

Gabriela Pereira Mafra

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA DE
MICROEXTRAÇÃO ADSORTIVA EM BARRA UTILIZANDO
TERRA DIATOMÁCEA PARA DETERMINAÇÃO DE
DESREGULADORES ENDÓCRINOS EM ÁGUA

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

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.

Mafra, Gabriela Pereira

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA DE MICROEXTRAÇÃO
ADSORTIVA EM BARRA UTILIZANDO TERRA DIATOMÁCEA PARA
DETERMINAÇÃO DE DESREGULADORES ENDÓCRINOS EM ÁGUA /
Gabriela Pereira Mafra ; orientador, Eduardo Carasek da
Rocha - Florianópolis, SC, 2016.
103 p.

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

Inclui referências

1. Química. 2. parabenos. 3. benzofenona. 4.
triclocarban. 5. terra diatomácea. I. da Rocha, Eduardo
Carasek . II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

Gabriela Pereira Mafra

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA DE
MICROEXTRAÇÃO ADSORTIVA EM BARRA UTILIZANDO
TERRA DIATOMÁCEA PARA DETERMINAÇÃO DE
DESREGULADORES ENDÓCRINOS EM ÁGUA.**

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

Florianópolis, 4 de novembro de 2016.

Prof. Dr. Vanderlei Gageiro Machado
Coordenador do Curso

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

Banca Examinadora:

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

Prof., Dr^a. Dilma Budziak
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Prof., Dr^a. Tatiane de Andrade Maranhão
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

RESUMO

Este estudo descreve a utilização de terra diatomácea proveniente do resíduo da indústria cervejeira como um novo revestimento para a microextração adsortiva em barra (BA μ E) e sua aplicação na determinação de parabenos, benzofenona e triclocarban em amostras de água da Lagoa do Peri por HPLC-DAD. Neste estudo foram usadas barras adsortivas com 7,5 mm de comprimento. As etapas de extração e dessorção líquida foram otimizadas empregando procedimentos multivariados e univariados. O tempo de dessorção e solventes utilizados para a dessorção líquida foram otimizados por estudos uni e multivariados, respectivamente. Na etapa de extração, um planejamento fatorial completo 2⁴ foi utilizado para fazer a triagem das variáveis pH da amostra, tempo de extração, temperatura de extração e adição de sal. O pH da amostra e tempo de extração foram avaliados utilizando o planejamento Doehlert. O tempo de extração também foi estudado por experimento univariado. As condições ótimas de extração foram pH da amostra de 5 e tempo de extração de 90 min. A dessorção líquida foi realizada durante 15 min com 100 μ L de ACN:MeOH (50:50, v/v). Os limites de quantificação variaram entre 0,63 e 6,9 μ g L⁻¹. Os valores de R² foram maiores que 0,998 para as curvas de calibração de todos os analitos. Ensaios de precisão e recuperação foram feitos em amostras de água superficiais coletadas em cinco diferentes pontos da Lagoa do Peri. O método de BA μ E apresentou valores de recuperação entre 63 e 124 % e RSD \leq 20 % (n = 2). A reprodutibilidade dos agitadores acoplados e na produção das barras apresentou RSD < 14 % (n = 3) e RSD < 11 % (n = 3), respectivamente.

Palavras-chave: parabenos, benzofenona, triclocarban, terra diatomácea, BA μ E, amostras aquosas.

ABSTRACT

This study describes the use diatomaceous earth from the residue of brewing industry as a new coating for bar adsorptive microextraction (BA μ E) and its application for the determination of parabens, benzophenone and triclocarban in aqueous samples from Lagoa do Peri by HPLC-DAD. In this study bars with 7.5 mm of length were used. The extraction and liquid desorption steps for BA μ E were optimized employing multivariate and univariate procedures. The desorption time and solvent used for liquid desorption were optimized by univariate and multivariate studies, respectively. A 2⁴ full factorial design was built to screening the variables sample pH, extraction time, sample temperature and NaCl concentration and then the parameters sample pH and extraction time were evaluated using the Doehlert design. The extraction time was also studied by univariate experiment. The optimum extraction conditions were sample pH 5 and extraction time 90 min. Liquid desorption was carried out for 15 min with 100 μ L of ACN:MeOH (50:50, v/v). The quantification limits varied between 0.63 and 6.9 g L⁻¹. The R² values were higher than 0.998 for all calibration curves of analytes. Precision and recovery essays were made in surface aqueous samples collected in five different points of Peri Lagoon. The BA μ E method showed recovery values between 63 and 124% and RSD \leq 20% (n = 2). The linked magnetic stirrers and the bar-to-bar reproducibility were lower than 14 % (n = 3) and 11% (n = 3), respectively.

Keywords: parabens, benzophenone, triclocarban, diatomaceous earth, BA μ E, aqueous samples.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - A) Representação da extração por DI-SPME. B) Barra de SBSE comercialmente conhecida como Twister. C) Exemplificação dos modos de extração em SBSE: (a) HS, (b) vortex, (c) amostra, (d) barra de agitação magnética de teflon e (e) twister.24
- Figura 2** - Representação esquemática: (a) imagem e (b) micrografia obtida por microscopia eletrônica por varredura dos dispositivos analíticos usados nas técnicas de BA μ E e MSA μ E.....25
- Figura 3** - Representação esquemática e imagens exemplificando os procedimentos de extração por BA μ E e MSA μ E. Legenda: (1) vortex, (2) amostra, (3) barra magnética de agitação, (4) dispositivo de BA μ E e (5) dispositivo de MSA μ E.26
- Figura 4** - Evolução no número de publicações utilizando a palavra BA μ E desde o desenvolvimento da técnica, em 2010.....28
- Figura 5** - a) Micrografia referente à terra diatomácea nova; b) micrografia que representa a terra diatomácea saturada com matéria orgânica; c) micrografia que indica a terra diatomácea tratada termicamente a 700 °C.31
- Figura 6** - Distribuição dos pontos experimentais de uma matriz Doehlert para otimização de duas variáveis, representada por um hexágono regular com as coordenadas normalizadas.42
- Figura 7** - Planejamento Simplex-Centróide.43
- Figura 8** - Preparo das barras adsorptivas com recobrimento de terra diatomácea.50
- Figura 9** - Esquema do acoplamento dos agitadores ao regulador de tensão.....53
- Figura 10** - Pontos de coleta de amostras água superficial na Lagoa do Peri para ensaios de validação de metodologia com suas respectivas coordenadas geográficas.55

Figura 11 - Superfície triangular com $R^2 = 0,9634$ gerada a partir do planejamento simplex centróide na otimização dos solventes de dessorção líquida.....	57
Figura 12 - Gráfico de barras gerado pelas áreas normalizadas dos analitos para escolha do tempo de dessorção líquida dos analitos.	58
Figura 13 - Diagrama de Pareto obtido pelo planejamento fatorial completo para triagem das variáveis e suas interações na análise de parabenos, benzofenona e triclocarban através da técnica de BA μ E.....	59
Figura 14 - Superfície de resposta gerada através da otimização simultânea de tempo de extração e pH da amostra na extração dos analitos por BA μ E.....	60
Figura 15 - Gráfico de barras gerado pelas áreas normalizadas dos analitos para escolha do tempo de dessorção líquida dos analitos.	61
Figura 16 - Reprodutibilidade na produção das barras de BA μ E com terra diatomácea e avaliação da eficiência de uma barra usada.	62
Figura 17 - Reprodutibilidade dos agitadores utilizados na técnica de BA μ E.	63
Figura 18 - Cromatogramas obtidos após a extração por BA μ E com terra diatomácea e determinação por HPLC-DAD para amostra de água da lagoa não fortificada e amostra fortificada com 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ de metil parabenos e etil parabenos, 2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ de benzofenona 1,25 $\mu\text{g L}^{-1}$ de triclocarban..	68
Figura B- 1: Gráfico de resíduos gerado pela curva de calibração do MP.	96
Figura B- 2: Desenho de linha ajustada para a curva de calibração do MP.	96
Figura B- 3: Gráfico de resíduos gerado pela curva de calibração do EP.....	97
Figura B- 4: Desenho de linha ajustada para a curva de calibração do EP.	98

Figura B- 5: Gráfico de resíduos gerado pela curva de calibração da BF.....	99
Figura B- 6: Desenho de linha ajustada para a curva de calibração da BF.....	99
Figura B- 7: Gráfico de resíduos gerado pela curva de calibração do TC.	100
Figura B- 8: Desenho de linha ajustada para a curva de calibração do TC.	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Trabalhos descritos na literatura que empregam a BA μ E.....	28
Tabela 2 - Estruturas químicas e propriedades físico-químicas dos analitos estudados.....	33
Tabela 3 - Principais técnicas de preparo de amostra e instrumentação utilizadas para a determinação de parabens, benzofenona e triclocarban.....	36
Tabela 4 - Concentração máxima autorizada (%) de parabens, benzofenonas e triclocarban em cosméticos e produtos de higiene pessoal.....	37
Tabela 5 - Matriz de coeficientes de contraste para um planejamento fatorial 2 ³ . x ¹² , x ¹³ e x ²³ são os efeitos de interação de 2 ^a ordem; x ₁₂₃ é o efeito de interação de 3 ^a ordem.....	40
Tabela 6 - Precisão (RSD%) e Recuperação (R%) como função da concentração do analito.....	44
Tabela 7 - Planejamento Simplex-Centróide para escolha do (s) solvente (s) na etapa dessorção líquida.....	51
Tabela 8 - Níveis, variáveis, matriz e a resposta obtida para o planejamento fatorial completo com triplicata do ponto central.....	52
Tabela 9 - Planejamento Doehlert adotado para a otimização da extração de parabens, benzofenona e triclocarban em amostras de água por BA μ E.....	53
Tabela 10 - Faixa linear, coeficiente de determinação, limites de detecção e quantificação e desvio do intercepto para o método de BA μ E para a determinação de parabens, benzofenona e triclocarban em água ultra pura.....	65
Tabela 11 - Comparação dos dados da literatura para BA μ E e os analitos com o método proposto com terra diatomácea. Todos os trabalhos utilizam HPLC-DAD.....	67

Tabela 12 - Ensaio de Recuperação (R%) e precisão (RSD%) utilizando o método de BAμE em amostras de água da Lagoa do Peri.	69
Tabela A-1: Tabela ANOVA da otimização do solvente de dessorção avaliando os modelos linear e quadrático.....	85
Tabela A-2: Áreas dos picos, média das áreas, desvio padrão e RSD% absolutos e normalizados obtidos na otimização univariada de tempo de dessorção dos analitos.....	85
Tabela A-3: Áreas obtidas no planejamento fatorial completo para os quatro analitos e sua média geométrica utilizada para plotar o gráfico de Pareto.....	86
Tabela A-4: Tabela ANOVA obtida do gráfico de Pareto. ...	87
Tabela A-5: Tabela ANOVA gerada pela otimização multivariada de tempo e pH através do planejamento Doehlert.....	88
Tabela A-6: Áreas dos picos, média das áreas, desvio padrão e RSD% absolutos e normalizados obtidos na otimização univariada de tempo de extração dos analitos.....	88
Tabela A-7: Áreas dos picos, média das áreas, desvio padrão e RSD% absolutos e normalizados obtidos na avaliação da reprodutibilidade na produção das barras.....	90
Tabela A-8: Áreas dos picos, média das áreas, desvio padrão e RSD% absolutos e normalizados obtidos na avaliação da reprodutibilidade dos agitadores.	91
Tabela B- 1: Concentrações dos analitos, áreas dos picos, média das áreas, desvio padrão e RSD% obtidos na curva de calibração do método proposto.	93
Tabela B- 2: Concentrações dos analitos, áreas dos picos, média das áreas, desvio padrão e RSD% obtidos na curva de calibração do método proposto.	95
Tabela B- 3: Tabela ANOVA gerada pela curva de calibração do MP.....	95
Tabela B- 4: Tabela ANOVA gerada pela curva de calibração do EP.....	97

Tabela B- 5: Tabela ANOVA gerada pela curva de calibração da BF.	98
Tabela B- 6: Tabela ANOVA gerada pela curva de calibração do TC.	100
Tabela B- 7: Áreas dos picos, média das áreas, desvio padrão e RSD% obtidos nos ensaios de recuperação e precisão método proposto com amostras de água da Lagoa do Peri.	102

LISTA DE ABREVIATURAS

- ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas
ACN – Acetonitrila
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC - Associação de Químicos Analíticos Oficiais, *do inglês Association of Official Analytical Chemists*
A μ E - Microextração adsortiva, *do inglês Adsorptive Microextraction*
BA μ E - Microextração adsortiva em barra, *do inglês Bar Adsorptive*
BF – Benzofenona
DAD - Detector por Arranjo de Diodos, *do inglês Diode Array Detection*
DI - Imersão direta, *do inglês Direct Immersion*^[1]_{S&EP}
DLLME – Microextração líquido-líquido dispersiva, *do inglês Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*
EDC – Desreguladores endócrinos, *do inglês Endocrine Disrupting Chemicals*
EP – Etilparabeno
ESI – Ionização por Eletrospray, *do inglês Electrospray Ionization*
FID – Detector por Ionização em Chama, *do inglês Flame Ionization Detector*
GC - Cromatografia Gasosa, *do inglês Gas Chromatography*
GC-MS - Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas, *do inglês Gas Chromatography with Mass Spectrometry*
GC-MS/MS - Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas acoplada à Espectrometria de Massas, *do inglês Gas Chromatography with Mass Spectrometry tandem Mass Spectrometry*
HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, *do inglês High-Performance Liquid Chromatography*
HPLC - DAD Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector por Arranjo de Diodos, *do inglês High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection*
HS - *do inglês Headspace*
IUPAC - União Internacional da Química Pura e Aplicada, *do inglês International Union of Pure and Applied Chemistry*
LC-MS/MS - Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas acoplada à Espectrometria de Massas, *do inglês Liquid Chromatography with Mass Spectrometry tandem Mass Spectrometry*
LLE - Extração Líquido-Líquido, *do inglês Liquid-Liquid Extraction*
LOQ - Limite de quantificação, *do inglês Limit of quantification*
MeOH – Metanol
MP – Metilparabeno

MS - Espectrômetro de Massas, *do inglês Mass Spectrometer*
MSA μ E - Microextração Adsorptiva em Multiesferas, *do inglês Multi-spheres Adsorptive Microextraction*
NBR - Sigla de Norma Brasileira aprovada pela ABNT
PCI - Ionização química positiva, *do inglês Positive Chemical Ionization*
PDMS - Polidimetilsiloxano
R (%) - Ensaio de recuperação
RSD (%) - Desvio Padrão Relativo, *do inglês Relative Standard Deviation*
SBSE - Extração Sortiva em Barra de Agitação, *do inglês Stir Bar Sorptive Extraction*
SPE – Extração em Fase Sólida, *do inglês Solid Phase Extraction*
SPME - Microextração em Fase Sólida, *do inglês Solid-Phase Microextraction*
TC – Triclocarban
UHPLC – Cromatografia Líquida de Ultra Alta Eficiência, *do inglês Ultra-High-Performance Liquid Chromatography*
UV - Ultravioleta, *do inglês ultraviolet*

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	21
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1.	Técnicas de preparo de amostra	23
2.1.1.	<i>BAμE</i>	25
2.2.	Terra diatomácea como biossorvente.....	30
2.3.	EDCs - Parabenos, Benzofenonas e Triclocarban.....	31
2.4.	Planejamento e otimização.....	38
2.4.1.	<i>Planejamentos fatoriais</i>	39
2.4.2.	<i>Metodologia de Superfície de Resposta</i>	41
2.4.3.	<i>Planejamento Doehlert</i>	41
2.4.4.	<i>Planejamento simplex-centróide</i>	42
2.5.	Validação de parâmetros de métodos analíticos	43
3.	OBJETIVOS	47
3.1.	Objetivo Geral	47
3.2.	Objetivos Específicos.....	47
4.	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	49
4.1.	Reagentes e materiais	49
4.2.	Instrumentação	49
4.3.	Preparo das barras adsorptivas	50
4.4.	Otimização do procedimento de BAμE	50
4.5.	Preparo de amostra otimizado	54
4.6.	Parâmetros analíticos de mérito e aplicação	54
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1.	Otimização do método	57
5.2.	Parâmetros analíticos de mérito e aplicação do método	64
6.	CONCLUSÃO	71
	REFERÊNCIAS	73
	APÊNDICE A – Otimização do método	85
	APÊNDICE B – Validação e aplicação do método	93

1. INTRODUÇÃO

Produtos farmacêuticos, materiais biológicos e amostras ambientais geralmente possuem matrizes complexas capazes de prejudicar a separação e análise de dados. O preparo de amostra promove a remoção dos interferentes, a pré-concentração dos analitos e aumento da sensibilidade. No entanto, além de importante, essa é considerada a etapa crítica da análise química, devido ao risco de perda de analito e contaminação da amostra, e à elevada morosidade.

As técnicas tradicionais de preparo de amostra são as mais conhecidas e amplamente utilizadas, mas estão associadas a um maior risco de operação e geração de resíduos. Em decorrência, a tendência que atrai a atenção dos pesquisadores de química analítica é o desenvolvimento de novos métodos e tecnologias de extração capazes de simplificar e miniaturizar os procedimentos analíticos, além de minimizar do consumo de solventes orgânicos, consistentes com os conceitos da *Química Verde*.

Nas últimas duas décadas as técnicas de microextração baseadas em mecanismos de sorção foram muito bem desenvolvidas e documentadas, demonstrando ser uma opção eficaz para a análise de traços em diversos tipos de matrizes, como etapa de enriquecimento prévio para aplicação de técnicas cromatográficas e hifenadas. Avanços na escolha de fases extratoras - com elevada capacidade sortiva e seletivas à classes específicas de analitos -acompanham estudos que buscam opções renováveis e sustentáveis de revestimentos, em especial, os materiais biossorbentes.

Este trabalho propôs o desenvolvimento de uma metodologia de extração de parabens, benzofenona e triclocarban em amostras de água da Lagoa do Peri, empregando a técnica de microextração adsortiva em barra (BAμE) e uma proposta amigavelmente ecológica de biossorbente: terra diatomácea proveniente do resíduo da indústria cervejeira.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Técnicas de preparo de amostra

A sequência analítica comumente adotada para a determinação de contaminantes em amostras biológicas e ambientais inclui etapas de amostragem e condicionamento da amostra, preparo de amostra e análise instrumental (BERTON et al., 2016). O objetivo do preparo de amostra é separar os analitos da matriz, concentrá-los para análise de traços e facilitar a introdução da amostra no equipamento analítico. Essa etapa é muitas vezes considerada como o “calcanhar de Aquiles” na análise química, principalmente devido ao risco de perda de analitos, contaminação da amostra e por ser a etapa mais demorada dos procedimentos analíticos (MERIB e CARASEK, 2015).

Os métodos tradicionais de preparo de amostra, como a extração líquido-líquido (LLE) e a extração em fase sólida (SPE), são amplamente utilizados e rotineiramente aceitos por muitas organizações internacionais e laboratórios credenciados. Ambos os métodos estão bem documentados e definidos, no entanto, possuem limitações para aplicações *on-site*, *in vivo* e em matrizes complexas, além de estarem associados a um maior risco de operação e geração de resíduos. (BOYACĎ et al., 2015)

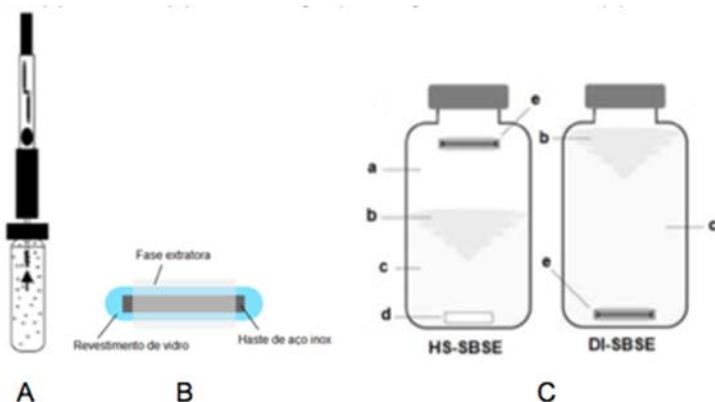
A química analítica moderna tem sido direcionada para a simplificação, miniaturização e automação dos sistemas analíticos, minimizando o consumo de solvente orgânico e volume da amostra, com vista a alcançar os conceitos da química verde (QUEIROZ, 2009).

Os últimos 25 anos foram de grande contribuição e importância em relação ao desenvolvimento e aperfeiçoamento de diversas técnicas de microextração (MERIB e CARASEK, 2015). Notáveis técnicas, como a microextração em fase sólida (*Solid Phase Microextraction*, SPME), desenvolvida por Arthur e Pawliszyn em 1990, e a extração sortiva em barra de agitação (*Stir Bar Sorptive Extraction*, SBSE), introduzida em 1999 por Baltussen *et al.*, estão baseadas em mecanismos de sorção, tendo a razão entre os volumes da fase extratora e amostra muito pequena. Seus princípios são fundamentados no equilíbrio de partição dos analitos entre a matriz e a fase extratora (QUEIROZ, 2009). Apenas uma pequena fração do analito é extraída, indicando que esses não são processos exaustivos, ou seja, quando o equilíbrio de partição do analito entre as fases é atingido, o aumento no tempo de extração não resulta no aumento da massa de analito extraída. Dessa forma, a quantificação por SPME e SBSE é realizada em condições de equilíbrio ou pré-equilíbrio e em ambas as técnicas os modos de extração *headspace* (HS) e imersão direta

(DI) podem ser empregados (Figura 1). (OUYANG e PAWLISZYN, 2008)

Essas técnicas de enriquecimento associam simultaneamente a microextração e a concentração dos analitos; reduzem a manipulação e consequentemente, o tempo global requerido para o preparo de amostra; são indicadas para serem combinadas com a grande sensibilidade da atual instrumentação analítica (QUEIROZ, 2009).

Figura 1 - A) Representação da extração por DI-SPME. B) Barra de SBSE comercialmente conhecida como Twister. C) Exemplificação dos modos de extração em SBSE: (a) HS, (b) vortex, (c) amostra, (d) barra de agitação magnética de teflon e (e) twister.



Fonte: ORMSBY (2005) e Nogueira (2012)

Na SBSE o sorvente é revestido sobre uma barra magnética de agitação, portanto a fase extratora e o elemento de agitação estão integrados num mesmo dispositivo (LUCENA, 2012). A principal diferença entre a SPME e a SBSE é que, como a SBSE utiliza uma quantidade de fase extratora de 50 a 250 vezes maior que a SPME, a difusão dos analitos é mais lenta e, consequentemente, os tempos de extração são geralmente mais longos do que para SPME. (JELE N *et al.*, 2012 e BALTHUSSEN *et al.*, 2002)

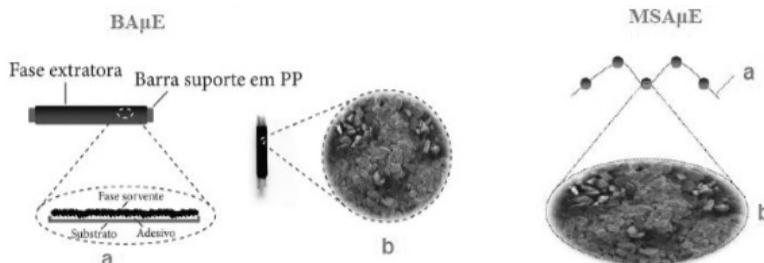
A SBSE comercial utiliza como fase extratora o (poli) dimetilsiloxano (PDMS). Por essa razão, a técnica é principalmente focada na extração de analitos não polares ou moderadamente polares. (LUCENA, 2012; NENG *et al.*, 2010). Para contornar essa limitação, diversas estratégias e conceitos inovadores baseados em sorção têm sido

desenvolvidos. As técnicas de microextração adsortiva (*adsorptive microextraction*, A μ E) foram inicialmente concebidas para solucionar a limitação da SBSE (PDMS) na análise de compostos orgânicos com características polares, com destaque para a microextração adsortiva em barra (*adsorptive bar microextraction*, BA μ E). (NOGUEIRA, 2013)

2.1.1. BA μ E

A A μ E é uma técnica criada por Neng et al. (2010) e proposta em duas configurações geométricas, que variam conforme o formato do dispositivo utilizado para a extração: a de multiesferas, MSA μ E (Microextração Adsortiva em Multiesferas, *do inglês Multi-spheres Adsorptive Microextraction*) e a de barras cilíndricas, a BA μ E. (NOGUEIRA, 2013). Na BA μ E, utiliza-se um filme adesivo para fixar o material sorvente no suporte de polipropileno; na MSA μ E, esferas de poliestireno são cobertas com sorvente e a fixação se dá através de tratamento térmico (NOGUEIRA, 2012). Enquanto que a BA μ E possui a limitação de suportar uma pequena quantidade de fase extratora na superfície do filme adesivo (até 5 mg), o número de esferas na MSA μ E pode variar dependendo da concentração dos analitos. Mesmo assim, a BA μ E tem demonstrado maior versatilidade do ponto de vista prático (NOGUEIRA, 2013). As duas configurações geométricas estão demonstradas na Figura 2.

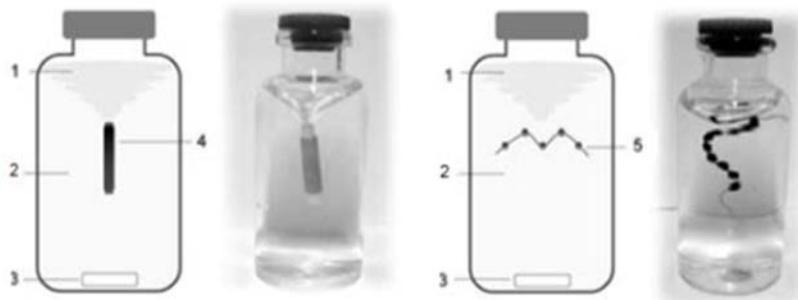
Figura 2 - Representação esquemática: (a) imagem e (b) micrografia obtida por microscopia eletrônica por varredura dos dispositivos analíticos usados nas técnicas de BA μ E e MSA μ E.



Fonte: (NOGUEIRA, 2012)

Como o suporte apresenta baixa densidade, a microextração opera através da tecnologia de flutuação. Devido a agitação magnética, os analitos migram por difusão desde o seio da matriz da amostra até a fase extratora, como é representado na Figura 3.

Figura 3 - Representação esquemática e imagens exemplificando os procedimentos de extração por BA μ E e MSA μ E. Legenda: (1) vortex, (2) amostra, (3) barra magnética de agitação, (4) dispositivo de BA μ E e (5) dispositivo de MSA μ E.



Fonte: (NOGUEIRA, 2012)

O fato de o dispositivo analítico flutuar imediatamente abaixo do vortex impede seu contato direto com as paredes e fundo do frasco, evitando a desagregação mecânica das partículas de sorvente, aumentando assim o tempo de vida médio das barras, já que elas são reutilizadas por aproximadamente 50 vezes. A facilidade de preparo dos dispositivos de BA μ E e a possibilidade de se adequar a fase extratora para cada analito é a grande vantagem desta técnica, principalmente no que diz respeito aos compostos polares ($\log K_{O/W} < 3,5$). (NOGUEIRA, 2012).

Estratégias univariadas e multivariadas podem ser adotadas para avaliar parâmetros experimentais em BA μ E que exercem influência na extração dos compostos, tais como: escolha da fase extratora, tempo de equilíbrio, velocidade de agitação, força iônica, polaridade e pH da amostra. A temperatura máxima a ser empregada é 40 °C, visto que acima deste valor ocorre a desagregação do filme adesivo do suporte de polipropileno (NENG, N. R. *et al.*, 2010).

O controle da velocidade de agitação é fundamental na BA μ E pois precisa garantir a flutuação do dispositivo de microextração, além de favorecer o processo de difusão dos analitos. Entretanto, velocidades de agitação elevadas promovem perda de fase extratora devido ao atrito entre

o dispositivo de extração e as paredes do frasco e devem ser evitadas. (NOGUEIRA, 2013).

O estudo do pH deve considerar as características químicas dos analitos e também a composição da fase extratora, investigando se possuem sítios ácidos ou básicos em sua superfície. Para a BA μ E, o ideal é atingir um pH que mantenha os analitos na sua forma neutra. (NOGUEIRA, 2012)

O uso de modificadores orgânicos que alterem a polaridade da amostra, também pode ser estudado, pelo fenômeno conhecido como wall-effect. A adição de metanol evita a adsorção de compostos como HPAs e PCBs nas paredes dos frascos de extração, pois aumenta a solubilidade desses compostos em fase aquosa. (CAMINO-SÁNCHEZ *et al.*, 2014).

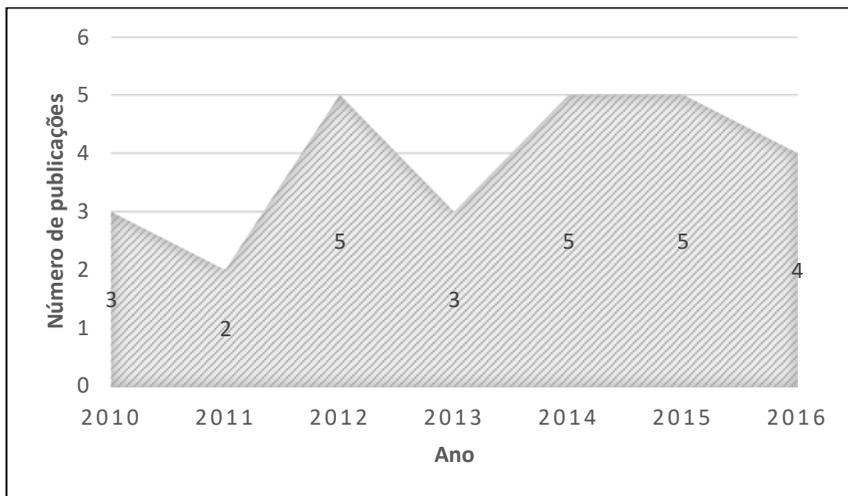
A variação da força iônica da amostra é avaliada através da adição de cloreto de sódio. A adição de sal pode aumentar ou diminuir a quantidade extraída, dependendo do composto e da concentração de sal. Para analitos polares ($\log K_{O/W} < 3$), a adição de sal favorece a extração, pois o chamado efeito *salting-out* é baseado na diminuição da solubilidade dos compostos favorecendo sua migração para a fase extratora (ALMEIDA e NOGUEIRA, 2014).

Subsequente ao procedimento de extração, a dessorção líquida e posterior análise em HPLC é o procedimento mais indicado após a extração com BA μ E. Desta forma, a otimização da etapa de dessorção é tão importante quanto a da extração, assim, o tipo de solvente e tempo de dessorção também devem ser estudados. (SPIETELUN *et al.*, 2013)

Por se tratar de uma técnica recente, ainda não foram documentadas equações que descrevem a eficiência de extração, no entanto, sabe-se que, assim como a SBSE, a BA μ E também depende de longos tempos de equilíbrio. Por vezes, não é possível trabalhar no equilíbrio e deve-se adotar uma condição compromisso entre as respostas. O uso de padrão interno é importante para assegurar a reprodutibilidade da técnica, mesmo operando-se em condições de pré-equilíbrio. (NOGUEIRA, 2013).

Apesar de nova, quase trinta artigos que utilizam a BA μ E como técnica de preparo de amostra foram publicados por diferentes grupos de pesquisa desde o seu surgimento em 2010 (Figura 4). A BA μ E tem sido aplicada para a extração de uma variedade de compostos, em diferentes matrizes, como mostra a Tabela 1.

Figura 4 - Evolução no número de publicações utilizando a palavra BAμE desde o desenvolvimento da técnica, em 2010.



Fonte: Scopus, (2016).

Tabela 1 - Trabalhos descritos na literatura que empregam a BAμE.

Nº	Analitos	Matriz	Referência
1	Fármacos, hormônios e subprodutos da desinfecção	Águas de superfície e urina humana	(NENG et al., 2010)
2	Subprodutos da desinfecção	Água potável	(NENG e NOGUEIRA, 2010)
3	Ácido clofibríco e ibuprofeno	Urina humana e águas superficiais, subterrâneas, estuarinas, do mar e residuais	(NENG et al., 2011a)
4	Herbicidas triazínicos	Água	(NENG et al., 2011b)
5	Morfina e Codeína	Urina humana	(GONÇALVEZ et al., 2012)

6	Cafeína, gemfibrozil, triclosan, cloridrato de propranolol, carbamazepina e diazepam	Águas superficiais, subterrâneas, estuarinas, do mar e residuais	(NENG e NOGUEIRA, 2012)
7	Fungicidas	Águas, vinhos tinto e branco	(ALMEIDA e NOGUEIRA, 2012)
8	Benzofenonas	Águas, protetores solares e urina humana	(ALMEIDA et al., 2013)
9	Inseticidas	Águas potável, de rio, superficiais, estuariana e de piscina	(ALMEIDA et al., 2014)
10	Conservantes	Águas, produtos cosméticos e urina	(ALMEIDA e NOGUEIRA, 2014)
11	Fenóis	Água superficial	(NENG e NOGUEIRA, 2014)
12	Epitosterona e testosterona	Urina	(AHMAD et al., 2014)
13	Estrióis, estrona, progesterona, norgestrel e mestranol	Águas e urina	(ALMEIDA e NOGUEIRA, 2015)
14	Parabenos, benzofenona e triclocarban	Águas de superfície	(DIAS et al., 2015)
15	Mitragina	Urina	(NENG et al., 2015)
16	Antibióticos sulfonamidas	Águas	(IDE, 2016)
17	Ácido salicílico, mefenâmico, diclofenaco e naproxen	Urina e amostra de água	(AHMAD, 2016)

Fonte: Autoria própria (2016)

2.2. Terra diatomácea como biossorvente

Os sorventes utilizados nas técnicas de AμE são materiais sólidos e porosos e que, por possuírem elevada área superficial, adsorvem moléculas orgânicas. Revestimentos disponíveis comercialmente, como carvões ativados, estireno-divinilbenzeno, pirrolidona modificada, já foram utilizados em BAμE por Almeida e Nogueira (2012). Materiais preparados e caracterizados no laboratório, como o carvão ativado produzido a partir da cortiça, também já foram utilizados por Nogueira (2012) e apresentaram bons resultados quando comparados aos materiais comerciais.

Por definição, biossorventes são materiais encontrados no meio ambiente formados por macromoléculas e constituídos por vários grupos funcionais hábeis para interagir com compostos através de diferentes fenômenos como sorção, complexação e troca iônica (DEMIRBAS, 2008). Recentemente, Dias et al., (2015) utilizou o biossorvente cortiça proveniente de rolhas de garrafas como uma fase extratora "verde" e renovável para BAμE e extraiu compostos de média e alta polaridade em água.

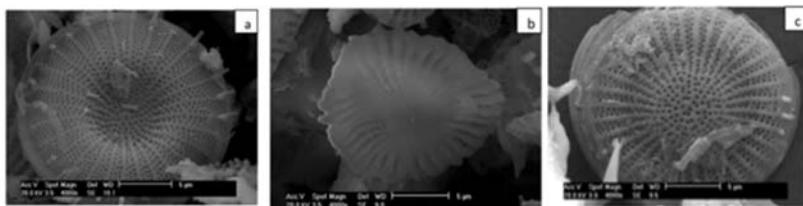
A terra diatomácea é um sedimento amorfo, originado a partir de frústulas ou carapaças de organismos unicelulares vegetais como algas microscópicas aquáticas, marinhas e lacustres, normalmente denominada diatomita e desenvolve-se indefinidamente nas camadas geológicas da crosta terrestre. A maioria das diatomáceas apresenta tamanho de partículas entre 4 e 500 μm, e existem mais de 12.000 espécies diferentes (SOUZA et al., 2003). É um material leve, de baixa massa específica aparente, com colorações variando do branco ao cinza escuro, constituído majoritariamente por sílica, SiO₂ (87 até 91%), grupos silanóis (≡Si-OH), alumina (Al₂O₃) e óxido férrico (Fe₂O₃). (ENGH, 1997)

Devido a sua elevada área superficial específica, baixas densidade e condutividade térmica e estrutura semelhante a um favo de mel, a terra diatomácea é utilizada em diferentes áreas, como na etapa de filtração e clarificação da cerveja, isolamento térmico e acústico, na adsorção de metais pesados, bem como na produção de capacitor cerâmico (GOULART et al, 2011). A terra diatomácea já foi reportada na literatura como material extrator de diferentes compostos, como os metais Pb(II), Cr(III) e Cr(VI) e herbicidas como atrazina e simazina (KATSUMATA et al., 2006; ABU-ZURAYK et al., 2015).

Quando aplicada na etapa de filtração e clarificação da cerveja, a terra diatomácea apresenta uma vida útil muito curta, pois satura-se com material orgânico, derivado do processo fermentação da cerveja,

inviabilizando a sua reutilização como material filtrante. Uma empresa cervejeira de grande porte pode gerar aproximadamente 30 ton/mês deste resíduo (GOULART et al, 2011). Conforme a NBR 10.004 da ABNT, a terra diatomácea classifica-se como Classe II A; resíduos que podem apresentar características de combustibilidade, biodegradabilidade ou solubilidade, com possibilidade de acarretar riscos à saúde ou ao meio ambiente (MELLO e PAWLOWSKY, 2003). Dessa forma, o tratamento térmico mostrado na Figura 5 através das micrografias a, b e c representa uma importante maneira de tornar esse material reaproveitável, recuperando sua capacidade filtrante e possibilitando um fim adequado para esse resíduo.

Figura 5 - a) Micrografia referente à terra diatomácea nova; b) micrografia que representa a terra diatomácea saturada com matéria orgânica; c) micrografia que indica a terra diatomácea tratada termicamente a 700 °C.



Fonte: (GOULART et al., 2011)

Após o tratamento térmico, a terra diatomácea foi recuperada e voltou a apresentar alta capacidade adsorptiva, podendo ser reutilizada em processos de filtração ou como biossorvente “verde” aplicado na técnica de BA μ E.

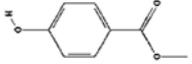
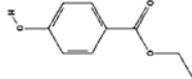
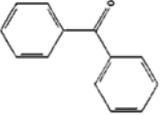
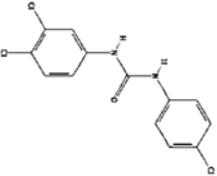
2.3. EDCs - Parabenos, Benzofenonas e Triclocarban

De acordo com a definição adotada pela União Européia, “desreguladores endócrinos (EDCs) são substâncias ou misturas exógenas que promovem alterações no sistema endócrino, causando efeitos adversos sobre a saúde de um organismo” (European Workshop on the Impact of Endocrine Disrupters on Human Health and Wildlife, Weybridge, UK, 2–4/12/1996, p.5). Atuam por diversos mecanismos fisiológicos, podendo substituir, bloquear a ação ou alterar a quantidade hormonal original, causando um desbalanço das funções endócrinas (GUIMARÃES, 2016). São compostos pseudo-persistentes presentes no

meio ambiente em concentrações traço, mas que estão associados a uma variedade de problemas de saúde, tais como danos reprodutivos, comprometimento do desenvolvimento e câncer em mulheres e homens. Além disso, os EDCs contribuem para a progressão de algumas desordens metabólicas incluindo a obesidade, a diabetes e endometriose (GIULIVO et al., 2016).

O “MCR Institute of Environment and Health” publicou no ano de 2005 uma lista com 966 compostos ou elementos relatados na literatura por se apresentarem como desreguladores endócrinos em potencial (IEH, 2005). Em junho de 2015, aproximadamente 1000 compostos foram classificados como EDCs em bancos de dados mundiais como o “TEDX List of Potencial Endocrine Disruptors” (TEDX, 2016). Metilparabeno, etilparabeno, benzofenona e triclocarban ainda não estão listados nos órgãos governamentais brasileiros, porém já são apontados pela comunidade científica como desreguladores endócrinos em potencial (DODSON et al., 2012; JIMÉNEZ-DÍAZ et al., 2016). A Tabela 2 relaciona as estruturas químicas e propriedades físico-químicas dos analitos utilizados neste estudo.

Tabela 2 - Estruturas químicas e propriedades físico-químicas dos analitos estudados.

Composto	Estrutura Química	pKa	logP	Classe Terapêutica	Classe Química
Metilparabeno		8,87	2	Preservativo	Alquil éster do ácido 4-hidróxibenzóico
Etilparabeno		8,90	2,5	Preservativo	Alquil éster do ácido 4-hidróxibenzóico
Benzofenona		-	3,4	Filtro UV	Benzofenonas
Triclocarban		12,77	5,3	Antiséptico	Feniluréia

Fonte: NCBI, PubChem Compound Database.

Parabenos, comumente usados como conservantes em cosméticos, fármacos e produtos de higiene pessoal, possuem propriedades antimicrobiana e antifúngica. São encontrados em cremes dentais, desodorantes, cremes hidratantes, produtos para cabelo e barba, e em conservantes de bebidas e alimentos industrializados (MÁRQUEZ-SILLERO et al., 2010; CANOSA et al., 2007). O uso de parabenos como aditivos alimentares é autorizado na União Europeia pelo Regulamento (EC) nº 1333/2008 do “European Parliament and of the Council”, de dezembro de 2008, relativo aos aditivos alimentares. Um estudo de Liao e Kannan (2014) revelou a presença de parabenos em algumas categorias de papel que são utilizados com frequência na vida diária, incluindo papel higiênico, papel-moeda, bilhetes, cartões de visita, caixas de alimentos, folhetos e jornais (GIULIVO, 2016).

Sua atividade antimicrobiana aumenta proporcionalmente ao comprimento do grupo éster, entretanto a solubilidade em água diminui, desse modo, os parabenos de cadeia curta, com até três átomos de carbono, possuem alta solubilidade em água, fazendo com que sejam os mais utilizados. (ELDER, 1984; LU et al., 2014). Economicamente viáveis, os parabenos são compostos de baixo custo e possuem um largo espectro de atividade antimicrobiana, são altamente estáveis às variações no pH, e podem ser adicionados aos produtos esterilizáveis por autoclave (BŁĘDZKA et al., 2014). Apesar da baixa toxicidade, a exposição continuada e a longo prazo destes compostos acarretam riscos potenciais sobre a saúde humana e de outros seres vivos devido sua atividade estrogênica. (MÁRQUEZ-SILLERO et al., 2010; CANOSA et al., 2007)

Outro composto estudado, a benzofenona, pertence a classe de filtros UV e é um grupo importante de produtos químicos adicionados a protetores solares e cosméticos em geral, como produtos para pele e cabelos, loções e perfumes (NIETO et al., 2009). Os filtros UV são divididos em orgânicos e inorgânicos e podem ser associados ou utilizados separadamente nos produtos. Os filtros orgânicos protegem contra a luz ultravioleta por conta de suas estruturas aromáticas, comumente conjugadas com diferentes grupos químicos, os quais absorvem luz UV (LI et al., 2015). Dessa forma, protegem a pele humana da radiação ultravioleta proveniente dos raios solares, ajudando a prevenir queimaduras, envelhecimento precoce e câncer de pele. (JIMÉNEZ-DÍAZ, I. et al., 2016).

O grupo das benzofenonas está sob investigação da comunidade acadêmica no que diz respeito a ser um EDC em potencial. Recentemente, a benzofenona-1 foi relatada por sua capacidade de bioacumular-se no corpo humano através da absorção pela pele com potencial para induzir

problemas de saúde, incluindo perturbações do sistema endócrino (PARK *et al.*, 2013). Elas são capazes de interferir no sistema endócrino de ratos e camundongos, promovendo comportamento sexual feminilizado e aumento do peso uterino em animais expostos (JIMÉNEZ-DÍAZ, I. *et al.*, 2016). Devido a sua atividade estrogênica, estudos *in vitro* têm relacionado a benzofenona com a proliferação da linhagem de células de câncer de mama e de ovário (PARK *et al.*, 2013). Não bastando, estes compostos apresentaram atividade antiandrogênica, antiestrogênica e atividade estrogênica em peixes (LI *et al.*, 2015; MOLINS-DELGADO, 2016).

Por fim, o último tipo de aditivo estudado neste trabalho é o triclocarban, um agente antimicrobiano clorado. Formulado em uma variedade de produtos de consumo, incluindo sabonetes, creme dental, dispositivos médicos, plásticos e têxteis há mais de meio século, agora ele está sob supervisão dos órgãos de saúde pública de diversos países, devido a evidências que questionam sua eficácia, sugerem possível atividade de desregulação endócrina e de contribuição para a resistência bacteriana à antibióticos (PYCKE *et al.*, 2014). Embora pouco se sabe a respeito da toxicidade do triclocarban, efeitos agudos e crônicos na saúde humana e de animais expostos incluem irritação dos olhos e pele, sensibilização a aeroalérgenos e alimentos, desenvolvimento e toxicidade reprodutiva e inibição da função muscular (HALDEN, 2014). Ele prejudica a reprodução de ratos em estudos laboratoriais e causa a redução da sobrevivência larval, além de promover um desenvolvimento anormal em mariscos (GUO *et al.*, 2009). Além disso, cloroanilinas são formadas decorrentes de sua degradação bacteriana aeróbia, sendo consideradas compostos citotóxicos e cancerígenos. (MILLER *et al.*, 2008).

Diversas técnicas de preparo de amostra são empregadas para determinação de parabenos, benzofenonas e triclocarban. SPE é a mais utilizada para isolamento e concentração desses compostos, mas é possível encontrar artigos que utilizem SBSE, BA μ E, DLLME e SPME. As técnicas instrumentais frequentemente adotadas são cromatografia líquida e gasosa, sendo a primeira a mais popular por possuir alta sensibilidade sem necessidade de uma etapa de derivatização. Os detectores DAD e MS são os mais utilizados. A Tabela 3 lista os principais artigos da literatura a respeito da determinação de parabenos, benzofenona e triclocarban assim como as técnicas de preparo de amostra e instrumentação utilizadas.

Tabela 3 - Principais técnicas de preparo de amostra e instrumentação utilizadas para a determinação de parabenos, benzofenona e triclocarban.

Analito	Preparo de Amostra	Instrumentação	Referência
Parabenos e Benzofenona	SPE	HPLC-MS/MS	(MOLINS-DELGADO, 2016)
Benzofenonas e Parabenos	DLLME	UHPLC-MS/MS	(JIMÉNEZ-DÍAZ, I. et al., 2016)
Parabenos, benzofenona e triclocarban	BA μ E	HPLC-DAD	(DIAS et al., 2015)
Parabenos	SPE	LC-MS/MS	(LI, 2015)
Benzofenonas	SPE	GC-MS	(KOTNIK, K. et al., 2014)
Benzofenonas	DLLME	HPLC-UV	(ZHANG, et al., 2011)
Benzofenonas	BA μ E	HPLC-DAD	(ALMEIDA, C. et al., 2013)
Parabenos, benzofenonas e triclocarban	SBSE	HPLC-MS/MS	(GILART, N. et al., 2013)
Parabenos	SPE	LC-LC-MS/MS	(GORGA, M. et al., 2013)
Parabenos	DLLME	GC-FID E GC-PCI-MS	(JAIN, R. et al., 2013)
Parabenos	DLLME	HPLC	(ÇABUK, H. et al., 2012.)
Parabenos e triclocarban	SPE	UHPLC-MS/MS	(CHEN, Z-F. et al., 2012)
Parabenos, benzofenona e triclocarban	SBSE	HPLC-MS/MS	(FERREIRA, A. M. C. et al., 2011)
Parabenos, benzofenona e triclocarban	SBSE	LC-ESI-MS/MS	(BRATKOWSKA, D. et al., 2011)

Triclocarban	SPE	LC-ESI-MS/MS	(GONZÁLEZ-MARIÑO, I. et al., 2009)
Benzofenonas	SPE	GC-MS	(NEGREIRA, N. et al., 2009a)
Parabenos	HS-SPME	GC-MS/MS	(REGUEIRO, J., 2009)
Benzofenonas	SPE	LC-MS	(NEGREIRA, N. et al., 2009b)

Fonte: Autoria própria, (2016).

A Tabela 4 indica a concentração máxima autorizada de parabenos, benzofenonas e triclocarban em produtos de higiene pessoal e cosméticos segundo a legislação vigente no Brasil, União Européia e Estados Unidos.

Tabela 4 - Concentração máxima autorizada (%) de parabenos, benzofenonas e triclocarban em cosméticos e produtos de higiene pessoal.

Substância	Concentração Máxima Autorizada (%)		
	Brasil	UE	EUA
Ácido 4-hidroxibenzóico, seus sais e ésteres (+) (metil e etil parabeno)	0,4 %	0,4 % (expresso como ácido) individual	0,4 %
	(expresso como ácido) individual	0,8 % (expresso como ácido) para misturas dos sais ou ésteres	(expresso como ácido) individual
Isobutil, isopropil, fenil, benzil e pentilparabeno	0,8 %	Proibidos	0,8 %
	(expresso como ácido) para misturas dos sais ou ésteres	A soma das concentrações individuais deve ser menor que 0,19 %	(expresso como ácido) para misturas dos sais ou ésteres
Butil e propilparabeno			
Triclocarban	0,2 %	1,5 %	*

Benzofenona 1	*	*	*
Benzofenona 2	10 %	*	*
Benzofenona 3	10 %	10 %	6 %
Benzofenona 4	10 %	5 %	10 %
Benzofenona 5	10 %	5 %	*
Benzofenona 8	3 %	*	3 %

* Informação não encontrada ou não há regulamentação

Fonte: (ANDERSEN, 2008; ANVISA, 2000; EP, 2009; EP, 2014; EP, 2014; DWECK, 2008)

Embora haja controle desses compostos na fabricação de produtos cosméticos, ainda não há legislação que limite a quantidade desses resíduos em amostras ambientais. Mesmo assim, diversos estudos têm relatado a presença de parabenos, benzofenona e triclocarban em amostras de água (GORGA *et al.*, 2013, KOTNIK *et al.*, 2014, CAREGHINI *et al.*, 2015). Uma revisão recente sobre a ocorrência de protetores solares em águas residuais indicou concentrações elevadas ($> 500 \text{ ng L}^{-1}$) de benzofenona-4 (RAMOS, 2016). Recentemente, Sánchez-Brunete *et al.* (2011) e Kim e Choi (2014) alertaram para a difusão direta de benzofenona-3 pela pele humana devido à liberação de protetores solar em água. Outro estudo, de Li *et al.* (2015) verificou a ocorrência, destino e avaliação de risco de parabenos e seus derivados clorados em uma estação avançada de tratamento de águas residuais. Heidler *et al.*, (2006) mostrou que, durante o tratamento de águas residuais, o triclocarban se acumula preferencialmente no lodo de esgoto rico em carbono e lípidios, o que favorece sua bioacumulação em organismos aquáticos. Além disso, muitos órgãos de proteção ambiental e de saúde pública, como a *World Health Organization*, vêm chamando atenção para os problemas ambientais e de saúde envolvendo desreguladores endócrinos (UNEP/WHO, 2012).

Diante de tamanha exposição acerca desses EDCs em potencial, é fundamental promover o desenvolvimento científico de métodos analíticos para a determinação dos mesmos, pois, somente assim, haverá suficiente informação que possibilite sua regulamentação em amostras ambientais.

2.4. Planejamento e otimização

Na otimização de um método analítico, é necessário o ajuste de muitas variáveis para se alcançar as melhores condições para a análise.

Esse processo pode consumir tempo, trabalho e material dependendo do tipo de otimização adotada. O método de otimização univariada é classificado como um método sequencial (EIRAS, 1994). Nesse caso, a melhor resposta é obtida variando-se um fator enquanto os outros são mantidos fixos em um certo nível. O processo se repete até que todos os fatores tenham sido ajustados para fornecer os valores otimizados. A metodologia univariada não considera a interação existente entre as variáveis e, como cada uma deve ser tratada independentemente, um grande número de experimentos precisa ser realizado (BRUNS; SCARMINIO; BARROS NETO, 2010).

Recentemente, otimizações envolvendo técnicas de estatística multivariada estão sendo muito utilizadas no desenvolvimento de métodos analíticos por serem mais econômicas e efetivas, além de possibilitarem que mais de uma variável seja otimizada simultaneamente.

Muitas vezes no desenvolvimento de um método, diversos fatores podem influenciar na resposta desejada e é necessário conhecer quais são os mais relevantes para o sistema estudado. De forma a reduzir o número de experimentos e poupar tempo ao analista. Planejamentos fatoriais são empregados a fim de se fazer uma triagem dos fatores. Estes são procedimentos estatísticos que buscam determinar quais variáveis experimentais e suas interações têm influência significativa sobre as diferentes respostas de interesse. (TEÓFILO; FERREIRA, 2006)

2.4.1. Planejamentos fatoriais

Para estudar o efeito de qualquer fator sobre a resposta é preciso variá-lo e observar o resultado dessa variação. Em um planejamento fatorial completo os experimentos devem ser executados em todas as possíveis combinações dos níveis dos fatores. Dessa forma, os fatores devem variar em pelo menos dois níveis (n) diferentes, um inferior (-) e outro superior (+). Para k fatores e $n \geq 2$ níveis são necessários n^k experimentos, ou seja, 2^k experimentos se forem dois níveis. Um nível zero (0) também pode ser acrescentado de modo que todas as variáveis estejam em seu valor médio. Para isso, é preciso trabalhar com variáveis quantitativas. Esse ponto central torna possível estimar o erro experimental sem a necessidade de replicata de todo planejamento. (BEZERRA, 2003)

A Tabela 5 representa uma matriz de contraste para um planejamento fatorial 2^3 , onde são avaliadas três variáveis e suas interações (colunas) e o número total de ensaios corresponde a oito

(linhas). As colunas representando as variáveis x_1 , x_2 e x_3 são construídas realizando todas as combinações possíveis de sinais entre os níveis. Os efeitos de interação de 2ª e 3ª ordem são obtidos pelo produto dos sinais originais das variáveis envolvidas. (TEÓFILO; FERREIRA,2006)

Tabela 5 - Matriz de coeficientes de contraste para um planejamento fatorial 2³. x^{12} , x^{13} e x^{23} são os efeitos de interação de 2ª ordem; x_{123} é o efeito de interação de 3ª ordem.

Média	Variáveis			Interações			
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₁₂	X ₁₃	X ₂₃	X ₁₂₃
+	-	-	-	+	+	+	-
+	+	-	-	-	-	+	+
+	-	+	-	-	+	-	+
+	+	+	-	+	-	-	-
+	-	-	+	+	-	-	+
+	+	-	+	-	+	-	-
+	-	+	+	-	-	+	-
+	+	+	+	+	+	+	+

Fonte: (TEÓFILO; FERREIRA,2006)

No planejamento fatorial completo o número de ensaios cresce a cada fator adicionado, portanto, sua principal desvantagem é o elevado número de experimentos que devem ser realizados para planejamentos com $k > 4$. Para contornar esse problema, é vantajoso aplicar um planejamento fatorial fracionário, que corresponde a uma fração do número de ensaios do planejamento completo. Este tipo de planejamento é adequado porque quando o número de fatores aumenta, aumentam também as chances de que uma ou mais variáveis sejam não significativas para a resposta, através de seus efeitos principais ou interações. Desta maneira, com um número menor de experimentos, é possível se obter, na maioria das vezes, as mesmas conclusões caso fosse realizado um fatorial completo. (TEÓFILO; FERREIRA, 2006) e (BRUNS; SCARMINIO; BARROS NETO, 2010).

Após a realização dos experimentos de triagem, os fatores significativos são selecionados e é necessário adotar uma metodologia para otimização do experimento. No sentido de química analítica, otimizar significa encontrar os valores das variáveis que irão produzir a melhor resposta possível. Dentre as técnicas de otimização existentes, destaca-se a Metodologia de Superfície de Resposta. (BEZERRA et al., 2008)

2.4.2. Metodologia de Superfície de Resposta

A Metodologia de Superfície de Resposta foi desenvolvida por G.E.P. Box na década de 1950 e baseia-se na construção de modelos matemáticos empíricos que geralmente empregam funções polinomiais lineares ou quadráticas para descrever o sistema estudado com o objetivo de fazer previsões estatísticas, podendo ser bem aplicada quando uma resposta, ou um conjunto de respostas de interesse, são influenciadas por diversas variáveis. O objetivo é otimizar simultaneamente os níveis dessas variáveis para atingir o melhor desempenho do sistema. As superfícies representam uma boa maneira de ilustrar graficamente a relação existente entre fatores e respostas, proporcionando melhor entendimento sobre a região estudada. (BEZERRA, 2003)

Para a etapa de otimização, é necessário um planejamento experimental mais sofisticado, que permita avaliar os fatores em mais de dois níveis e gere boas estimativas para todos os coeficientes, exigindo poucos experimentos além de fornecer condições de avaliação dos coeficientes e do modelo, ou seja, da regressão e da falta de ajuste. Dois tipos de planejamento são mais utilizados para ajustar modelos quadráticos: Composto Central e Doehlert. (FERREIRA et al., 2004)

2.4.3. Planejamento Doehlert

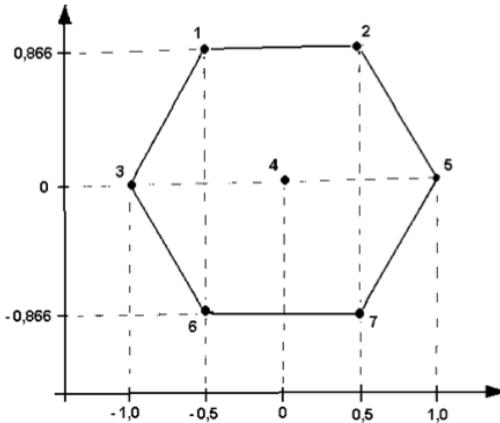
O planejamento Doehlert é um planejamento uniforme onde seus pontos experimentais correspondem aos vértices de um hexágono gerado de um simplex regular e, em geral, o número total de pontos experimentais no planejamento é calculado pela equação 1:

$$\text{número de experimentos} = k^2 + k + pc \quad (1)$$

Onde: k = número de fatores e pc = é o nº de experimentos no ponto central.

Para um planejamento de duas variáveis, as dimensões da matriz Doehlert são (5,3).

Figura 6 - Distribuição dos pontos experimentais de uma matriz Doehlert para otimização de duas variáveis, representada por um hexágono regular com as coordenadas normalizadas.



Fonte: (BEZERRA, 2003).

A Figura 6 representa a distribuição dos pontos experimentais no Planejamento Doehlert com duas variáveis, onde é possível observar os 3 níveis eixo y e 5 níveis em x. (TEÓFILO; FERREIRA, 2006)

2.4.4. Planejamento simplex-centróide

Planejamentos experimentais para o estudo de misturas apresentam uma importante diferença em relação aos demais. Isso porque as propriedades de uma mistura são determinadas pelas proporções de seus componentes, não por valores absolutos. A soma das proporções dos diversos componentes de uma mistura é sempre 100%. (BRUNS; SCARMINIO; BARROS NETO, 2010)

Para uma mistura qualquer de q componentes, no planejamento simplex-centróide, o número de pontos distintos é dado pela Equação 2:

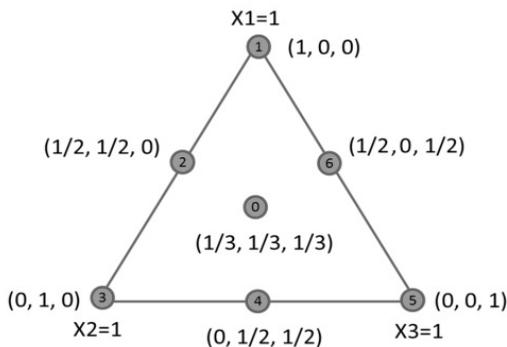
$$\text{número de pontos} = 2^q - 1 \quad (2)$$

Onde q é o número de componentes da mistura.

Desta forma, em uma mistura ternária, os sete pontos da superfície triangular são dados por: $(1,0,0)$, $(0,1,0)$, $(0,0,1)$, $(\frac{1}{2}, \frac{1}{2}, 0)$, $(0, \frac{1}{2}, \frac{1}{2})$, $(\frac{1}{2}, 0, \frac{1}{2})$ e $(\frac{1}{3}, \frac{1}{3}, \frac{1}{3})$, onde os três primeiros pontos representam os

vértices do triângulo equilátero e correspondem à 100 % de um componente, os três pontos seguintes a uma mistura de 50 % de dois componentes e o último ponto, ou ponto central, é a mistura dos três componentes em igual proporção 33,3...%. Esse planejamento pode ser visualizado na Figura 7. (NIST/SEMATECH,2016).

Figura 7 - Planejamento Simplex-Centróide.



Fonte: (CORNELL, 2002)

2.5. Validação de parâmetros de métodos analíticos

A validação de um método analítico é a etapa subsequente à otimização do mesmo. A validação mais comum para métodos desenvolvidos por laboratórios de pesquisa é a "*single-laboratory method validation*", em que uma validação total não é necessária (IUPAC, 2002). Nesses casos, alguns parâmetros de mérito são considerados: limites de detecção e quantificação, faixa linear, coeficiente de determinação (R^2), ensaios de recuperação e precisão.

Por definição da IUPAC, o limite de detecção (LOD) é a menor quantidade de analito na amostra que pode ser diferenciado do zero. Já o limite de quantificação (LOQ) é definido pela ANVISA (2005) como a menor concentração de analito na amostra que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis. Esses limites podem ser calculados pela curva de calibração e dependem da razão entre o desvio padrão do intercepto e o coeficiente angular, como pode ser visto nas Equações 3 e 4:

$$\text{LOD} = \frac{3 \times (\text{desvio intercepto})}{\text{coeficiente angular}} \quad (3)$$

$$LOQ = \frac{10 \times (\text{desvio intercepto})}{\text{coeficiente angular}} \quad (4)$$

A recuperação está relacionada com a exatidão, pois reflete a quantidade de determinado analito, recuperado no processo, em relação à quantidade real presente na amostra (AOAC, 2012). Calcula-se a quantidade percentual recuperada usando a Equação 5. Para avaliar a precisão utiliza-se o desvio padrão relativo (RSD%), descrito pela Equação 6:

$$R\% = \frac{[\text{analito}]_{rec.100\%}}{[\text{analito}]_{add}} \quad (5)$$

$$RSD\% = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100\% \quad (6)$$

onde, s = desvio padrão absoluto e \bar{x} = média.

A Tabela 6 indica os valores de RSD% e R% aceitáveis com relação à concentração de analito. (AOAC, 2012)

Tabela 6 - Precisão (RSD%) e Recuperação (R%) como função da concentração do analito.

Analito, %	Proporção de analito	Unidade	RSD, %	Recuperação média, %
100	1	100%	1,3	98 – 102
10	10-1	10%	1,9	98 – 102
1	10-2	1%	2,7	97 – 103
0,01	10-3	0,1%	3,7	95 – 105
0,001	10-4	100 ppm (mg/kg)	5,3	90 – 107
0,0001	10-5	10 ppm (mg/kg)	7,3	80 – 110
0,00001	10-6	1 ppm (mg/kg)	11	80 – 110
0,000001	10-7	100 ppb (µg/kg)	15	80 – 110
0,0000001	10-8	10 ppb (µg/kg)	21	60 – 115
0,00000001	10-9	1 ppb (µg/kg)	30	40 - 120

Fonte: (AOAC, 2012)

Em alguns casos, podem ser aceitos valores fora do intervalo de recuperação, desde que o RSD% corresponda à concentração de analito (SANCO, 2013).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Desenvolver e aplicar um método analítico baseado na microextração em barra adsortiva (BA μ E) que empregue terra diatomácea proveniente do resíduo da indústria cervejeira como fase extratora para determinação de parabenos, benzofenona e triclocarban em amostras aquosas utilizando HPLC-DAD.

3.2. Objetivos Específicos

- Produzir barras adsortivas de BA μ E com terra diatomácea empregando suportes cilíndricos de polipropileno e filmes adesivos.
- Avaliar a reprodutibilidade da produção das barras adsortivas de terra diatomácea assim como a reprodutibilidade de agitadores acoplados.
- Otimizar as condições de extração por BA μ E para determinação de parabenos, benzofenona e triclocarban em água por HPLC-DAD.
- Determinar e avaliar os principais parâmetros analíticos de mérito como limites de detecção e quantificação, coeficientes de determinação.
- Aplicar o procedimento BA μ E otimizado em ensaios de recuperação e precisão para amostras de águas superficiais coletadas na Lagoa do Peri, Florianópolis.

4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1. Reagentes e materiais

Todos os padrões utilizados neste trabalho, metil parabeno ou 4-hidróxibenzoato de metila, etil parabeno ou 4-hidróxibenzoato de etila, benzofenona ou 1,1-difenilmetanona, triclocarban ou 1-(4-clorofenil)-3-(3,4-diclorofenil)uréia, com grau de pureza 99,0 % foram adquiridos da Sigma-Aldrich (São, Paulo, Brasil). Água ultrapura foi obtida pelo sistema de água ultrapura (Mega Purity, Billerica, EUA). Acetonitrila (ACN) e metanol (MeOH) com grau HPLC foram comprados da JT Baker (Mallinckrodt, NJ, EUA). Para estudo da força iônica, foi utilizado cloreto de sódio (VETEC, Rio de Janeiro, Brasil). O pH da amostra foi ajustado com ácido clorídrico 0,1 mol L⁻¹ e hidróxido de sódio 0,1 mol L⁻¹ (VETEC, Rio de Janeiro, Brasil).

Soluções estoques individuais foram preparadas com concentração de 1000 mg L⁻¹ em ACN. Através de diluições apropriadas foi feita uma solução mix dos analitos 100 mg L⁻¹ em ACN que foi usada para fortificação das amostras aquosas nos experimentos de otimização e validação do método.

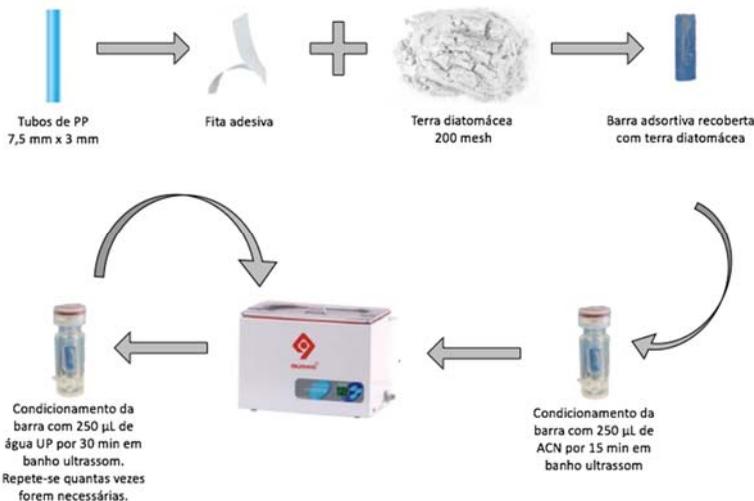
4.2. Instrumentação

Um cromatógrafo líquido modelo LC 20AT (Shimadzu, Kyoto, Japão) equipado com DAD modelo SPD- M20A, injeção manual modelo Rheodyne 7725i (Rohnert Park, CA, EUA) e *loop* de injeção de 20 µL foi utilizado neste estudo. A separação foi realizada em fase reversa com uma coluna C18 (ZORBAX XDB, 250 mm x 4.6 mm d.i., 5 µm de espessura de filme) (Agilent Technologies, EUA) e vazão 1 mL min⁻¹. A fase móvel consistiu de: água (A) 55 % e ACN (B) 45% isocrático de 0 - 2,5 min; em 2,5 - 4,0 min foi iniciado o gradiente até que A caísse a 20%, sendo mantida essa condição até os 14 min de corrida. Por fim, de 14 - 15 min a composição inicial foi restabelecida e equilibrada até 20 min. Os comprimentos de onda monitorados foram 255, 257 e 265 nm para benzofenona, parabenos e triclocarban, respectivamente. Três agitadores magnéticos (Fisatom, SP, Brasil) foram acoplados a um Variac Regulador de Tensão TDGC2-1 1KVA/4 AMP (EZA Instrumentos, SP) e a um filtro de linha NBR 20605 (Power Line). A tensão dos agitadores foi controlada por um Multímetro Digital ET-1002 (Minipa, SP, Brasil) e mantida em 145 V para todas as extrações.

4.3. Preparo das barras adsorativas

As barras foram preparadas conforme Neng *et al.*, (2010) e Dias *et al.*, (2015) relataram. A terra diatomácea foi previamente tratada por Goulart *et al.*, 2011. Foram produzidas quatro barras de terra diatomácea de 7,5 mm e o preparo das mesmas é descrito na Figura 8.

Figura 8 - Preparo das barras adsorativas com recobrimento de terra diatomácea.



Fonte: Autoria própria, (2016).

Para avaliar a reprodutibilidade no processo de produção das barras, foram utilizadas três barras, sendo duas novas e uma usada por aproximadamente 30 vezes.

4.4. Otimização do procedimento de BAµE

Todos os experimentos desta etapa foram efetuados em frascos de 22 mL (Supelco) contendo 15 mL de água ultrapura fortificada com $600 \mu\text{g L}^{-1}$ dos analitos, extraídos por 1 hora e agitação constante de 1200 rpm. A ordem de experimentos apresentada no texto foi a mesma adotada na otimização.

A) Dessorção líquida – Um Planejamento Simplex-Centróide de sete experimentos foi utilizado para estudar a escolha do solvente ou mistura deles (H₂O, MeOH e/ou ACN), conforme indica a Tabela 7. A etapa de dessorção para esse planejamento foi fixada em 15 min em banho ultrassônico e foram utilizados 150 µL do solvente ou mistura de solvente em cada experimento. Os dados experimentais do planejamento foram processados usando o programa computacional *Statsoft Statistica 8.0*. Em seguida, o tempo de dessorção foi otimizado com ensaios univariados em triplicata para 15 e 30 min. Os resultados foram processados com o auxílio o programa Excel.

Tabela 7 - Planejamento Simplex-Centróide para escolha do (s) solvente (s) na etapa dessorção líquida.

Experimento	ACN Proporção (v/v)	MeOH Proporção (v/v)	Água Proporção (v/v)
1	1	0	0
2	0	1	0
3	0	0	1
4	0,5	0,5	0
5	0,5	0	0,5
6	0	0,5	0,5
7	0,33	0,33	0,33

Fonte: Autoria própria

B) Procedimento de extração – Os parâmetros pH, tempo, temperatura e força iônica foram estudados através de um planejamento fatorial completo em dois níveis com triplicata do ponto central (Tabela 8). Os dados experimentais do planejamento fatorial completo foram processados usando o programa computacional *Statsoft Statistica 8.0* e a resposta obtida foi calculada a partir das médias geométricas das áreas dos picos de cada analito.

Tabela 8 - Níveis, variáveis, matriz e a resposta obtida para o planejamento fatorial completo com triplicata do ponto central.

Variáveis	Símbolo	Níveis		
		-1	0	+1
pH	pH	4	5,5	7
Tempo (min)	t	30	75	120
Temperatura (°C)	T	15	25	35
Sal (%)	%	0	17,5	35
Ensaio	t	T	%	pH
1	-1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1	-1
3	-1	+1	-1	-1
4	+1	+1	-1	-1
5	-1	-1	+1	-1
6	+1	-1	+1	-1
7	-1	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1	-1
9	-1	-1	-1	+1
10	+1	-1	-1	+1
11	-1	+1	-1	+1
12	+1	+1	-1	+1
13	-1	-1	+1	+1
14	+1	-1	+1	+1
15	-1	+1	+1	+1
16	+1	+1	+1	+1
17	0	0	0	0
18	0	0	0	0
19	0	0	0	0

Fonte: Autoria própria.

Tempo de extração (60 - 180 min) e pH (5 - 9) foram otimizados via planejamento *Doehlert* de 9 experimentos (incluindo triplicata no ponto central) (Tabela 9). Os dados experimentais desse planejamento foram processados usando o programa computacional *Statsoft Statistica 8.0*. Os dados foram plotados e as respostas usadas foram as médias geométricas das áreas dos picos para cada experimento considerando as áreas dos quatro analitos. Em seguida, tempo de extração foi otimizado univariadamente em triplicata de 90, 140, 180 e 220 min. Os resultados foram processados com o auxílio o programa Excel.

Tabela 9 - Planejamento Doehlert adotado para a otimização da extração de parabenos, benzofenona e triclocarban em amostras de água por BA μ E.

Experimentos	Tempo (min)	pH
1	120	5
2	180	6
3	60	6
4	180	8
5	60	8
6	120	9
7 (ponto central)	120	7
8 (ponto central)	120	7
9 (ponto central)	120	7

Fonte: A autoria própria.

A reprodutibilidade dos agitadores associados ao regulador de tensão foi avaliada com três agitadores. A Figura 9 ilustra o esquema de acoplamento dos três agitadores ao regulador de tensão. Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados foram processados com o auxílio do programa Excel.

Figura 9 - Esquema do acoplamento dos agitadores ao regulador de tensão.



Fonte: A autoria própria, (2016)

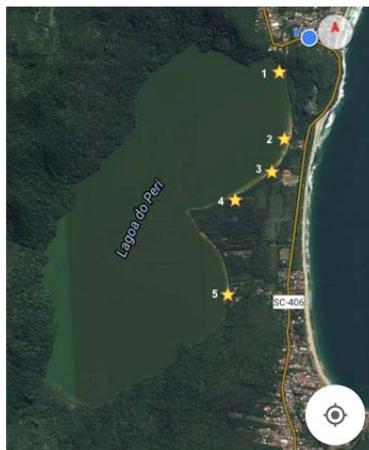
4.5. Preparo de amostra otimizado

Em frascos de 22 mL, foram transferidos 15 mL de amostra em pH = 5 e 600 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada analito. A solução foi agitada por 5 min, e, em seguida, a barra de BA μ E foi imersa na amostra. A extração procedeu por 90 min e após foi feita a dessorção líquida por 15 min com 100 μL (50:50, v/v) de ACN:MeOH em frascos de polipropileno com *insert* de vidro de 300 μL (Agilent, CA, EUA). Depois da extração/dessorção, a barra passou por um procedimento de limpeza em banho ultrassônico por 5 min em ACN:MeOH (50:50, v/v) e, em seguida, foi retirada e lavada com água ultra pura. Sistemáticamente, antes das extrações, as barras eram submetidas ao procedimento de limpeza com ACN:MeOH (50:50, v/v) por 10 min e a solução mix dos analitos era retirada do freezer e sonicada por aproximadamente 15 min em temperatura ambiente.

4.6. Parâmetros analíticos de mérito e aplicação

O método proposto para BA μ E foi validado através de LOD, LOQ, faixa linear e coeficiente de determinação (R^2). Precisão e exatidão foram estudadas através de dois níveis de fortificação de amostras de água da Lagoa do Peri (Florianópolis, Santa Catarina, Brasil). As amostras de água foram coletadas com até 20 cm de profundidade em cinco diferentes pontos da Lagoa do Peri, incluindo o local de coleta da Casan (ponto 3), com auxílio de frascos de vidro âmbar e foram armazenadas em refrigerador a 4 °C até a análise (Figura 10).

Figura 10 - Pontos de coleta de amostras água superficial na Lagoa do Peri para ensaios de validação de metodologia com suas respectivas coordenadas geográficas.



Ponto de coleta	Coordenadas Geográficas
1	-27.7196443, -48.5094452
2	-27.7256540, -48.5092712
3	-27.7285262, -48.5107092
4	-27.7308748, -48.5145816
5	-27.7392855, -48.5158171

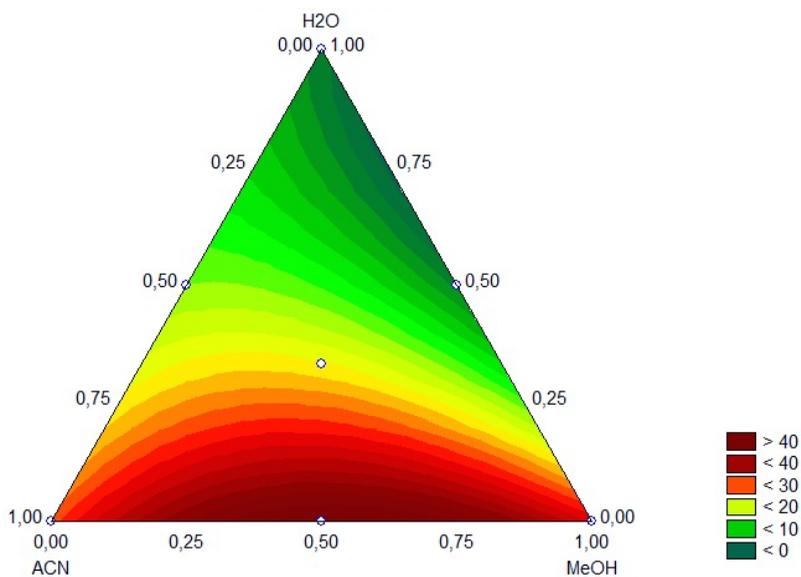
Fonte: Autoria própria.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Otimização do método

Primeiramente, foi otimizada a etapa de dessorção líquida em que foram estudadas a melhor mistura de solventes e tempo de dessorção. Os resultados obtidos na superfície triangular (Figura 11) indicam que a mistura ideal para a dessorção líquida dos analitos é ACN:MeOH (50:50, v/v). Em um estudo recente, Dias *et al.*, (2015) obteve a mesma composição de solventes para extração de parabenos, benzofenona e triclocarban utilizando BA μ E como técnica de preparo de amostra e empregando cortiça como material extrator. Outros estudos que também utilizaram a técnica para a extração de parabenos e benzofenonas de amostras aquosas obtiveram a mesma mistura para a dessorção líquida. (ALMEIDA *et al.*, 2013; ALMEIDA e NOGUEIRA, 2014)

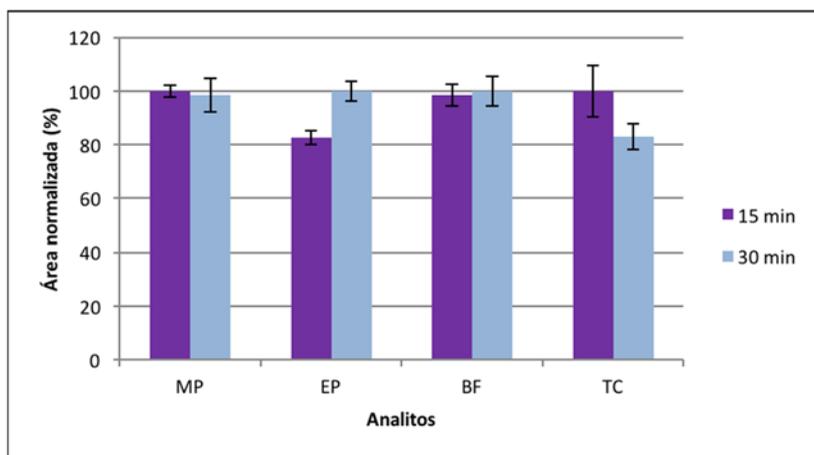
Figura 11 - Superfície triangular com $R^2 = 0,9634$ gerada a partir do planejamento simplex centróide na otimização dos solventes de dessorção líquida.



* Condições BA μ E: 15 mL de água ultra pura fortificada com 600 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ dos analitos, pH = 5, tempo de extração de 1 h e dessorção líquida com 150 μL por 15 min.

O tempo de dessorção foi estudado univariadamente em dois níveis: 15 e 30 minutos, conforme mostrado na Figura 12. Metilparabeno e triclocarban obtiveram as melhores respostas em 15 min de dessorção. Benzofenona apresentou bons resultados nos dois tempos estudados, considerando-se estatisticamente iguais conforme os desvios apresentados. Para etilparabeno, 30 min foi ligeiramente maior, entretanto, 15 min foi considerado satisfatório por apresentar área normalizada maior que 80 % e menor desvio. Dessa forma, foi fixado 15 min como o melhor tempo de dessorção líquida para os analitos.

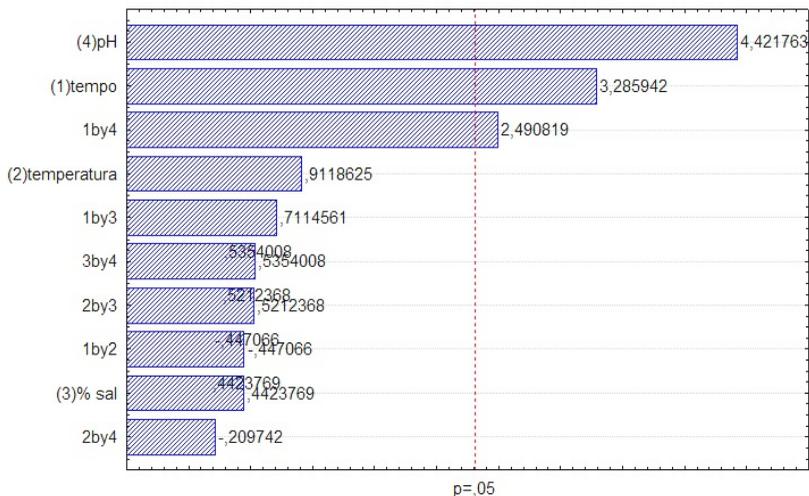
Figura 12 - Gráfico de barras gerado pelas áreas normalizadas dos analitos para escolha do tempo de dessorção líquida dos analitos.



* Condições BA μ E: 15 mL de água ultra pura fortificada com 600 μ g.L⁻¹ dos analitos, pH = 5, tempo de extração de 1 h e dessorção líquida com 150 μ L de ACN:MeOH (50:50, v/v).

Após a otimização da etapa de dessorção líquida, foi realizado um planejamento fatorial completo (2⁴) com o objetivo de fazer uma triagem das variáveis que poderiam exercer influência significativa no procedimento de extração. Foi estudado pH da amostra, tempo de extração, temperatura e concentração de sal em dois níveis, conforme matriz elucidada na Tabela 8. A partir dessa matriz, foi possível construir o diagrama de Pareto (Figura 13). Nesse gráfico, a variável ou interação entre variáveis são consideradas significativas no processo de extração, quando suas respectivas barras são interceptadas transversalmente pela linha do valor $p = 0,05$, ou seja, num intervalo de confiança de 95 %.

Figura 13 - Diagrama de Pareto obtido pelo planejamento fatorial completo para triagem das variáveis e suas interações na análise de parabenos, benzofenona e triclocarban através da técnica de BAμE.

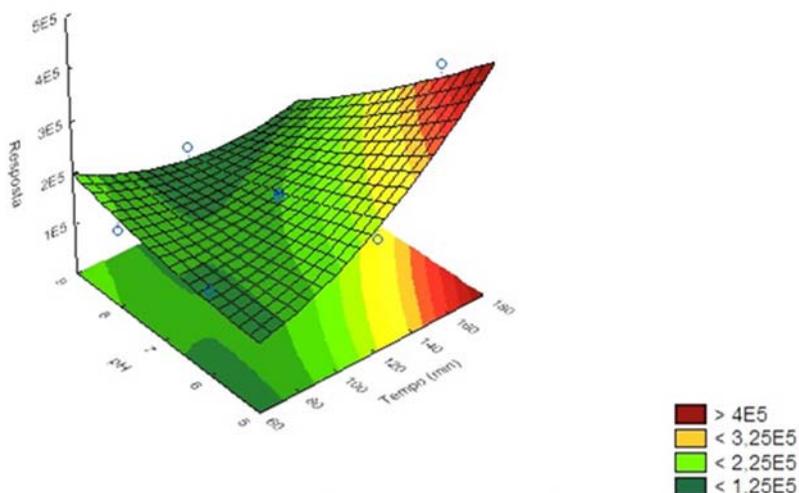


* Condições BAμE: 15 mL de água ultra pura fortificada com 600 μg L⁻¹ dos analitos, pH variando em 4 (-), 5,5 (0) e 7(+), temperatura 15 (-), 25 (0) e 35 °C (+), tempo de extração 30(-), 75 (0) e 120 min (+), concentração de sal em zero (-), 17,5 (0) e 35 % (+) e tempo de desorção líquida de 15 min com 150 μL de ACN:MeOH (50:50, v/v).

Os resultados mostram que os fatores pH, tempo de extração e o efeito da interação entre pH e tempo de extração exercem influência significativa no processo de extração, sendo o primeiro o mais relevante. Os sinais dos fatores considerados relevantes são todos positivos, indicando que as maiores respostas foram obtidas nos níveis superiores de pH e tempo, 7 e 120 min, respectivamente. A interação positiva de pH e tempo de extração é consequência de ambos os fatores positivos (ensaios 10, 12, 14 e 16), pois maiores áreas foram observadas em comparação com ensaios onde ambos os fatores pH e tempo foram negativos (ensaios 1, 3, 5 e 7). Em contrapartida, as variáveis temperatura e concentração de sal não apresentaram influência significativa para o processo de extração e, por sua vez, não foram avaliadas na otimização da metodologia. A tabela contendo as médias geométricas das áreas obtidas no experimento pode ser visualizada no Apêndice A, Tabela A-3.

Após a triagem das variáveis, foi feito o estudo multivariado de pH e tempo de extração por planejamento Doehlert, sendo o primeiro avaliado em 5 níveis (pH = 5, 6, 7, 8 e 9) e o segundo em três (60, 120 e 180 min). A superfície de resposta (Figura 14) foi gerada a partir da média geométrica das respostas dos quatro analitos e indica a condição compromisso entre eles. A equação quadrática que representa o gráfico é $z = -57514,9999 + 3293,5916.x + 13,505694.x^2 + 20898,6666.y + 3013,666.y^2 - 777,05833.xy + 0$, e o coeficiente de determinação $R^2 = 0,91854$ revela boa correlação entre os dados experimentais e os valores preditos.

Figura 14 - Superfície de resposta gerada através da otimização simultânea de tempo de extração e pH da amostra na extração dos analitos por BA μ E.

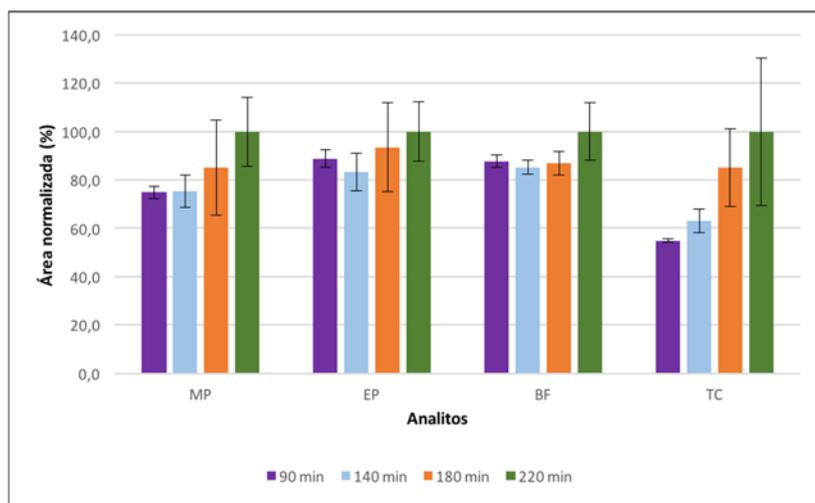


* Condições BA μ E: 15 mL de água ultra pura fortificada com 600 $\mu\text{g.L}^{-1}$ dos analitos, pH variando em 5, 6, 7, 8 e 9, tempo de extração em 60, 120 e 180 min com dessorção líquida de 15 min com 150 μL de ACN:MeOH (50:50, v/v).

Resultados ótimos foram obtidos entre 140 e 180 minutos e entre pH = 5 e 6. Para tal, pH = 5 foi escolhido como condição ótima de extração. Dias *et al.*, (2015) relatou pH = 5,5 como ótimo para a extração dos mesmos analitos, o que corrobora com os resultados obtidos nesse estudo.

Segundo a Figura 14, o tempo de extração aponta uma região de máximo para valores superiores à faixa estudada. Isto ocorre devido ao longo tempo de equilíbrio demandado pelos analitos em questão. Dessa forma, optou-se pela otimização univariada do tempo de extração com o objetivo de verificar se há diferença significativa nas áreas acima de 140 min que justifique utilizar tempo maior que este e que compreenda um domínio maior. A Figura 15 representa o estudo univariado de tempo de extração dos analitos com ensaios realizados em duplicata. No Apêndice A, Tabela A-6, estão contidas maiores informações referentes às áreas obtidas no procedimento de extração utilizadas para gerar o gráfico.

Figura 15 - Gráfico de barras gerado pelas áreas normalizadas dos analitos para escolha do tempo de dessorção líquida dos analitos.



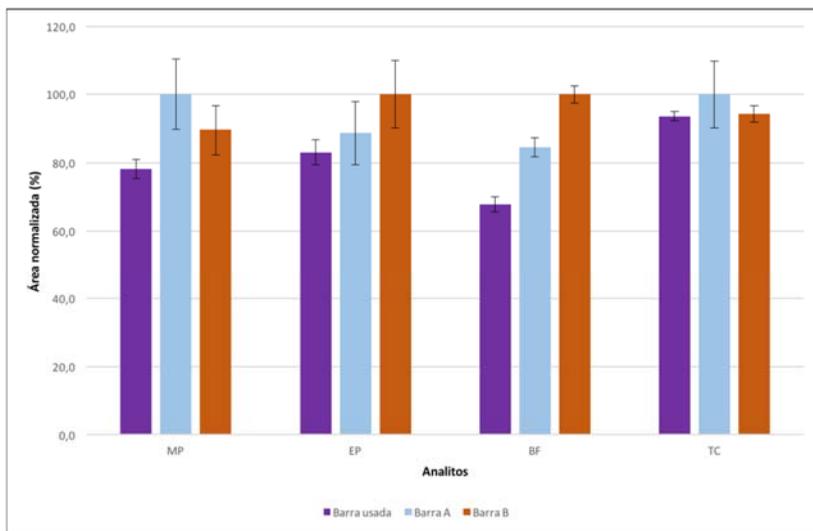
* Condições BAμE: 15 mL de água ultra pura fortificada com 600 μg.L⁻¹ dos analitos, pH = 5, tempo de extração variado em 90, 140 e 180 e 220 min com dessorção líquida de 15 min com 150 μL de ACN:MeOH (50:50, v/v).

O melhor tempo escolhido foi 90 min, devido ao baixo desvio e valores consideráveis de área normalizada, em comparação ao maior tempo (220 min). Levando-se em conta os desvios das medidas, para etilparabeno e benzofenona, 90 e 220 min são estatisticamente iguais. Já para metilparabeno e triclocarban, mesmo considerando o limite dos desvios, os valores são ligeiramente menores em 90 min que em 220 min, mas mesmo assim, é mais conveniente adotar o menor tempo, visto que a

diferença entre as áreas é pequena comparada ao incremento de tempo que existe entre elas (130 min). Outra justificativa é que o triclocarban, o analito com maior perda de sinal ao utilizar 90 min de extração, é também o analito que possui maior eficiência de extração e o mais sensível ao detector DAD, podendo ser empregado o tempo de 90 min sem interferir substancialmente no sinal analítico do mesmo. Desta forma, foi adotada uma condição de pré-equilíbrio para a extração dos quatro analitos.

A reprodutibilidade na produção das barras foi avaliada utilizando duas barras novas denominadas A e B e a eficiência da barra usada por aproximadamente 50 vezes também foi testada. Os ensaios foram feitos em duplicata e o gráfico gerado encontra-se na Figura 16.

Figura 16 - Reprodutibilidade na produção das barras de BA μ E com terra diatomácea e avaliação da eficiência de uma barra usada.



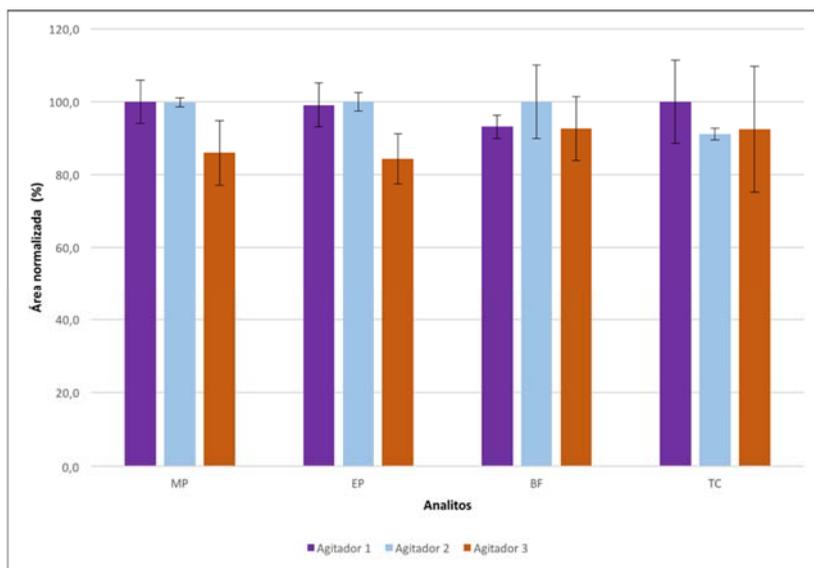
* Condições BA μ E: 15 mL de água ultra pura fortificada com 600 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ dos analitos, pH = 5, tempo de extração de 90 min com dessorção líquida de 15 min com 100 μL de ACN:MeOH (50:50, v/v).

A reprodutibilidade na produção das barras apresentou boa precisão e valores de RSD% menores que 11 % foram obtidos para todos os analitos (Apêndice A, Tabela A-7). A Figura 16 também permite avaliar a eficiência da barra usada após a otimização do método em comparação às novas. Embora as respostas tenham sido ligeiramente

menores para os parabenos e benzofenona, o resultado para a barra usada foi satisfatório.

Este trabalho também avaliou a reprodutibilidade dos agitadores ao se acoplar três agitadores a um regulador de tensão (Figura 17). Assegurando-se que todos os agitadores possuam os mesmos componentes internos, ou seja, que sejam do mesmo modelo e marca, garante-se que todos agitem em igual velocidade pois a tensão da rede é mantida constante entre os três, com auxílio do regulador de tensão. Este experimento foi realizado em triplicata e um multímetro auxiliou no ajuste fino de tensão sendo que a mesma foi mantida em 145,0 V (± 1) durante todos os ensaios.

Figura 17 - Reprodutibilidade dos agitadores utilizados na técnica de BA μ E.



* Condições BA μ E: 15 mL de água ultra pura fortificada com 600 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ dos analitos, pH = 5, tempo de extração de 90 min com dessorção líquida de 15 min com 100 μL de ACN:MeOH (50:50, v/v).

Avaliando a Figura 17 pode-se dizer que os agitadores 1 e 2 são estatisticamente idênticos, pois seus desvios se ultrapassam e asseguram que não haja diferença significativa entre eles. O agitador 3 possui uma eficiência ligeiramente menor, mas por apresentar RSD < 20 % e área normalizada maior que 80 % para todos os analitos, teve seu desempenho

considerado bom e foi utilizado juntamente com os outros dois até o desfecho deste trabalho.

Após o estudo de reprodutibilidade das barras e agitadores, pode-se assegurar que ambos podem ser utilizados indiscriminadamente para a validação dos parâmetros analíticos de mérito e aplicação da metodologia, aumentando assim a frequência analítica do método, visto que se torna possível utilizar simultaneamente três aparatos de extração. Conforme a disponibilidade no laboratório, mais agitadores podem ser acoplados ao regulador de tensão e aumentar ainda mais a frequência analítica deste e de outros métodos propostos pelo grupo de pesquisa.

5.2. Parâmetros analíticos de mérito e aplicação do método

Após a otimização dos parâmetros para extração de parabenos, benzofenona e triclocarban, o método foi avaliado através das principais figuras de mérito com a construção de curva de calibração aquosa (Tabela 10). Os valores de LOQ podem ser diminuídos com o uso de detectores mais sensíveis, como o MS.

Tabela 10 - Faixa linear, coeficiente de determinação, limites de detecção e quantificação e desvio do intercepto para o método de BAμE para a determinação de parabenos, benzofenona e triclocarban em água ultra pura.

Composto	LOD ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Faixa linear de trabalho ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Curva Analítica	R ²	Desvio intercepto
MP	1,6	5,3	5,3 - 100	$y = 39,247x + 501,0666$	0,99974	20,63091
EP	2	6,9	6,9 - 100	$y = 58,637x + 656,5148$	0,99956	40,56398
BF	0,29	0,96	0,96 - 10	$y = 733,813x + 553,9930$	0,99942	70,2383
TC	0,19	0,63	0,63 - 5	$y = 6462,195x + 2744,9$	0,99852	409,3978

* Condições BAμE: 15 mL de água ultra pura fortificada com os analitos, pH da amostra de 5, tempo de extração de 90 min e dessorção líquida com 100 μL (50:50, v/v) de ACN:MeOH por 15 min.

A Tabela 11 compara este método com outros descritos na literatura que utilizam BAμE como técnica de preparo de amostra e HPLC-DAD para análise dos mesmos analitos. Em comparação ao método desenvolvido por Dias *et al.*, (2015) este apresentou menores LOQ para metilparabeno, etilparabeno e triclocarban, para o mesmo tempo de extração e menor tempo de dessorção, contudo, as faixas lineares de trabalho foram mais estreitas. Em contrapartida, valores muito próximos ou maiores de LOQ foram obtidos na metodologia proposta em comparação às que utilizam 16 h de extração e volumes de dessorção maiores. Devido ao elevado tempo de extração requerido nos trabalhos de Almeida *et al.*, (2013) e Almeida e Nogueira, (2014), o método proposto neste trabalho se mostra mais vantajoso, pois apenas 90 min são necessários para se alcançar LOQ ligeiramente maiores, além de utilizar menor volume de solvente orgânico, o que é ambientalmente mais amigável/verde.

Tabela 11 - Comparação dos dados da literatura para BAμE e os analitos com o método proposto com terra diatomácea. Todos os trabalhos utilizam HPLC-DAD.

Analito	Condições BaμE	Condições dessorção	Faixa linear de trabalho (μg.L ⁻¹)	Trabalho
BF	25 mL de amostra, pH = 5,5 sem adição de sal, tempo de extração: 4h ^a e 16 h ^b	1,5 mL MeOH:ACN (50:50, v/v) por 15 ^a ou 30 ^b min	1- 24 ^a 2- 24 ^b	(ALMEIDA et al., 2013)
BF, MP, EP e TC	15 mL de amostra, pH = 5,5, 25 % de sal, 90 min extração ^c	100 μL ACN:MeOH (50:50, v/v) por 30 min	0,64 – 60 ¹ 8 – 400 ^{2,3} 3,2 – 400 ⁴	(DIAS et al., 2015)
MP e EP	25 mL de amostra, pH = 5,5 sem adição de sal, 16 h de extração ^a	200 μL ACN:MeOH (50:50, v/v) por 45 min	0,5 – 28	(ALMEIDA e NOGUEIRA, 2014)
BF, MP, EP e TC	15 mL de amostra, pH = 5, sem adição de sal, 90 min de extração ^d	100 μL ACN:MeOH (50:50, v/v) por 15 min	5,3 – 100 ² 6,9 – 100 ³ 0,96 – 10 ¹ 0,63 – 5 ⁴	Este trabalho

Sorventes: carvão ativado^a, polímero pirrolidona modificado^b, cortiça^c; terra diatomácea^d.

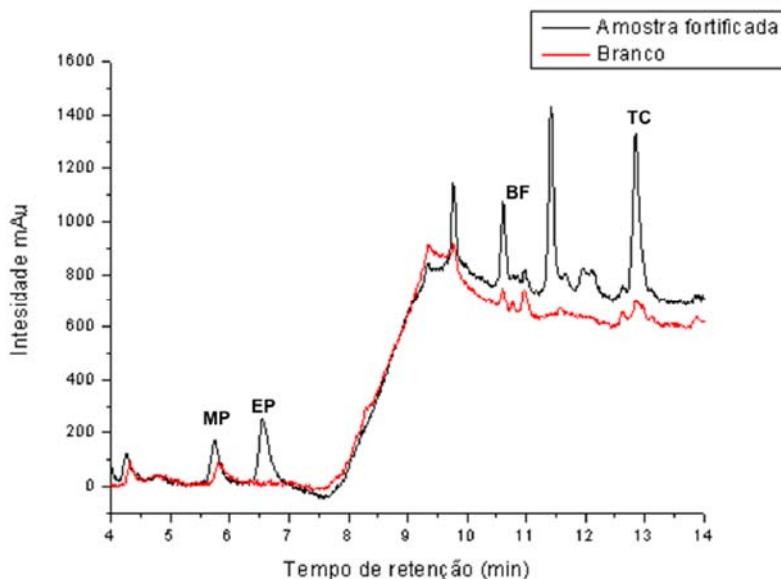
Analitos: benzofenona¹; metilparabeno²; etilparabeno³; triclocarban⁴.

Fonte: Autoria própria, (2016).

O método proposto foi aplicado em amostras de água da Lagoa do Peri, coletadas em cinco pontos diferentes da lagoa. Estudos de exatidão (R %) e precisão (RSD %) foram feitos em dois níveis de fortificação, em triplicata. No Apêndice B, Tabela B-7, estão contidos os valores das áreas obtidas durante o experimento e que foram usadas para gerar a Tabela 12. Os valores de R % variaram de 63 a 124 % e RSD % de 1 a 20 % e foram considerados satisfatórios, pois se enquadram nos limites definidos pela AOAC, (2012).

Nas amostras da Lagoa do Peri analisadas não foram encontrados parabenos, benzofenona e triclocarban considerando os limites de detecção e quantificação do método proposto (Figura 18).

Figura 18 - Cromatogramas obtidos após a extração por BA μ E com terra diatomácea e determinação por HPLC-DAD para amostra de água da lagoa não fortificada e amostra fortificada com 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ de metil parabenho e etil parabenho, 2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ de benzofenona 1,25 $\mu\text{g L}^{-1}$ de triclocarban.



* Condições BA μ E: 15 mL de água ultra pura fortificada com os analitos, pH da amostra de 5, tempo de extração de 90 min e dessorção líquida com 100 μL (50:50, v/v) de ACN:MeOH por 15 min.

Tabela 12 - Ensaios de Recuperação (R%) e precisão (RSD%) utilizando o método de BA μ E em amostras de água da Lagoa do Peri.

Composto	Nível fortificado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Amostra 1			Amostra 2			Amostra 3			Amostra 4			Amostra 5		
		[] _{rec} ($\mu\text{g L}^{-1}$)	R (%)	RSD (%)	[] _{rec} ($\mu\text{g L}^{-1}$)	R (%)	RSD (%)	[] _{rec} ($\mu\text{g L}^{-1}$)	R (%)	RSD (%)	[] _{rec} ($\mu\text{g L}^{-1}$)	R (%)	RSD (%)	[] _{rec} ($\mu\text{g L}^{-1}$)	R (%)	RSD (%)
MP	5,6	7,0	124	9	6,3	112	3,8	6,4	115	1,5	5,5	99	8	4,8	86	6,5
	25	23,9	96	1	16,1	64	18	24,1	96	7	20,8	83	8	21,9	88	10
EP	7	7,1	101	9	7,1	102	16	7,2	102	11	6,7	96	8	8,0	114	6
	25	21,8	87	1	22,8	91	11	22,0	88	6	26,5	106	16	25,4	102	7
BF	1	0,8	81	20	0,9	92	5	1,0	101	17	1,1	106	9	1,1	105	5
	2,5	2,5	99	1	2,2	89	9	1,6	63	7	1,7	67	7	2,2	90	8
TC	0,7	0,7	101	6	0,8	108	10	0,7	99	12	0,8	111	8	0,8	115	3
	1,25	1,2	99	16	1,1	88	7	1,15	92	6	1,0	80	6	1,3	103	9

* Condições BA μ E: 15 mL de água da Lagoa do Peri fortificada com os analitos, pH da amostra de 5, tempo de extração de 90 min e desorção líquida com 100 μ L (50:50, v/v) de ACN:MeOH por 15 min.

6. CONCLUSÃO

Uma metodologia de extração de parabenos, benzofenona e triclocarban em amostras de águas superficiais foi desenvolvida empregando a técnica de BA μ E e o biossorvente terra diatomácea. As barras adsorptivas são fáceis de preparar e possuem uma vida útil longa, aproximadamente 60 extrações, tornando-se uma alternativa simples e de baixo custo para a extração de uma ampla faixa de analitos e posterior análise por HPLC-DAD. Ademais, a proposta inédita deste trabalho de utilização de terra diatomácea proveniente do resíduo da indústria cervejeira apontou uma solução criativa e amigavelmente ecológica para o reaproveitamento deste rejeito, após tratamento térmico, como biossorvente no desenvolvimento de uma ferramenta analítica.

A técnica BA μ E foi otimizada utilizando estratégias univariada e multivariada e apresentou baixos limites de detecção e quantificação e satisfatórios valores de recuperação e precisão, variando entre 63 a 124 % e 1 a 20 %, respectivamente. A BA μ E é uma excelente alternativa para análise de parabenos, benzofenona e triclocarban em águas superficiais, visto que obteve boas respostas utilizando apenas calibração aquosa e sem necessidade de diluição das amostras, o que facilita a aplicação do método em outras matrizes aquosas uma vez em que ele é capaz de extrair os analitos de forma seletiva, sem sofrer influência de efeito de matriz.

A reprodutibilidade na produção das barras apresentou RSD menor que 11 %, indicando que, mesmo sendo preparadas artesanalmente no laboratório de pesquisa, são consideradas robustas. Como alternativa ao elevado tempo de extração demandado, o acoplamento de agitadores em um regulador de tensão permite fazer várias extrações simultaneamente e aumentar a frequência analítica do método. Os valores de RSD encontrados na avaliação da reprodutibilidade dos agitadores foram baixos, menores que 14 % e sugerem que mais agitadores possam ser utilizados neste e nos demais trabalhos do grupo de pesquisa.

REFERÊNCIAS

ABU-ZURAYK, Rund A. et al. Adsorption of Pb(II), Cr(III) and Cr(VI) from aqueous solution by surfactant-modified diatomaceous earth: Equilibrium, kinetic and thermodynamic modeling studies.

International Journal Of Mineral Processing. Amman, p. 79-87. maio 2013.

AHMAD, S.M. Bar adsorptive microextraction (BA μ E) coated with mixed sorbent phases—Enhanced selectivity for the determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in real matrices in combination with capillary electrophoresis. **Journal Of Chromatography B**. Lisboa, p. 115-124. nov. 2015.

AHMAD, S.M. et al.. Application of bar adsorptive microextraction (BA μ E) for anti-doping control screening of anabolic steroids in urine matrices. **Journal of Chromatography B**, v. 969, p. 35–41, 2014.

ALMEIDA, C. et al. Determination of trace levels of benzophenone type ultra-violet filters in real matrices by bar adsorptive microextraction using selective sorbent phases. **Journal of Chromatography A**, v. 1311, p. 1-10, 2013.

ALMEIDA, C. et al. Improvements on bar adsorptive microextraction (BA μ E) technique—Application for the determination of insecticide repellents in environmental water matrices. **Talanta**, v. 120, p. 126–134, 2014.

ALMEIDA, C., NOGUEIRA, J. M. F. Comparison of the selectivity of different sorbent phases for bar adsorptive microextraction - Application to trace level analysis of fungicides in real matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 1265, p. 7– 16, 2012.

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

ANDERSEN, Alan. Final Amended Report on the Safety Assessment of Methylparaben, Ethylparaben, Propylparaben, Isopropylparaben, Butylparaben, Isobutylparaben and Benzylparaben as dudes in Cosmetic Products. **Internacional Journal Of Toxicology**. Washington, p. 1-82. fev. 2008.

ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Registro de produtos cosméticos. **Resolução RDC nº 79**, de 28 de agosto de 2000.

ANVISA/ AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **SÉRIE TEMÁTICA 1**: Guia para Qualidade em Química Analítica. Brasília: Eurachem Nederland, 2005.

AOAC/ Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis**: Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. AOAC Internacional: Maryland, 2012.

ARTHUR, C. L., PAWLISZYN, J. Solid-phase microextraction with thermal-desorption using fused-silica optical fibers. **Analytical Chemistry**, v.62, p. 2145-2148, 1990.

BALTUSSEN, E. et al. Sorptive sample preparation - a review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 373, p. 3-22, 2002.

BALTUSSEN, E. et al. Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE) , a Novel Extraction Technique for Aqueous Samples: Theory and Principles. **Journal of Microcolumn Separations**, v.11, p. 737-747, 1999.

BERTON, Paula et al. 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**. Argentina, p. 24-4, 2016.

BEZERRA, Marcos Almeida et al. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**. Niterói, p. 965-977. maio 2008.

BEZERRA, Marcos de Almeida. **Aplicação de Matriz de Doehlert na otimização de um sistema de pré-concentração em linha para determinação de cobre usando Espectrometria de Absorção Atômica com Chama**. 2003. 95 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2003.

BŁĘDZKA, D., GROMADZIŃSKA, J., WĄSOWICZ, W., 2014. Parabens. From environmental studies to human health. **Environ. Int.** 67, 27–42 (Review).

BOYACĐ, Ezel et al. Sample preparation with solid phase microextraction and exhaustive extraction approaches: Comparison for challenging cases. **Analytica Chimica Acta**. Canada, p. 14-30. jan. 2015.

BRATKOWSKA, D. et al. Development and application of a polar coating for stir bar sorptive extraction of emerging pollutants from environmental water samples. **Analytica Chimica Acta**, v.706, p. 135-142, 2011.

BRUNS, Roy Edward; SCARMINIO, Ieda Spacino; BARROS NETO, Benício de. **Como Fazer experimentos**. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2010. 414 p.

ÇABUK, H. et al. A simple solvent collection technique for a dispersive liquid–liquid microextraction of parabens from aqueous samples using low-density organic solvent. *Journal Separation Science*, v. 35, p. 2645-2652, 2012.

CAMINO-SÁNCHEZ, F. J. et al. Stir bar sorptive extraction: Recent applications, limitations and future trends. **Talanta**, v. 130, p. 388–399, 2014.

CANOSA, P. et al. Determination of Parabens and Triclosan in Indoor Dust Using Matrix Solid-Phase Dispersion and Gas Chromatography with Tandem Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 79, p. 1675 - 1681, 2007.

CAREGHINI, Alessandro et al. Bisphenol A, nonylphenols, benzophenones, and benzotriazoles in soils, groundwater, surface water, sediments, and food: a review. **Environ. Sci. Pollut. Res.**. Milão, p. 5711-5741. jan. 2015.

CHEN, Z-F. et al. Determination of biocides in different environmental matrices by use of ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, v. 404, p. 3175–3188, 2012.

CORNELL, John. Experiments with Mixtures: Designs, Models, and the Analysis of Mixture Data, John Wiley & Sons, Inc. New York, 2002.

DEMIRBAS, A.; Heavy metal adsorption onto agro-based waste materials. A review: *Journal of Hazardous Materials*, 157 (2008) 220-229.

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

DIAS, Adriana Neves. **CORTIÇA: UMA NOVA ABORDAGEM COMO FASE EXTRATORA PARA MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA E MICROEXTRAÇÃO EM BARRA ADSORTIVA**. 2015. 151 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

DODSON, Robin E. et al. Endocrine Disruptors and Asthma-Associated Chemicals in Consumer Products. ***Environmental Health Perspectives***. Belmont, p. 935-943. jul. 2012.

DWECK, Anthony C. Regulations. ***Personal Care***. UK, p. 22-25. set. 2008.

EIRAS, Sebastião de Paula. Um estudo comparativo sobre a eficiência de estratégias quilométricas de otimização. *Química Nova*, Uberlândia, v. 17, n. 3, p.216-219, jan. 1994.

ELDER, R.L., 1984. Final report on the safety assessment of methyl paraben, ethyl paraben, propyl paraben and butyl paraben. *J. Am. Coll. Toxicol.* 3, 147–209.

ENGH, K.R., in: M. Howe-Grant (Ed.), *Kirk–Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, vol. 8, fourth ed., Wiley, New York, 1993, p. 108.

EP, 2008. Regulation (EC) N°. 1333/2008 of 16 December 2008 on Food Additives. European Parliament, p. 17.

EP, 2009. Regulation (EC) N°. 1223/2009 of 30 November 2009 on Cosmetic Products. European Parliament, p.151.

EP, 2014. Regulation (EC) N°. 1004/2014 of 18 September 2014 on Cosmetic Products. European Parliament, p. 4.

FERREIRA, A. M. C. et al. GC-MS determination of parabens, triclosan and methyl triclosan in water by in situ derivatisation and stir- bar sorptive extraction. **Analytica Bioanalytical Chemistry**, v. 399, p. 945-953, 2011.

FERREIRA, Sérgio L. C. et al. Doehlert matrix: a chemometric tool for analytical chemistry - review. **Talanta**. Salvador, p. 1061-1067. jan. 2004.

GILART, N. et al. Novel coatings for stir bar sorptive extraction to determine pharmaceuticals and personal care products in environmental waters by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 774, p. 51-60, 2013.

GIULIVO, Monica et al. Human exposure to endocrine disrupting compounds: Their role in reproductive systems, metabolic syndrome and breast cancer. A review. **Environmental Research**. Piacenza, p. 251-264. jul. 2016.

GONÇALVES, A. F. P. et al. Development of a Powdered Activated Carbon in Bar Adsorptive Micro-Extraction for the Analysis of Morphine and Codeine in Human Urine. **Journal of Chromatographic Science**, v. 50, p. 574-581, 2012.

GONZÁLEZ-MARIÑO, I. et al. Simultaneous determination of parabens, triclosan and triclocarban in water by liquid chromatography/electrospray ionisation tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 23, p. 1756–1766, 2009.

GORGA, M. et al. Multi-residue analytical method for the determination of endocrine disruptors and related compounds in river and waste water using dual column liquid chromatography switching system coupled to mass spectrometry, **Journal of Chromatography A**, 1295, p. 57– 66, 2013.

GOULART, Marcos Roberto et al. Metodologias para reutilização do resíduo de terra diatomácea, proveniente da filtração e clarificação da cerveja. **Química Nova**, Lages, v. 34, n. 4, p.625-629, mar. 2011.

GUIMARÃES, João Roberto Penna de Freitas. **Disruptores endócrinos no meio ambiente: um problema de saúde pública e ocupacional.**

Disponível em:

<http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/trabalhador/pdf/texto_disruptores.pdf>.

Acesso em: 22 ago. 2016.

GUO, L., LEE, H. K. Low-density solvent-based solvent demulsification dispersive liquid–liquid microextraction for the fast determination of trace levels of sixteen priority polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 5040– 5046, 2011.

HALDEN, Rolf U. On the Need and Speed of Regulating Triclosan and Triclocarban in the United States. **Environ. Sci. Technol.** Arizona, p. 3603-3611. mar. 2014.

HEIDLER, J. Partitioning, persistence, and accumulation in digested sludge of the topical antiseptic triclocarban during wastewater treatment. **Environ. Sci. Technol.** v. 40 (11), p. 3634–3639, 2006

IDE, A.H. Enhancement for trace analysis of sulfonamide antibiotics in water matrices using bar adsorptive microextraction (BA μ E). **Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis.** Lisboa, p. 593-599. jul. 2016.

IEH (2005) Chemicals Purported to be Endocrine Disrupters: A compilation of Published Lists (Web Report W20), Leicester, UK, MRC Institute for Environment and Health, available at <http://www.le.ac.uk/ieh/>

IUPAC, INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis. *Pure Appl. Chem.*, v. 74, No. 5, p. 835–855, 2002. Disponível em: < [http://pac.iupac.org/publications/pac/pdf/2002/pdf/7405x0835 .pdf](http://pac.iupac.org/publications/pac/pdf/2002/pdf/7405x0835.pdf)>, Acesso em: 17 de ago. 2016.

- JAIN, R. et al. 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.
- JELÉN, H. H. et al. Microextraction techniques in the analysis of food flavor compounds: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 738, p. 13-26, 2012.
- JIMÉNEZ-DÍAZ, I. et al. Urinary levels of bisphenol A, benzophenones and parabens in Tunisian women: A pilot study. **Science Of The Total Environment**. Granada, p. 81-88. abr. 2016.
- KATSUMATA, Hideyuki et al. Determination of atrazine and simazine in water samples by high-performance liquid chromatography after preconcentration with heat-treated diatomaceous earth. **Analytica Chimica Acta**. Japan, p. 214-219. jun. 2006.
- KIM S, CHOI K. Occurrences, toxicities, and ecological risks of benzophenone-3, a common component of organic sunscreen products: a mini-review. **Environ. Int**, v70, p.143–157, 2014.
- KOTNIK, K. et al. Trace analysis of benzophenone-derived compounds in surface waters and sediments using solid-PAHse extraction and microwave-assisted extraction followed by gas chromatography–mass spectrometry, **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, p. 3179–3190, 2014.
- LI, N. et al. A novel dispersive solid-phase extraction method using metal-organic framework MIL-101 as the adsorbent for the analysis of benzophenones in toner. **Talanta**, v. 132, p. 713–718, 2015.
- LI, Wenhui. Occurrence, fate and risk assessment of parabens and their chlorinated derivatives in an advanced wastewater treatment plant. **Journal Of Hazardous Materials**. Pequim, p. 29-38. jun. 2015.
- LIAO, C., KANNAN, K., 2014. Concentrations and composition profiles of parabens in currency bills and paper products including sanitary wipes. **Sci. Total Environ**. 475, 8–15.

LU, S. *et al.* Determination of parabens in human urine by liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Analytical Methods**, v. 6, p. 5566-5572, 2014.

LUCENA, R. Extraction and stirring integrated techniques: examples and recent advances. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 403, p. 2213–2223, 2012.

MÁRQUEZ-SILLERO, I. *et al.* Determination of parabens in cosmetic products using multi-walled carbon nanotubes as solid phase extraction sorbent and corona-charged aerosol detection system. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 1-6, 2010.

Mello, E. T.; Pawlowsky, U.; *Engenharia Sanitária Ambiental* **2003**, *4*, 249. ^[1]_[SEP]

MERIB, Josias; CARASEK, Eduardo. Membrane-based microextraction techniques in analytical chemistry: A review. **Analytica Chimica Acta**. Florianópolis, p. 8-25. fev. 2015.

MILLER, T. R. *et al.* Fate of Triclosan and Evidence for Reductive Dechlorination of Triclocarban in Estuarine Sediments. **Environmental Science Technology**, v. 42, p. 4570–4576, 2008.

MOLINS-DELGADO, Daniel. Ecological risk assessment associated to the removal of endocrine-disrupting parabens and benzophenone-4 in wastewater treatment. **Journal Of Hazardous Materials**. Barcelona, p. 143-151. fev. 2016.

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=7456, <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=7456> (accessed Aug. 24, 2016).

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=8434, <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=8434> (accessed Aug. 24, 2016).

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=3102, <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=3102> (accessed Aug. 24, 2016).

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=7547, <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=7547>

NEGREIRA, N. et al. Sensitive determination of salicylate and benzophenone type UV filters in water samples using solid-phase microextraction, derivatization and gas chromatography tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 638, p. 36-44, 2009a.

NEGREIRA, N. et al. Solid-phase extraction followed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of hydroxylated benzophenone UV absorbers in environmental water samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 654, p. 162-170, 2009b.

NENG, N. R, NOGUEIRA, J. M. F. Determination of short-chain carbonyl compounds in drinking water matrices by bar adsorptive micro-extraction (BA μ E) with in situ derivatization. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 398, p. 3155-3163, 2010.

NENG, N. R, NOGUEIRA, J. M. F. Development of a bar adsorptive micro-extraction–large-volume injection–gas chromatography–mass spectrometric method for pharmaceuticals and personal care products in environmental water matrices. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 402, p. 1355-1364, 2012.

NENG, N. R. et al. Adsorptive micro-extraction techniques—Novel analytical tools for trace levels of polar solutes in aqueous media. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 7303–7310, 2010.

NENG, N. R. et al. Cork-based activated carbons as supported adsorbent materials for trace level analysis of ibuprofen and clofibric acid in environmental and biological matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 6263– 6270, 2011a.

NENG, N. R. et al. Determination of mitragynine in urine matrices by bar adsorptive microextraction and HPLC analysis. **Talanta**. Lisboa, p. 105-109. maio 2015.

NENG, N. R. et al. Powdered activated carbons as effective phases for bar adsorptive micro-extraction (BA μ E) to monitor levels of triazinic herbicides in environmental water matrices. **Talanta**, v. 83, p. 1643 - 1649, 2011b.

NIETO, A. et al. Determination of personal care products in sewage sludge by pressurized liquid extraction and ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 5619-5625, 2009.

NIST/SEMATECH e-Handbook of Statistical Methods, <http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/>, 2016.

NOGUEIRA, J. M. F. Novel sorption-based methodologies for static microextraction analysis: A review on SBSE and related techniques. **Analytica Chimica Acta**, v. 757, p. 1–10, 2012.

NOGUEIRA, J. M. F.. Microextração adsorptiva em barra (BA μ E): Um conceito analítico inovador para microextração estática. **Scientia Chromatographica**. Lisboa, p. 275-283, 2013.

ORMSBY, Mark. ANALYSIS OF LAMINATED DOCUMENTS USING SOLID-PHASE MICROEXTRACTION. **Journal Of The American Institute For Conservation**. p. 13-26. 2005.

OUYANG, G., PAWLISZYN, J. A critical review in calibration methods for solid-phase microextraction. **Analytica Chimica Acta**, v.627, p. 184–197, 2008.

PARK, Min-ah et al. Benzophenone-1 stimulated the growth of BG-1 ovarian cancer cells by cell cycle regulation via an estrogen receptor alpha-mediated signaling pathway in cellular and xenograft mouse models. **Toxicology**. Chungbuk, p. 41-48. jan. 2013.

PYCKE, Benny F. G. et al. Human Fetal Exposure to Triclosan and Triclocarban in an Urban Population from Brooklyn, New York. **Environ. Sci. Technol.** Arizona, p. 8831-8838. jun. 2014.

QUEIROZ, Maria Eugênia C.. Extração sortiva em barra de agitação (SBSE): Fundamentos teóricos e fases seletivas. **Scientia Chromatographica**. São Paulo, p. 21-29, 2009.

RAMOS, V. A review of organic UV-filters in wastewater treatment plants, **Environ. Int.** 86 (2016) 24–44. 

REGUEIRO, J. Trace analysis of parabens, triclosan and related chlorophenols in water by headspace solid-phase microextraction with in situ derivatization and gas chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 4693-4702, 2009.

SÁNCHEZ-BRUNETE C., Analysis of salicylate and benzophenone-type UV filters in soils and sediments by simultaneous extraction cleanup and gas chromatography–mass spectrometry. **J Chromatogr A**, v. 1218, p. 4291–4298, 2011.

SANCO/12571/2013, EUROPEAN COMMISSION: HEALTH & CONSUMER PROTECTION DIRECTORATE-GENERAL: Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. Belgium, 2013. 44p.

Souza, G. P.; Filgueira, M.; Rosenthal, R.; Holanda, J. N. F.; Caracterização de material compósito diatomáceo natural, **Cerâmica** 2003, 49, 40.

SPIETELUN, Agata et al. Recent developments and future trends in solid phase microextraction techniques towards green analytical chemistry. **Journal Of Chromatography A**. Gdansk, p. 1-13. out. 2013.

TEDX - The Endocrine Disruption Exchange. **TEDX List of Potential Endocrine Disruptors**. Disponível em: <http://endocrinedisruption.org/endocrine-disruption/tedx-list-of-potential-endocrine-disruptors/overview>>. Acesso em: 22 ago. 2016.

TEÓFILO, Reinaldo. T.; FERREIRA, Márcia. M. C. Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, Campinas, v. 29, n. 2, p.338-350, dez. 2006.

UNEP/WHO (2012). State of the science of endocrine disrupting chemicals—2012. Geneva, Switzerland, United Nations Environment Programme/World Health Organization.

ZHANG, P-P. A new device for magnetic stirring-assisted dispersive liquid–liquid microextraction of UV filters in environmental water samples. **Talanta**, v. 83, p. 1711–1715, 2011.

APÊNDICE A – OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO

Tabela A-1: Tabela ANOVA da otimização do solvente de dessorção avaliando os modelos linear e quadrático.

ANOVA; Var.:normalizada (SPREADSHEET solvente dessorção) 3 Factor mixture design; Mixture total=1., 7 Runs Sequential fit of models of increasing complexity										
Model	SS Effect	df Effect	MS Effect	SS Error	df Error	MS Error	F	p	R-Sqr	R-Sqr Adjusted
Linear	1190,247	2	595,1236	429,1898	4	107,2975	5,546484	0,070238	0,734976	0,602464
Quadratic	369,962	3	123,3206	59,2280	1	59,2280	2,082133	0,461871	0,963427	0,780561
Total Adjusted	1619,437	6	269,9062							

Fonte: Elaborado pelo software Statistica 8.0 a partir dos dados coletados pela autora, (2016).

Tabela A-2: Áreas dos picos, média das áreas, desvio padrão e RSD% absolutos e normalizados obtidos na otimização univariada de tempo de dessorção dos analitos.

Tempo de dessorção (min)	Área dos picos e RSD%			
	MP	EP	BF	TC
15.1	21859	27598	389286	
15.2			403583	797910
15.3			416812	
15.4	22604	26436	380114	698041
Média	22232	27017	397449	747976
Desvio padrão	527	822	16121	70618
RSD %	2,37	3,04	4,06	9,44
30.1		33055	387936	
30.2	22856	31415	419479	647025
30.3	20899	33675		594638

Média	21878	32715	403708	620832
Desvio padrão	1384	1168	22304	37043
RSD %	6,33	3,57	5,52	5,97
Área e RSD % normalizados				
	MP	EP	BF	TC
15	100	82,58	98,45	100
RSD₁₅ %	2,37	2,51	3,99	9,44
30	98,41	100,00	100,00	83,00
RSD₃₀ %	6,22	3,57	5,52	4,95

Fonte: Autoria própria (2016).

Tabela A-3: Áreas obtidas no planejamento fatorial completo para os quatro analitos e sua média geométrica utilizada para plotar o gráfico de Pareto.

Ensaio	Fatores				Áreas				Média geométrica
	t (min)	T (°C)	Sal (%)	pH	MP	EP	BF	TC	
1	-1	-1	-1	-1	49158	85783	119545	622127	133077
2	+1	-1	-1	-1	40662	60062	665083	959407	198686
3	-1	+1	-1	-1	39455	62889	857568	1734666	246485
4	+1	+1	-1	-1	30278	51375	766249	4471984	270201
5	-1	-1	+1	-1	25869	63425	470824	320629	125451
6	+1	-1	+1	-1	59989	77480	760559	717162	224390
7	-1	+1	+1	-1	53870	69500	677701	947612	221437
8	+1	+1	+1	-1	36583	55602	625256	3151475	251614
9	-1	-1	-1	+1	126865	360831	1228674	617765	431744
10	+1	-1	-1	+1	104480	359561	2115084	1283664	565127

11	-1	+1	-1	+1	136593	306824	464576	114613	217346
12	+1	+1	-1	+1	247295	673308	1842970	791032	701916
13	-1	-1	+1	+1	35410	84318	212153	273741	114752
14	+1	-1	+1	+1	157493	535929	3294026	1811042	842376
15	-1	+1	+1	+1	121471	326172	1881610	792960	493089
16	+1	+1	+1	+1	269332	879758	4953776	248011	734539
17	0	0	0	0	72548	154737	2084789	978551	389015
18	0	0	0	0	101220	234667	2846369	1571266	570906
19	0	0	0	0	69424	159427	2185967	1625632	445332

Tabela A-4: Tabela ANOVA obtida do gráfico de Pareto.

ANOVA; Var.:Resposta; R-sqr=,82938; Adj:,61612 2**(4-0) design; MS Residual=188687E5 DV: Resposta					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)Tempo (min)	2,037323E+11	1	2,037323E+11	10,79742	0,011089
(2)Temperatura (°C)	1,568913E+10	1	1,568913E+10	0,83149	0,388492
(3)Sal (%)	3,692538E+09	1	3,692538E+09	0,19570	0,669932
(4)pH	3,689190E+11	1	3,689190E+11	19,55199	0,002221
1 by 2	3,771230E+09	1	3,771230E+09	0,19987	0,666683
1 by 3	9,550725E+09	1	9,550725E+09	0,50617	0,497019
1 by 4	1,170643E+11	1	1,170643E+11	6,20418	0,037474
2 by 3	5,126373E+09	1	5,126373E+09	0,27169	0,616319
2 by 4	8,300608E+08	1	8,300608E+08	0,04399	0,839112
3 by 4	5,408766E+09	1	5,408766E+09	0,28665	0,606931
Error	1,509489E+11	8	1,886862E+10		
Total SS	8,847334E+11	18			

Fonte: Elaborado pelo software Statistica 8.0 a partir dos dados coletados pela autora, (2016).

Tabela A-5: Tabela ANOVA gerada pela otimização multivariada de tempo e pH através do planejamento Doehlert.

ANOVA; Var.:Var3; R-sqr=,91854; Adj:,78278 2 factors, 1 Blocks, 9 Runs; MS Residual=123966E4 DV: Var3					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1) tempo (L)	1,728331E+10	1	1,728331E+10	13,94197	0,033485
tempo (Q)	5,043100E+09	1	5,043100E+09	4,06813	0,137058
(2)pH (L)	1,091334E+10	1	1,091334E+10	8,80349	0,059207
pH (Q)	1,743780E+08	1	1,743780E+08	0,14067	0,732566
1L by 2L	8,695003E+09	1	8,695003E+09	7,01402	0,077099
Error	3,718980E+09	3	1,239660E+09		
Total SS	4,565476E+10	8			

Fonte: Elaborado pelo software Statistica 8.0 a partir dos dados coletados pela autora, (2016).

Tabela A-6: Áreas dos picos, média das áreas, desvio padrão e RSD% absolutos e normalizados obtidos na otimização univariada de tempo de extração dos analitos.

Tempo de extração (min)	Área dos picos e RSD%			
	MP	EP	BF	TC
90.1	21533	31667	338869	1012707
90.2	22633	29896	325137	1035545
Média	22083	30781,5	332003	1024126
Desvio padrão	777,8	1252,3	9710,0	16148,9
RSD %	3,5	4,1	2,9	1,6
140.1	23624	30716	329873	1240280
140.2	20872	26931	314562	1111070

Média	22248	28824	322218	1175675
Desvio padrão	1946	2676	10827	91365
RSD %	8,75	9,29	3,36	7,77
180.1	29188	36957	342318	1798140
180.2	20977	27888	315847	1377309
Média	25082,5	32422,5	329082,5	1587724,5
Desvio padrão	5806,1	6412,8	18717,8	297572,5
RSD %	23,1	19,8	5,7	18,7
220.1	26550	31672	346884	1462386
220.2	32485	37653	410128	2267118
Média	29517,5	34662,5	378506	1864752
Desvio padrão	4196,7	4229,2	44720,3	569031,5
RSD %	14,2	12,2	11,8	30,5
Área e RSD % normalizados				
	MP	EP	BF	TC
90	74,8	88,8	87,7	54,9
RSD₉₀ %	2,6	3,6	2,6	0,9
140	75,4	83,2	85,1	63,0
RSD₁₄₀ %	6,6	7,7	2,9	4,9
180	85,0	93,5	86,9	85,1
RSD₁₈₀ %	19,7	18,5	4,9	16,0
220	100,0	100,0	100,0	100,0
RSD₂₂₀ %	14,2	12,2	11,8	30,5

Fonte: Autoria própria, (2016).

Tabela A-7: Áreas dos picos, média das áreas, desvio padrão e RSD% absolutos e normalizados obtidos na avaliação da reprodutibilidade na produção das barras.

Barra	Área dos picos e RSD %			
	MP	EP	BF	TC
Usada	21533	31667	338869	1012707
Usada	21947	26977	261805	1335653
Usada	22633	29896	325137	1035545
Média	22038	29513	308604	1127968
Desvpad	778	1252	9710	16149
RSD %	3,5	4,2	3,1	1,4
A	26104	29204	393159	1366963
A	30210	33763	375947	1188286
Média	28157	31484	384553	1277625
Desvpad	2903	3224	12171	126344
RSD %	10,31	10,24	3,16	9,89
B	23818	33001	462397	1227152
B	26629	37985	446507	1182452
Média	25223,5	35493	454452	1204802
Desvpad	1987,7	3524,2	11235,9	31607,7
RSD %	7,9	9,9	2,5	2,6
Barra	Área e RSD % normalizados			
	MP	EP	BF	TC
Usada	78,3	83,2	67,9	93,6
RSD_U %	2,8	3,5	2,1	1,3
A	100,0	88,7	84,6	100,0
RSD_A %	10,3	9,1	2,7	9,9

B	89,6	100,0	100,0	94,3
RSD_B %	7,1	9,9	2,5	2,5
Avaliando as barras como um conjunto				
	MP	EP	BF	TC
Média	24031	32725	399448	1192680
Desvpad	3271	4838	57237	134913
RSD %	13,6	14,8	14,3	11,3

Fonte: Autoria própria, (2016).

Tabela A-8: Áreas dos picos, média das áreas, desvio padrão e RSD% absolutos e normalizados obtidos na avaliação da reprodutibilidade dos agitadores.

Agitador	Área dos picos e RSD %			
	MP	EP	BF	TC
1	27716	36983	350771	958646
1	25735	33280	350398	872760
1	24642	37016	329849	1094328
Média	26031	35760	343673	975245
Desvpad	1558	2148	11973	111713
RSD %	6,0	6,0	3,5	11,5
2	26222	35398	342445	877599
2	25758	36732	395412	900044
2	Excluído	Excluído	Excluído	Excluído
Média	25990	36065	368929	888822
Desvpad	328	943	37453	15871
RSD %	1,26	2,62	10,15	1,79
3	23296	31072	347734	771975

3	24114	32468	370544	699809
3	19746	27661	307285	993698
Média	22385	30400	341854	821827
Desvpad	2322	2473	32037	153156
RSD %	10,4	8,1	9,4	18,6
Área e RSD % normalizados				
	MP	EP	BF	TC
Agitador 1	100,0	99,2	93,2	100,0
RSD₁ %	6,0	6,0	3,2	11,5
Agitador 2	99,8	100,0	100,0	91,1
RSD₂ %	1,3	2,6	10,2	1,6
Agitador 3	86,0	84,3	92,7	92,5
RSD₃ %	8,9	6,9	8,7	17,2
Avaliando os agitadores como um conjunto				
	MP	EP	BF	TC
Média	24654	33826	349305	896107
Desvpad	2404	3355	26115	123965
RSD %	9,8	9,9	7,5	13,8

Fonte: Autoria própria, (2016).

APÊNDICE B – VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DO MÉTODO

Tabela B- 1: Concentrações dos analitos, áreas dos picos, média das áreas, desvio padrão e RSD% obtidos na curva de calibração do método proposto.

[MP] ppb	Área	[EP] ppb	Área	[BF] ppb	Área	[TC] ppb	Área
2,5	511	2,5	668	0,25	1502	0,125	2541
2,5	661	2,5	788	0,25	1598	0,125	3302
						0,125	2802
media	586	media	728	media	1550	media	2882
desvpad	106	desvpad	85	desvpad	68	desvpad	387
RSD%	18	RSD%	11,7	RSD%	4,4	RSD%	13,4
5	654	5	959	0,5	802	0,25	4246,0
5	707	5	872	0,5	834	0,25	4250
						0,25	4551
media	681	media	915,5	media	818	media	4349
desvpad	37	desvpad	62	desvpad	23	desvpad	175
RSD%	6	RSD%	7	RSD%	3	RSD%	4
10	1004	10	1404	1	1121	1	7503
10	735	10	1283	1	1497	1	6909
10	977	10		1			
media	905	media	1344	media	1309	media	7206
desvpad	148	desvpad	86	desvpad	266	desvpad	420
RSD%	16	RSD%	6	RSD%	20	RSD%	6
25		25	2094	3	2563	1	10680
25	1519	25		3	2326	1	10692
25	1532	25	2236	3		1	10953

media	1526	media	2165	media	2445	media	10775
desvpad	9	desvpad	100	desvpad	168	desvpad	154
RSD%	1	RSD%	5	RSD%	7	RSD%	1
50		50	3768	5	4241	3	15629
50	2473	50		5	4469	3	16838
50	2359	50	3420	5		3	22156
media	2416	media	3594	media	4355	media	18208
desvpad	81	desvpad	246	desvpad	161	desvpad	3472
RSD%	3	RSD%	7	RSD%	4	RSD%	19
75	3847	75	5553	8		4	28316
75	2910	75	4826	8	6372	4	22371
75	3704	75	4549	8	5513	4	29527
media	3487	media	4976	media	5943	media	26738
desvpad	505	desvpad	519	desvpad	607	desvpad	3830
RSD%	14	RSD%	10	RSD%	10	RSD%	14
100	4211	100	6490	10	8043	5	26933
100		100	6547	10		5	43521
100	4603	100	6641	10	7761	5	36009
media	4407	media	6559	media	7902	media	35488
desvpad	277	desvpad	76	desvpad	199	desvpad	8306
RSD%	6	RSD%	1	RSD%	3	RSD%	23

* Condições: 15 mL de água ultra pura fortificada com os analitos, pH = 5 da amostra, tempo de extração de 1,5 h e dessorção líquida com 100 μ L (50:50, v/v) de ACN:MeOH por 15 min.

Tabela B- 2: Concentrações dos analitos, áreas dos picos, média das áreas, desvio padrão e RSD% obtidos na curva de calibração do método proposto.

[MP] ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Área	[EP] ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Área	[BF] ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Área	[TC] ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Área
2,5	586	2,5	728	0,25	-	0,125	2882
5	681	5	915,5	0,5	818	0,25	4349
10	905	10	1343,5	1	1309	0,5	7206
25	1525,5	25	2165	2,5	2444,5	1,25	10775
50	2416	50	3594	5	4355	2,5	18208
75	3487	75	4976	7,5	5942,5	3,75	26738
100	4407	100	6559	10	7902	5	35488

* Condições: 15 mL de água ultra pura fortificada com os analitos, pH da amostra de 5, tempo de extração de 1,5 h e dessorção líquida com 100 μL (50:50, v/v) de ACN:MeOH por 15 min.

Tabela B- 3: Tabela ANOVA gerada pela curva de calibração do MP.

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significância</i>
Regressão	1	13334922,74	13334922,74	9711,989399	2,03964E-09
Residual	5	6865,186006	1373,037201		
Total	6	13341787,93			

Fonte: Elaborado pelo Microsoft Excel a partir dos dados da curva de calibração.

Figura B- 1: Gráfico de resíduos gerado pela curva de calibração do MP.

Fonte: Elaborado pelo Microsoft Excel a partir dos dados da curva de calibração.

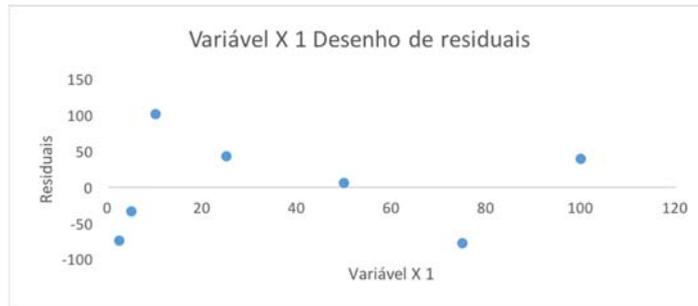
Figura B- 2: Desenho de linha ajustada para a curva de calibração do MP.

Fonte: Elaborado pelo Microsoft Excel a partir dos dados da curva de calibração.

Tabela B- 4: Tabela ANOVA gerada pela curva de calibração do EP.

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significância</i>
Regressão	1	29774387,4	29774387,4	5631,24633	7,96098E-09
Residual	5	26436,7652	5287,35304		
Total	6	29800824,17			

Fonte: Elaborado pelo Microsoft Excel a partir dos dados da curva de calibração.

Figura B- 3:Gráfico de resíduos gerado pela curva de calibração do EP.

Fonte: Elaborado pelo Microsoft Excel a partir dos dados da curva de calibração.

Figura B- 4: Desenho de linha ajustada para a curva de calibração do EP.

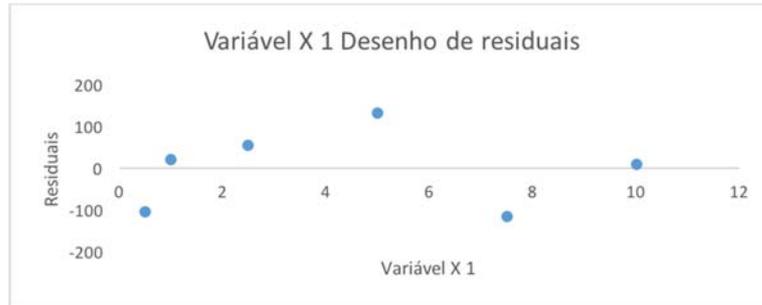
Fonte: Elaborado pelo Microsoft Excel a partir dos dados da curva de calibração.

Tabela B- 5: Tabela ANOVA gerada pela curva de calibração da BF.

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significância</i>
Regressão	1	38614457,8	38614457,8	3438,314994	5,06545E-07
Residual	4	44922,53661	11230,63415		
Total	5	38659380,33			

Fonte: Elaborado pelo Microsoft Excel a partir dos dados da curva de calibração.

Figura B- 5: Gráfico de resíduos gerado pela curva de calibração da BF.



Fonte: Elaborado pelo Microsoft Excel a partir dos dados da curva de calibração.

Figura B- 6: Desenho de linha ajustada para a curva de calibração da BF.



Fonte: Elaborado pelo Microsoft Excel a partir dos dados da curva de calibração.

Tabela B- 6: Tabela ANOVA gerada pela curva de calibração do TC.

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significância</i>
Regressão	1	903960160,3	903960160,3	1680,518688	1,62904E-07
Residual	5	2689527,248	537905,4496		
Total	6	906649687,5			

Fonte: Elaborado pelo Microsoft Excel a partir dos dados da curva de calibração.

Figura B- 7: Gráfico de resíduos gerado pela curva de calibração do TC.

Fonte: Elaborado pelo Microsoft Excel a partir dos dados da curva de calibração.

Figura B- 8: Desenho de linha ajustada para a curva de calibração do TC.



Fonte: Elaborado pelo Microsoft Excel a partir dos dados da curva de calibração.

Tabela B- 7: Áreas dos picos, média das áreas, desvio padrão e RSD% obtidos nos ensaios de recuperação e precisão método proposto com amostras de água da Lagoa do Peri.

	Amostra 1		Amostra 2		Amostra 3		Amostra 4		Amostra 5	
	[] add	área	[] add	área						
MP	5,6	823,0	5,6	733,0	5,6	760,0	5,6	778,0	5,6	
	5,6		5,6	780,0	5,6	741,0	5,6	663,0	5,6	722,0
	5,6	726,0	5,6	730,0	5,6	761,0	5,6	712,0	5,6	659,0
	media	774,5	media	747,7	media	754,0	media	717,7	media	690,5
	desvpad	68,6	desvpad	28,0	desvpad	11,3	desvpad	57,7	desvpad	44,5
	RSD%	8,9	RSD%	3,8	RSD%	1,5	RSD%	8	RSD%	6,5
	25	1450,0	25	987,0	25	1322,0	25	1271,0	25	
	25	1427,0	25		25	1508,0	25	1432,0	25	1264,0
	25		25	1276,0	25	1507,0	25	1247,0	25	1458,0
	media	1438,5	media	1131,5	media	1445,7	media	1316,7	media	1361,0
desvpad	16,3	desvpad	204,4	desvpad	107,1	desvpad	100,6	desvpad	137,2	
RSD%	1	RSD%	18	RSD%	7	RSD%	8	RSD%	10	
EP	7	1102,0	7	1197,0	7	1113,0	7	1048,0	7	1066,0
	7	1149,0	7		7	942,0	7	962,0	7	1121,0
	7	965,0	7	950,0	7	1174,0	7	1140,0	7	1192,0
	media	1072,0	media	1073,5	media	1076,3	media	1050,0	media	1126,3
	desvpad	95,6	desvpad	174,7	desvpad	120,3	desvpad	89,0	desvpad	63,2
	RSD%	9	RSD%	16	RSD%	11	RSD%	8	RSD%	6
	25	1912,0	25	1751,0	25	1863,0	25	1830,0	25	2045,0
	25	1949,0	25	2062,0	25		25	2254,0	25	
	25	1940,0	25	2176,0	25	2031,0	25	2546,0	25	2248,0
	media	1933,7	media	1996,3	media	1947,0	media	2210,0	media	2146,5
desvpad	19,3	desvpad	220,0	desvpad	118,8	desvpad	360,0	desvpad	143,5	
RSD%	1	RSD%	11	RSD%	6	RSD%	16	RSD%	7	

	1		1		1		1		1	1279,0
	1	986,0	1	1187,0	1	1452,0	1	1251	1	
	1	1313,0	1	1277,0	1	1133,0	1	1413,0	1	1372,0
	media	1149,5	media	1232,0	media	1292,5	media	1332,0	media	1325,5
	desvpad	231,2	desvpad	63,6	desvpad	225,6	desvpad	114,6	desvpad	65,8
	RSD%	20	RSD%	5	RSD%	17	RSD%	9	RSD%	5
BF	2,5	2382,0	2,5	2316,0	2,5	1622,0	2,5	1705,0	2,5	1995,0
	2,5		2,5	2047,0	2,5		2,5	1925,0	2,5	2354,0
	2,5	2348,0	2,5		2,5	1780,0	2,5	1698,0	2,5	2248,0
	media	2365,0	media	2181,5	media	1701,0	media	1776,0	media	2199,0
	desvpad	24,0	desvpad	190,2	desvpad	111,7	desvpad	129,1	desvpad	184,4
	RSD%	1	RSD%	9	RSD%	7	RSD%	7	RSD%	8
TC	0,7		0,7	5482,0	0,7		0,7	5178,0	0,7	5440,0
	0,7	4760,0	0,7	5697,0	0,7	5277,0	0,7	5903,0	0,7	5751,0
	0,7	5195,0	0,7	4715,0	0,7	4463,0	0,7	5188,0	0,7	5613,0
	media	4977,5	media	5298,0	media	4870,0	media	5423,0	media	5601,3
	desvpad	307,6	desvpad	516,2	desvpad	575,6	desvpad	415,7	desvpad	155,8
	RSD%	6	RSD%	10	RSD%	12	RSD%	8	RSD%	3
	1,25	9341,0	1,25		1,25	8146,0	1,25	6426,0	1,25	
	1,25		1,25	7157,0	1,25		1,25	7267,0	1,25	9266,0
	1,25	7407,0	1,25	7896,0	1,25	7486,0	1,25	6949,0	1,25	8118,0
	media	8374,0	media	7526,5	media	7816,0	media	6880,7	media	8692,0
	desvpad	1367,5	desvpad	522,6	desvpad	466,7	desvpad	424,6	desvpad	811,8
RSD%	16	RSD%	7	RSD%	6	RSD%	6	RSD%	9	

* Condições: 15 mL de amostra de água da Lagoa do Peri fortificada em dois níveis, pH da amostra de 5, tempo de extração de 1,5 h e dessorção líquida com 100 µL (50:50, v/v) de ACN:MeOH por 15 min.