 132-136, jan. 1984. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/bf00584674>.

NOVÁKOVÁ, Lucie; VLČKOVÁ, Hana. A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: chromatography and sample preparation. **Analytica Chimica Acta**, [s.l.], v. 656, n. 1-2, p. 8-35, dez. 2009. Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.10.004>.

LSZOWY, Pawel; BUSZEWSKI, Boguslaw. Urine sample preparation for proteomic analysis. **Journal Of Separation Science**, [s.l.], v. 37, n. 20, p. 2920-2928, 4 set. 2014. Wiley. <https://doi.org/10.1002/jssc.201400331>.

PATTERSON, Tucker A. et al. Concurrent determination of bisphenol A pharmacokinetics in maternal and fetal rhesus monkeys. **Toxicology And Applied Pharmacology**, [s.l.], v. 267, n. 1, p.41-48, fev. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2012.12.006>.

PEIJNENBURG, W.j.g.m..Phthalates. **Encyclopedia Of Ecology**, [s.l.], p. 2733-2738, 2008. Elsevier.<http://dx.doi.org/10.1016/b978-008045405-4.00419-5>.

PINTO, Mônia Ap. Lemos; SOUZA, Israel D.de; QUEIROZ, Maria Eugênia 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**, [s.l.], v. 139, p. 116-124, 30 mai. 2017. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.02.052>.

PINTO, Mônia Aparecida Lemos; QUEIROZ, Maria Eugênia Costa. Extração em ponteiros descartáveis: fundamentos teóricos e aplicações. **Scientia Chromatographica**, [s.l.], v. 7, n. 2, p.101-108, 2015. GN1 Genesis Network.<http://dx.doi.org/10.4322/sc.2015.019>.

RAHMAN, Atta-ur- *et al.* Recent Advances in Analytical Techniques: Volume 1. Sharjah Editora Bentham Science, 2017.

RIBANI, Marcelo; BOTTOLI, Carla Beatriz Grespan; COLLINS, Carol H.; JARDIM, Isabel Cristina Sales Fontes; MELO, Lúcio Flávio Costa. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, [S.L.], v. 27, n. 5, p. 771-780, out. 2004. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422004000500017>.

ROSENFELD, Paul E.; FENG, Lydia G.H. Emerging Contaminants. Risks Of Hazardous Wastes, [s.l.], p. 215-222, 2011. Elsevier.<http://dx.doi.org/10.1016/b978-1-4377-7842-7.00016-7>.

SARGAZI, Shahnaz *et al.* One-step in-syringe dispersive liquid–liquid microextraction and GC-FID determination of trace amounts of di(2-ethylhexyl) phthalate and its metabolite in human urine samples. **Journal Of Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 72, n. 5, p. 557-561, maio 2017. Pleiades Publishing Ltd. <http://dx.doi.org/10.1134/s1061934817050100>.

SAUDE, Erik J.; SYKES, Brian D.. Urine stability for metabolomic studies: effects of preparation and storage. **Metabolomics**, [s.l.], v. 3, n. 1, p. 19-27, 23 jan. 2007. Springer Science and Business Media LLC.<https://doi.org/10.1007/s11306-006-0042-2>.

SIDDIQUE, Shabana; KUBWABO, Cariton; HARRIS, Shelley A..A review of the role of emerging environmental contaminants in the development of breast cancer in women. **Emerging Contaminants**, [s.l.], v. 2, n. 4, p.204-219, dez. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.emcon.2016.12.003>.

SIGMA-ALDRICH. **Styrene-DVB Copolymer**. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/supelco/13390?lang=pt®ion=BR>. Acesso em: 07 jul. 2020.

SMITAL, Tvrtko *et al.* Emerging Contaminants from Industrial and Municipal Waste: acute and chronic effects of emerging contaminants. **The Handbook Of Environmental Chemistry**, [s.l.], v. 5(S/1), p. 105-142, 2008. Springer Berlin Heidelberg. <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-540-74795-6>.

SZULTKA, Malgorzata *et al.* Microextraction sample preparation techniques in biomedical analysis. **Journal Of Separation Science**, [s.l.], v. 37, n. 21, p.3094-3105, 25 set. 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jssc.201400621>.

TLILI, Khawla *et al.* Bioaccumulation of Polybrominated Diphenyl Ethers by the Freshwater Benthic Amphipod *Gammarus pulex*. **Archives Of Environmental Contamination And Toxicology**, [s.l.], v. 63, n. 1, p. 69-76, 26 fev. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00244-012-9751-x>.

VANDENTORREN, Stephanie *et al.* Bisphenol-A and phthalates contamination of urine samples by catheters in the Elfe pilot study: Implications for large-scale biomonitoring studies. **Environmental Research**, [s.l.], v. 111, n. 6, p.761-764, ago. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2011.05.018>.

WANG, Yuan; SHI, Yali; VESTERGREN, Robin; ZHOU, Zhen; LIANG, Yong; CAI, Yaqi. Using hair, nail and urine samples for human exposure assessment of legacy and emerging per- and polyfluoroalkyl substances. **Science Of The Total Environment**, [s.l.], v. 636, p. 383-391, set. 2018. Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.279>.

WARNER, Genoa R; LI, Zhong; HOUDE, Madeline L; ATKINSON, Cassandra e; MELING, Daryl D; CHIANG, Catheryne; A FLAWS, Jodi. Ovarian Metabolism of an Environmentally Relevant Phthalate Mixture. **Toxicological Sciences**, [s.l.], v. 169, n. 1, p. 246-259, 15 fev. 2019. Oxford University Press (OUP). <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfz047>.

WU, Jia *et al.* Optimization of a NH₄PF₆-enhanced, non-organic solvent, dual microextraction method for determination of phthalate metabolites in urine by high performance liquid chromatography. **Journal Of Chromatography B**, [s.l.], v. 1014, p. 1-9, mar. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.01.024>.

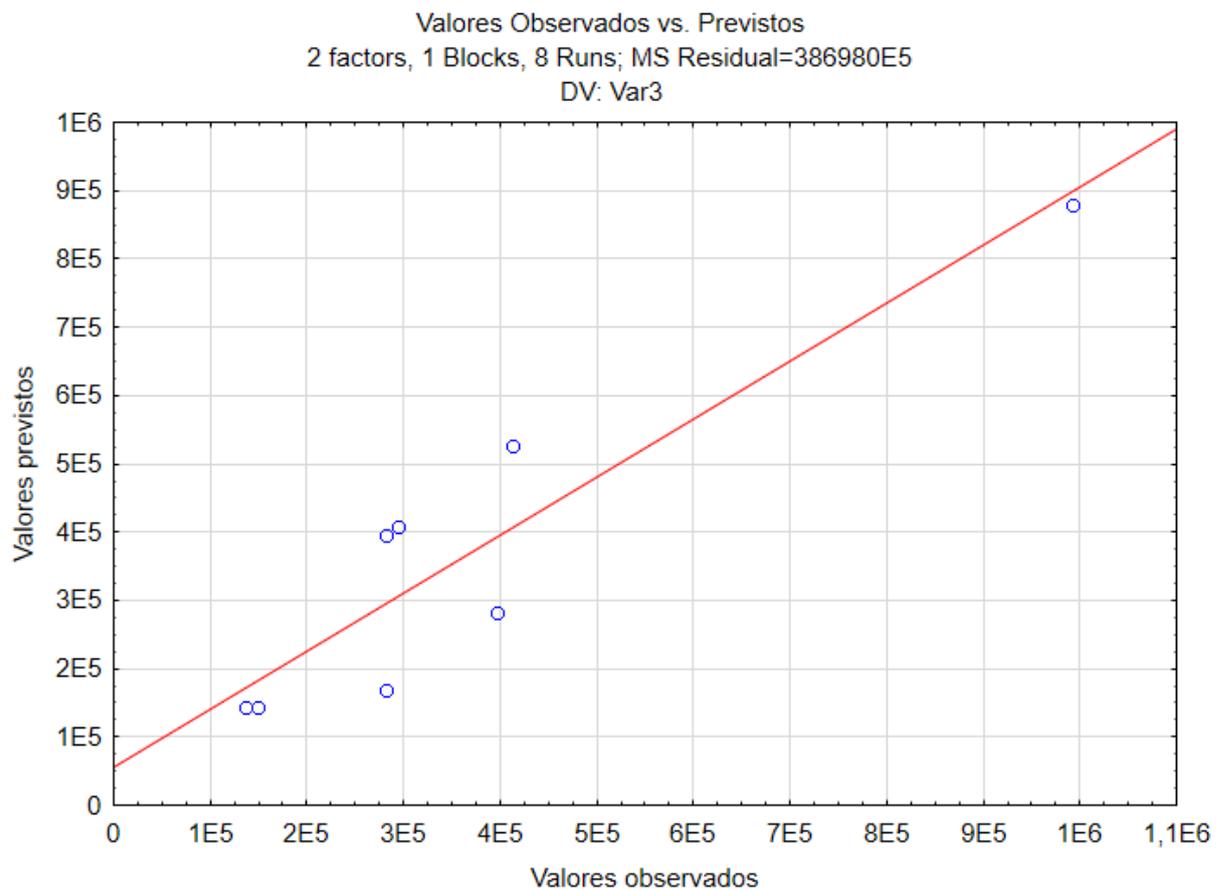
WWF. **Toxic Chemicals.** Disponível em: https://wwf.panda.org/knowledge_hub/teacher_resources/webfieldtrips/toxics/. Acesso em: 08 jun. 2020.

YE, Zhihan *et al.* Determination of Phthalate and Metabolites in Human Urine by Lithium Bis(trifluoromethanesulfonyl)imide-Enhanced Dual Microextraction Method Optimized by Central Composite Design. **Chromatographia**, [s.l.], v. 83, n. 3, p. 397-408, 1 fev. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10337-020-03858-3>.

APÊNDICE A – Tabela ANOVA referente à otimização do número de ciclos e volume de solvente na etapa de dessorção.

| Fator | Soma dos quadrados | Graus de liberdade | Média quadrática | F | p |
|------------------------|---------------------------|--------------------|---------------------------|----------|----------|
| Número de ciclos (L) | 1,757002e ⁺¹¹ | 1 | 1,757002e ⁺¹¹ | 6,810181 | 0,079710 |
| Número de ciclos (Q) | 2,437010e ⁺¹¹ | 1 | 2,437010e ⁺¹¹ | 9,445906 | 0,054416 |
| Volume de solvente (L) | 1,350996 e ⁺¹⁰ | 1 | 1,350996e ⁺¹⁰ | 0,523649 | 0,521610 |
| Volume de solvente (Q) | 1,141711e ⁺¹⁰ | 1 | 1,141711e ⁺¹⁰ | 0,442530 | 0,553476 |
| Erro | 7,739891e ⁺¹⁰ | 3 | 2,579964 e ⁺¹⁰ | | |
| Total | 5,140558 e ⁺¹¹ | 7 | | | |

APÊNDICE B – Gráfico dos valores previstos vs. observados referente à otimização do número de ciclos e volume de solvente na etapa de dessorção.



APÊNDICE C – Tabela ANOVA referente à otimização do número de ciclos e volume de amostra na etapa de extração.

| Fator | Soma dos quadrados | Graus de liberdade | Média quadrática | F | p |
|---------------------------|---------------------------|--------------------|---------------------------|----------|----------|
| (1) Número de ciclos (L) | 1,395060e ⁺¹⁰ | 1 | 1,395060e ⁺¹⁰ | 9,229887 | 0,055952 |
| Número de ciclos (Q) | 2,075369e ⁺⁰⁸ | 1 | 2,075369e ⁺⁰⁸ | 0,137309 | 0,735589 |
| (2) Volume de amostra (L) | 1,427874 e ⁺¹⁰ | 1 | 1,427874 e ⁺¹⁰ | 9,446984 | 0,054409 |
| Volume de amostra (Q) | 3,683274e ⁺⁰⁸ | 1 | 3,683274e ⁺⁰⁸ | 0,243690 | 0,655433 |
| 1L por 2L | 1,523719 e ⁺⁰⁷ | 1 | 1,523719 e ⁺⁰⁷ | 0,010081 | 0,926357 |
| Erro | 4,534380e ⁺⁰⁹ | 3 | 1,511460 e ⁺⁰⁹ | | |
| Total | 3,326362e ⁺¹⁰ | 8 | | | |

APÊNDICE D – Gráfico dos valores previstos vs. observados referente à otimização do número de ciclos e volume de amostra na etapa de extração.

