

Daniela Lopes

**APLICAÇÃO DE MEMBRANA OCA EM UM SISTEMA DE 96-  
WELL PLATE PARA DETERMINAÇÃO DE  
DESREGULADORES ENDÓCRINOS EM ÁGUA POR HPLC.**

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

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Carasek da Rocha

Florianópolis  
2016

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

Lopes, Daniela

Aplicação de membrana oca em um sistema de *96-well plate* para determinação de Desreguladores endócrinos em água por HPLC/Daniela Lopes; orientador, Eduardo Carasek - Florianópolis, SC, 2016.

96 p.

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

Inclui referências

1. Química. 2. Química Analítica. 3. Técnicas de preparo de amostra. 4. Desreguladores endócrinos. 5. Cromatografia líquida. I. Carasek, Eduardo. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

Daniela Lopes

APLICAÇÃO DE MEMBRANA OCA EM UM SISTEMA DE 96-WELL PLATE PARA DETERMINAÇÃO DE DESREGULADORES ENDÓCRINOS EM ÁGUA POR HPLC.

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

Florianópolis, 26 de agosto de 2016.

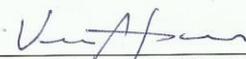
  
Prof., Dr. Vanderlei Gageiro Machado  
Coordenador do Programa

Banca Examinadora:

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

  
Prof., Dr. Gustavo Amadeu Micke  
Universidade Federal de Santa  
Catarina (UFSC)

  
Prof., Dr<sup>a</sup>. Dilma Budziak  
Universidade Federal de Santa Catarina  
(UFSC-Campus Curitibanos)

  
Prof., Dr<sup>a</sup>. Vera Lúcia Azzolin  
Frescura Bascuñan  
Universidade Federal de Santa  
Catarina (UFSC)

  
Prof., Dr. Eduardo Carasek da Rocha  
Orientador  
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)



## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pois ele é o meu socorro bem presente na angústia, me deu a vida e as condições necessárias para que eu chegasse até aqui.

Aos meus pais, que são a minha vida, Laureci e Diná, por todo o apoio, amor e compreensão durante toda essa caminhada. E também aos demais membros da minha família.

Aos irmãos da minha fé, que sempre me desejaram sucesso e me apoiaram da sua maneira, seja orando ou dando uma palavra de incentivo.

A todos os colegas do grupo CROMAAS, que tornam os meus dias mais alegres. Em especial a minha amiga Adriana que sempre me ajuda e me encoraja a realizar minhas tarefas. A todos vocês, muito obrigada!

Ao professor Carasek pela orientação neste trabalho, contribuindo grandemente para a minha formação acadêmica.

A Andressa, Cassiane, Bianca e Christiano que são presentes que a vida e o inglês me trouxeram.

Aos demais colegas e amigos que de uma forma ou de outra contribuíram com esse trabalho.

À Universidade Federal de Santa Catarina, que me permitiu ingressar neste programa de pós-graduação e me tornar mestre em química analítica.

Aos professores desta instituição, que contribuíram imensamente para o meu aprendizado e instrução profissional.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

E à banca, pelas contribuições com este projeto.



## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um método para determinação de seis desreguladores endócrinos (4-nonilfenol, 4-octilfenol, 4-*terc*-octilfenol, metilparabeno, etilparabeno e bisfenol A) empregando-se um sistema de *96-Well plate* associado com a microextração por membrana líquida renovável usando membrana oca e cromatografia líquida de alta eficiência. O sistema de *96-Well plate* permite que o analista realize até 96 extrações simultâneas, o que contribui em muito para uma melhor frequência analítica. Poços de amostragem foram utilizados para a realização da extração e dessorção. Neste estudo, o volume total de amostra em cada poço foi de 1,5 mL enquanto o volume de solvente de dessorção foi de 300  $\mu\text{L}$ . O método proposto mostrou-se muito vantajoso, pois alcançou valores satisfatórios de detecção bem como também ganho de tempo nas análises. Além disso, pode-se citar uma eficiente limpeza da amostra e adequação do método ao instrumento analítico. Primeiramente foi estudada a relevância dos procedimentos com a membrana oca porosa, tais como o uso ou não de recobrimento na membrana, e a utilização ou não de solventes extrator e dispersor na amostra. A melhor condição encontrada foi o uso de recobrimento na membrana e o emprego de solvente extrator junto a amostra. Logo após, foram otimizadas as condições de dessorção. O tempo de dessorção foi avaliado na faixa de 10 a 30 min, sendo que a condição ótima foi de 10 min. O solvente de dessorção também foi estudado e o que obteve uma maior resposta foi a utilização de 75% de acetonitrila e 25% de água. O melhor solvente de recobrimento da membrana foi a mistura de 50% de 1-octanol e 50% de hexano. Dentre os solventes extratores avaliados, o hexano apresentou um melhor resultado. A faixa de pH estudada variou de 4 a 6, sendo 5 o pH ótimo para a extração. Por fim, foi realizado um planejamento de composto central para analisar o efeito da força iônica (adição de sal), volume de solvente extrator e tempo de extração sobre a eficiência de extração. As condições ótimas foram a não adição de sal (NaCl), 15  $\mu\text{L}$  de solvente extrator e o emprego de 45 min de extração. A partir dos resultados obtidos foram realizadas curvas de calibração para a obtenção dos parâmetros analíticos de mérito. Os limites de quantificação variaram de 0,5 a 15  $\mu\text{g L}^{-1}$ . A HFRLM combinada com o sistema de *96-Well plate* foi aplicada em amostra de água e foram obtidas recuperações entre 72 e 130% com RSD variando de 1 a 14,3%. Deste modo, a técnica mostrou boa sensibilidade e aplicabilidade para a

determinação de parabenos, bisfenol A e alquilfenóis em amostras aquosas.

Palavras chaves: Desreguladores endócrinos, HFRLM, 96-Well plate, amostras de água.

## ABSTRACT

The present work aims to determine six endocrine disruptors (4-nonylphenol, 4-octylphenol, 4-terc-octylphenol, methylparaben, ethylparaben and bisphenol A) employing the 96-Well plate system associated with hollow fiber renewal liquid membrane and high-performance liquid chromatography. The 96-Well plate allows to the analyst to perform up to 96 simultaneous extractions, which increases considerably the analytical frequency. Sampling wells were used to perform the extraction and desorption. In this study, the total volume in each well was 1.5 mL while the volume of desorption solvent was 300  $\mu$ L. The proposed method exhibited very advantageous for the reason that good analytical performance was achieved and analysis time was saved. Furthermore, an efficient clean-up of the sample and suitability of the method to the analytical instrument can be mentioned. Firstly, it was studied the relevance of the techniques, such as the use of recoating on the membrane and the use of extractor and disperser solvents. The best conditions achieved were the use of recoating on the membrane and the use of extractor solvent. After that, liquid desorption conditions were optimized, being the time between 10 and 30 min evaluated and the time of 10 min was chosen. The desorption solvent was also studied and it was obtained a greater response using 75% of acetonitrile and 25% of water. The best recoating solvent on the membrane was a mixture of 50% of 1-octanol and 50% hexane. Among the extractor solvents evaluated the hexane showed the best result. The pH of the sample was also investigated in the range of 4 to 6, being 5 the optimal pH. Finally, it was made a central compound planning to study the ionic strength, extractor solvent volume and extraction time. The optimal conditions were not adding salt, 15  $\mu$ L of extractor solvent and 45 min of extraction. From these results it was prepared calibration curves to each analyte to obtain the statistical parameters and analytical figures of merit. The limit of quantification varied from 0.5 to 15  $\mu$ g L<sup>-1</sup>. The HFRLM combined with the 96-Well plate was applied in water samples and recuperation from 72 to 130% were achieved with errors between 1 to 14,3%. Thus, this technique shows good sensibility and applicability to determination of parabens, bisphenol A and alkylphenols in aqueous samples.

*Key words:* endocrine disruptors, HFRLM, 96-Well plate, water samples.



## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1</b> – Sistema endócrino.....   | 25 |
| <b>Figura 2</b> – Disfunções endócrinas: a) resposta natural, b) efeito agonista, c) efeito antagonista. ....  | 26 |
| <b>Figura 3</b> – Estrutura e distribuição das espécies do Metilparabeno (MP) .....  | 30 |
| <b>Figura 4</b> – Estrutura e distribuição das espécies do Etilparabeno (EP) .....   | 31 |
| <b>Figura 5</b> – Estrutura e distribuição das espécies do Bisfenol A (BFA) .....  | 32 |
| <b>Figura 6</b> – Estrutura e distribuição das espécies do 4- <i>t</i> -Octilfenol (4- <i>t</i> -OF) .....   | 33 |
| <b>Figura 7</b> – Estrutura e distribuição das espécies do 4-Octilfenol (4-OF) .....   | 34 |
| <b>Figura 8</b> – Estrutura e distribuição das espécies do 4-Nonilfenol (4-NF) .....   | 35 |
| <b>Figura 9</b> – Formas básicas da HF-LPME (a) Três fases (b) Duas fases. ....  | 39 |
| <b>Figura 10</b> – Configurações da HF-LPME (a) Tipo U (b) Tipo haste. ...   | 40 |
| <b>Figura 11</b> – Etapas de Amostragem em SDME. (1) agulha perfura o septo do frasco amostrador, (2) a gota é exposta diretamente na matriz da amostra e os analitos são sorvidos, (3) a gota é retraída para dentro da seringa e o extrato é injetado no instrumento analítico. ....   | 42 |
| <b>Figura 12</b> – Modos da SDME (a) Headspace (b) Imersão direta. ....  | 43 |
| <b>Figura 13</b> – Esquema representativo da injeção da mistura de solventes extrator e dispersor. ....  | 44 |
| <b>Figura 14</b> – Esquema representativo da etapa de centrifugação.....   | 45 |
| <b>Figura 15</b> – Fotografia dos diferentes passos da DLLME: (a) antes da injeção da mistura de solvente dispersor (acetona) e de solvente extrator (C <sub>2</sub> Cl <sub>4</sub> ) na amostra, (b) início da injeção, (c) final de injeção, (d) fotografia do microscópio óptico, a magnitude 1000 (que mostra as partículas finas de C <sub>2</sub> Cl <sub>4</sub> em estado turvo), (e) depois da centrifugação e (f) vista ampliada de fase sedimentada (5,0 ± 0.2 µL). .... | 46 |
| <b>Figura 16</b> – (a) Dispositivo de 96- <i>blade</i> SPME recoberto com MWCNTs-COOH/PDMS (b) sistema manual 96- <i>blade</i> SPME (A)  |    |

|  |    |
|--|----|
| incluindo o dispositivo de 96- <i>blade</i> (B) placa de 96 poços (C) agitador orbital.....  | 49 |
| <b>Figura 17</b> – Modificações do sistema de 96- <i>well plate</i> .....  | 50 |
| <b>Figura 18</b> – Preparação das membranas ocas e sistema de 96- <i>well plate</i> .<br>.....   | 55 |
| <b>Figura 19</b> – Etapas de extração e dessorção.....   | 56 |
| <b>Figura 20</b> – Cromatograma obtido pela injeção direta no cromatógrafo líquido da mistura contendo os analitos (8 mg L <sup>-1</sup> ). Analitos: MP (t <sub>R</sub> = 17,91 min), EP (t <sub>R</sub> = 20,72 min), BFA (t <sub>R</sub> = 23,31 min), 4- <i>t</i> -OF (t <sub>R</sub> = 33,76 min), 4-OF (t <sub>R</sub> = 36,17 min) e 4-NF (t <sub>R</sub> = 37,97 min).....   | 59 |
| <b>Figura 21</b> – Cromatograma obtido pela injeção direta no cromatógrafo líquido da mistura contendo os analitos (8 mg L <sup>-1</sup> ). Analitos: MP (t <sub>R</sub> = 5,96 min), EP (t <sub>R</sub> = 7,69 min), BFA (t <sub>R</sub> = 11,94 min), 4- <i>t</i> -OF (t <sub>R</sub> = 19,05 min), 4-OF (t <sub>R</sub> = 20,73 min) e 4-NF (t <sub>R</sub> = 22,13 min).....   | 60 |
| <b>Figura 22</b> – Cromatograma obtido pela injeção direta no cromatógrafo líquido da mistura contendo os analitos (8 mg L <sup>-1</sup> ). Analitos : MP (t <sub>R</sub> = 4,36 min), EP (t <sub>R</sub> = 5,18 min), BFA (t <sub>R</sub> = 6,13 min), 4- <i>t</i> -OF (t <sub>R</sub> = 16,47 min), 4-OF (t <sub>R</sub> = 19,08 min) e 4-NF (t <sub>R</sub> = 21,56 min).....   | 61 |
| <b>Figura 23</b> – Cromatogramas obtidos após a extração pelo sistema de 96- <i>well plate</i> combinado com a HFRLM nas condições iniciais fixadas (condições não otimizadas)* com analitos a 240 µg L <sup>-1</sup> . Analitos: MP (t <sub>R</sub> = 4,36 min), EP (t <sub>R</sub> = 5,18 min), BFA (t <sub>R</sub> = 6,13 min), 4- <i>t</i> -OF (t <sub>R</sub> = 16,47 min), 4-OF (t <sub>R</sub> = 19,08 min) e 4-NF (t <sub>R</sub> = 21,56 min). (A) com detector de arranjo de diodos (DAD) (B) com detector de fluorescência (FLD). ..... | 62 |
| <b>Figura 24</b> – Comparação da eficiência de extração. ....  | 63 |
| <b>Figura 25</b> – Escolha do tempo de dessorção. ....   | 65 |
| <b>Figura 26</b> – Superfície triangular com r <sup>2</sup> = 0,8450 para otimização do(s) solvente(s) para dessorção líquida. ....  | 67 |
| <b>Figura 27</b> – Superfície triangular com r <sup>2</sup> = 0,9071 para otimização do(s) solvente(s) para recobrimento da membrana. ....   | 69 |
| <b>Figura 28</b> – Superfície triangular com r <sup>2</sup> = 0,9436 para otimização do(s) solvente(s) extrator.....   | 71 |
| <b>Figura 29</b> – Escolha do pH da amostra. ....  | 72 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 30</b> – Superfície de resposta obtida tempo versus % de sal ( $r^2 = 0,8447$ ) na extração dos parabenos, bisfenol A e alquilfenóis por HFRLM combinada com o sistema 96-well plate. ....                       | 75 |
| <b>Figura 31</b> – Superfície de resposta obtida tempo versus volume de solvente extrator ( $r^2 = 0,8447$ ) na extração dos parabenos, bisfenol A e alquilfenóis por HFRLM combinada com o sistema 96-well plate. ....    | 76 |
| <b>Figura 32</b> – Superfície de resposta obtida volume de solvente extrator versus % de sal ( $r^2 = 0,8447$ ) na extração dos parabenos, bisfenol A e alquilfenóis por HFRLM combinada com o sistema 96-well plate. .... | 77 |
| <b>Figura 33</b> – Localização dos poços do sistema de 96-Well plate. ....   | 79 |



## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1</b> – Valores de pKa e log P para os analitos estudados.....  | 29 |
| <b>Tabela 2</b> – Experimentos da superfície triangular para escolha do(s) solvente(s) na etapa de dessorção líquida.....   | 66 |
| <b>Tabela 3</b> – Experimentos da superfície triangular para escolha do(s) solvente(s) para o recobrimento da membrana.....   | 68 |
| <b>Tabela 4</b> – Experimentos da superfície triangular para escolha do(s) solvente(s) extrator.....  | 70 |
| <b>Tabela 5</b> – Planejamento do Composto Central para a otimização da quantidade de sal, volume de solvente extrator (hexano) e tempo de extração.....  | 74 |
| <b>Tabela 6</b> – Estudo da precisão da localização dos poços.....  | 79 |
| <b>Tabela 7</b> – Faixa linear, coeficiente de correlação, limites de detecção e quantificação obtidos para o método proposto HFRLM combinada com o sistema 96-Well plate para determinar parabenos, bisfenol A e alquilfenóis em amostra aquosa..... | 81 |
| <b>Tabela 8</b> – Comparação de trabalhos descritos na literatura com o método proposto HFRLM combinada com o sistema 96-Well plate. ...  | 82 |
| <b>Tabela 9</b> – Ensaio de recuperação (R%) e precisão (RSD %) usando o método proposto HFRLM combinada com o sistema 96-Well plate. ...   | 84 |



## LISTA DE ABREVIATURAS

- BA $\mu$ E - Microextração adsortiva em barra (do inglês *Bar Adsorptive Microextraction*)
- CE – Eletroforese capilar (do inglês “*Capillary Electrophoresis*”)
- CPE – Extração em ponto nuvem (do inglês “*Cloud Point Extraction*”)
- DAD – Detector por Arranjo de Diodos (do inglês “*Diode Array Detection*”)
- DLLME – Microextração líquido-líquido dispersiva (do inglês “*Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*”)
- ELM – Membrana líquida de emulsão (do inglês “*Emulsion Liquid Membrane*”)
- FID – Detector por ionização em chama (do inglês “*Flame Ionization Detector*”)
- FLD – Detector de fluorescência (do inglês “*Fluorescence Detector*”)
- GC – Cromatografia Gasosa (do inglês “*Gas Chromatography*”)
- HF-LPME – Microextração em fase líquida suportada com fibra oca (do inglês “*Hollow-fiber Liquid-Phase Microextraction*”)
- HF-MMLLE – Extração líquido-líquido utilizando membrana oca microporosa (do inglês “*Hollow fiber microporous liquid-liquid extraction*”)
- HFRLM - Microextração por membrana líquida renovável usando membrana oca/porosa (do inglês “*Hollow fiber renewable liquid membrane*”)
- HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês “*High-Performance Liquid Chromatography*”)
- MASE – Membrana assistida por solvente (do inglês “*Membrane Assisted Solvent Extraction*”)
- NACE – Eletroforese capilar em solução não-aquosa (do inglês “*non-aqueous capillary electrophoresis*”)
- LOD – Limite de detecção (do inglês “*Limit of detection*”)
- LOQ – Limite de quantificação (do inglês “*Limit of quantification*”)
- LVSS – Stacking com injeção de grande volume (do inglês “*large volume sample stacking*”)
- R(%) – Ensaios de recuperação
- RSD(%) – Desvio Padrão Relativo (do inglês “*Relative Standard Deviation*”)
- SBSE - Extração Sortiva em Barra de Agitação (do inglês “*Stir Bar Sorptive Extraction*”)
- SDME – Microextração em gota única (do inglês “*Single-Drop Microextraction*”)

SLM – Membrana de líquida suportada (do inglês “*Supported Liquid Membrane*”)

SPME - Microextração em fase sólida (do inglês “*solid phase microextraction*”)

UV – Ultravioleta (do inglês “*ultraviolet*”)

## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>   | <b>21</b> |
| <b>2. REVISÃO DA LITERATURA .....</b>   | <b>23</b> |
| 2.1. ÁGUA .....   | 23        |
| 2.2. DESREGULADORES ENDÓCRINOS .....  | 23        |
| 2.3. SISTEMA ENDÓCRINO.....   | 24        |
| 2.4. DESREGULADORES ENDÓCRINOS – MECANISMOS<br>DE AÇÃO .....  | 25        |
| 2.5. DESREGULADORES ENDÓCRINOS – MEIOS DE<br>EXPOSIÇÃO E O MEIO AMBIENTE.....                           | 27        |
| 2.6. OS ANALITOS .....  | 28        |
| 2.7. PREPARO DE AMOSTRA.....  | 35        |
| 2.7.1. <i>Microextração em fase líquida suportada com fibra oca<br/>        (HF-LPME).....</i>          | <i>37</i> |
| 2.7.2. <i>Microextração com gota única (SDME).....</i>  | <i>41</i> |
| 2.7.3. <i>Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME).....</i>                                     | <i>43</i> |
| 2.7.4. <i>Microextração por membrana líquida renovável usando<br/>        membrana oca (HFRLM).....</i> | <i>47</i> |
| 2.7.4. <i>Sistema de extração 96-well plate .....</i>   | <i>48</i> |
| <b>3. OBJETIVOS.....</b>  | <b>51</b> |
| 3.1. OBJETIVO GERAL.....  | 51        |
| 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....  | 51        |
| <b>4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....</b>  | <b>53</b> |
| 4.1. REAGENTES QUÍMICOS E MATERIAIS.....  | 53        |
| 4.2. INSTRUMENTAÇÃO .....   | 53        |
| 4.3. PREPARO DAS MEMBRANAS DE POLIPROPILENO E<br>SISTEMA DE 96-WELL PLATE.....                          | 54        |
| 4.4. OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA DE 96-WELL PLATE<br>COMBINADO COM A HFRLM.....                               | 55        |
| 4.5. PREPARO DA AMOSTRA OTIMIZADO .....   | 56        |
| 4.6. DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS ANALÍTICOS DE<br>MÉRITO DO MÉTODO E APLICAÇÃO DO MESMO .....           | 57        |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>  | <b>59</b> |
| 5.1. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS .....   | 59        |
| 5.2. COMPARAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE EXTRAÇÃO .....                                      | 63        |
| 5.3. CONDIÇÕES DE DESSORÇÃO .....  | 64        |
| 5.4. SOLVENTE DE RECOBRIMENTO DA MEMBRANA ....                                       | 67        |
| 5.5. SOLVENTE EXTRATOR .....   | 70        |
| 5.6. PH DA AMOSTRA .....   | 71        |
| 5.7. TEMPO DE EXTRAÇÃO, EFEITO DA FORÇA IÔNICA E<br>VOLUME DE SOLVENTE EXTRATOR..... | 73        |
| 5.8. REPRODUTIBILIDADE DOS POÇOS .....   | 78        |
| 5.9. PARÂMETROS ANALÍTICOS DE MÉRITO E ANÁLISE<br>DAS AMOSTRAS.....                  | 80        |
| <b>6. CONCLUSÕES.....</b>  | <b>85</b> |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>   | <b>87</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

A água tem um papel fundamental para a sobrevivência da vida no planeta. Apesar da sua importância, esta vem sendo utilizada de forma indiscriminada. Juntamente com o aumento da população e das indústrias, a poluição dos recursos hídricos tomou grandes proporções (BACCI; PATAÇA, 2008).

Muitos contaminantes são persistentes e permanecem presentes na água mesmo após o processo de tratamento. Os desregulados endócrinos são exemplos desses contaminantes (OTOMO, 2010; GHISELLI, 2006; TANKIEWICZ; FENIK; BIZIUK, 2011). Estes interferentes hormonais podem afetar o sistema endócrino de diversas maneiras e ocasionar danos à saúde. Como estes contaminantes se encontram em concentração a nível traço em águas, um preparo de amostra é requerido para realizar a análise dos mesmos (GHISELLI; JARDIM, 2007; BILA; DEZOTTI, 2007).

O preparo da amostra é uma etapa essencial para o sucesso analítico do método, pois é nesta parte que ocorre a remoção de possíveis interferentes, os analitos são pré-concentrados e a amostra é adequada ao instrumento analítico (OLIVEIRA, *et al.*, 2008; DIONÍSIO, *et al.*, 2010).

Atualmente, cada vez mais se tem buscado empregar técnicas que sejam ambientalmente amigáveis, ou seja, que adotem pequenas quantidades de solvente ou nenhuma, o uso de solventes menos tóxicos e agressivos, entre outras características (BERTON, *et al.*, 2016).

Neste contexto, destacam-se as técnicas de microextração por atender a esses aspectos. Podem ser citadas: a SPME (microextração em fase sólida), a HFRLM (microextração por membrana líquida renovável usando membrana oca) e a DLLME (microextração líquido-líquido dispersiva). Estas técnicas podem ainda ser automatizadas como, por exemplo, a SPME. Além do sistema tradicional automático de amostragem/injeção a SPME tem sido usada com o sistema de 96-Well plate (BIDDLECOMBE; BENEVIDES; PLEASANCE, 2001).

O sistema de 96-Well plate é uma poderosa ferramenta de análise, podendo-se realizar até 96 extrações de forma simultânea, fornecendo um altíssimo ganho no tempo de trabalho e frequência analítica (BIDDLECOMBE; BENEVIDES; PLEASANCE, 2001). Neste estudo pela primeira vez esse sistema será associado com a HFRLM.

A HFRLM apresenta-se como um método atraente por exibir vantagens sobre as técnicas convencionais que utilizam membrana. Isto devido à quantidade de solvente extra que é adicionado na amostra, fazendo com que a camada fina de solvente impregnada nos poros da membrana permaneça sempre renovada (CARASEK; MERIB, 2015; HE, *et al.*, 2016).

Desta maneira, o propósito geral deste estudo foi o desenvolvimento de um método que combina as técnicas de HFRLM e 96-Well plate para a determinação de parabenos, bisfenol A e alquilfenóis em amostras aquosas.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. ÁGUA

A água é de vital importância para a manutenção da vida humana, como também para a fauna e a flora. Os recursos hídricos são utilizados de diversas formas pelo homem, como por exemplo, na agricultura, indústria e geração de energia elétrica. A água pode ser encontrada em diferentes estados físicos e é abundante na natureza, mas apesar disso, a água que é considerada própria para consumo apresenta-se em uma porcentagem baixíssima, o que aumenta ainda mais a preocupação com a qualidade da mesma (OTOMO, 2010; GHISELLI, 2006; TANKIEWICZ; FENIK; BIZIUK, 2011).

A qualidade da água também é um assunto de saúde pública, uma vez que, a não potabilidade da mesma acaba acarretando doenças. Pesquisas vêm mostrando que um índice altíssimo de atendimentos em unidades de saúde é devido à utilização de água inapropriada para consumo (MERTEN; MINELLA, 2002; MEDEIROS; LIMA; GUIMARÃES, 2016).

O crescimento populacional e industrial afetou ainda mais a questão hídrica. Além do uso do corpo hídrico para o fornecimento de água, o mesmo também atua como receptor de efluentes. Esses efluentes, tanto domésticos quanto industriais, muitas vezes não passam por um tratamento adequado (OTOMO, 2010; GHISELLI, 2006).

Com os avanços nos diversos setores da indústria, houve uma grande expansão no emprego de produtos químicos, desde agrotóxicos até produtos de higiene pessoal. O que acaba ocasionando o aumento de micropoluentes, que muitas vezes não são totalmente biodegradados durante o tratamento da água. Uma classe de compostos que se enquadra nesses aspectos são os desreguladores endócrinos (OTOMO, 2010; GHISELLI, 2006; TANKIEWICZ; FENIK; BIZIUK, 2011).

### 2.2. DESREGULADORES ENDÓCRINOS

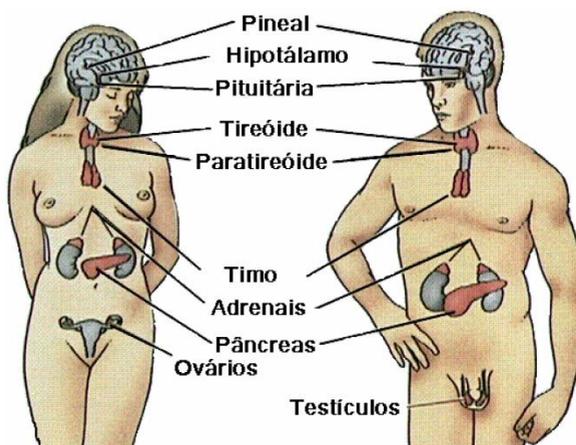
O termo desreguladores endócrinos origina-se do “endocrine disrupting chemicals”, podendo ainda ter outras traduções, tais como, interferentes endócrinos, disruptores endócrinos, perturbadores endócrinos e interferentes hormonais (BILA; DEZOTTI, 2007). Os

desreguladores endócrinos foram conceituados pela Comissão Europeia em 1996, como sendo substâncias exógenas que fomentam efeitos prejudiciais para um organismo intacto e suas futuras gerações, devido a alterações no sistema endócrino (BALEST, *et al.*, 2008; ZAFRA-GÓMEZ, *et al.*, 2008). Os desreguladores endócrinos em sua grande maioria são derivados de compostos químicos sintéticos, chamados de *xenoestrogênios*. Eles também podem ser de origem natural, os *fitoestrogênios*, que estão presentes em plantas, como por exemplo, as isoflavonas da soja (GHISELLI, 2006; RAIMUNDO, 2007; CASTRO-CORREIA; FONTOURA, 2015; HAMPL; KUBATOVA; STARKA, 2016).

A exposição de homens e animais a esses compostos pode ocasionar doenças como: câncer, disfunção no sistema reprodutor e imunológico, problemas na tireóide e no sistema neurológico, entre outros (GHISELLI; JARDIM, 2007; BILA; DEZOTTI, 2007). Os desreguladores endócrinos podem modificar o sistema endócrino das seguintes formas: permutando, impedindo e alterando os níveis e as ações hormonais, ou seja, causando confusões e desorganizações nas mensagens hormonais (GHISELLI; JARDIM, 2007, SANTAMARTA, 2001).

### 2.3. SISTEMA ENDÓCRINO

Na maioria dos animais, tanto vertebrados como invertebrados, as suas funções corporais são controladas pelas glândulas do sistema endócrino (figura 1) juntamente com o sistema nervoso. Essas glândulas estão presentes em diversas partes do corpo e liberam hormônios (mensageiros químicos) que são diretamente lançados na circulação sanguínea (OTOMO, 2010; GHISELLI, 2006; NOGUEIRA, 2003; MORGAN; TSAI, 2015).

**Figura 1** – Sistema endócrino.

Fonte: Adaptado de Raimundo (2007)

Os hormônios regulam várias funções, tais como, níveis de açúcares, água e sais no sangue, temperatura, sistema digestivo, sistema reprodutivo, entre outros. O sistema reprodutivo (ovários e testículos) é um dos mais afetados pelos desreguladores endócrinos, e por isso são muitas as pesquisas relacionadas a esse tema (OTOMO, 2010; GHISELLI, 2006; NOGUEIRA, 2003).

Produzir óvulos e expelir os mesmos durante a menstruação representam algumas das funções dos ovários. Hormônios sexuais também são produzidos pelos ovários, influenciando na gravidez, menstruação e ovulação. Além disso, esses hormônios são encarregados do desenvolvimento das características sexuais femininas (OTOMO, 2010; GHISELLI, 2006).

Nos testículos ocorre a produção de hormônios sexuais e espermatozoides. Esses hormônios são responsáveis pela regulação da produção dos espermatozoides e também pelo desenvolvimento de características sexuais secundárias (OTOMO, 2010; GHISELLI, 2006).

#### 2.4. DESREGULADORES ENDÓCRINOS – MECANISMOS DE AÇÃO

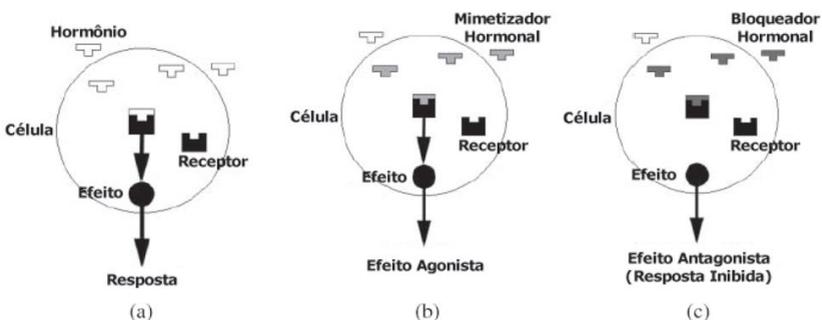
Os hormônios ligam-se a receptores específicos, e estes por sua vez produzirão uma resposta (NOGUEIRA, 2003). Os receptores são muito sensíveis e já apresentam uma resposta, mesmo em pequenas concentrações de hormônio (GHISELLI, 2006).

Os desreguladores endócrinos possuem uma estrutura semelhante à de muitos hormônios e são capazes de exibir funções similares apesar de encontrar-se em concentrações baixíssimas (SCHUG, *et al.*, 2011).

A função dos hormônios pode ser afetada de alguma forma pelos desreguladores endócrinos, isto devido à grande similaridade em suas características, e acarretando desta maneira diversos prejuízos tanto à saúde humana quanto à vida de outros seres vivos. Alguns dos mecanismos pelos quais esses processos podem ocorrer são através da mimetização ou inibição (KABIR; RAHMAN; RAHMAN, 2015).

O efeito agonista ocorre quando os desreguladores endócrinos imitam a função dos hormônios, ou seja, mimetizam os mesmos e produzem uma resposta. Por outro lado, quando nenhuma resposta é obtida o efeito é chamado de antagonista e os desreguladores endócrinos bloqueiam a interação hormônio – receptor, assim atuando como um inibidor (GHISELLI, 2006; KABIR; RAHMAN; RAHMAN, 2015). Na figura 2 estão representados os efeitos citados anteriormente.

**Figura 2** – Disfunções endócrinas: a) resposta natural, b) efeito agonista, c) efeito antagonista.



Fonte: Adaptado de Ghiselli; Jardim (2007)

Os desreguladores endócrinos ainda podem interferir na síntese e eliminação de hormônios, entre outros processos (GHISELLI, 2006; NOGUEIRA, 2003).

## 2.5. DESREGULADORES ENDÓCRINOS – MEIOS DE EXPOSIÇÃO E O MEIO AMBIENTE

Diversas são as maneiras pelas quais pode ocorrer a exposição aos interferentes hormonais. A alimentação é uma dessas formas, pois grande parte da classe dos desreguladores endócrinos é praticamente insolúvel em água e apresentam caráter lipofílico, assim acumulando-se na gordura, tais como nos peixes por exemplo. Neste contexto, enquadram-se os agrotóxicos e outros meios que de algum modo afetam os alimentos. Outras contaminações podem decorrer através da inalação, contato com a pele, ingestão de água, etc. (CASTRO-CORREIA; FONTOURA, 2015; BILA; DEZOTTI, 2007; REIS FILHO; LUVIZOTTO-SANTOS; VIEIRA, 2007).

A fonte prioritária de contaminação da água por desreguladores endócrinos dar-se-á através dos efluentes industriais e domésticos. Esses compostos muitas vezes não são completamente degradados durante o processo de tratamento, como por exemplo, o bisfenol A, octilfenol e nonilfenol. Assim ocorrendo à propagação destes no meio hídrico e causando vários efeitos adversos para os sistemas aquáticos, homens e animais (BILA; DEZOTTI, 2007; REIS FILHO; LUVIZOTTO-SANTOS; VIEIRA, 2007).

Desta maneira, possui-se uma imensa preocupação com a concentração dos desreguladores endócrinos em água. Alguns desreguladores endócrinos são amplamente encontrados em produtos de uso diário, como por exemplo, produtos de higiene pessoal, detergentes, etc. Estes podem ser inseridos no ambiente aquático por diversas maneiras, tais como, lavar louça, tomar banho, natação, águas residuais, entre outros (ZHANG; LEE, 2012; BENEDÉ, *et al.*, 2016).

Muitos são os compostos pertencentes a classe de desreguladores endócrinos, dentre eles podem ser destacados os alquilfenóis, parabenos, fármacos, bisfenóis, estrogênios, entre outros (BALEST, *et al.*, 2008; GORGA, *et al.*, 2014). No Brasil, nenhuma legislação é apresentada a respeito da quantidade máxima permitida desses compostos no sistema hídrico. Na legislação Europeia, alguns desreguladores endócrinos já possuem esses valores, tais como,  $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $0,3 \mu\text{g L}^{-1}$  para octilfenóis e nonilfenóis, respectivamente.

Neste projeto foram estudados três alquilfenóis (4-nonilfenol, 4-octilfenol, 4-*terc*-octilfenol), dois parabenos (metilparabeno, etilparabeno) e um bisfenol (bisfenol A).

## 2.6. OS ANALITOS

Os parabenos são ésteres derivados do ácido 4-hidroxibenzóico. Eles são largamente aplicados como bacteriostáticos em cosméticos, e também são encontrados nos setores farmacêuticos, produtos de higiene pessoal, etc. Estudos vêm mostrando que em altas concentrações os parabenos induzem a ocorrência de dermatite alérgica. Esses compostos também estão sendo associados à incidência de câncer de mama, pois se relatou a presença de parabenos na faixa de concentração de  $20,6 \pm 4,2$  ng g<sup>-1</sup> em 20 tumores de mama humano. Tendo como base algumas pesquisas, estima-se que a exposição total a parabenos é de  $1,3$  mg (kg de peso corporal)<sup>-1</sup> ou  $76$  mg dia<sup>-1</sup>, em que  $50$  mg dia<sup>-1</sup> seria proveniente de produtos de cuidado pessoal,  $25$  mg dia<sup>-1</sup> referente a fármacos e  $1$  mg dia<sup>-1</sup> por alimentos (ZHANG, *et al.*, 2005; LIAO; CHEN; KANNAN, 2013; MARTINS, *et al.*, 2011).

O bisfenol A (BFA) é amplamente utilizado na indústria, principalmente na produção de resinas epóxi e de plásticos (como garrafas para bebidas, mamadeiras e embalagens de alimentos). Com o aumento da temperatura e a presença de compostos básicos ou ácido, a hidrólise dos polímeros correspondentes é acelerada liberando o bisfenol A, o que acaba ocasionando a contaminação de alimentos ou bebidas, além dos prejuízos ambientais. A exposição humana ao BFA pode causar problemas como infertilidade, obesidade, câncer no sistema reprodutor, transtorno comportamental, entre outros (CUNHA; FERNANDES, 2010; CUNHA; FERNANDES, 2013; ZHANG, *et al.*, 2015).

Os alquilfenóis são agentes tensoativos não-iônicos, extensamente empregados no setor industrial, como emulsionantes em praguicidas e são predominantemente utilizados na fabricação de detergentes e conseqüentemente são produtos de degradação dos mesmos. Geralmente no tratamento de esgoto e também no meio ambiente os alquilfenóis são degradados a cadeias menores e mais resistentes como nonilfenol e octilfenol. Os alquilfenóis interferem no sistema endócrino e podem atuar no lugar de hormônios naturais, acarretando prejuízos ao sistema reprodutor, eles também são muito

persistentes e bioacumulativos. Além de serem danosos ao homem, esses analitos podem ser perigosos para diversas espécies de animais (VILLAR-NAVARRO, *et al.*, 2013; LIN, *et al.*, 2009; ESPEJO, *et al.*, 2002).

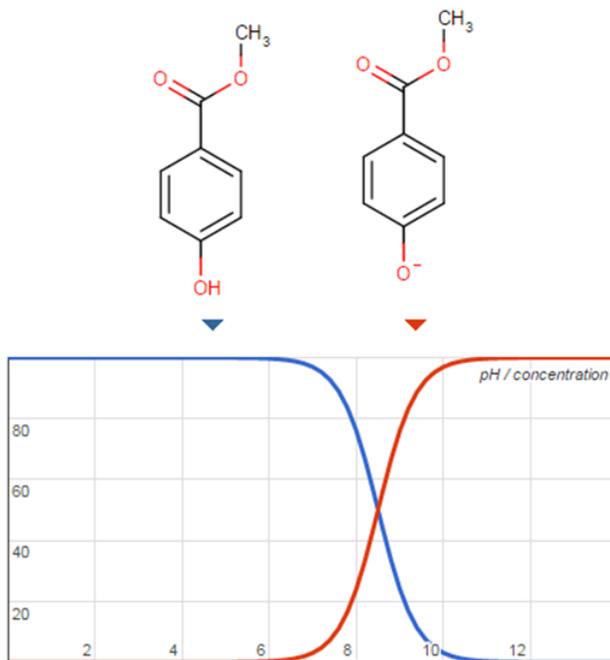
Na tabela (1) é apresentada algumas características dos compostos estudados e nas figuras 3 a 8 são mostradas as estruturas e distribuição das espécies. O log P (coeficiente de partição) é uma razão de concentrações de um composto não-ionizado em duas fases imiscíveis de solventes em equilíbrio. No caso dos valores apresentados abaixo trata-se do n-octanol e água. Portanto, este pode ser calculado como exemplificado pela equação 1. O log P nos proporciona uma ideia de polaridade, pois quanto maior for este valor mais hidrofóbico é o composto (PERUZZO; CANTO, 2012).

$$\log P_{oct/wat} = \log \left( \frac{[soluto]_{octanol}}{[soluto]_{\text{água}}^{\text{n\~{a}o-ionizado}}} \right) \quad (1)$$

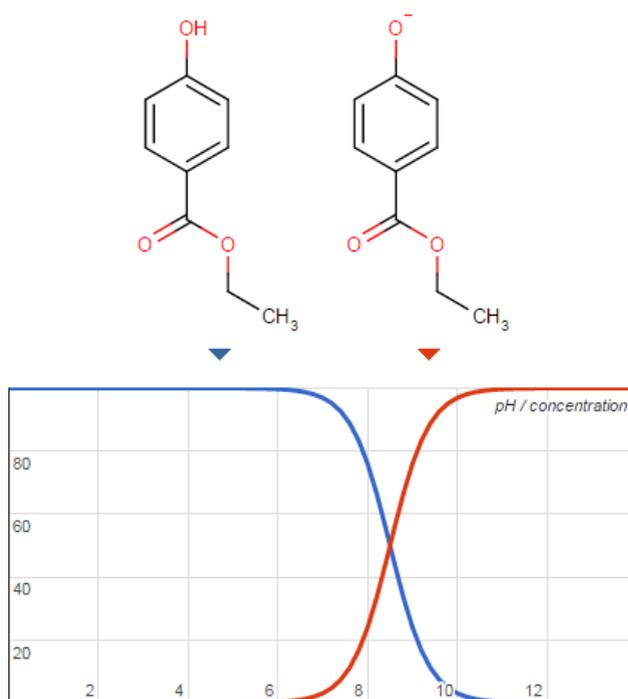
**Tabela 1** – Valores de pKa e log P para os analitos estudados.

| <b>Analito</b>          | <b>pKa</b>    | <b>Log P</b> |
|-------------------------|---------------|--------------|
| Metilparabeno           | 8,50          | 1,67         |
| Etilparabeno            | 8,50          | 2,03         |
| Bisfenol A              | 9, 78 e 10,39 | 4,04         |
| 4- <i>t</i> -Octilfenol | 10,23         | 4,69         |
| 4-Octilfenol            | 10,31         | 5,30         |
| 4-Nonilfenol            | 10,30         | 5,74         |

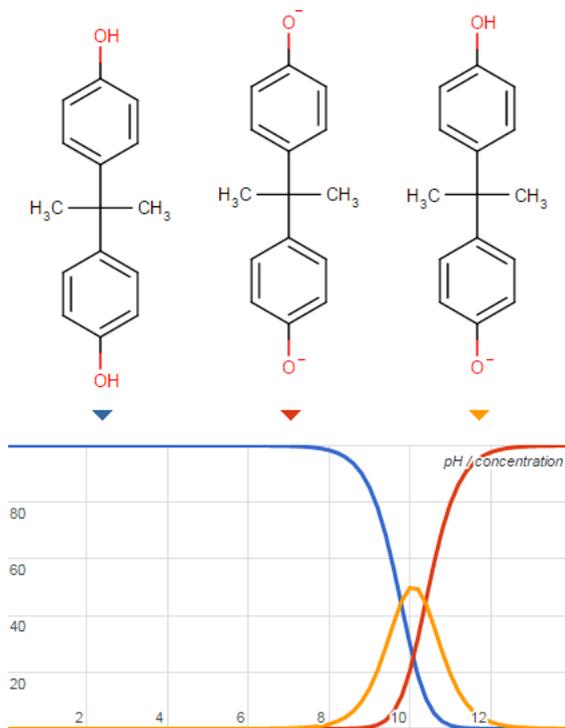
Fonte: Chemicalize.org (acessado em 2016)

**Figura 3** – Estrutura e distribuição das espécies do Metilparabeno (MP)

Fonte: Chemicalize.org (acessado em 2016)

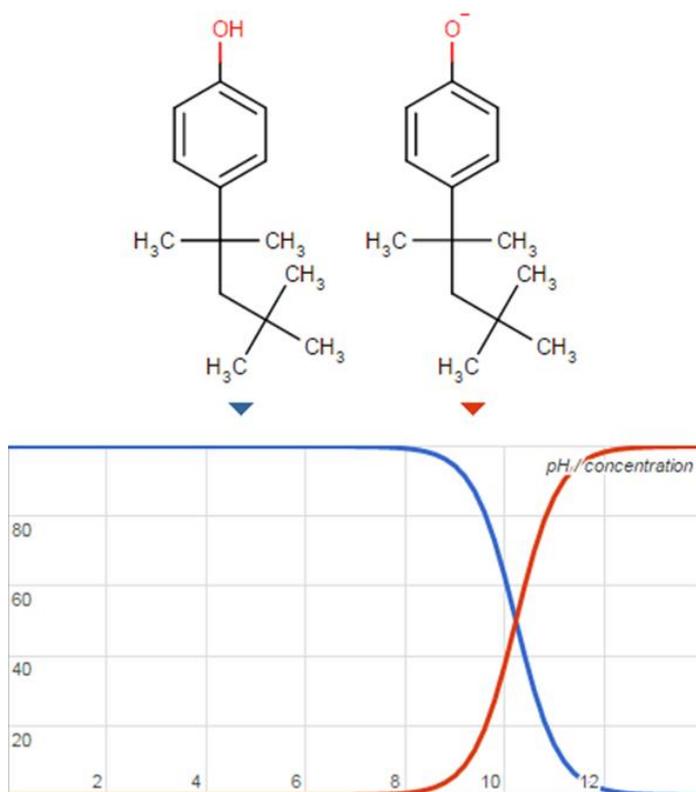
**Figura 4** – Estrutura e distribuição das espécies do Etilparabeno (EP)

Fonte: Chemicalize.org (acessado em 2016)

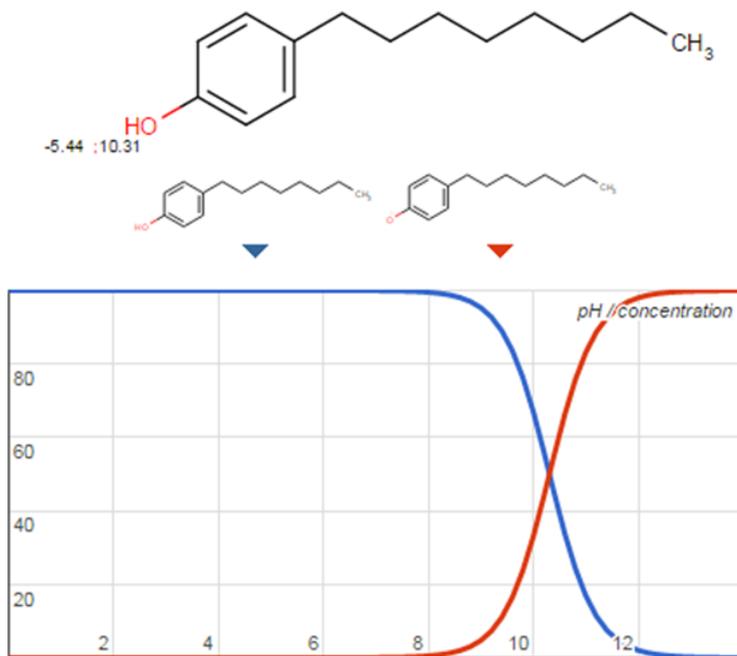
**Figura 5** – Estrutura e distribuição das espécies do Bisfenol A (BFA)

Fonte: Chemicalize.org (acessado em 2016)

**Figura 6** – Estrutura e distribuição das espécies do 4-*t*-Octilfenol (4-*t*-OF)

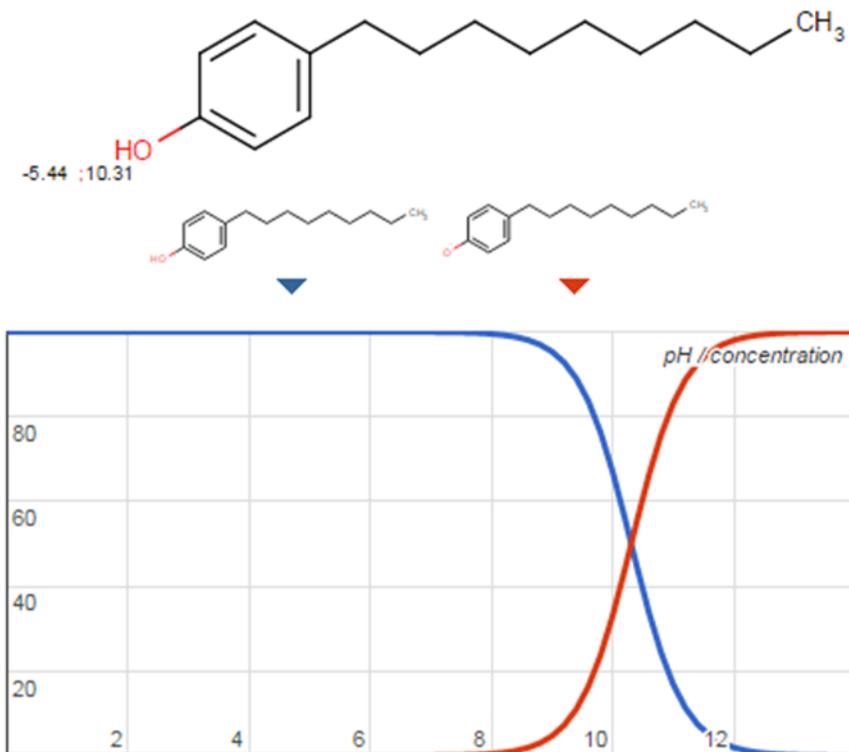


Fonte: Chemicalize.org (acessado em 2016)

**Figura 7** – Estrutura e distribuição das espécies do 4-Octilfenol (4-OF)

Fonte: Chemicalize.org (acessado em 2016)

**Figura 8** – Estrutura e distribuição das espécies do 4-Nonilfenol (4-NF)



Fonte: Chemicalize.org (acessado em 2016)

Como geralmente esses contaminantes apresentam-se na faixa de  $\text{ng L}^{-1}$  e  $\mu\text{g L}^{-1}$  é necessário realizar um preparo de amostra para pré-concentrar esses analitos, para que os mesmos possam ser analisados.

## 2.7. PREPARO DE AMOSTRA

O pré-tratamento da amostra é uma etapa chave no procedimento analítico, pois é nesta que podem ocorrer os maiores erros e a necessidade de uma maior quantidade de tempo. Portanto, deve-se ter uma grande atenção e cuidado nesta parte da análise (ANDRADE, *et al.*, 2008; PAN, *et al.*, 2014).

O preparo da amostra é uma etapa que antecede a análise instrumental. Esta parte do método analítico é de fundamental importância para obter-se uma análise com menos interferentes, uma vez que reduz a complexidade de muitas matrizes como sangue, urina, etc. Além disso, evita contaminações nas colunas cromatográficas como também pré-concentra os analitos presentes na amostra, entre outras vantagens (OLIVEIRA, *et al.*, 2008; DIONÍSIO, *et al.*, 2010).

Com o elevado crescimento na produção de compostos químicos, surge a necessidade da análise dos mesmos. Assim, a conscientização sobre as questões ambientais apresenta significativa importância, buscando-se técnicas cada vez mais amigáveis ao meio ambiente (BERTON, *et al.*, 2016).

As técnicas clássicas mais utilizadas são: extração líquido-líquido e a extração em fase sólida. Porém, com as crescentes pesquisas, os métodos de preparo de amostra estão ficando cada vez mais eficazes para atender a demanda atual. Com isso procura-se a utilização de métodos que empreguem uma menor quantidade de amostra, que sejam menos laboriosos, que use uma pequena ou nenhuma quantidade de solvente, que adotem solventes menos tóxicos e menos prejudiciais ao ambiente e diminuam o tempo de análise (OLIVEIRA, *et al.*, 2008; DIONÍSIO, *et al.*, 2010).

Deste modo a miniaturização das técnicas têm-se mostrado uma saída interessante, visto que se utiliza uma quantidade mínima de solvente e diminui as etapas necessárias para a extração (OLIVEIRA, *et al.*, 2008; DIONÍSIO, *et al.*, 2010; MERIB; CARASEK, 2013).

Muitas destas técnicas estão sendo usadas para analisar interferentes hormonais. Dentre essas, podem ser citadas algumas. A microextração em fase líquida suportada com fibra oca (HF-LPME) foi empregada para a determinação de parabenos (DÍAZ-ÁLVAREZ; TURIEL; MARTÍN-ESTEBAN, 2012) e alquilfenóis (VILLAR-NAVARRO, *et al.*, 2013). A microextração com gota única (SDME) foi aplicada para analisar alquilfenóis e bisfenol A em água de mar (LÓPEZ-DARIAS, *et al.*, 2010). A microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) foi utilizada na determinação de parabenos (PRICHODKO; ŠAKOČIŪTĒ; VIČKAČKAITĒ, 2010), alquilfenóis e bisfenol A (LÓPEZ-DARIAS, *et al.*, 2010).

Foram ainda adotados métodos, tais como, extração com membrana assistida por solvente (MASE) e extração sortiva em barra magnética (SBSE) para alquilfenóis (SALGUEIRO-GONZÁLEZ, *et al.*, 2013; KAWAGUCHI, *et al.*, 2004), microextração adsortiva em barra

(BAμE) para parabenos (ALMEIDA; NOGUEIRA, 2014; DIAS, *et al.*, 2015), extração em ponto nuvem (CPE) para bisfenol A (ZHONG, *et al.*, 2011), entre muitos outros.

### 2.7.1. Microextração em fase líquida suportada com fibra oca (HF-LPME)

O princípio da técnica de HF-LPME é fundamentado na utilização de uma membrana oca hidrofóbica que é recoberta por um solvente orgânico que seja imiscível em água. No interior da membrana são empregados alguns microlitros de um solvente (orgânico ou aquoso), o qual será o solvente receptor. A fase doadora será a matriz aquosa que contém os analitos a serem estudados (OLIVEIRA, *et al.*, 2008; DIONÍSIO, *et al.*, 2010; MERIB; CARASEK, 2013).

O recobrimento da membrana ocorre através da imersão da mesma em um solvente orgânico. Os analitos serão extraídos da amostra aquosa através da membrana líquida formada e passam então para a fase receptora. Posteriormente a extração, o solvente presente no interior na membrana é retirado com ajuda de uma microsseringa e levado para a análise instrumental (MERIB; CARASEK, 2013).

Este método pode adquirir duas formas básicas: duas fases ou três fases (figura 9). No modo de duas fases o solvente presente no interior da membrana também é hidrofóbico, assim esse tipo de extração é muito aplicado a compostos neutros que vão ter grande afinidade pela solução receptora. A extração ocorre por difusão passiva da fase doadora para a fase receptora (equação 2) e o processo é dependente do coeficiente de partição entre as fases (equação 3) (OLIVEIRA, *et al.*, 2008; DIONÍSIO, *et al.*, 2010; MERIB; CARASEK, 2013).

$$A_{amostra} \rightleftharpoons A_{fase\ orgânica} \quad (2) \qquad K = \frac{C_{eq,r}}{C_{eq,d}} \quad (3)$$

Em que,  $C_{eq,r}$  corresponde à concentração do analito no equilíbrio na solução receptora e  $C_{eq,d}$  à concentração do analito no equilíbrio na solução doadora.

Quando se usa três fases, a solução receptora é aquosa, e os compostos utilizados são os que sofrem ionização. Assim na matriz aquosa esses analitos encontram-se na forma neutra para possuir afinidade pela membrana e quando eles entram em contato com a fase

receptora são ionizados (OLIVEIRA, *et al.*, 2008; DIONÍSIO, *et al.*, 2010; MERIB; CARASEK, 2013).

Neste sistema o ajuste do pH é essencial para a eficiência do processo, e necessita ser selecionado cuidadosamente mediante o pKa dos analitos. Assim, na amostra deve-se ter um pH inferior ao pKa do analito para que o mesmo se apresente na forma não-ionizada e possa migrar para a membrana hidrofóbica, e a fase receptora deve possuir um pH superior ao pKa do analito para que o mesmo permaneça ionizado e não retorne para a amostra aquosa (OLIVEIRA, *et al.*, 2008; DIONÍSIO, *et al.*, 2010; MERIB; CARASEK, 2013).

A extração procede-se por difusão passiva da amostra por meio do solvente de recobrimento, e logo após pela fase receptora (equação 4). Os coeficientes de partição envolvidos entre as fases influenciam o processo de extração (equações 5 e 6) (OLIVEIRA, *et al.*, 2008; MERIB; CARASEK, 2013).

$$A_{amostra} \rightleftharpoons A_{fase\ orgânica} \rightleftharpoons A_{fase\ receptora} \quad (4)$$

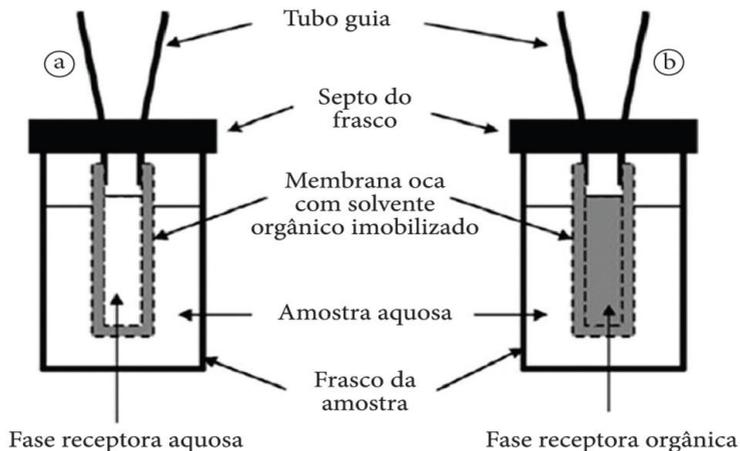
$$K_{org/d} = \frac{C_{eq,org}}{C_{eq,d}} \quad (5)$$

$$K_{r/org} = \frac{C_{eq,r}}{C_{eq,org}} \quad (6)$$

Em que,  $C_{eq/org}$  corresponde à concentração do analito no equilíbrio na fase orgânica,  $C_{eq/d}$  corresponde à concentração do analito no equilíbrio na solução doadora,  $C_{eq/r}$  corresponde à concentração do analito no equilíbrio da solução receptora e  $K$  corresponde ao coeficiente de partição. A força motriz do processo é o coeficiente de partição entre as fases receptora e doadora ( $K_{r/d}$ ) e é obtido pelo produto de  $K_{org/d}$  e  $K_{r/org}$  (OLIVEIRA, *et al.*, 2008; MERIB; CARASEK, 2013).

$$K_{r/d} = \frac{C_{eq,r}}{C_{eq,d}} = K_{org/d} \cdot K_{r/org} \quad (7)$$

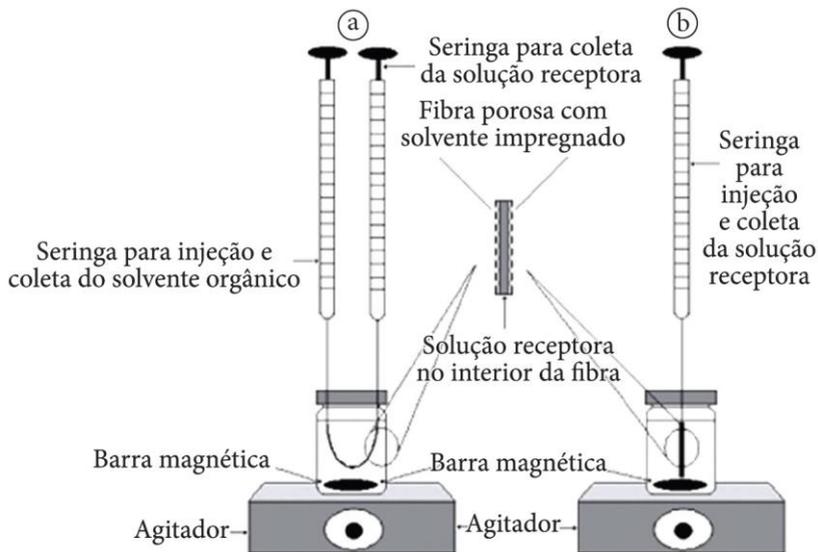
**Figura 9** – Formas básicas da HF-LPME (a) Três fases (b) Duas fases.



Fonte: Adaptado de Merib; Carasek (2013)

Neste tipo de técnica também podem ser usados dois tipos de configurações: tipo U e tipo haste (figura 10). No tipo U empregam-se duas microsseringas para colocar e retirar o solvente do interior da membrana, e no tipo haste adota-se apenas uma microsseringa sendo selada a outra extremidade da membrana. Vários parâmetros podem ser avaliados na HF-LPME, tais como, escolha da membrana, solvente de recobrimento, força iônica, pH da amostra e volume da fase doadora e receptora (MERIB; CARASEK, 2013).

**Figura 10** – Configurações da HF-LPME (a) Tipo U (b) Tipo haste.



Fonte: Adaptado de Merib; Carasek (2013)

Em uma das determinações de parabenos e alquilfenóis, esta técnica foi empregada em três fases e configuração do tipo U. O solvente de recobrimento utilizado foi o tolueno e o éter dihexil para determinação de parabenos e alquilfenóis, respectivamente (DÍAZ-ÁLVAREZ; TURIÉL; MARTÍN-ESTEBAN, 2012; VILLAR-NAVARRO, *et al.*, 2013).

Uma variação interessante da HF-LPME é a extração líquido-líquido por membrana microporosa (HF-MMLLE), esta foi desenvolvida em 2007 por Zorita e colaboradores. O grande diferencial do método é não empregar solvente no interior da membrana, apenas nos poros da mesma. Assim, o solvente orgânico impregnado na membrana atua como fase receptora. Logo após a extração, é realizada a dessorção do solvente orgânico imobilizado na membrana por um solvente adequado e posteriormente é feita a análise instrumental. A HF-MMLLE foi utilizada para análise de vários compostos como 4-isobutilacetofenona, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e agrotóxicos (ZORITA; BARRI; MATHIASSEN, 2007; BEDENDO, 2010; HYDER, *et al.*, 2011; BEDENDO; JARDIM; CARASEK, 2012).

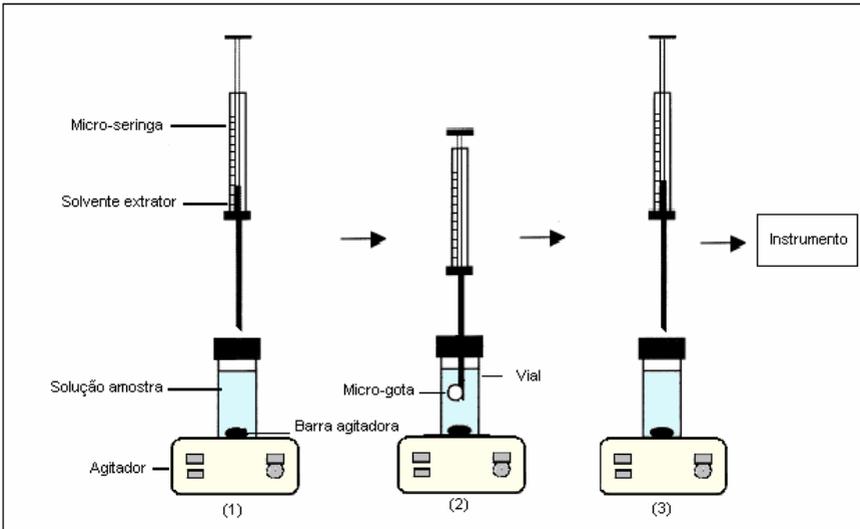
### 2.7.2. Microextração com gota única (SDME)

A SDME foi proposta por Jeannot e colaboradores em 1996. Neste primeiro estudo foi empregado o n-octano como solvente para a formação da gota, a extração ocorreu por imersão direta da gota na amostra para a determinação de compostos orgânicos. A partir deste trabalho inicial, a técnica vem sendo grandemente utilizada (MALTEZ, 2007; PINTO; PEDROSO, 2015). Neste método o equilíbrio de partição do analito entre as fases envolvidas rege o processo de extração (PINTO; PEDROSO, 2015).

Na extração com SDME utiliza-se uma gota que atua como extrator, essa gota é composta por um solvente orgânico que não é miscível em água. Essa microgota fica suspensa na ponta de uma microsseringa (OLIVEIRA, *et al.*, 2008; DIONÍSIO, *et al.*, 2010).

Então, primeiramente uma determinada quantidade de solvente orgânico é coletada com uma microsseringa de forma a preencher o lúmen da mesma. Depois, a microsseringa é colocada no frasco e a gota é formada na extremidade da agulha. Posteriormente a extração, a gota é então aspirada para o interior da microsseringa e então é realizada a análise instrumental (figura 11) (PINTO; PEDROSO, 2015).

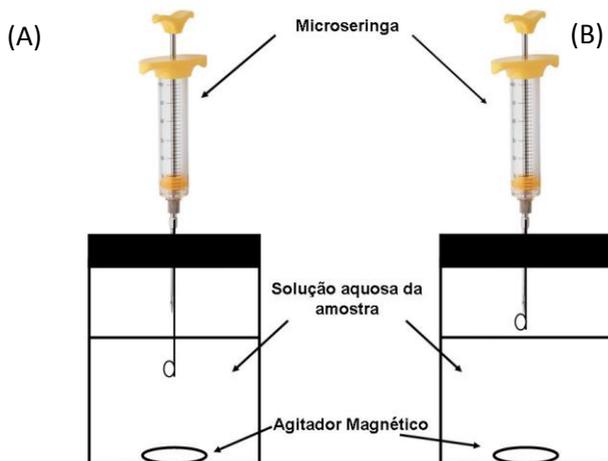
**Figura 11** – Etapas de Amostragem em SDME. (1) agulha perfura o septo do frasco amostrador, (2) a gota é exposta diretamente na matriz da amostra e os analitos são sorvidos, (3) a gota é retraída para dentro da seringa e o extrato é injetado no instrumento analítico.



Fonte: Adaptado de Maltez (2007)

Apesar de a SDME apresentar vários arranjos, os modos de extração mais adotados para esse método são os tipos *Headspace* e imersão direta (figura 12) (MALTEZ, 2007; PINTO; PEDROSO, 2015).

**Figura 12** – Modos da SDME (a) Headspace (b) Imersão direta.



Fonte: Adaptado de Dionísio, et al. (2010)

Na imersão direta a microgota entra em contato direto com a matriz, então é imprescindível que o solvente extrator apresente uma baixa pressão de vapor e insolubilidade em água, além de ser eficiente para a extração dos analitos (PINTO; PEDROSO, 2015).

No modo *headspace*, a microgota fica exposta a amostra. Na HS-SDME a gota possui uma maior estabilidade comparada ao modo anterior, uma vez que minimiza as possibilidades de desprendimento da mesma. Portanto, pode-se aplicar uma maior agitação com o intuito de aumentar a transferência dos analitos para o *headspace* (PINTO; PEDROSO, 2015).

Em um dos artigos desta técnica que determinam bisfenol A e alquilfenóis os autores adotaram como solvente o decanol. A gota de decanol foi então imersa em 5 mL de amostra de água do mar para a realização da extração (LÓPEZ-DARIAS, *et al.*, 2010).

### 2.7.3. Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME)

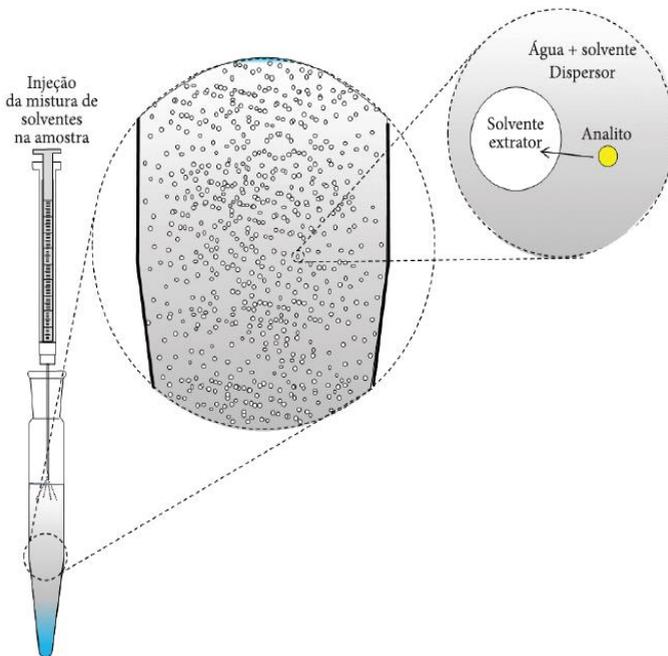
A microextração líquido-líquido dispersiva é uma técnica que foi desenvolvida em 2006 por Rezaee e colaboradores. No trabalho proposto por eles, foram analisados hidrocarbonetos policíclicos

aromáticos em amostra aquosa utilizando a DLLME e um cromatógrafo gasoso com detecção por ionização em chama (REZAEI, *et al.*, 2006).

Neste método são utilizados dois solventes, um extrator e outro dispersor. O solvente extrator deve apresentar características mais apolares, para que o mesmo seja imiscível na matriz aquosa. Já o solvente dispersor deve ser miscível tanto no solvente extrator quanto na amostra (MARTINS, *et al.*, 2012).

É feita então uma mistura adequada de ambos os solventes, e a mesma é injetada na amostra (figura 13). Quando ocorre a injeção nota-se que a solução fica turva, isso devido às microgotas que são formadas e a dispersão das mesmas por toda a solução, criando assim uma área superficial imensamente grande e fazendo com que o equilíbrio seja atingido de forma rápida (REZAEI, *et al.*, 2006; MARTINS, *et al.*, 2012).

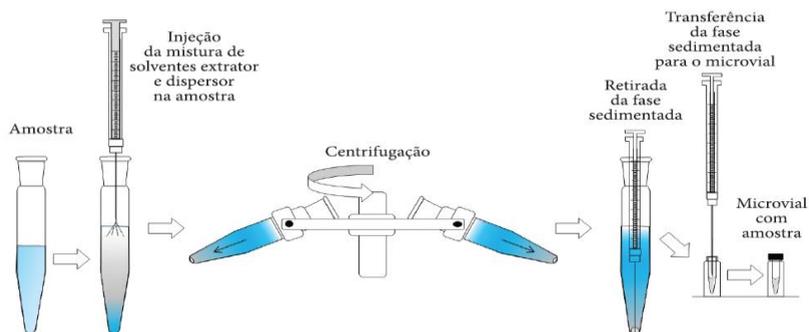
**Figura 13** – Esquema representativo da injeção da mistura de solventes extrator e dispersor.



Fonte: Adaptado de Martins, et al. (2012)

Logo após a extração ocorre a etapa de centrifugação (figura 14), para que o solvente extrator que já contém os analitos seja sedimentado, e seja feita e a análise instrumental posteriormente (REZAEI, *et al.*, 2006; MARTINS, *et al.*, 2012).

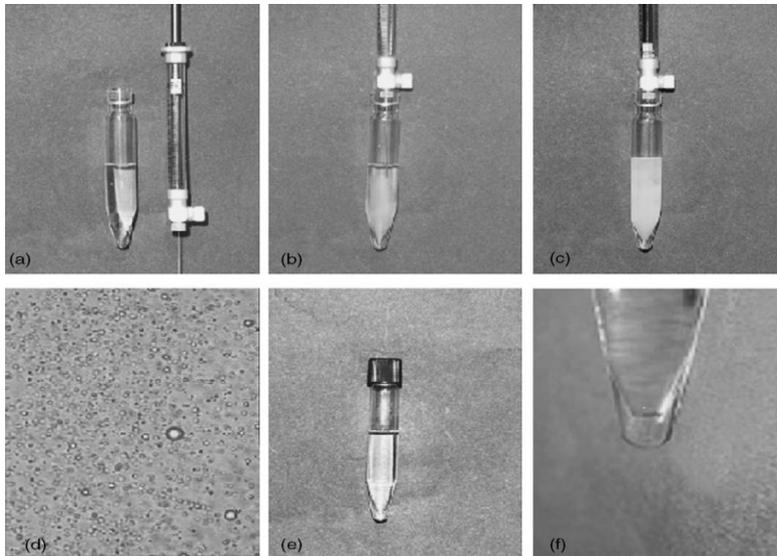
**Figura 14** – Esquema representativo da etapa de centrifugação.



Fonte: Adaptado de Martins, et al. (2012)

No trabalho elaborado pelos criadores da técnica foi usado como solvente dispersor a acetona e como solvente extrator o tetracloroetileno, e a formação da microgotas foi comprovada por microscopia (figura 15) (REZAEI, *et al.*, 2006).

**Figura 15** – Fotografia dos diferentes passos da DLLME: (a) antes da injeção da mistura de solvente dispersor (acetona) e de solvente extrator ( $C_2Cl_4$ ) na amostra, (b) início da injeção, (c) final de injeção, (d) fotografia do microscópio óptico, a magnitude 1000 (que mostra as partículas finas de  $C_2Cl_4$  em estado turvo), (e) depois da centrifugação e (f) vista ampliada de fase sedimentada ( $5,0 \pm 0,2 \mu L$ ).



Fonte: Adaptado de Rezaee, et al. (2006)

Na DLLME vários fatores devem ser analisados, tais como: o volume, tipo e proporção de solventes extratores e dispersores, pH da amostra, tempo de extração e força iônica (MARTINS, *et al.*, 2012).

A DLLME vem sendo empregada para análise de diversos analitos, tais como, alquilfenóis, bisfenol A e parabenos. Em um dos trabalhos usou-se 150  $\mu L$  de uma mistura acetonitrila e decanol na razão de 15:7 v/v, respectivamente, para determinação de bisfenol A e alquilfenóis em 5 mL de amostra de água do mar. Nos ensaios para determinação de parabenos foi utilizado como solvente dispersor a acetona (480  $\mu L$ ) e como solvente extrator o clorobenzeno (20  $\mu L$ ). Essa mistura foi então rapidamente injetada em 8 mL de amostra aquosa (PRICHODKO; ŠAKOČIŪTĖ; VIČKAČKAITĖ, 2010).

#### 2.7.4. Microextração por membrana líquida renovável usando membrana oca (HFRLM)

Técnicas convencionais de extração que utilizam membrana oca, tais como, a membrana líquida suportada (SLM) e membrana líquida de emulsão (ELM) apesar de serem bastante atrativas apresentam algumas limitações. A instabilidade do filme líquido formado e a dificuldade na emulsificação são alguns exemplos. Com a finalidade de solucionar e minimizar esses problemas, a HFRLM foi proposta em 2005 por Ren e colaboradores (CARASEK; MERIB, 2015; HE, *et al.*, 2016 ).

Neste método, além do recobrimento da membrana, introduz-se diretamente na amostra uma determinada quantidade de solvente extrator, fornecendo desta maneira uma alta razão entre a fase aquosa e o solvente orgânico (CARASEK; MERIB, 2015; BEDENDO, 2010).

Em virtude da grande afinidade entre a membrana e o solvente orgânico um filme fino é formado. Durante a agitação, a força de cisalhamento vai influenciar na partição e coalescência das gotículas de solvente extrator. Assim, neste processo ocorre a formação de microgotas com altíssima área superficial e conseqüentemente maior será a área de contato entre a amostra e o solvente orgânico. Ao mesmo tempo, sucede-se a renovação da membrana líquida através da reintrodução dessas gotículas (CARASEK; MERIB, 2015; BEDENDO, 2010; REN, *et al.*, 2007).

Esta técnica apresenta uma elevada transferência de massa, pequeno consumo de solvente extrator, não possui poluição secundária, baixo custo, fácil manuseio e boa estabilidade, uma vez que a membrana líquida é constantemente renovada evitando assim perdas por emulsão e solubilização. O coeficiente de partição fase aquosa/solvente orgânico e a difusão governam este método, prezando os equilíbrios envolvidos entre as fases (HE, *et al.*, 2016; REN, *et al.*, 2007).

A HFRLM foi utilizada para determinação de metais como cobre (II) (REN, *et al.*, 2007) e cádmio (II) (CARLETTO, *et al.*, 2009), e para análise de compostos orgânicos como sulfonamidas (BEDENDO; JARDIM; CARASEK, 2010) e penicilina G (HE, *et al.*, 2016).

#### 2.7.4. Sistema de extração 96-well plate

Kaye e colaboradores apresentaram, em 1996, a utilização de um sistema de extração de 96-well plate associado à extração em fase sólida com o intuito de realizar uma análise rápida (KAYE, *et al.*, 1996; BIDDLECOMBE; BENEVIDES; PLEASANCE, 2001).

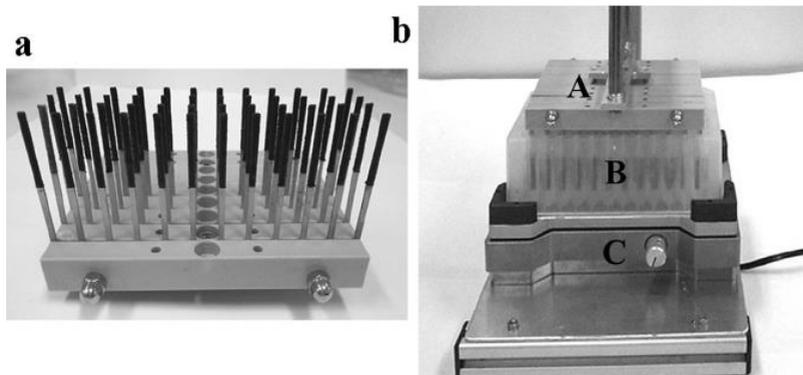
Tendo em vista a rapidez e praticidade de efetuar a extração de 96 amostras simultaneamente, outras técnicas foram também associadas a este sistema (BIDDLECOMBE; BENEVIDES; PLEASANCE, 2001). Pawliszyn e seu grupo têm utilizado a microextração em fase sólida juntamente com o 96-well plate, em que, o sorvente é aderido em lâminas na forma de pente. Assim, forma-se um filme fino com grande área superficial, sendo chamada de extração com filme fino (BOYACI; SPARHAM; PAWLISZYN, 2014; BOYACI, *et al.*, 2014; MIRNAGHI, *et al.*, 2013; MIRNAGHI; PAWLISZYN, 2012).

A extração líquido-líquido aliada ao sistema de 96-Well plate vem sendo empregada para análise de amostras como plasma e urina (STEINBORNER; HENION, 1999; ZWEIGENBAUM, *et al.*, 1999; BIDDLECOMBE; BENEVIDES; PLEASANCE, 2001).

A instrumentação de 96-well plate aumenta a frequência analítica do método, pois diminui o tempo necessário para realização de todas as extrações, uma vez que podem ser realizadas até 96 ao mesmo tempo, minimiza os custos e apresenta boa precisão (MIRNAGHI; PAWLISZYN, 2012).

No 96-well plate tem-se uma escova composta por 8 pentes, e cada um destes são constituídos por 12 haste. A agitação da amostra ocorre no próprio sistema, pois o mesmo possui agitador (figura 16).

**Figura 16** – (a) Dispositivo de 96-blade SPME recoberto com MWCNTs-COOH/PDMS (b) sistema manual 96-blade SPME (A) incluindo o dispositivo de 96-blade (B) placa de 96 poços (C) agitador orbital.



Fonte: Adaptado de Kueseng; Pawliszyn (2013)

Neste trabalho, necessitou-se adaptar o sistema de *96-well plate* para que fosse possível a utilização das membranas ocas de polipropileno (figura 17). As hastes presentes em cada pente possuem um formato chato (2 mm), estas foram então moldadas para um formato cilíndrico (1 mm). Assim, após as modificações tornou-se viável a associação das técnicas de *96-well plate* e HFRLM.

**Figura 17** – Modificações do sistema de 96-well plate.



Fonte: Autoria própria (2016)

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo geral determinar desreguladores endócrinos em matrizes aquosas através do sistema de *96-well plate* combinado com a microextração por membrana líquida renovável usando membrana oca ressaltando o desenvolvimento e otimização de metodologias analíticas.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Desenvolver e otimizar uma metodologia para determinação de desreguladores endócrinos (metilparabeno, etilparabeno, bisfenol A, 4-nonilfenol, 4-octilfenol e 4-*terc*-octilfenol) em água, utilizando o sistema de *96-well plate* associado à microextração por membrana líquida renovável usando membrana oca;

Desenvolver a microextração com membrana oca de polipropileno.

Utilizar otimização multivariada, a fim de obter superfícies de resposta que indiquem as melhores condições de trabalho;

Determinação dos parâmetros analíticos de mérito para a metodologia proposta neste trabalho.

Aplicar o método desenvolvido para amostra de água superficial coletada na Lagoa da Conceição, Santa Catarina.



## 4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

### 4.1. REAGENTES QUÍMICOS E MATERIAIS

Os desreguladores endócrinos metilparabeno (99,0%), etilparabeno (99,0%), bisfenol A (99,0%), 4-*terc*-octilfenol (97,0%), 4-octilfenol (99,0%) e 4-nonilfenol (99,8%) foram obtidos da Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, USA). Acetonitrila (ACN) e metanol (MeOH) ambos de grau cromatográfico foram adquiridos da JT Baker (Mallinckrodt, NJ, EUA). A água foi purificada através do sistema de água ultra-pura (Mega Purity, Billerica, EUA). Os solventes utilizados nos ensaios de preenchimento nos poros da membrana e como solventes extratores foram o hexano, 1-octanol e iso-octano (todos de grau cromatográfico) comprados da Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, USA), Tedia (Fairfield, OH, USA) e Tedia (Fairfield, OH, USA), respectivamente. O solvente empregado como dispersor, acetona (AC) foi obtido da Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, USA). A membrana oca usada neste estudo foi de polipropileno PP300/1200 Accurel® com 1,2 mm de diâmetro interno, 300 µm de espessura, 0,2 µm de tamanho do poro e foi obtida da Membrane (Wuppertal, Germany).

Soluções estoque (1000 mg L<sup>-1</sup>) foram preparadas dissolvendo uma quantidade apropriada de cada analito em ACN (metilparabeno, etilparabeno e bisfenol A) e MeOH (4-*terc*-octilfenol, 4-octilfenol e 4-nonilfenol) e a solução trabalho contendo todos os analitos (8 mg L<sup>-1</sup>) foi preparada pela diluição das soluções estoques em MeOH e estocadas a 4°C.

Para o preparo do tampão foi utilizado ácido cítrico e hidrogenofosfato dissódico (VETEC, Rio de Janeiro, Brasil). Cloreto de sódio para o ensaio da força iônica foi adquirido da VETEC (Rio de Janeiro, Brasil).

### 4.2. INSTRUMENTAÇÃO

As amostras foram analisadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (Prominence Shimadzu LC-20AT) com injetor manual (Rheodyne 7725i), sendo utilizado um detector de arranjo diodos (DAD) e um detector de fluorescência (FLD). A separação foi realizada em uma coluna em fase reversa C<sub>18</sub> da Thermo Scientific (4,6 mm d.i x 25cm c x 5 µm d.p.). Foram utilizados volume de injeção de 20 µL e a vazão de 1,0 ml min<sup>-1</sup>. Gradiente foi o modo de eluição selecionado e a fase

móvel constituiu de: ACN (A) 50% e água (B) 50% de 0-4,0 min; a concentração de A aumentou até 80% de 4,0-10,0 min e manteve-se constante até 20,0 min; de 20,0-25,0 min a concentração de A retornou novamente a 50%; por fim de 25,0-30,0 min a concentração de A manteve-se em 50%. O comprimento de onda máximo selecionado para os parabens foi de 257 nm (DAD), e para o bisfenol A e alquilfenóis foi escolhido como comprimento de onda de excitação e emissão de 277 nm e 307 nm (FLD), respectivamente.

#### 4.3. PREPARO DAS MEMBRANAS DE POLIPROPILENO E SISTEMA DE 96-*WELL PLATE*

Para a realização dos ensaios, membranas de polipropileno foram cortadas no comprimento de 1,0 cm. Para a limpeza, as mesmas foram imersas em acetona até a sua utilização. No sistema de *well plate* tem-se uma placa com 96 poços que foi inserida no equipamento onde foi realizada a extração. O sistema de 96 *well plate* consiste de uma escova constituída de 8 pentes, sendo que cada pente contém 12 hastes. Para efetuar a extração as membranas ocas são colocadas nos pentes com auxílio de uma pinça. Então, os poros das membranas fixadas nas hastes foram impregnadas com solvente orgânico. Para o processo de preenchimento do lúmen da membrana, o solvente orgânico é colocado nos poços do sistema de 96-*well plate* (300  $\mu$ L) com auxílio de um micropipetador multicanal. O tempo de impregnação no solvente foi de 10 segundos. Logo após, inicia-se o processo de extração. Na Figura 18 são mostradas algumas etapas.

**Figura 18** – Preparação das membranas ocas e sistema de 96-well plate.



Fonte: Autoria própria (2016)

#### 4.4. OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA DE 96-WELL PLATE COMBINADO COM A HFRLM

Os ensaios foram realizados em poços de 2,0 mL para a etapa de extração e de 500  $\mu\text{L}$  para a etapa de dessorção do sistema 96-well plate. Na extração empregou-se 75  $\mu\text{L}$  de tampão, 30  $\mu\text{L}$  de solvente extrator e água ultra-pura fortificada com 240  $\mu\text{g L}^{-1}$  dos analitos (volume total de 1,5 mL), e para a dessorção foi utilizado 300  $\mu\text{L}$  de solvente (figura 19).

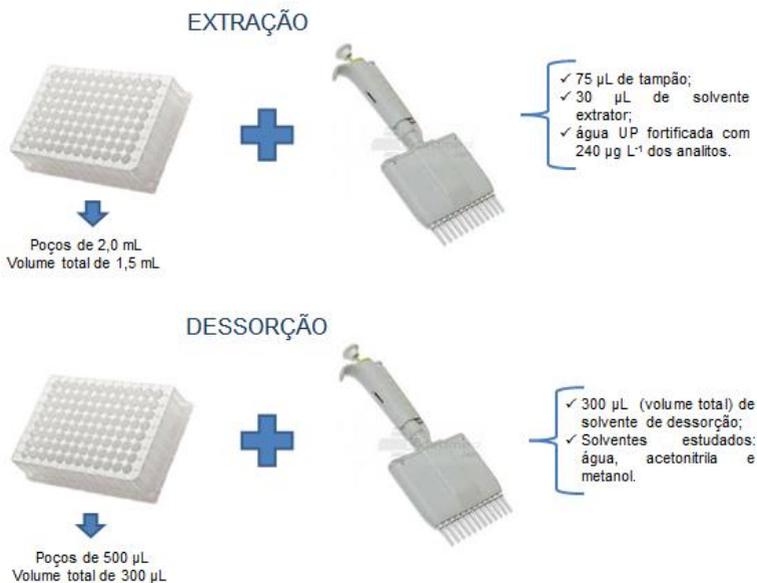
Na dessorção foram estudados o tipo de solvente e o tempo. Foi analisado univariadamente e em triplicata os tempos de 10, 20 e 30 min. O solvente de dessorção (acetonitrila, água e metanol) foi selecionado através da superfície triangular.

Na extração, o recobrimento da membrana e o solvente extrator (1-octanol, hexano e iso-octano) foram avaliados através da superfície ternária. A relevância das técnicas (HF-MMLLE, DLLME e HFRLM) e o pH da amostra (4, 5 e 6) foram estudadas de forma univariada e em triplicata. O tempo de extração (15-60 min.), volume de solvente extrator (15-55  $\mu\text{L}$ ) e efeito da força iônica (0-30%) foram analisados pelo planejamento do composto central (otimização multivariada).

O último teste feito antes da construção da curva de calibração foi sobre a reprodutibilidade dos poços no sistema de 96-well plate.

Os dados foram processados utilizando os programas computacionais Statsoft Statistica 8.0, Origin 8.0 e Microsoft Excel.

**Figura 19** – Etapas de extração e dessorção.



Fonte: Autoria própria (2016)

#### 4.5. PREPARO DA AMOSTRA OTIMIZADO

Primeiramente, as membranas foram impregnadas com uma mistura de 1-octanol e hexano (50:50 v/v). Posteriormente, as amostras

(volume total de 1,5 mL) foram inseridas nos poços do sistema de 96-well plate (2,0 mL). A técnica empregada foi a HFRLM e o solvente de extração foi hexano (15 µL). Não foi utilizado NaCl e o pH da amostra foi de 5. A extração foi realizada em um tempo de 45 min e em seguida procedeu-se a dessorção em outra placa do sistema plate (500 µL) com 300 µL de acetonitrila e água (75:25 v/v) durante 10 min. A agitação durante a etapa de extração e dessorção foi realizada no próprio sistema de 96-well plate. As membranas de polipropileno não foram reutilizadas.

#### 4.6. DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS ANALÍTICOS DE MÉRITO DO MÉTODO E APLICAÇÃO DO MESMO

Para avaliação do método proposto, foram estudados parâmetros como a faixa linear, limite de quantificação (LOQ), limite de detecção (LOD) e coeficiente de correlação linear ( $r^2$ ). A curva de calibração foi construída através da fortificação de diferentes níveis de concentração em água ultrapura. O LOD e LOQ foram obtidos por meio dos parâmetros da curva de calibração. O LOD é definido como a menor concentração de analito que pode ser detectada e, o LOQ corresponde a menor concentração de analito que pode ser quantificada (PASCHOAL, *et al.*, 2008; RIBEIRO, *et al.*, 2008). Estes foram calculados como segue abaixo:

$$LOD = 3,3 \frac{\sigma}{s} \quad (\text{equação 8}) \quad LOQ = 10 \frac{\sigma}{s} \quad (\text{equação 9})$$

Em que, “ $\sigma$ ” representa o desvio do intercepto e “ $s$ ” o valor da inclinação da curva de calibração. Ainda existem outras formas de calcular o LOQ e LOD, como por exemplo, a razão sinal/ruído (PASCHOAL, *et al.*, 2008; RIBEIRO, *et al.*, 2008).

A exatidão e a precisão do método foram analisadas pela fortificação de amostras de água da lagoa da Conceição (Florianópolis, Santa Catarina, Brasil). Para a coleta da amostra foi empregado um frasco esterilizado e esta foi mantida a uma temperatura de 4°C até a sua utilização. A coleta foi realizada na Avenida das Rendeiras.

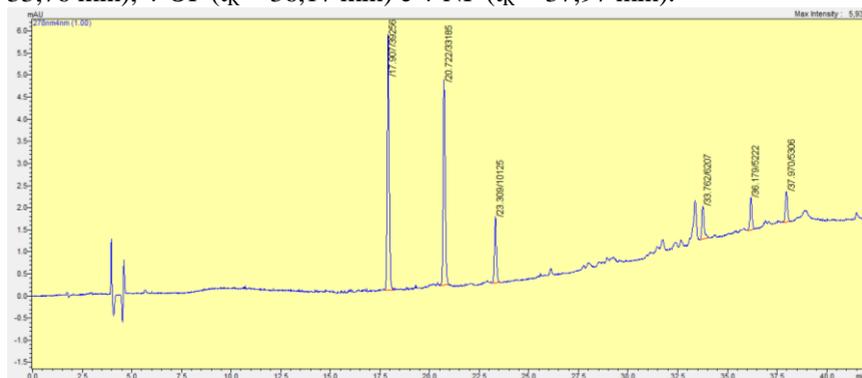


## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

Inicialmente foram realizados testes para a obtenção de uma boa separação cromatográfica dos analitos. Assim, para a análise dos desreguladores endócrinos, métodos presentes na literatura auxiliaram nesta escolha. O primeiro método empregado foi o proposto por Raimundo (2007), neste utiliza-se como solvente de eluição ACN (A) e água (B). Em 30 min a proporção de A variou de 10 a 90%. Posteriormente, a proporção de A aumentou para 92% de 30-35 min, e variou de 92 até 95% durante mais 2 min. Por fim, nos últimos 3 min de análise a proporção de A decresceu de 95% para 10%. Desta maneira, o tempo total da corrida cromatográfica foi de 40 min, com fluxo de 0,8 mL min<sup>-1</sup> (figura 20).

**Figura 20** – Cromatograma obtido pela injeção direta no cromatógrafo líquido da mistura contendo os analitos (8 mg L<sup>-1</sup>). Analitos: MP (t<sub>R</sub> = 17,91 min), EP (t<sub>R</sub> = 20,72 min), BFA (t<sub>R</sub> = 23,31 min), 4-*t*-OF (t<sub>R</sub> = 33,76 min), 4-OF (t<sub>R</sub> = 36,17 min) e 4-NF (t<sub>R</sub> = 37,97 min).

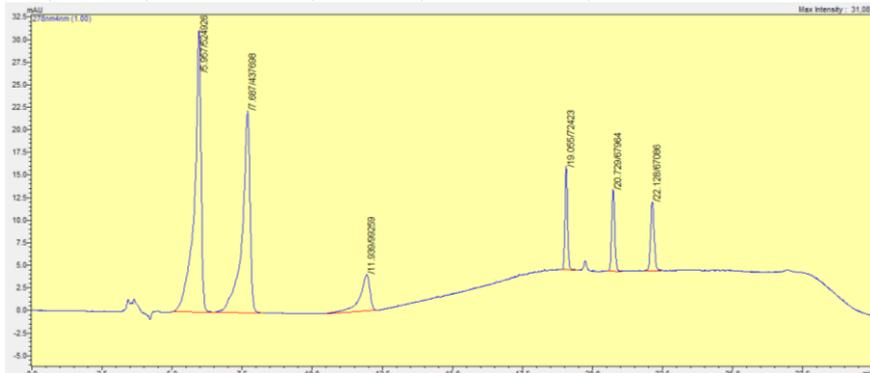


Fonte: A autoria própria (2016)

Na intenção de diminuir o tempo de análise, testou-se o método proposto por Neng (2011). Os solventes adotados foram água (B) e MeOH (C), em que a proporção de C alcançou 60% em um intervalo de 0-4 min. Durante 4-10 min a proporção de C aumentou para 90% e finalmente diminuiu de 90 a 60% de 10-20 min. Como Neng

usou uma coluna de 15 cm o fluxo foi de  $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ . Na tentativa de aproximar-se dos tempos obtidos, tendo-se uma coluna de 25 cm, foi selecionado um fluxo de  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$  e o tempo final de corrida estendeu-se até 30 min (figura 21).

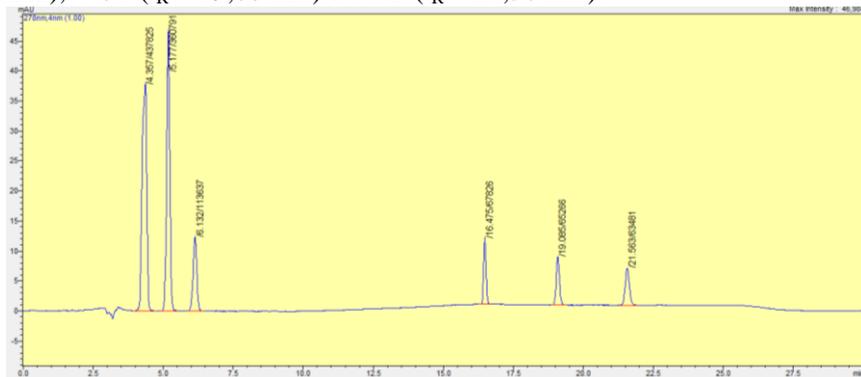
**Figura 21** – Cromatograma obtido pela injeção direta no cromatógrafo líquido da mistura contendo os analitos ( $8 \text{ mg L}^{-1}$ ). Analitos: MP ( $t_R = 5,96 \text{ min}$ ), EP ( $t_R = 7,69 \text{ min}$ ), BFA ( $t_R = 11,94 \text{ min}$ ), 4-*t*-OF ( $t_R = 19,05 \text{ min}$ ), 4-OF ( $t_R = 20,73 \text{ min}$ ) e 4-NF ( $t_R = 22,13 \text{ min}$ ).



Fonte: Autoria própria (2016)

Apesar de haver um ganho de tempo na corrida cromatográfica, ocorreu uma pequena deformação no formato dos três primeiros picos. Para solucionar este problema, optou-se por um terceiro método levando em conta os resultados obtidos anteriormente. Desta forma, foram realizados experimentos utilizando a seguinte fase móvel: ACN (A) 50% e água (B) 50% de 0-4,0 min; a concentração de A aumentou até 80% de 4,0-10,0 min e manteve-se constante até 20,0 min; de 20,0-25,0 min a concentração de A retornou novamente a 50%; por fim de 25,0-30,0 min a concentração de A manteve-se em 50%. O fluxo foi de  $1 \text{ mL min}^{-1}$  (figura 22).

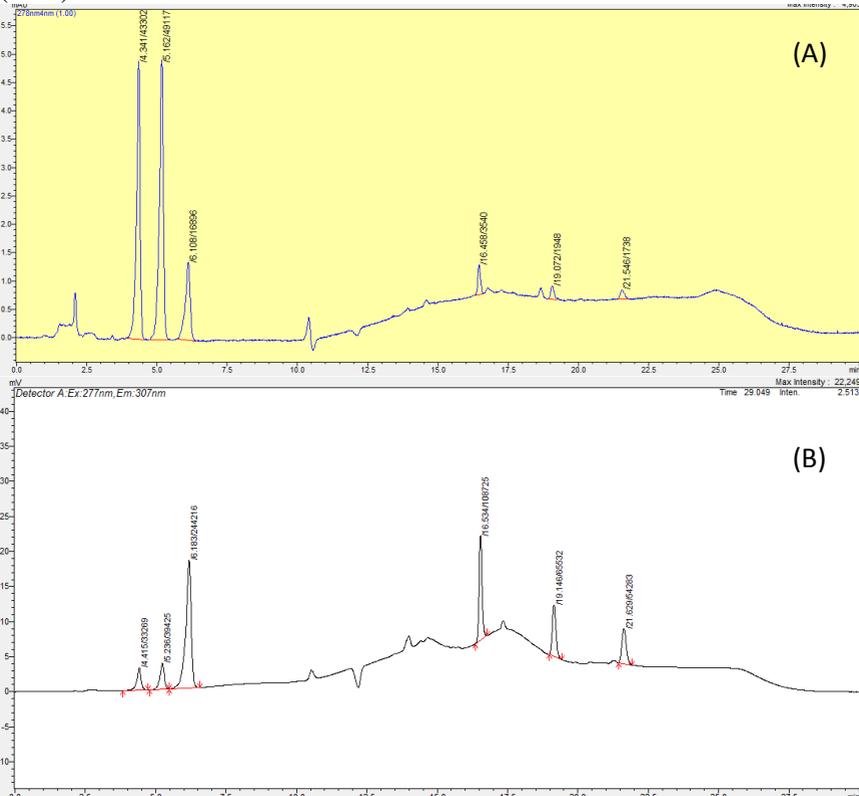
**Figura 22** – Cromatograma obtido pela injeção direta no cromatógrafo líquido da mistura contendo os analitos (8 mg L<sup>-1</sup>). Analitos : MP (t<sub>R</sub> = 4,36 min), EP (t<sub>R</sub> = 5,18 min), BFA (t<sub>R</sub> = 6,13 min), 4-*t*-OF (t<sub>R</sub> = 16,47 min), 4-OF (t<sub>R</sub> = 19,08 min) e 4-NF (t<sub>R</sub> = 21,56 min).



Fonte: Aatoria própria (2016)

Este gradiente apresentou uma boa resolução e separação dos picos, sendo então escolhido para a realização dos testes posteriores. Para os parabenois o comprimento de onda máximo foi de 257 nm. Os alquilfenóis e bisfenol A apresentam uma maior sensibilidade no detector de fluorescência (figura 23), então foram usados 277 e 307 como comprimentos de onda de excitação e emissão, respectivamente.

**Figura 23** – Cromatogramas obtidos após a extração pelo sistema de 96-well plate combinado com a HFRLM nas condições iniciais fixadas (condições não otimizadas)\* com analitos a  $240 \mu\text{g L}^{-1}$ . Analitos: MP ( $t_R = 4,36$  min), EP ( $t_R = 5,18$  min), BFA ( $t_R = 6,13$  min), 4-*t*-OF ( $t_R = 16,47$  min), 4-OF ( $t_R = 19,08$  min) e 4-NF ( $t_R = 21,56$  min). (A) com detector de arranjo de diodos (DAD) (B) com detector de fluorescência (FLD).



\*Condições: volume total de 1,5 mL, membrana recoberta com 1-octanol, 30  $\mu\text{L}$  de hexano como solvente extrator, tempo de extração de 60 min, pH fixado em 4, sem adição de NaCl e dessorção líquida com 300  $\mu\text{L}$  de ACN por 10 min.

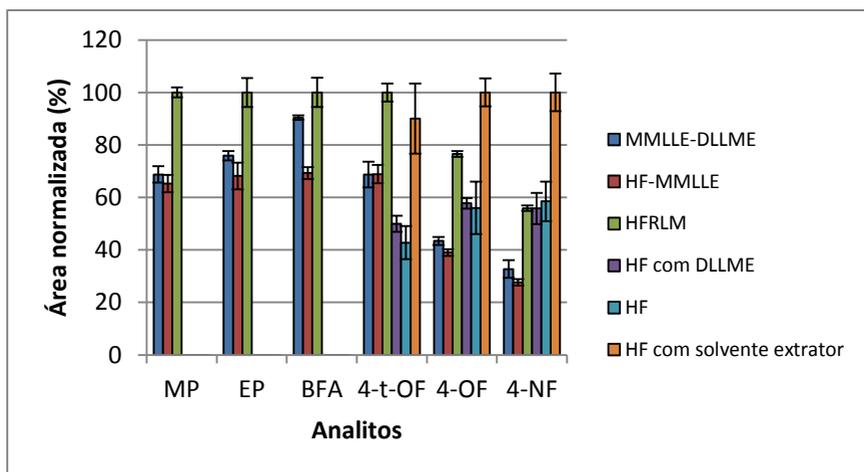
Fonte: Autoria própria (2016)

Posteriormente foram realizadas as otimizações das condições de extração e dessorção.

## 5.2. COMPARAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE EXTRAÇÃO

O estudo inicial realizado foi sobre a comparação das técnicas juntamente com o sistema de *96-well plate*. Para tal, testou-se o uso ou não do recobrimento na membrana, a utilização de solvente extrator e o emprego de uma mistura de solventes extrator e dispersor (figura 24).

**Figura 24** – Comparação da eficiência de extração.



\*Condições gerais: volume total de 1,5 mL fortificado com  $240 \mu\text{g L}^{-1}$  dos analitos, tempo de extração de 60 min, pH fixado em 4, sem adição de NaCl e dessorção líquida com  $300 \mu\text{L}$  de ACN por 10 min. Número de replicatas igual a 3.

Condições específicas:

MMLLE-DLLME: solvente de recobrimento 1-octanol e  $30 \mu\text{L}$  de uma mistura de solventes extrator e dispersor (hexano e acetona, 1:8).

HF-MMLLE: solvente de recobrimento 1-octanol.

HFRLM: solvente de recobrimento 1-octanol e  $30 \mu\text{L}$  de hexano como solvente extrator.

HF com DLLME: membrana sem recobrimento e  $30 \mu\text{L}$  de uma mistura de solventes extrator e dispersor (hexano e acetona, 1:8).

HF: membrana sem recobrimento.

HF com solvente extrator: membrana sem recobrimento e  $30 \mu\text{L}$  de hexano como solvente extrator.

Fonte: Autoria própria (2016)

De acordo com os dados obtidos, a técnica compromisso para a análise de todos os analitos é a HFRLM, em que o 1-octanol é o solvente impregnado nos poros da membrana e o hexano atua como solvente extrator.

Nota-se a necessidade de recobrimento da membrana para a avaliação dos três primeiros analitos, pois sem este os mesmos não são extraídos. Percebe-se que os três últimos analitos também apresentam uma boa resposta para a membrana oca não recoberta com adição de solvente extrator.

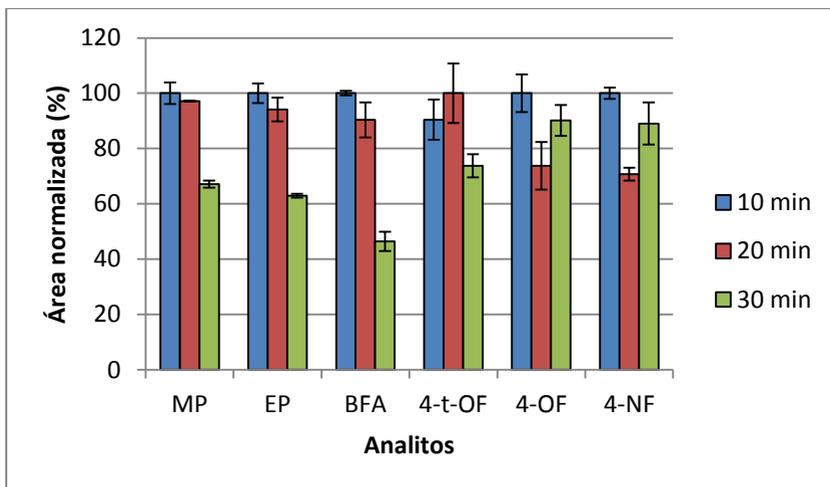
Isto pode ser devido ao fato que mesmo não havendo solvente impregnado nos poros da membrana, o hexano que é adicionado na amostra, forma uma fina camada na membrana hidrofóbica devido à afinidade com a mesma e assim ocorrendo o transporte dos analitos. Juntamente com isso, estes compostos (alquilfenóis) possuem um maior log P (entre 4,69 e 5,74) comparado aos demais analitos em estudo, e o hexano (3,13) em relação ao 1-octanol (2,58) também tem um log P mais elevado. Esta pode ser uma justificativa para o fato de este método ter se mostrado tão eficiente para a extração dos mesmos.

Para melhorar ainda mais a eficiência da HFRLM o solvente extrator, o volume do mesmo, recobrimento e outros fatores foram estudados.

### 5.3. CONDIÇÕES DE DESSORÇÃO

Definido o procedimento de extração, seguiu-se a otimização. Para a dessorção foram estudados o tempo e o solvente de dessorção.

O tempo que apresentou uma melhor resposta analítica foi 10 min (figura 25). Este também mostrou boa precisão, além de aumentar a frequência analítica do método.

**Figura 25** – Escolha do tempo de dessorção.

\*Condições: volume total de 1,5 mL fortificado com  $240 \mu\text{g L}^{-1}$  dos analitos, solvente de recobrimento 1-octanol,  $30 \mu\text{L}$  de hexano como solvente extrator, tempo de extração de 60 min, pH fixado em 4, sem adição de NaCl e dessorção líquida com  $300 \mu\text{L}$  de ACN. Número de replicatas igual a 3.

Fonte: Autoria própria (2016)

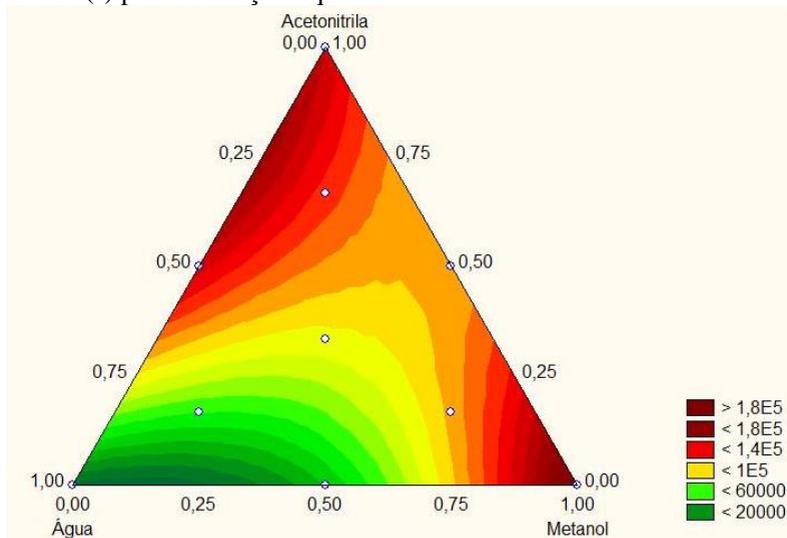
O solvente de dessorção foi escolhido através de ensaios realizados seguindo o modelo da superfície triangular de acordo com a tabela 2 e os resultados são apresentados na figura 26.

**Tabela 2** – Experimentos da superfície triangular para escolha do(s) solvente(s) na etapa de dessorção líquida.

| Experimentos       | Água          |                 | Acetonitrila  |                 | Metanol       |                 |
|--------------------|---------------|-----------------|---------------|-----------------|---------------|-----------------|
|                    | Proporção (%) | Proporção (v/v) | Proporção (%) | Proporção (v/v) | Proporção (%) | Proporção (v/v) |
| 1                  | 1,000         | 300 µL          | 0,000         | 0 µL            | 0,000         | 0 µL            |
| 2                  | 0,000         | 0 µL            | 1,000         | 300 µL          | 0,000         | 0 µL            |
| 3                  | 0,000         | 0 µL            | 0,000         | 0 µL            | 1,000         | 300 µL          |
| 4                  | 0,500         | 150 µL          | 0,500         | 150 µL          | 0,000         | 0 µL            |
| 5                  | 0,500         | 150 µL          | 0,000         | 0 µL            | 0,500         | 150 µL          |
| 6                  | 0,000         | 0 µL            | 0,500         | 150 µL          | 0,500         | 150 µL          |
| 7                  | 0,667         | 200 µL          | 0,167         | 50 µL           | 0,167         | 50 µL           |
| 8                  | 0,167         | 50 µL           | 0,667         | 200 µL          | 0,167         | 50 µL           |
| 9                  | 0,167         | 50 µL           | 0,167         | 50 µL           | 0,667         | 200 µL          |
| 10 (ponto central) | 0,333         | 100 µL          | 0,333         | 100 µL          | 0,333         | 100 µL          |
| 11 (ponto central) | 0,333         | 100 µL          | 0,333         | 100 µL          | 0,333         | 100 µL          |
| 12 (ponto central) | 0,333         | 100 µL          | 0,333         | 100 µL          | 0,333         | 100 µL          |

Fonte: Autoria própria (2016)

**Figura 26** – Superfície triangular com  $r^2 = 0,8450$  para otimização do(s) solvente(s) para dessorção líquida.



\*Condições: volume total de 1,5 mL fortificado com  $240 \mu\text{g L}^{-1}$  dos analitos, solvente de recobrimento 1-octanol,  $30 \mu\text{L}$  de hexano como solvente extrator, tempo de extração de 60 min, pH fixado em 4, sem adição de NaCl e dessorção líquida com  $300 \mu\text{L}$  de solvente por 10 min.

Fonte: Autoria própria (2016)

Os dados obtidos sugerem duas regiões de máximo, uma com 100% de metanol e outra com uma mistura de acetonitrila e água na proporção de 75:25, respectivamente. Apesar de o solvente metanol apresentar uma boa resposta, o pico do metilparabeno ficou duplicado. Além disso, a fase móvel do método é composta por acetonitrila e água, assim a escolha desses solventes para dessorção apresentará total compatibilidade com a fase móvel empregada.

Otimizado o processo de dessorção, prosseguiu-se com os estudos sobre os parâmetros de extração.

#### 5.4. SOLVENTE DE RECOBRIMENTO DA MEMBRANA

Ao mergulhar a membrana em um solvente orgânico forma-se uma membrana líquida que fica impregnada nos poros da mesma.

Apesar de esta técnica apresentar grandes benefícios, ela também possui suas limitações (MALIK, M. A 2011; MANNA, M. S. 2014).

Um problema desta metodologia está associado à estabilidade do filme formado, vários fatores durante o procedimento podem causar a desestabilização do solvente impregnado, como por exemplo, o uso prolongado (MALIK, M. A 2011; MANNA, M. S. 2014).

Assim pode-se ocorrer a perda desse recobrimento devido à dissolução ou evaporação, pois muitos solventes orgânicos são voláteis. Sabendo dessas restrições é possível minimizar as mesmas, através de escolhas cuidadosas, tais como o solvente utilizado para a formação do filme (MALIK, M. A 2011; MANNA, M. S. 2014).

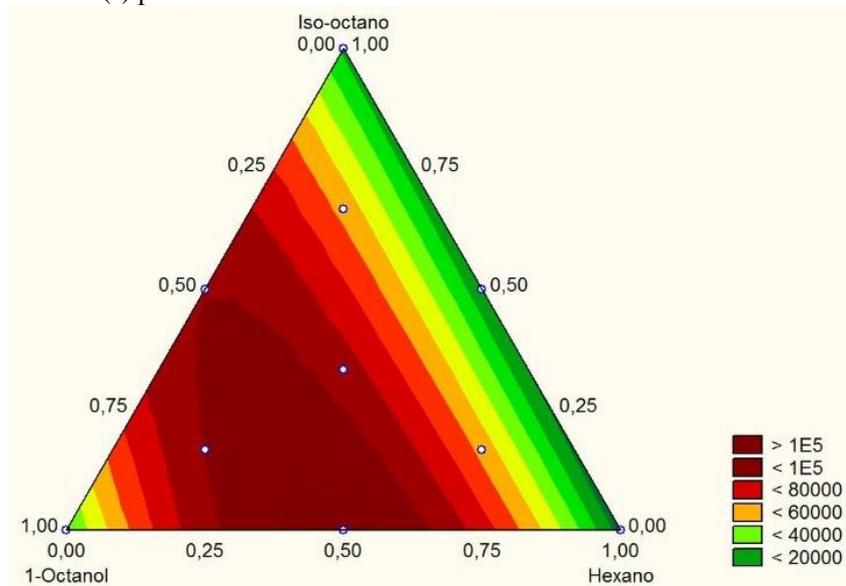
Nesta otimização foram empregados três solventes diferentes sendo eles: 1-octanol, hexano e iso-octano (figura 27) e por meio da superfície triangular foram realizados os experimentos (tabela 3).

**Tabela 3** – Experimentos da superfície triangular para escolha do(s) solvente(s) para o recobrimento da membrana.

| Experimentos       | 1-Octanol     |                 | Hexano        |                 | Iso-octano    |                 |
|--------------------|---------------|-----------------|---------------|-----------------|---------------|-----------------|
|                    | Proporção (%) | Proporção (v/v) | Proporção (%) | Proporção (v/v) | Proporção (%) | Proporção (v/v) |
| 1                  | 1,000         | 300 µL          | 0,000         | 0 µL            | 0,000         | 0 µL            |
| 2                  | 0,000         | 0 µL            | 1,000         | 300 µL          | 0,000         | 0 µL            |
| 3                  | 0,000         | 0 µL            | 0,000         | 0 µL            | 1,000         | 300 µL          |
| 4                  | 0,500         | 150 µL          | 0,500         | 150 µL          | 0,000         | 0 µL            |
| 5                  | 0,500         | 150 µL          | 0,000         | 0 µL            | 0,500         | 150 µL          |
| 6                  | 0,000         | 0 µL            | 0,500         | 150 µL          | 0,500         | 150 µL          |
| 7                  | 0,667         | 200 µL          | 0,167         | 50 µL           | 0,167         | 50 µL           |
| 8                  | 0,167         | 50 µL           | 0,667         | 200 µL          | 0,167         | 50 µL           |
| 9                  | 0,167         | 50 µL           | 0,167         | 50 µL           | 0,667         | 200 µL          |
| 10 (ponto central) | 0,333         | 100 µL          | 0,333         | 100 µL          | 0,333         | 100 µL          |
| 11 (ponto central) | 0,333         | 100 µL          | 0,333         | 100 µL          | 0,333         | 100 µL          |
| 12 (ponto central) | 0,333         | 100 µL          | 0,333         | 100 µL          | 0,333         | 100 µL          |

Fonte: Autoria própria (2016)

**Figura 27** – Superfície triangular com  $r^2 = 0,9071$  para otimização do(s) solvente(s) para recobrimento da membrana.



\*Condições: volume total de 1,5 mL fortificado com  $240 \mu\text{g L}^{-1}$  dos analitos,  $30 \mu\text{L}$  de hexano como solvente extrator, tempo de extração de 60 min, pH fixado em 4, sem adição de NaCl e dessorção líquida com  $300 \mu\text{L}$  (75:25 v/v) de ACN:H<sub>2</sub>O por 10 min.

Fonte: Autoria própria (2016)

De acordo com os dados obtidos, uma mistura de 1-octanol e hexano na proporção 50:50 foi a condição ótima selecionada. Este resultado fortalece mais uma vez a ideia da afinidade dos analitos pelos diferentes solventes. Enquanto os parabens e o bisfenol A demonstram uma preferência por 1-octanol que apresenta um menor valor de log P comparado aos demais, os alquilfenóis exibem maior afinidade pelos solventes mais polares.

Embora a proporção 50:50 de 1-octanol e iso-octano também tenha exibido uma boa resposta, escolheu-se o hexano. Pois, este apresenta uma menor toxicidade ( $\text{LD } 50_{\text{iso-octano}} > \text{LD } 50_{\text{hexano}}$ ).

O emprego de uma mistura de solventes para o recobrimento dos poros da membrana é inédito na literatura.

## 5.5. SOLVENTE EXTRATOR

O solvente extrator deve apresentar polaridade semelhante a dos analitos em estudo, para a obtenção de um elevado coeficiente de partição (BEDENDO, 2010).

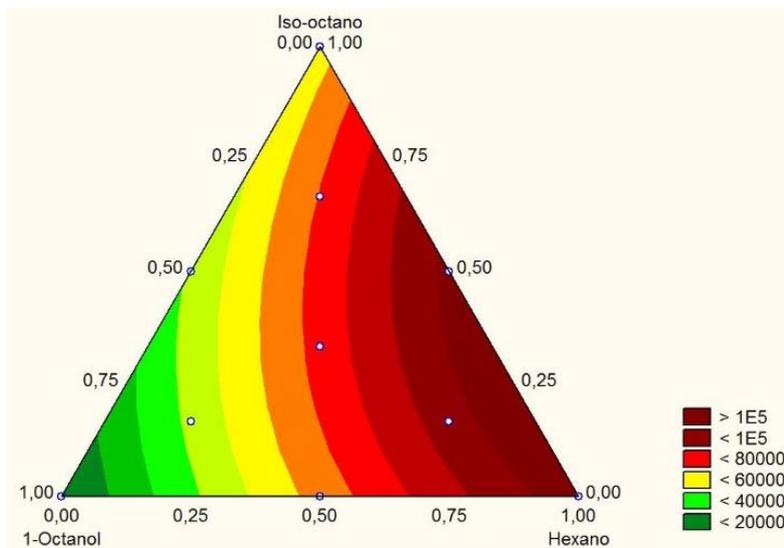
Através do modelo da superfície ternária (tabela 4), foi estudada a influência de três solventes: 1-octanol, hexano e iso-octano (figura 28).

**Tabela 4** – Experimentos da superfície triangular para escolha do(s) solvente(s) extrator.

| Experimentos       | 1-Octanol<br>Proporção |       | Hexano<br>Proporção |       | Iso-octano<br>Proporção |       |
|--------------------|------------------------|-------|---------------------|-------|-------------------------|-------|
|                    | (%)                    | (v/v) | (%)                 | (v/v) | (%)                     | (v/v) |
| 1                  | 1,000                  | 30 µL | 0,000               | 0 µL  | 0,000                   | 0 µL  |
| 2                  | 0,000                  | 0 µL  | 1,000               | 30 µL | 0,000                   | 0 µL  |
| 3                  | 0,000                  | 0 µL  | 0,000               | 0 µL  | 1,000                   | 30 µL |
| 4                  | 0,500                  | 15 µL | 0,500               | 15 µL | 0,000                   | 0 µL  |
| 5                  | 0,500                  | 15 µL | 0,000               | 0 µL  | 0,500                   | 15 µL |
| 6                  | 0,000                  | 0 µL  | 0,500               | 15 µL | 0,500                   | 15 µL |
| 7                  | 0,667                  | 20 µL | 0,167               | 5 µL  | 0,167                   | 5 µL  |
| 8                  | 0,167                  | 5 µL  | 0,667               | 20 µL | 0,167                   | 5 µL  |
| 9                  | 0,167                  | 5 µL  | 0,167               | 50 µL | 0,667                   | 20 µL |
| 10 (ponto central) | 0,333                  | 10 µL | 0,333               | 10 µL | 0,333                   | 10 µL |
| 11 (ponto central) | 0,333                  | 10 µL | 0,333               | 10 µL | 0,333                   | 10 µL |
| 12 (ponto central) | 0,333                  | 10 µL | 0,333               | 10 µL | 0,333                   | 10 µL |

Fonte: Autoria própria (2016)

**Figura 28** – Superfície triangular com  $r^2 = 0,9436$  para otimização do(s) solvente(s) extrator.



\*Condições: volume total de 1,5 mL fortificado com  $240 \mu\text{g L}^{-1}$  dos analitos, solventes de recobrimento 1-octanol:hexano (50:50 v/v), tempo de extração de 60 min, pH fixado em 4, sem adição de NaCl e dessorção líquida com  $300 \mu\text{L}$  (75:25 v/v) de ACN:H<sub>2</sub>O por 10 min.

Fonte: Autoria própria (2016)

A condição ótima foi o emprego de hexano como solvente de extração. Apesar de uma mistura contendo hexano e iso-octano também fornecer um bom resultado, optou-se pela simplificação de utilizar apenas um solvente. Além disso, este é um dos solventes extratores mais empregados por diversas técnicas para este fim, como por exemplo, no estudo de compostos aromáticos (BOCQUET, *et al.*, 2006) e pesticidas (SILVA, *et al.*, 2015).

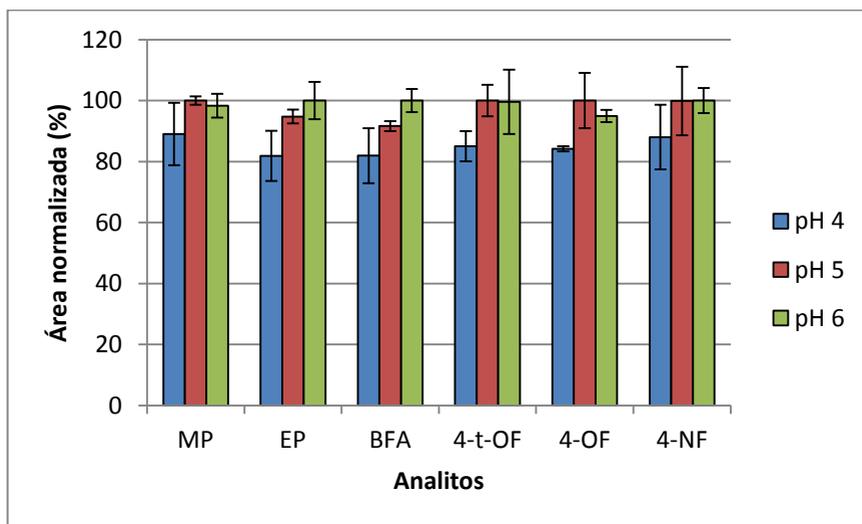
## 5.6. pH DA AMOSTRA

O ajuste do pH é essencial para que se possa obter uma elevada eficiência de extração. Na técnica adotada neste trabalho é fundamental que os analitos presentes na amostra encontrem-se na forma neutra. Isto, para que os mesmos apresentem afinidade pelo solvente extrator e consequentemente pela membrana líquida suportada.

Desta maneira, ocorre a migração dos compostos da fase aquosa para a membrana. Assim, para a análise de espécies ácidas o pH da amostra deve ser ao menos 1,5 unidade inferior em relação ao pKa dos analitos estudados (OLIVEIRA, *et al.*, 2008; MERIB; CARASEK, 2013).

Para os parabenos predomina-se a forma neutra até um pH de aproximadamente 6 (ALMEIDA; NOGUEIRA, 2014). Desta maneira, considerando o pKa dos diferentes compostos foi avaliada uma faixa de pH de 4 a 6. A Figura 29 mostra o resultado deste estudo.

**Figura 29** – Escolha do pH da amostra.



\*Condições: volume total de 1,5 mL fortificado com  $240 \mu\text{g L}^{-1}$  dos analitos,  $30 \mu\text{L}$  de hexano como solvente extrator, solventes de recobrimento 1-octanol:hexano (50:50 v/v), tempo de extração de 60 min, sem adição de NaCl e dessorção líquida com  $300 \mu\text{L}$  (75:25 v/v) de ACN:H<sub>2</sub>O por 10 min. Número de replicatas igual a 3.

Fonte: Autoria própria (2016)

Avaliando os dados da Figura 29 é possível notar que tanto o pH 5 como o 6 exibem boas respostas e precisão. Dentre todos os analitos em estudo, o metilparabeno é o que possui menor sensibilidade, assim o pH 5 foi escolhido com o intuito de favorecer a determinação do

mesmo. Este resultado é semelhante aos descritos na literatura. Neng (2011) empregou pH 5 como condição ótima no estudo de alguns desreguladores endócrinos, tais como, bisfenol A, 4-octilfenol e 4-nonilfenol. No caso dos parabenos, pH na faixa 5,5 tem sido reportado (ALMEIDA; NOGUEIRA, 2014; DIAS, *et al.*, 2015).

## 5.7. TEMPO DE EXTRAÇÃO, EFEITO DA FORÇA IÔNICA E VOLUME DE SOLVENTE EXTRATOR.

A transferência de massa entre as fases influencia diretamente a eficiência da extração. E esta é dependente do tempo, assim a otimização desse parâmetro torna-se importantíssimo. Sendo este um processo de equilíbrio, quanto mais próximo o sistema estiver destas condições menor será essa taxa de transferência. E quando o equilíbrio for atingido ela se torna constante (PSILLAKIS; KALOGERAKIS, 2003; OLIVEIRA, *et al.*, 2008; MERIB; CARASEK, 2013).

A influência do ajuste da força iônica vai ser dependente dos analitos de estudo. A adição de sal pode aumentar a eficiência da extração através do efeito chamado *salting out*, em que será reduzida a solubilidade dos compostos na amostra. Isto ocorre devido à solvatação dos íons pelas moléculas de água e consequentemente reduzindo a dissolução dos analitos por um mecanismo de competição. Porém, em alguns casos a força iônica pode não ser significativa para o processo de extração ou até limitar o mesmo (PSILLAKIS; KALOGERAKIS, 2003; OLIVEIRA, *et al.*, 2008; MERIB; CARASEK, 2013).

O solvente adicionado diretamente na amostra deve apresentar características, tais como, baixa solubilidade em água e atuar como um bom extrator para os analitos. O volume de solvente extrator deve ser suficiente para manter a renovação da membrana líquida suportada, em altas quantidades pode ocorrer a formação de microemulsões (BEDENDO, 2010; ASSADI, *et al.*, 2010).

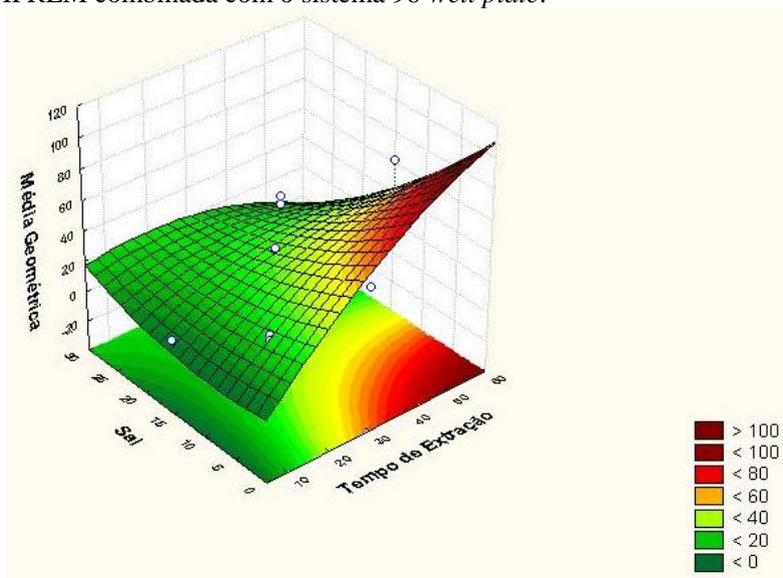
Para a verificação dessas variáveis foi realizada uma otimização multivariada baseada no modelo do composto central. Foram realizados 17 experimentos como descrito na Tabela 5. Foram estudados tempos de extração na faixa de 5 a 60 min., a porcentagem de sal (NaCl) variou de 0 a 30 % e o volume de solvente extrator investigado foi de 5 a 55  $\mu\text{L}$ . A partir dos dados obtidos, foram construídas superfícies de resposta para a avaliar as melhores condições de extração (figuras 30, 31 e 32).

**Tabela 5** – Planejamento do Composto Central para a otimização da quantidade de sal, volume de solvente extrator (hexano) e tempo de extração.

| <b>Tempo de extração</b> | <b>Sal</b> | <b>Volume de solvente extrator</b> | <b>Tempo de extração</b> | <b>Sal</b> | <b>Volume de solvente extrator</b> |
|--------------------------|------------|------------------------------------|--------------------------|------------|------------------------------------|
| -1,00000                 | -1,00000   | -1,00000                           | 15 min                   | 6%         | 15 µL                              |
| -1,00000                 | 1,00000    | 1,00000                            | 15 min                   | 24%        | 45 µL                              |
| 1,00000                  | -1,00000   | 1,00000                            | 45 min                   | 6%         | 45 µL                              |
| 1,00000                  | 1,00000    | -1,00000                           | 45 min                   | 24%        | 15 µL                              |
| 0,00000                  | 0,00000    | 0,00000                            | 30 min                   | 15%        | 30 µL                              |
| -1,00000                 | -1,00000   | 1,00000                            | 15 min                   | 6%         | 45 µL                              |
| -1,00000                 | 1,00000    | -1,00000                           | 15 min                   | 24%        | 15 µL                              |
| 1,00000                  | -1,00000   | -1,00000                           | 45 min                   | 6%         | 15 µL                              |
| 1,00000                  | 1,00000    | 1,00000                            | 45 min                   | 24%        | 45 µL                              |
| 0,00000                  | 0,00000    | 0,00000                            | 30 min                   | 15%        | 30 µL                              |
| -1,67332                 | 0,00000    | 0,00000                            | 5 min                    | 15%        | 30 µL                              |
| 1,67332                  | 0,00000    | 0,00000                            | 60 min                   | 15%        | 30 µL                              |
| 0,00000                  | -1,67332   | 0,00000                            | 30 min                   | 0%         | 30 µL                              |
| 0,00000                  | 1,67332    | 0,00000                            | 30 min                   | 30%        | 30 µL                              |
| 0,00000                  | 0,00000    | -1,67332                           | 30 min                   | 15%        | 5 µL                               |
| 0,00000                  | 0,00000    | 1,67332                            | 30 min                   | 15%        | 55 µL                              |
| 0,00000                  | 0,00000    | 0,00000                            | 30 min                   | 15%        | 30 µL                              |

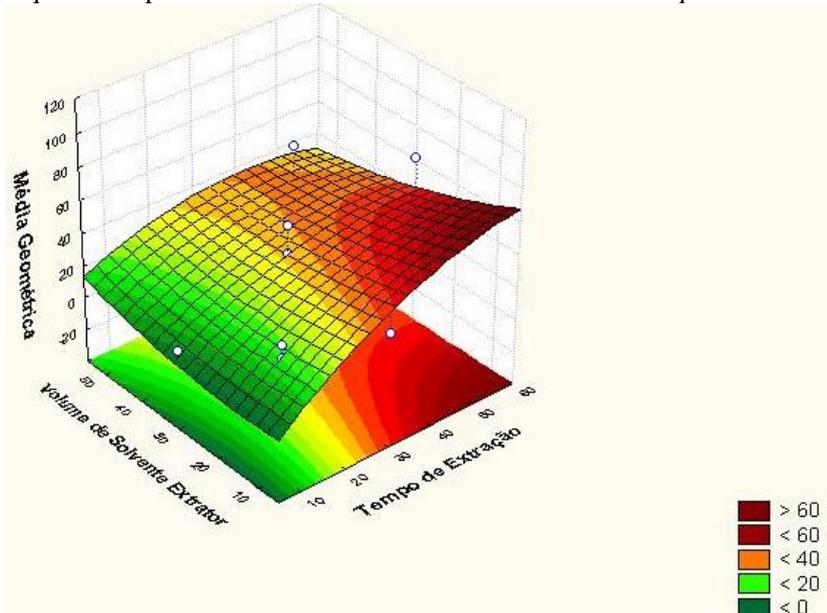
Fonte: Autoria própria (2016)

**Figura 30** – Superfície de resposta obtida tempo versus % de sal ( $r^2 = 0,8447$ ) na extração dos parabenos, bisfenol A e alquilfenóis por HFRLM combinada com o sistema 96-well plate.



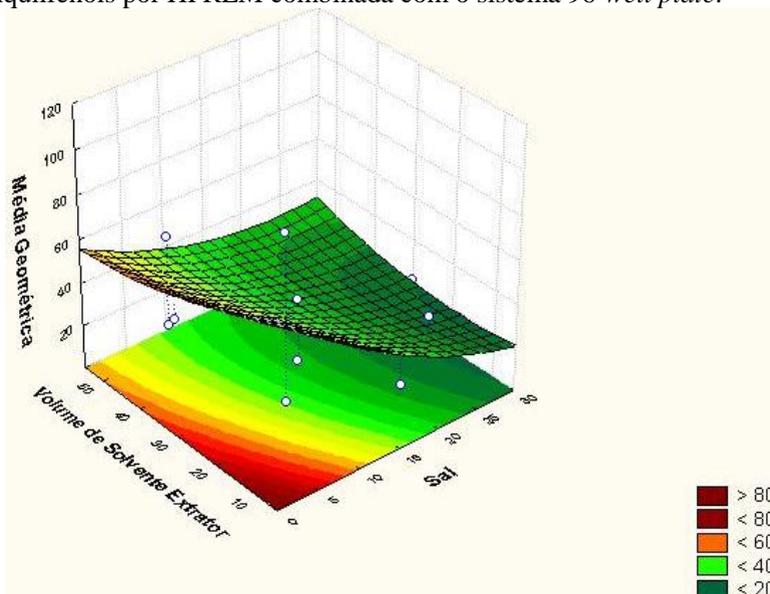
Fonte: Autoria própria (2016)

**Figura 31** – Superfície de resposta obtida tempo versus volume de solvente extrator ( $r^2 = 0,8447$ ) na extração dos parabenos, bisfenol A e alquilfenóis por HFRLM combinada com o sistema 96-well plate.



Fonte: Autoria própria (2016)

**Figura 32** – Superfície de resposta obtida volume de solvente extrator versus % de sal ( $r^2 = 0,8447$ ) na extração dos parabenos, bisfenol A e alquilfenóis por HFRLM combinada com o sistema 96-well plate.



Fonte: Autoria própria (2016)

De acordo com os resultados obtidos, o tempo de extração tende a um máximo, como pode ser observado na primeira e na segunda superfície. Para aumentar a frequência analítica do método escolheu-se a utilização de 45 min de extração.

Em relação ao efeito da força iônica a condição ótima foi a não utilização de sal (NaCl), como pode ser notado na primeira e na terceira superfície. Este efeito não significativo sobre a eficiência da extração está de acordo com alguns artigos publicados na literatura. Na análise de 4-octilfenol e 4-nonilfenol, Villar-Navarro e colaboradores (2013) chegaram ao mesmo resultado encontrado neste trabalho. Apesar dos parabenos apresentarem uma maior polaridade em comparação aos outros analitos além do grupo -OH e já ter sido reportado o emprego de sal na análise destes (DIAS, *et al.*, 2015), também tem sido relatado experimentos em que 0 % de sal foi a condição ideal para as extrações (JAIN, *et al.*, 2013; ALSHANA; ERTAS; GOGER, 2015).

Analisando a segunda e a terceira superfície percebe-se que uma menor quantidade de solvente apresentou uma melhor resposta.

Desta forma, um volume de 15  $\mu\text{L}$  foi adotado para a realização dos ensaios seguintes.

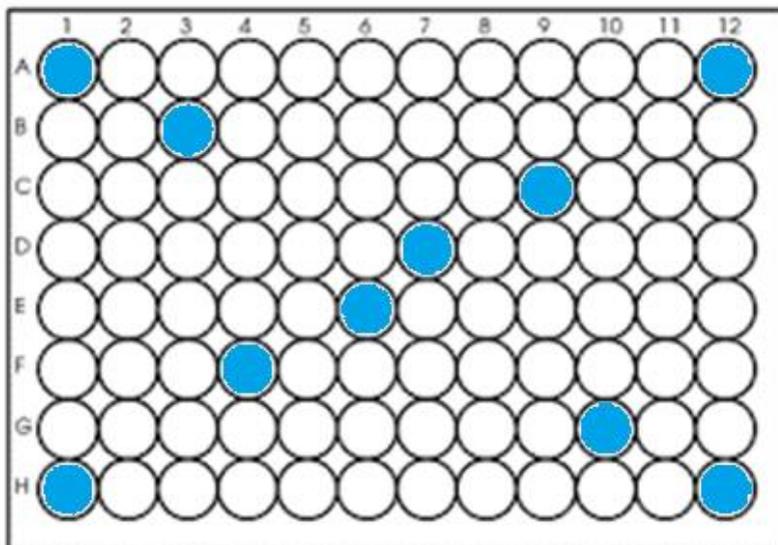
## 5.8. REPRODUTIBILIDADE DOS POÇOS

Este experimento teve a intenção de demonstrar que o resultado é independente da posição do poço, ou seja, que a localização não interferirá na precisão da extração. Para tal, foram empregadas as condições ótimas do método.

Em resumo, foram empregados um volume total de 1,5 mL fortificado com 240  $\mu\text{g L}^{-1}$  dos analitos, 15  $\mu\text{L}$  de hexano como solvente extrator, solventes de recobrimento 1-octanol:hexano (50:50 v/v), tempo de extração de 45 min, pH fixado em 5, sem adição de NaCl e dessorção líquida com 300  $\mu\text{L}$  (75:25 v/v) de ACN:H<sub>2</sub>O por 10 min.

Foram utilizadas 10 localizações diferentes como exemplificado na Figura 33 e os resultados são mostrados na tabela 6.

**Figura 33** – Localização dos poços do sistema de 96-Well plate.



Fonte: Adaptado da internet (2016)

**Tabela 6** – Estudo da precisão da localização dos poços.

| <b>Analito</b>             | <b>RSD (%)</b> |
|----------------------------|----------------|
| Metilparabeno              | 7,1            |
| Etilparabeno               | 6,1            |
| Bisfenol A                 | 4,7            |
| 4- <i>terc</i> -Octilfenol | 8,4            |
| 4-Octilfenol               | 13,1           |
| 4-Nonilfenol               | 11,6           |

Fonte: Autoria própria (2016)

Os dados mostraram-se satisfatórios, pois o desvio máximo foi de 13,1 % que está compreendido entre a faixa considerada como adequada, até 20 %. Vale ressaltar que, os três últimos analitos que apresentaram maior RSD são analisados através do detector de fluorescência que possui uma grande detectabilidade, deste modo podendo aumentar a faixa de erro. Assim, comprova-se que independentemente da localização do poço o resultado é o mesmo.

## 5.9. PARÂMETROS ANALÍTICOS DE MÉRITO E ANÁLISE DAS AMOSTRAS

Apesar de muitos desreguladores endócrinos não possuírem uma legislação vigente para a sua concentração máxima permitida em água, na legislação Europeia os octilfenóis e nonilfenóis apresentam valores de  $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $0,3 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente. Como o FLD (fluorescência) é um detector muito sensível, na primeira parte deste trabalho empregou-se uma baixa sensibilidade e um ganho menor. Isto foi necessário, pois o modo gradiente da fase móvel alterava muito a linha base, dificultando a integração dos picos. Na intenção de aumentar a sensibilidade e o ganho na análise dos alquilfenóis, foram realizadas corridas separadas para a obtenção dos parâmetros analíticos de mérito e análise das amostras. Na determinação de parabenos e bisfenol A usou-se a mesma fase móvel inicial, porém a corrida foi apenas até 8 min. Para os alquilfenóis empregou-se uma corrida cromatográfica no modo isocrático cujos solventes foram acetonitrila (80%) e água (20%), e o tempo total de análise foi de 12 min, sendo os novos tempos de retenção de 6,4; 8,5 e 10,8 para 4-*terc*-Octilfenol, 4-Octilfenol, e 4-Nonilfenol, respectivamente. Assim, 20 min foi o tempo total para as corridas, tendo-se um ganho de 10 min em cada corrida ao se comparar a realizada anteriormente.

Obtidas as condições ótimas de extração e dessorção foram, então, avaliados os parâmetros analíticos de mérito (tabela 7). Para tal, foram construídas curvas de calibração para cada analito e então se avaliou o limite de quantificação (LOQ), limite de detecção (LOD), desvio padrão relativo (RSD) e faixa linear de trabalho.

**Tabela 7** – Faixa linear, coeficiente de correlação, limites de detecção e quantificação obtidos para o método proposto HFRLM combinada com o sistema 96-Well plate para determinar parabenos, bisfenol A e alquilfenóis em amostra aquosa.

| <b>Analitos</b>                | <b>LOD<br/>(<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</b> | <b>LOQ<br/>(<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</b> | <b>Faixa<br/>Linear*<br/>(<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</b> | <b>Curva<br/>Analítica</b> | <b><math>r^2</math></b> |
|--------------------------------|--|--|--|----------------------------|-------------------------|
| Metilparabeno                  | 5,0  | 15,0   | 15,0-60,0  | $y = 135,65x - 33,57$      | 0,9908                  |
| Etilparabeno                   | 5,0  | 15,0   | 15,0-60,0  | $y = 186,22x - 303,59$     | 0,9921                  |
| Bisfenol A                     | 3,0  | 8,0  | 8,0-60,0   | $y = 530,89x - 111,46$     | 0,9963                  |
| 4- <i>terc</i> -<br>Octilfenol | 0,2  | 0,5  | 0,5-8,0  | $y = 31756x + 100509$      | 0,9992                  |
| 4-Octilfenol                   | 0,4  | 1,0  | 1,0-8,0  | $y = 7992,3x + 26395$      | 0,9945                  |
| 4-Nonilfenol                   | 0,2  | 0,5  | 0,5-6,0  | $y = 9005,5x + 2821,1$     | 0,9984                  |

\*Analitos: metilparabeno e etilparabeno, DAD com  $\lambda_{\text{máx}}$  de 257. Analitos: bisfenol A, 4-*terc*-octilfenol, 4-octilfenol e 4-nonilfenol, FLD com  $\lambda_{\text{ex}}$  de 277 e  $\lambda_{\text{em}}$  de 307.

Fonte: Autoria própria (2016)

Ao comparar os dados obtidos com alguns encontrados na literatura (tabela 8), nota-se que o método proposto apresenta um bom limite de detecção e faixa linear para os analitos em questão. Além disso, a combinação do sistema de 96-*well plate* com a HFRLM permite realizar a extração de 96 amostras em 45 min, enquanto outras técnicas levam em torno de 10 a 30 minutos para apenas uma extração. O pouco consumo de solvente empregado também é um destaque da metodologia adotada neste trabalho. Ainda é possível reduzir os limites encontrados empregando-se, por exemplo, um espectrômetro de massa (MS). Outra possível maneira seria realizar a secagem do solvente de dessorção com nitrogênio e posteriormente reconstituir em um volume menor. Em resumo, o método mostrou uma boa eficiência de extração, baixo custo, pouco consumo de solvente e uma excelente frequência analítica.

**Tabela 8** – Comparação de trabalhos descritos na literatura com o método proposto HFRLM combinada com o sistema 96-Well plate.

| Trabalho                                | Analitos        | LOD<br>( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) | Faixa<br>Linear<br>( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) | Modo de<br>extração | Modo<br>de<br>detecção |
|---|-----------------|---------------------------------|---|---------------------|------------------------|
| Este trabalho                           | MP              | 5,0                             | 15,0-                                       | HRLME               | HPLC-                  |
|   | EP              | 5,0                             | 60,0  | combinada           | DAD e                  |
|   | BFA             | 3,0                             | 15,0-                                       | com 96-Well         | FLD                    |
|   | 4- <i>t</i> -OF | 0,2                             | 60,0  | plate, hexano       |                        |
|   | 4-OF            | 0,4                             | 8,0-  | como solvente       |                        |
|   | 4-NF            | 0,2                             | 60,0  | extrator, poros     |                        |
|   |                 |                                 | 0,5-8,0                                     | da membrana         |                        |
|   |                 |                                 | 1,0-8,0                                     | recobertos          |                        |
|   |                 |                                 | 0,5-6,0                                     | com hexano e        |                        |
|   |                 |                                 |   | 1-octanol           |                        |
|   |                 |                                 |   | (50:50 v/v) e       |                        |
|   |                 |                                 |   | tempo de            |                        |
|   |                 |                                 |   | extração de 45      |                        |
|   |                 |                                 |   | min.                |                        |
| Villar-<br>Navarro,<br>et al.,<br>2013. | 4-OF            | 0,54                            | -   | HF-LPME em          | HPLC-                  |
|   | 4-NF            | 0,52                            | -   | configuração        | FLD                    |
|   |                 |                                 |   | de três fases,      |                        |
|   |                 |                                 |   | poros da            |                        |
|   |                 |                                 |   | membrana            |                        |
|   |                 |                                 |   | recobertos          |                        |
|   |                 |                                 |   | com dihexil         |                        |
|   |                 |                                 |   | éter e tempo        |                        |
|   |                 |                                 |   | de extração de      |                        |
|   |                 |                                 |   | 30 min.             |                        |
| Zhou, <i>et</i><br><i>al.</i> , 2011.   | BFA             | 0,23                            | 1,0–  | IL-DLLME,           | HPLC-                  |
|   | 4- <i>t</i> -OF | 0,35                            | 100,0                                       | 65 $\mu\text{L}$ de | FLD                    |
|   | 4-NF            | 0,48                            | 1,5–  | líquido iônico,     |                        |
|   |                 |                                 | 150,0                                       | sem adição de       |                        |
|   |                 |                                 | 3,0–  | sal e tempo de      |                        |
|   |                 |                                 | 300,0                                       | extração de 20      |                        |
|   |                 |                                 |   | min.                |                        |
| Zhong, <i>et</i><br><i>al.</i> , 2011.  | BFA             | 0,50                            | 200,0-                                      | CPE, 0,10%          | CE-UV                  |
|   |                 |                                 | 10000,0                                     | (m/v) de            |                        |
|   |                 |                                 |   | Triton X-114        |                        |
|   |                 |                                 |   | e tempo de          |                        |

|                                  |    |       |                             | extração de 10 min.  |          |
|----------------------------------|----|-------|-----------------------------|--|----------|
| Prichodko, <i>et al.</i> , 2010. | MP | 210,0 | 350,0-                      | DLLME, sem adição de sal, bromobenzeno como solvente extrator e acetona como solvente dispersor. | GC-FID   |
|                                  | EP | 23,0  | 10000,0<br>35,0-<br>10000,0 |  |          |
| Blanco, <i>et al.</i> , 2009.    | MP | 2,2   | 5,0-                        | SPE, pH  | LVSS-    |
|                                  | EP | 2,3   | 1000,0<br>5,0-<br>1000,0    | fixado em 2,5 e metanol como solvente de eluição.  | NACE-DAD |

Fonte: Autoria própria (2016)

Para avaliar a recuperação, precisão e exatidão do método, o mesmo foi aplicado em amostras de água da Lagoa da Conceição (Florianópolis-SC) (tabela 9). As recuperações variaram de 72-130% e os desvios relativos foram de 1-14,3%. Portanto, os resultados foram considerados satisfatórios.

**Tabela 9** – Ensaio de recuperação (R%) e precisão (RSD %) usando o método proposto HFRLM combinada com o sistema 96-Well plate.

| Analito                    | Nível de fortificação ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) | R (%) | RSD (%) |
|----------------------------|--|-------|---------|
| Metilparabeno              | 15,0   | 114   | 4,2     |
|                            | 20,0   | 116   | 5,2     |
|                            | 40,0   | 104   | 2,3     |
| Etilparabeno               | 15,0   | 96    | 6,0     |
|                            | 20,0   | 102   | 2,4     |
|                            | 40,0   | 105   | 3,4     |
| Bisfenol A                 | 8,0  | 86    | 14,3    |
|                            | 15,0   | 98    | 6,5     |
|                            | 20,0   | 106   | 5,7     |
| 4- <i>terc</i> -Octilfenol | 0,5  | 112   | 5,4     |
|                            | 1,0  | 82    | 3,0     |
|                            | 2,0  | 109   | 6,0     |
| 4-Octilfenol               | 1,0  | 72    | 2,4     |
|                            | 2,0  | 91    | 4,0     |
| 4-Nonilfenol               | 0,5  | 130   | 4,4     |
|                            | 1,0  | 92    | 1,0     |
|                            | 2,0  | 96    | 1,3     |

\*Condições: volume total de 1,5 mL, 15  $\mu\text{L}$  de hexano como solvente extrator, solventes de recobrimento 1-octanol:hexano (50:50 v/v), tempo de extração de 45 min, pH fixado em 5, sem adição de NaCl e dessorção líquida com 300  $\mu\text{L}$  (75:25 v/v) de ACN:H<sub>2</sub>O por 10 min. Número de replicatas igual a 3.

Fonte: Autoria própria (2016)

As amostras de água da Lagoa da Conceição apresentaram concentrações de parabenos, bisfenol A e alquilfenóis abaixo dos limites de detecção do método.

## 6. CONCLUSÕES

A nova metodologia proposta, combinação entre a HFRLM e o sistema de *96-well plate* foi aplicada obtendo boas respostas para a determinação e extração de parabenos, bisfenol A e alquilfenóis em amostras aquosas. Embora o fator de pré-concentração não tenha sido muito alto devido a pouca quantidade de amostra empregada, a técnica exibiu bons resultados. O procedimento apresentou valores satisfatórios de LOQ, LOD e faixa linear. Além disso, mostrou uma boa precisão e exatidão através dos ensaios de recuperação em amostras reais. O método possui inúmeras vantagens, tais como, uma excelente frequência analítica com a possibilidade de realizar até 96 extrações ao mesmo tempo, baixo custo, fácil aplicação, pouco uso de solvente e evita efeitos de memória, pois a membrana não é reutilizada. Atrelado a isto, pode-se citar o benefício de empregar a HFRLM que é uma alternativa atraente frente às técnicas de membrana líquida suportada, uma vez que, ao usar-se o solvente extrator evita-se ou minimiza a perda do solvente impregnado nos poros da membrana. Por fim, o método mostrou-se eficiente para a determinação de parabenos, bisfenol A e alquilfenóis em amostras de água.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, C.; NOGUEIRA, J.M.F. Determination of trace levels of parabens in real matrices by baradsorptive microextraction using selective sorbent phases. *Journal of Chromatography A*. v. 1348, p. 17–26, 2014.

ALSHANA, U.; ERTAS, N.; GOGER, N. G. Determination of parabens in human milk and other food samples by capillary electrophoresis after dispersive liquid–liquid microextraction with back-extraction. *Food Chemistry*. v. 181, p. 1–8, 2015.

ANDRADE, K. P.; ALENCAR, L.; BRAGANÇA, R. N. P.; FURTUNATO, D. M. N. A importância do preparo da amostra para o sucesso da análise de alimentos. *Higiene Alimentar*. v. 22, n. 160, 2008.

ASSADI, Y.; AHMADI, F.; HOSSIENI, M. R. M. Determination of BTEX Compounds by Dispersive Liquid–Liquid Microextraction with GC–FID. *Chromatographia*. v. 71, p.1137–1141, 2010.

BACCI, D. C.; PATACA, E. M. Educação para a água. *Estudos Avançados*. v. 22, n. 63, p. 211–226, 2008.

BALEST, L.; LOPEZ, A.; MASCOLO, G.; DI LACONI, C. Removal of endocrine disrupter compounds from municipal wastewater using an aerobic granular biomass reactor. *Biochemical Engineering Journal*. v. 41, p. 288–294, 2008.

BEDENDO, G. Determinação de resíduos de contaminantes orgânicos em matrizes alimentícias e ambientais por microextração em fase líquida suportada por membranas e detecção por LC-MS/MS e GC-ECD. Tese de doutorado, UFSC, Florianópolis, 2010.

BEDENDO, G. C.; JARDIM, I. C. S. F.; CARASEK, E. A simple hollow fiber renewal liquid membrane extraction method for analysis of sulfonamides in honey samples with determination by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. v. 1217, p. 6449–6454, 2010.

BEDENDO, G. C.; JARDIM, I. C. S. F.; CARASEK, E. Multiresidue determination of pesticides in industrial and fresh orange juice by

hollow fiber microporous membrane liquid–liquid extraction and detection by liquid chromatography electrospray-tandem mass spectrometry. *Talanta*. v. 88, p. 573–580, 2012.

BENEDÉ, J. L.; CHISVERT, A.; GIOKAS, D. L.; SALVADOR, A. Determination of ultraviolet filters in bathing waters by stir bar sorptive–dispersive microextraction coupled to thermal desorption– gas chromatography–mass spectrometry. *Talanta*. v. 147, p. 246–252, 2016.

BERTON, P.; LANA, N. B.; RÍOS, J. M.; GARCÍA-REYES, J. F.; ALTAMIRANO, J. C. State of the art of environmentally friendly sample preparation approaches for determination of PBDEs and metabolites in environmental and biological samples: A critical review. *Analytica Chimica Acta*. v. 905, p. 24–41, 2016.

BIDDLECOMBE, R. A.; BENEVIDES, C.; PLEASANCE, S. A clinical trial on a plate? The potential of 384-well format solid phase extraction for high-throughput bioanalysis using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* v. 15, p. 33-40, 2001.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. *Quim. Nova*. v. 30, n. 3, p. 651-666, 2007.

BLANCO, E.; CASAIS, M. del C.; MEJUT, M. del C.; CELA, R. Combination of off-line solid-phase extraction and on-column sample stacking for sensitive determination of parabens and p-hydroxybenzoic acid in waters by non-aqueous capillary electrophoresis. *Analytica Chimica Acta*. v. 647, p. 104–111, 2009.

BOCQUET, S.; VILADOMAT, F. G.; NOVA, C. M.; SANCHEZ, J.; ATHES, V.; SOUCHON, I. Membrane-based solvent extraction of aroma compounds: Choice of configurations of hollow fiber modules based on experiments and simulation. *Journal of Membrane Science*. v. 281, p. 358–368, 2006.

BOYACI, E.; GORYNSKI, K.; RODRIGUEZ-LAFUENTE, A.; BOJKO, B.; PAWLISZYN, J. Introduction of solid-phase microextraction as a high-throughput sample preparation tool in

laboratory analysis of prohibited substances. *Analytica Chimica Acta*. v. 809, p. 69–81, 2014.

BOYACI, E.; SPARHAM, C.; PAWLISZYN, J. Thin-film microextraction coupled to LC-ESI-MS/MS for determination of quaternary ammonium compounds in water samples. *Anal Bioanal Chem*. v. 406, p. 409–420, 2014.

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

CARLETTO, J. S.; LUCIANO, R. M.; BEDENDO, G. C.; CARASEK, E. Simple hollow fiber renewal liquid membrane extraction method for pre-concentration of Cd(II) in environmental samples and detection by Flame Atomic Absorption Spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. v. 638, p. 45–50, 2009.

CASTRO-CORREIA, C.; FONTOURA, M. A influência da exposição ambiental a disruptores endócrinos no crescimento e desenvolvimento de crianças e adolescentes. *Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo*. v. 2, n.10, p. 186–192, 2015.

CUNHA, S.C.; FERNANDES, J. O. Assessment of bisphenol A and bisphenol B in canned vegetables and fruits by gas chromatography-mass spectrometry after QuEChERS and dispersive liquid-liquid microextraction. *Food Control*. v. 33, p. 549-555, 2013.

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

DIAS, A. N.; SILVA, A. C.; SIMÃO, V.; MERIB, J.; CARASEK, E. A novel approach to bar adsorptive microextraction: Cork as extractor phase for determination of benzophenone, triclocarban and parabens in aqueous samples. *Analytica Chimica Acta*. v. 888, p. 59-66, 2015.

DÍAZ-ÁLVAREZ, M.; TURIEL, E.; MARTÍN-ESTEBAN, A. Hollow fibre liquid-phase microextraction of parabens from environmental waters. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* v. 93, n. 7, p. 727–738, 2013.

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

ESPEJO, R.; VALTER, K.; SIMONA, M.; JANIN, Y.; ARRIZABALAGA, P. Determination of nineteen 4-alkylphenol endocrine disrupters in Geneva municipal sewage wastewater. *Journal of Chromatography A*. v. 976, p. 335–343, 2002.

GHISELLI, G.; JARDIM, W. F. Interferentes endócrinos no ambiente. *Quim. Nova*. v. 30, n. 3, p. 695-706, 2007.

GHISELLI, G. Avaliação da qualidade das águas destinadas ao abastecimento público na região de Campinas: ocorrência e determinação dos interferentes endócrinos (IE) e produtos farmacêuticos e de higiene pessoal (PFHP). Tese de doutorado, UNICAMP, Campinas, 2006.

GORGA, M.; INSA, S.; PETROVIC, M.; BARCELÓ, D. Analysis of endocrine disrupters and related compounds in sediment sand sewage sludge using on-line turbulent flow chromatography–liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. v. 1352, p. 29–37, 2014.

HAMPL, R.; KUBATOVA, J.; STARKA, L. Steroids and endocrine disruptors—History, recent state of art and open questions. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. v. 155, p. 217–223, 2016.

HE, L.; LI, L.; SUN, W.; ZHANG, W.; ZHOU, Z.; REN, Z. Extraction and recovery of penicillin G from solution by cascade process of hollow fiber renewal liquid membrane. *Biochemical Engineering Journal*. v. 110, p. 8–16, 2016.

HYDER, M.; AGUILAR, L. L.; GENBERG, J.; SANDAHL, M.; WESÉN, C.; JÖNSSON, J. Å. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from organic aerosols using hollow fiber micro –

porous membrane liquid – liquid extraction (HF-MMLLE) followed by gas chromatography–mass spectrometry analysis. *Talanta*. v. 85, p. 919– 926, 2011.

JAIN, R.; MUDIAM, M. K. R.; CHAUHAN, A.; CH, R.; MURTHY, R.C.; KHAN, H. A. Simultaneous derivatisation and preconcentration of parabens in food and other matrices by isobutyl chloroformate and dispersive liquid–liquid microextraction followed by gas chromatographic analysis. *Food Chemistry*. v. 141, p. 436–443, 2013.

KABIR, E. R.; RAHMAN, M. S.; RAHMAN, I. A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. v. 40, p. 241–258, 2015.

KAWAGUCHI, M.; TAKAHASHI, S.; SESHIMO, F.; SAKUI, N.; OKANOUCI, N.; ITO, R.; INOUE, K.; YOSHIMURA, Y.; IZUMI, S.; MAKINO, T.; NAKAZAWA, H. Determination of 4-*tert*-octylphenol and 4-nonylphenol in laboratory animal feed sample by stir bar sorptive extraction followed by liquid desorption and column-switching liquid chromatography–mass spectrometry with solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A*. v. 1046, p. 83–88, 2004.

KAYE, B.; HERRON, W. J.; MACRAE, P. V.; ROBINSON, S.; STOPHER, D. A.; VENN, R. F.; WILD, W. Rapid, Solid Phase Extraction Technique for the High-Throughput Assay of Darifenacin in Human Plasma. *Anal. Chem.* v. 68, p. 1658-1660, 1996.

KUESENG, P.; PAWLISZYN, J. Carboxylated multiwalled carbon nanotubes / polydimethylsiloxane, a new coating for 96-blade solid-phase microextraction for determination of phenolic compounds in water. *Journal of Chromatography A*. v. 1317, p. 199– 202, 2013.

LIAO, C.; CHEN, L.; KANNAN, K. Occurrence of parabens in foodstuffs from China and its implications for human dietary exposure. *Environment International*. v. 57-58, p. 68-74, 2013.

LIN, W.; WANG, S.; CHENG, C.; DING, W. Determination of alkylphenol residues in breast and commercial milk by solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Food Chemistry*. v. 114, p. 753–757, 2009.

LÓPEZ-DARIAS, J.; GERMÁN-HERNÁNDEZ, M.; PINO, V.; AFONSO, A. M. Dispersive liquid–liquid microextraction versus single-drop microextraction for the determination of several endocrine-disrupting phenols from seawaters. *Talanta*. v. 80, p. 1611–1618, 2010.

MALIK, M. A.; HASHIM, M. A.; NABI, F. Ionic liquids in supported liquid membrane technology. *Chemical Engineering Journal*. v. 171, p. 242–254, 2011.

MALTEZ, H. Desenvolvimento de metodologias analíticas baseadas em sistemas de pré-concentração empregando extração em fase sólida e microextração com gota única para determinação de metais-traço em amostras aquosas ambientais. Tese de doutorado, UFSC, Florianópolis, 2007.

MANNA, M. S.; SAHA, P.; GHOSHAL, A. K. Separation of medicinal catechins from tea leaves (*Camellia sinensis*) extract using hollow fiber supported liquid membrane (HF-SLM) module. *Journal of Membrane Science*. v.471, p. 219–226, 2014.

MARTINS, I.; CARREIRA, F. C.; CANAES, L. S.; JUNIOR, F. A. S. C.; CRUZ, L. M. S.; RATH, S. Determination of parabens in shampoo using high performance liquid chromatography with amperometric detection on a boron-doped diamond electrode. *Talanta*. v. 85, p. 1-7, 2011.

MARTINS, M. L.; PRIMEL, E. G.; CALDAS, S. S.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME): fundamentos e aplicações. *Scientia Chromatographica*.; v. 4, n.1, p. 35-51, 2012.

MEDEIROS, A. C.; LIMA, M. O.; GUIMARÃES, R. M. Avaliação da qualidade da água de consumo por comunidades ribeirinhas em áreas de exposição a poluentes urbanos e industriais nos municípios de Abaetetuba e Barcarena no estado do Pará, Brasil. *Ciência & Saúde Coletiva*. v. 21, n.3, 695-708, 2016.

MERIB, J.; CARASEK, E. Microextração em fase líquida suportada com fibra oca (HF-LPME): Fundamentos e aplicações recentes. *Scientia Chromatographica*. v. 5, n. 4, p. 249-262, 2013.

MERTEN, G. H.; MINELLA, J. P. Qualidade da água em bacias hidrográficas rurais: um desafio atual para a sobrevivência futura. *Agroecol. e Desenvol. Rur. Sustent. Porto Alegre*. v. 3, n. 4, p. 33-38, 2002.

MIRNAGHI, F. S.; MOUSAVI, F.; ROCHA, S. M.; PAWLISZYN, J. Automated determination of phenolic compounds in wine, berry, and grape samples using 96-blade solid phase microextraction system coupled with liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. v. 1276, p. 12–19, 2013.

MIRNAGHI, F. S.; PAWLISZYN, J. Development of coatings for automated 96-blade solid phase microextraction-liquid chromatography–tandem mass spectrometry system, capable of extracting a wide polarity range of analytes from biological fluids. *Journal of Chromatography A*. v. 1261, p. 91–98, 2012.

MORGAN, D.; TSAI, S. C. Sleep and the Endocrine System. *Critical Care Clinics*. v. 31, n. 3, p. 403–418, 2015.

NENG, N. R. Desenvolvimento de novas metodologias analíticas conducentes à monitorização de poluentes orgânicos prioritários em matrizes aquosas. Tese de doutorado, ULISBOA, Lisboa, 2011.

NOGUEIRA, J. M. F. Desreguladores Endócrinos: Efeitos Adversos e Estratégias para Monitorização dos Sistemas Aquáticos. *Sociedade Portuguesa de Química*. v. 88, p. 65-71, 2003.

OLIVEIRA, A. R. M.; MAGALHÃES, I. R. S.; SANTANA, F. J. M.; BONATO, P. S. Microextração em fase líquida (lpme): fundamentos da técnica e aplicações na análise de fármacos em fluidos biológicos. *Quim. Nova*. v. 31, n. 3, p. 637-644, 2008.

OTOMO, J.I. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para a determinação de hormônios, considerados disruptores endócrinos, nas águas destinadas ao abastecimento público na região do Rio Paraíba do Sul, SP. Dissertação de mestrado, IPEN-CNEN-SP, São Paulo, 2010.

PAN, J.; ZHANG, C.; ZHANG, Z.; LI, G. Review of online coupling of sample preparation techniques with liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*. v. 815, p. 1–15, 2014.

PASCHOAL, J. A. R.; RATH, S.; AIROLDI, F. P. S.; REYES, F. G. R. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. *Quim. Nova*. v. 31, n. 5, p. 1190-1198, 2008.

PERUZZO, T.; CANTO, E. O que é coeficiente de partição?. *Edição para professores*. n. 55, 2012.

PINTO, I. P.; PEDROSO, M. P. Microextração em gota única (SDME): fundamentos e aplicações. *Scientia Chromatographica*. v. 7, n. 3, p. 183-198, 2015.

PRICHODKO, A.; ŠAKOČIŪTĒ, V.; VIČKAČKAITĒ, V. Dispersive liquid–liquid microextraction of parabens. *Chemija*. v. 21. n. 2–4, p. 112–117, 2010.

PSILLAKIS, E.; KALOGERAKIS, N. Developments in liquid-phase microextraction. *Trends in Analytical Chemistry*. v. 22, n. 10, p. 565-574, 2003.

RAIMUNDO, C.C. M. Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos nas águas superficiais da bacia do rio Atibaia. Dissertação de mestrado, UNICAMP, Campinas, 2007.

REIS FILHO, R. W.; LUVIZOTTO-SANTOS, R.; VIEIRA, E. M. Poluentes Emergentes como Desreguladores Endócrinos. *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.* v. 2, n. 3, p. 283-288, 2007.

REN, Z.; ZHANG, W.; LIU, Y.; DAI, Y.; CUI, C. New liquid membrane technology for simultaneous extraction and stripping of copper (II) from wastewater. *Chemical Engineering Science*. v. 62, p. 6090 – 6101, 2007.

REZAEI, M.; ASSADI, Y.; HOSSEINI, M. M.; AGHAEI, E.; AHMADI, F.; BERIJANI, S. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid–liquid microextraction. *Journal of Chromatography A*. v. 1116, p. 1–9, 2006.

RIBEIRO, F. A. L.; FERREIRA, M. M. C.; MORANO, S. C.; SILVA, L. R.; SCHNEIDER, R. P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. *Quim. Nova*. v. 31, n. 1 p. 164 – 171, 2008.

SALGUEIRO-GONZÁLEZ, N.; TURNES-CAROU, I.; MUNIATEGUI-LORENZO, S.; LÓPEZ-MAHÍA, P.; PRADA-RODRÍGUEZ, D. Membrane assisted solvent extraction coupled with liquid chromatography tandem mass spectrometry applied to the analysis of alkylphenols in water samples. *Journal of Chromatography A*. v. 1281, p. 46– 53, 2013.

SANTAMARTA, J. A ameaça dos disruptores endócrinos. *Agroecol. e Desenvol. Rur. Sustent. Porto Alegre*. v. 2, n. 3, p. 18-29, 2001.

SCHUG, T. T.; JANESICK, A.; BLUMBERG, B.; HEINDEL, J. J. Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. v. 127, p. 204– 215, 2011.

SILVA, V. D.; SIMÃO, V.; DIAS, A. N.; CARLETTO, J. S.; CARASEK, E. Combination of hollow-fiber-supported liquid membrane and dispersive liquid–liquid microextraction as a fast and sensitive technique for the extraction of pesticides from grape juice samples followed by high-performance liquid chromatography. *Journal of Separation Science*, v. 00, p. 1-10, 2015.

TANKIEWICZ, M.; FENIK, J.; BIZIUK, M. Solventless and solvent-minimized sample preparation techniques for determining currently used pesticides in water samples: A review. *Talanta*. v. 86, p. 8–22, 2011.

VILLAR-NAVARRO, M.; RAMOS-PAYÁN, M.; FERNÁNDEZ-TORRES, R.; CALLEJÓN-MOCHÓN, M.; BELLO-LÓPEZ, M. A. A novel application of three phase hollow fiber based liquid phase microextraction (HF-LPME) for the HPLC determination of two endocrine disrupting compounds (EDCs), n-octylphenol and n-nonylphenol, in environmental waters. *Science of the Total Environment*. v. 443, p. 1–6, 2013.

ZAFRA-GÓMEZ, A.; BALLESTEROS, O.; NAVALÓN, A.; VÍLCHEZ, J. L. Determination of some endocrine disrupter chemicals in urban wastewater samples using liquid chromatography–mass spectrometry. *Microchemical Journal*. v. 88, p. 87-94, 2008.

ZHANG, H.; LEE, H. K. Simultaneous determination of ultraviolet filters in aqueous samples by plunger-in-needle solid-phase microextraction with graphene-based sol–gel coating as sorbent coupled

with gas chromatography–mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. v. 742, p. 67–73, 2012.

ZHANG, Q.; LIAN, M.; LIU, L.; CUI, H. High-performance liquid chromatographic assay of parabens in wash-off cosmetic products and foods using chemiluminescence detection. *Analytica Chimica Acta*. v. 537, p. 31-39, 2005.

ZHANG, X.; ZHU, D.; HUANG, C.; SUN, Y.; LEE, Y. Sensitive detection of bisphenol A in complex samples by in-column molecularly imprinted solid-phase extraction coupled with capillary electrophoresis. *Microchemical Journal*. v. 121, p. 1–5, 2015.

ZHONG, S.; TAN, S. N.; GE, L.; WANG, W.; CHEN, J. Determination of bisphenol A and naphthols in river water samples by capillary zone electrophoresis after cloud point extraction. *Talanta*. v. 85, p. 488–492, 2011.

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

ZORITA, S.; BARRI, T.; MATHIASSEN, L. A novel hollow-fibre microporous membrane liquid–liquid extraction for determination of free 4-isobutylacetophenone concentration at ultra trace level in environmental aqueous samples. *Journal of Chromatography A*. v. 1157, p. 30–37, 2007.