

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
NICOLAS KIRSCHNER

**TERRA DIATOMÁCEA COMO FASE EXTRATORA NA
MICROEXTRAÇÃO EM FILME FINO (TF - SPME) PARA
DETERMINAÇÃO DE DESREGULADORES ENDÓCRINOS
ATRAVÉS DO SISTEMA 96-WELL PLATE.**

Florianópolis
2017

Nicolas Kirschner

**TERRA DIATOMÁCEA COMO FASE EXTRATORA NA
MICROEXTRAÇÃO EM FILME FINO (TF - SPME) PARA
DETERMINAÇÃO DE DESREGULADORES ENDÓCRINOS
ATRAVÉS DO SISTEMA 96-WELL PLATE.**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Química da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
Mestre em Química
Orientador: Prof. Dr. Eduardo Carasek
da Rocha

Florianópolis
2017

Kirschner, Nicolas
TERRA DIATOMÁCEA COMO FASE EXTRATORA NA
MICROEXTRAÇÃO EM FILME FINO (TF - SPME) PARA
DETERMINAÇÃO DE DESREGULADORES ENDÓCRINOS ATRAVÉS DO
SISTEMA 96-WELL PLATE. / Nicolas Kirschner ;
orientador, Eduardo Carasek da Rocha, 2017.
79 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e
Matemáticas, Programa de Pós-Graduação em Química,
Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Química. 2. Microextração em filme fino. 3.
Terra diatomácea. 4. 96 well-plate. 5.
Desreguladores endócrinos. I. Carasek da Rocha,
Eduardo. II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. III.
Título.

Nicolas Kirschner

**TERRA DIATOMÁCEA COMO FASE EXTRATORA NA
MICROEXTRAÇÃO EM FILME FINO (TF - SPME) PARA
DETERMINAÇÃO DE DESREGULADORES ENDÓCRINOS
ATRAVÉS DO SISTEMA 96-WELL PLATE.**

Esta dissertação foi julgada e aprovada para a obtenção do título de
Mestre em Química no **Programa de Pós-Graduação em Química** da
Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 11 de julho de 2017.

Prof. Dr. Vanderlei Gageiro Machado
Coordenador do Programa

Banca Examinadora

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

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

Prof. Dr. Luciano Vitali
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Dra. Gizelle Cristina Bedendo
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e a minha irmã: Sandra, Rupert e Nicole

Ao Professor Dr. Eduardo Carasek pela oportunidade de ter participado de seu grupo de pesquisa, pelo conhecimento e pela atenção.

Aos meus colegas do laboratório CroMass, especialmente Adriana Neves Dias e Josias Merib.

A Priscilla Machado Marcondes e a minha filha Luísa M. Kirschner.

Aos meus amigos da República Vista Alegre, e a meus conterrâneos de Caçador – SC que lá habitam, Jhonatan do Amaral, Israel Lazzari e Vinícius Santim Menger.

Aos professores e colegas da graduação na Universidade Estadual do Paraná, câmpus União da Vitória.

A Banca Examinadora.

A FAPESC pela bolsa de estudo.

RESUMO

Uma nova abordagem para TF-SPME é apresentada usando terra diatomácea reciclada como fase extratora para a determinação de bisfenol A (BPA), benzofenona (BzP), triclocarban (TCC), 4-metilbenzilideno cânfora (4-MBC) e 2-etilhexil-p-metoxicinamato (EHMC) em amostras de água de rio. Utilizou-se TF-SPME combinado com o sistema de placa de 96 poços, permitindo alta frequência analítica devido à possibilidade de extrações simultâneas de até 96 amostras. A fase sorvente proposta foi caracterizada por espectroscopia de infravermelho e microscopia eletrônica de varredura, e exibiu boa estabilidade em relação aos solventes orgânicos utilizados para análise em cromatografia líquida, bem como desempenho analítico satisfatório. O método otimizado consistiu em 240 minutos de extração, pH 6 com a adição de cloreto de sódio a 15% (m/v), sendo utilizada uma mistura de MeOH:ACN 50:50 (v/v) para dessorção líquida durante 30 minutos. Os limites de detecção encontrados foram de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ para BzP e TCC e $8 \mu\text{g L}^{-1}$ para as demais substâncias utilizadas no estudo, com R^2 variando de 0,9988 para BPA a 0,9926 para 4-MBC. Valores de recuperação em amostras de água de rio ficaram entre 70 a 170, atestando a exatidão da metodologia. Esta nova abordagem surge como uma alternativa muito promissora para a análise de rotina, uma vez que a fase extratora é de baixo custo e fácil acesso, além de o método poder ser totalmente automatizado, permitindo uma análise múltipla e mais precisa.

Palavras-chave: preparo de amostras, contaminantes emergentes, TF-SPME, 96-well plate.

ABSTRACT

A novel approach for TF-SPME is presented by using recycled diatomaceous earth as sorbent phase for the determination of bisphenol A (BPA), benzophenone (BzP), triclocarban (TCC), 4-methylbenzylidene camphor (4-MBC) and 2-ethylhexyl-p-methoxycinnamate (EHMC) from environmental water samples. TFME was used combined with a 96-well plate system allowing for high-throughput analysis due to possibility of simultaneous extractions up to 96 samples. The proposed sorbent phase was characterized by infra-red spectroscopy and scanning electron microscopy, and exhibited good stability toward organic solvents used for liquid chromatography analysis, as well as satisfactory analytical performance. The optimized method consisted of 240 min of extraction at pH 6 with the addition of sodium chloride at 15% (w/v), a mixture of MeOH:ACN 50:50 (v/v) was used for liquid desorption during 30 min. Limits of detection varying from $1 \mu\text{g L}^{-1}$ for BzP and TCC to $8 \mu\text{g L}^{-1}$ for the other substances contained in this study, with R^2 ranged from 0.9988 for BPA to 0.9926 for 4-MBC. Recovery values in river water samples were between 70 and 170, attesting to the accuracy of the methodology. This novel and straightforward approach emerges as very promising alternative for routine analysis, once the sorbent phase is ease to obtain and the procedure can be fully automated allowing for multiple and more accurate analysis.

Keywords: sample preparation; emerging contaminants; TF-SPME, 96-well plate.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Perturbação do sistema endócrino; A) resposta normal, B) substância atuando como mimetizador e aumentando a resposta considerada adequada, C) interferente impedindo a ação dos hormônios..... 25
- Figura 2** - Representação dos três principais modos de utilização da SPME: A) DI - SPME, B) HS - SPME, e C) SPME protegida com membrana..... 29
- Figura 3** - Representação dos processos de absorção e adsorção das substâncias de interesse (pontos escuros) que podem ocorrer em um sorvente na SPME..... 30
- Figura 4** - Configuração utilizada por Bruheim et al (2003). A) Extração em filme fino no modo headspace, B) Membrana após extração, enrolada para a inserção no injetor do cromatógrafo . 1 - suporte, 2 - filme fino, 3 - amostra, 4 - agitador magnético e 5 membrana enrolada..... 33
- Figura 5** - Sistema 96-blade..... 36
- Figura 6** - Esquema do processo de reciclagem através de tratamento térmico da terra diatomácea utilizada na filtração da cerveja..... 37
- Figura 7** - A) Micrografia referente à terra de diatomácea nova; B) micrografia que representa a terra de diatomácea saturada com matéria orgânica; C) micrografia que indica a terra de diatomácea tratada termicamente a 700 °C..... 38
- Figura 8** - Planejamento Doehlert, onde o hexágono pontilhado indica a possibilidade de ampliação do domínio experimental..... 39
- Figura 9** - Superfície triangular utilizada para otimizar mistura de três componentes..... 40
- Figura 10** - Coleta de amostras no porto de São Francisco do Sul..... 45

Figura 11 - Coleta de amostras no rio Itajaí-açu.....	46
Figura 12 - Esquema do recobrimento do suporte com a terra diatomácea.....	47
Figura 13 - Representação de um ciclo de extração/dessorção: A) Pentes encaixados na escova, B) Amostrador automático 96-well plate com a escova, C) Pinos em contato com 1500 μL da amostra dentro dos poços de extração, D) Etapa de dessorção, com 300 μL de solvente.....	47
Figura 14 - Poços escolhidos para análise da reprodutibilidade inter-poços. O experimento foi realizado com condições otimizadas tanto na etapa de extração como na de dessorção. Extração feita com uma mistura dos analitos a 150,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	50
Figura 15 - Imagens obtidas por MEV, com A) 500x, B) 2000x e C) 3000x de ampliação da terra diatomácea.....	53
Figura 16 - Espectro no Infra Vermelho da diatomácea.....	54
Figura 17 - Superfície triângulo para escolha do solvente de dessorção. Neste experimento realizou-se uma extração de 60 min. e uma dessorção de 30 min, através de uma mistura dos analitos numa concentração de 50,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. A superfície resposta foi obtida através da soma das áreas dos picos dos analitos em cada experimento, seguido de normalização.....	55
Figura 18 - Resultados do tempo de dessorção, utilizando 60 min. de extração e uma mistura ACN:MeOH 50:50 (v/v), de para dessorção...	56
Figura 19 - Efeito do pH na etapa de extração. Dessorção realizada sob condições ótimas.....	58
Figura 20 - Superfície Resposta obtida pela matriz Doehlert. Análise do tempo e da % NaCl na etapa de extração. A etapa de dessorção foi realizada sob condições ótimas.....	59
Figura 21 - Comparativo entre pinos com cerca de 20 ciclos realizados, com recém confeccionados. Para este experimento se utilizou quatro pinos novos e quatro usados sob condições ótimas do ciclo.....	61

Figura 22 - Cromatograma obtido por HPLC-DAD com água ultra pura foritificada com $150 \mu\text{g L}^{-1}$ dos analitos A) e em água de rio B). Ordem de eluição: 1) BPA; 2) BzP; 3) TCC; 4) 4-MBC; 5) EHMC..... 66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Diferentes classes de substâncias que alteram o sistema endócrino.....	23
Tabela 2 - Estrutura, log K_{ow} e pKa dos analitos.....	27
Tabela 3 - Recentes trabalhos descritos na literatura que utilizam o conceito TF – SPME.....	34
Tabela 4 - Gradiente de solventes utilizado durante a corrida cromatográfica.....	43
Tabela 5 - Coordenadas UTM dos pontos (P) onde foram realizados a coleta (C) das amostras.....	45
Tabela 6 - Experimentos realizados para escolha do solvente de dessorção através da superfície triângulo.....	48
Tabela 7 - Experimentos realizados para construção da superfície resposta, onde se avaliou o tempo de extração em conjunto com a NaCl %.....	49
Tabela 8 - Presição entre poços. Valores referentes a extrações realizadas em uma concentração de $150,0 \mu\text{g L}^{-1}$, sob condições otimizadas do ciclo de extração/dessorção em sete poços aleatoriamente distribuídos sobre a placa de 96 poços.....	62
Tabela 9 – Parâmetros analíticos de mérito obtidos através de curva analítica em matriz (água de rio).....	63
Tabela 10 - Recuperação relativa em amostra de água de rio.....	65
Tabela 11 - Comparação da TF - SPME 96 well plate com outros métodos de microextração da literatura para a análise de desreguladores endócrinos em amostras aquosas utilizados neste trabalho.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

4-MBC - 4-Metil benzilideno cânfora, do inglês *4-Methylbenzylidene camphor*.

ACN - Acetonitrila

BPA - Bisfenol A, do inglês *Bisphenol A*.

BzP - Benzofenona, do inglês *Benzophenone*.

DAD - Detector por arranjo de diodos, do inglês *Diode Array Detection*.

DI - Imersão direta, do inglês *Direct Imersion*.

DLLME - Microextração líquido-líquido dispersiva, *dispersive liquid-liquid microextraction*.

GC - Cromatografia gasosa, do inglês *Gas Chromatography*.

H₂O U. P. - água ultrapura.

HPA - Hidrocarboneto policíclico aromático.

HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*.

HS - do inglês, *Headspace*.

EHMC - 2-Etilhexil-p-metoxicinamato, do inglês *2-Ethylhexyl-p-methoxycinnamate*.

EDCs – Desreguladores endócrinos, do inglês *Endocrine Disruptor Compounds*.

Ko/w – coeficiente de partição n-octanol/água.

LOD – Limite de detecção, do inglês *Limit of Detection*.

LOQ - Limite de quantificação, do inglês *Limit of Quantitation*.

MeOH - Metanol.

MS – Espectrometria de massa, do inglês *Mass Spectrometry*.

R² - Coeficiente de determinação.

Rec – Recuperação.

RSD – Precisão, do inglês *Relative Standard Deviation*.

RSM – Metodologia de superfície de resposta, do inglês *Response Surface Methodology*.

MEV – Microscopia eletrônica de varredura.

PDMS - Polidimetil siloxano.

SPE – Extração em fase sólida, do inglês *Solid Phase Extraction*.

SPME – Microextração em fase sólida, do inglês *Solid Phase Microextraction*.

TCC – Triclocarban, do inglês *Triclocarban*.

TF-SPME – Microextração em filme fino, do inglês *Thin-Film Microextraction*.

UV – Ultravioleta, do inglês *Ultraviolet*.

SUMÁRIO

1. REVISÃO DA LITERATURA	23
1.1 Desreguladores endócrinos	23
1.2 Preparo de amostras	28
1.3 Microextração em fase sólida	28
1.4 TF - SPME E 96-WELL PLATE	31
1.5 Terra diatomácea como bioissorvente	36
1.6 Otimização Multivariada	38
2. OBJETIVOS	41
2.1 Objetivo Geral.....	41
2.2 Objetivos Específicos	41
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
3.1 Instrumentação e Condições cromatográficas.....	43
3.2 Reagentes, Solventes e Materiais	44
3.3 Amostras.....	44
3.4 Confecção e limpeza dos pentes	46
3.5 Otimizações	47
3.6 Durabilidade dos pentes	50
3.7 Reprodutibilidade entre os poços	50
3.8 Parâmetros Analíticos de mérito	51
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	53
4.1 Caracterização da diatomácea como fase extratora para TF - SPME	53
4.2 Otimizações da etapa de dessorção	55
4.3 Otimizações da etapa de extração	57
4.4 Estabilidade da diatomácea como fase extratora e reprodutibilidade entre os poços	60
4.5 Figuras analíticas de mérito e análise de amostra real.....	62

4.6 Comparação com outras técnicas de microextração.....	66
5. CONCLUSÃO	69
REFERÊNCIAS.....	71

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Desreguladores endócrinos

Os micropoluentes são substâncias encontradas na natureza numa ordem de concentração de $\mu\text{g L}^{-1}$ a ng L^{-1} e tem recebido uma atenção especial nos últimos anos, devido aos efeitos que ocasionam nos seres vivos mesmo em baixas concentrações. Entre essas substâncias, destacam-se certas classes que ocasionam interferências no sistema endócrino dos animais afetando seu ciclo de vida e ocasionando doenças. Tais substâncias, denominadas EDCs – desreguladores endócrinos, do inglês *Endocrine Disruptor Compounds*, abrangem uma vasta gama de compostos naturais e sintéticos, como é apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 - Diferentes classes de substâncias que alteram o sistema endócrino.

Inseticidas	Surfactantes
DDT	Nonilfenol
Organofosfatos	Acetato de nonilfenol
Herbicidas	Plastificantes
Atrazina	Bisfenol A
Fungicidas	Fitoestrogenos
Mancozeb	Cumestrol
Tributilestanho	Genistein
Metais pesados	Produtos químicos industriais
Chumbo	PCB e PDB
Cádmio	Filtros UV
	Fragrâncias almíscar
	Furanos e dioxinas

Fonte: Adaptado de (LOCATELLI; et al, 2016)

Em humanos, conforme dados da literatura, ocasionam o aumento da incidência de câncer, a redução da quantidade de esperma, endometriose, disfunção da tireóide, deformidade dos órgãos reprodutivos e alterações relacionadas ao sistema neurológico. Uma definição de EDC é dada pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS) em parceria com países como os EUA, Japão, Canadá e a União Européia: substância ou composto exógeno que altera uma ou várias funções do sistema endócrino e tem consequentemente efeitos adversos sobre a saúde de um organismo intacto, sua descendência ou sub-populações. (BILLA; DEZZOTI, 2007; GHISELLI; JARDIM, 2007).

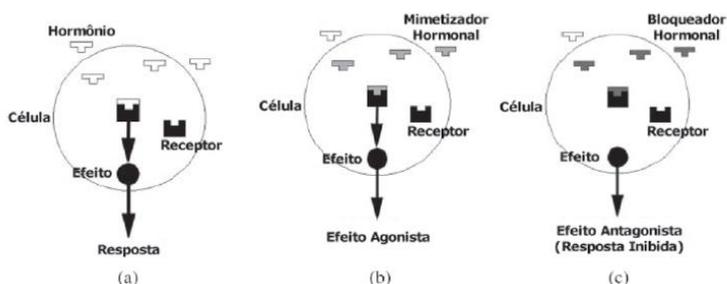
Constituído por um conjunto de glândulas localizadas em diferentes lugares do corpo, o sistema endócrino é responsável pela síntese de hormônios como a tiroxina, os estrogênios e progestagênios, a testosterona e a adrenalina. Os hormônios são compostos químicos que são distribuídos pelo corpo através da corrente sanguínea, e ajudam a controlar diversas funções do organismo, entre elas o desenvolvimento e crescimento, características sexuais, níveis de sais e açúcares e o uso e armazenamento de energia. (GHISELLI; JARDIM, 2007)

Através de processos bioquímicos complexos, os hormônios chegam aos tecidos alvo e em seguida entram nas células e se ligam a receptores específicos. Após esta etapa, formam-se complexos que irão em direção a determinados lugares no DNA contido no núcleo da célula, denominados genes. Este complexo irá atuar na atividade deste gene. O organismo possui mecanismos para controlar os níveis de hormônios no sangue através de processos fisiológicos semelhantes a um “feedback”. Por exemplo, quando ele constata que determinado hormônio está com concentração acima do padrão, ele cessa a síntese e distribuição desta substância pelo corpo. (GHISELLI; JARDIM, 2007)

Determinadas substâncias podem se ligar aos sensíveis receptores hormonais contidos nas células, acarretando perturbações no seu normal funcionamento. Estes interferentes podem atuar como mimetizadores ou bloqueadores, conforme ilustra a Figura 1. Os mimetizadores irão aumentar a resposta provocada pelo hormônio no organismo, pois imitam a sua atuação, sendo este efeito chamado de agonista. Já os bloqueadores, como o próprio nome sugere, irão impedir a formação do complexo entre receptor e hormônio, desta forma impedindo a resposta, este efeito é chamado de antagonista. Vários efeitos no sistema endócrino serão desencadeados após atuação destes interferentes, sendo

que sua total elucidação ainda está sendo pesquisada. (GHISELLI; JARDIM, 2007)

Figura 1 - Perturbação do sistema endócrino; A) resposta normal, B) substância atuando como mimetizador e aumentando a resposta considerada adequada, C) interferente impedindo a ação dos hormônios.



Fonte: Adaptado de (GHISELLI; JARDIM, 2007)

Uma substância muito conhecida por sua atuação como disruptora endócrina é o bisfenol A (BPA), que é um monômero amplamente utilizado na fabricação de policarbonatos, resinas epóxi, como fungicida e retardantes de chama. Vários materiais destinados a conter líquidos e alimentos, tais como louças, garrafas e embalagens em geral, possuem BPA em sua composição. A não completa polimerização e fenômenos de lixiviação destes materiais derivados de BPA, fazem com que esta substância seja liberada para a comida ou bebida que estão em contato com estes materiais, sendo esta a principal forma de contaminação humana por BPA. Devido sua grande utilização na indústria e por fazer parte da composição de diversos utensílios domésticos, esta substância pode estar presente em efluentes industriais e no esgoto doméstico. A absorção pela pele e a inalação de material particulado são outras formas de contaminação por este interferente. Estudos correlacionam elevadas concentrações de BPA e seus derivados em humanos com problemas na reprodução, de comportamento, obesidade, diabetes, doenças do coração, comprometimento das funções do fígado e tireóide. (CABALLERO-CASERO; LUNAR; RUBIO, 2016; GHISELLI; JARDIM, 2007)

Outra classe de substâncias na qual estudos indicam que possuem poder de interferir no sistema endócrino dos animais são os filtros UV,

utilizados há décadas para proteger a pele humana dos efeitos nocivos da radiação ultravioleta proveniente do sol. Estas substâncias possuem um ou mais anéis benzênicos, grupos carbonilas e ligações duplas conjugadas, que são capazes de absorver fótons na região do ultravioleta. (GIOKAS; SALVADOR; CHISVERT, 2007)

Substâncias como a benzofenona (BzP), 4-metil benzilideno cânfora (4-MBC) e o etilhexil metoxicinamato (EHMC), são utilizadas como filtros UV em produtos cosméticos e chegam aos corpos de água de diferentes formas: através de banhistas em lugares destinados a recreação, efluente industrial e esgoto doméstico. Possuem elevada estabilidade, o que é uma característica inconveniente para um contaminante, pois tendem a ficar longos períodos no meio ambiente. (EKPEGHERE; et al, 2016)

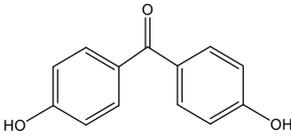
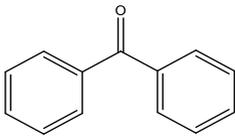
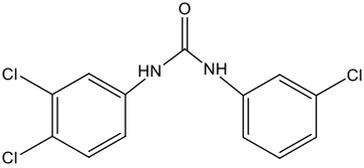
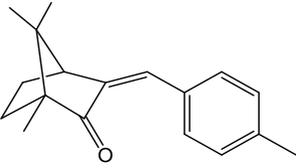
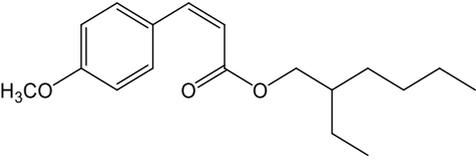
O triclocarban é um antimicrobiano utilizado em sabões, shampoos, pasta de dentes e cremes em geral. Pesquisas até o momento indicam que esta substância prejudica a reprodução de ratos e sua degradação no ambiente aquático gera espécies químicas cancerígenas. Junto com o triclosan, substância similar que tem o mesmo propósito, são contaminantes orgânicos frequentemente detectados em rios e lagos. (GUO; et al, 2009)

Quantificar e identificar os EDCs é uma tarefa que requer muita pesquisa, pois a cada ano a lista destas substâncias só aumenta. A matriz onde estes contaminantes se encontram também tornam sua determinação um desafio, pois são encontrados em matrizes complexas como amostras aquosas superficiais e subterrâneas e efluentes diversos. Metodologias destinadas para a análise de EDCs necessitam possuir elevada sensibilidade e seletividade porque a atuação destes compostos no organismo acontece mesmo em concentrações muito baixas. Até o momento, as metodologias que apresentam os melhores resultados são as que utilizam técnicas de separação como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e a cromatografia gasosa (GC), aliadas a detectores sensíveis como o de espectrometria de massas (MS) e o de arranjo de diodos (DAD). (LOCATELLI; et al, 2016)

O desenvolvimento e aperfeiçoamento de técnicas para análise de EDCs aliado a criação de tratamentos que removam estas substâncias dos efluentes é de suma importância para a comunidade científica e órgãos reguladores, uma vez que a utilização destes compostos só tende a crescer, caso contrário o meio ambiente e a população humana ficarão expostos aos efeitos prejudiciais destes compostos. (LOCATELLI; et al, 2016)

A Tabela 2 apresenta as fórmulas estruturais e algumas propriedades das substâncias utilizadas neste estudo.

Tabela 2 - Estrutura, log $K_{o/w}$ e pKa dos analitos.

Analito	Fórmula estrutural	Log $K_{o/w}$	pKa
BPA		3,6	9,7
BzP		3,2	-
TCC		4,9	12,7
4-MBC		5,4	-
EHMC		6,0	-

Fonte: O autor (2017)

1.2 Preparo de amostras

O preparo de amostras é etapa fundamental para uma análise química, é onde a amostra passa por um procedimento que a torna compatível com o equipamento analítico a ser utilizado. Esta etapa também visa à eliminação de interferências, chamada de limpeza da amostra, e a concentração dos analitos. (VALENTE, AUGUSTO, 2000).

Este preparo é necessário na maioria das análises onde os analitos se encontram em concentrações traços, na ordem $\mu\text{g L}^{-1}$ e ng L^{-1} , principalmente em matrizes complexas, podendo ocupar cerca de 80 % do tempo de uma análise e gerar erros na quantificação devido a perda de analito ou a contaminação dos equipamentos. O preparo de amostras também é interessante em técnicas cromatográficas, tanto na cromatografia gasosa (GC) como na cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), para se evitar que os interferentes sejam inseridos na coluna cromatográfica juntamente com as substâncias a serem analisadas, reduzindo assim sua vida útil e sendo necessárias mais etapas de limpeza na mesma para análises posteriores. (JARDIM, 2010)

O método de preparo de amostras escolhido para uma análise vai depender das características do analito e da matriz, sendo necessária a otimização dos parâmetros envolvidos. As tendências atuais nas técnicas de preparo de amostras são a miniaturização, simplificação, automatização e a melhor capacidade de extração dos analitos na amostra. (MERIB, CARASEK, 2013)

1.3 Microextração em fase sólida

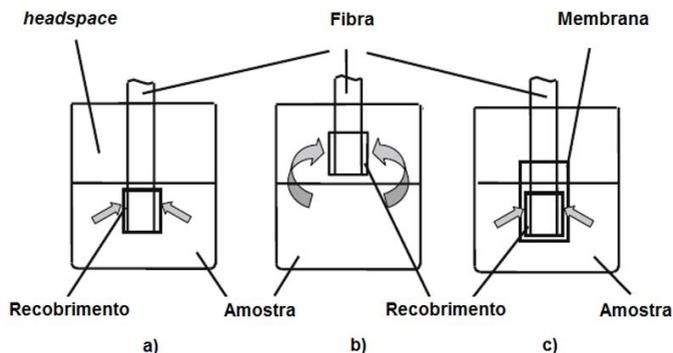
Tendo em vista os problemas ambientais gerados por produtos perigosos utilizados na química analítica, foi criado o conceito GAC (química analítica verde, *green analytical chemistry*) que visa a criação de metodologias ecologicamente corretas, ou seja, mais “verdes”. Vários princípios podem ser utilizados para a redução do impacto ambiental gerado em uma análise química. Destacam-se a redução da quantidade de amostra, automatização e miniaturização dos métodos analíticos, a realização do preparo da amostra dentro do conceito GAC, eliminação do uso de solventes tóxicos, utilização de materiais renováveis, economia de energia e a segurança do analista. (MOHAMED, 2015)

A microextração em fase sólida (SPME) foi desenvolvida por Pawliszyn e Arthur (1990), e é uma técnica de preparo de amostras que objetiva a eliminação do uso de solventes orgânicos, maior simplicidade

e rapidez, sendo, portanto, considerada uma técnica mais “verde”. (JIANG, PAWLISZYN, 2012)

Três principais modos são utilizados para a aplicação da SPME: imersão direta (DI - SPME), headspace (HS - SPME), e fibra de SPME envolvida por membrana, como é ilustrado na Figura 2. Na DI - SPME, a fibra é inserida diretamente na amostra, e a transferência da substância de interesse acontece diretamente da amostra para o recobrimento. No modo HS - SPME a fibra é inserida no espaço confinado logo acima da amostra aquosa, e é indicada para a extração de analitos voláteis ou em amostras que possuem grandes concentrações de interferentes de altas massas moleculares. A extração protegida por membrana é indicada para substâncias não voláteis contidos em amostras com interferentes de altas massas moleculares, tais como proteínas e ácidos húmicos. (PAWLISYN, 2012)

Figura 2 - Representação dos três principais modos de utilização da SPME: A) DI - SPME, B) HS - SPME, e C) SPME protegida com membrana.



Fonte: adaptado de (PAWLISZYN, 2012)

Dependendo da fase extratora, a interação com o analito pode ser de absorção ou de adsorção, conforme ilustra a Figura 3. Para sorventes sólidos é essencial uma elevada área superficial, para proporcionar mais sítios de interação aumentando assim a capacidade de extração. O uso de sólidos tem como vantagem possuir maior seletividade e capacidade de extrair compostos polares. (PAWLISZYN, 2000)

Figura 3 - Representação dos processos de absorção e adsorção das substâncias de interesse (pontos escuros) que podem ocorrer em um sorvente na SPME.



Fonte: Adaptado de (PAWLISZYN, 2000)

Para aumentar a velocidade na qual os analitos migram da amostra para a fase extratora é possível utilizar agitação no sistema, tais como fluxo da amostra, agitação do frasco da amostra, sonicação e movimentação da fibra. Isto é necessário para se reduzir os efeitos da camada limite, uma região que se forma entre a superfície da fase extratora e a amostra, na qual a difusão do analito é menor, criando uma espécie de “barreira” para a transferência da substância alvo. (PAWLISZYN, 2012)

Na SPME geralmente utiliza-se a sílica fundida como suporte para um recobrimento, podendo este ser um polímero ou sólido adsorvente, que serve para extrair os analitos da amostra. Depois da extração das substâncias de interesse é realizada a etapa de dessorção, onde os analitos acabam sendo transferidos para o instrumento analítico para que ocorra sua detecção e quantificação. (LUIZ, 2015)

O processo de extração ocorre num sistema trifásico formado pelo HS, amostra e a fibra utilizada como sorvente. A extração consiste num equilíbrio químico que se dá entre estas três fases. A massa do soluto permanece constante na extração, conforme equação 1

$$C_o V_s = C_f^e V_f + C_h^e V_h + C_s^e V_s \quad (1)$$

Onde:

C_o é concentração total do analito,

C_f^e é a concentração na fibra,

V_f é o volume de fase extratora

C_h^e é a concentração no *headspace*

V_h é o volume do *headspace*

C_s^e é a concentração na amostra.

V_s é o volume da amostra.

A quantidade de soluto (n) extraída pela fibra depende das constantes de equilíbrio, que ocorrem entre as fases do sistema.

$$n = C_f^e V_f \quad (2)$$

$$K_{fh} = \frac{C_f^e}{C_h^e} \quad (3)$$

$$K_{hs} = \frac{C_h^e}{C_s^e} \quad (4)$$

Onde K_{fh} é o equilíbrio entre a fibra e o *headspace* e K_{hs} é o equilíbrio entre o *headspace* e a amostra. Rearranjado as equações pode-se chegar numa expressão que fornece o número de mols de analito extraído depois de atingido o equilíbrio num processo de extração.

$$n = \frac{K_{fh} K_{hs} V_f V_s C_o}{K_{fh} K_{hs} V_f + K_{hs} V_h + V_s} \quad (5)$$

Onde se percebe que a concentração da substância de interesse é diretamente proporcional a quantidade de matéria extraída, sendo portando viável a análise quantitativa por SPME. (QUEIROZ, 2009)

1.4 TF - SPME E 96-WELL PLATE

A SPME possui algumas limitações. Certas substâncias tem fortes interações com a fase extratora e requerem altas temperaturas para serem desorvidas completamente no injetor. Este problema ocorre principalmente com compostos polares, e pode levar a deterioração precoce do material utilizado como sorvente. Outra limitação da SPME convencional é a pequena quantidade de fase extratora que pode ser

utilizada para recobrir o suporte, que naturalmente possui pequeno diâmetro. (JIANG; PAWLISZYN, 2012)

A TF-SPME (microextração em filme fino, *thin film microextraction*) busca a superação destas limitações da SPME, criando geometrias onde é possível colocar maior quantidade de fase extratora no *headspace* ou dentro da amostra, através de filmes com pequena espessura e que possuem grande área superficial. (JIANG, PAWLISZYN, 2012)

Esta técnica se fundamenta na teoria cinética da extração, como é mostrado na equação a seguir:

$$t_{95\%} = 3 \frac{\delta K_{es}(b-a)}{D} \quad (7)$$

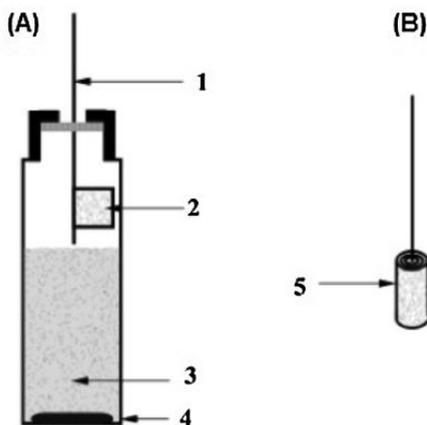
Onde K_{es} é o coeficiente de partição, $t_{95\%}$ é o tempo de extração, $b - a$ é a espessura da fase extratora, D é coeficiente de difusão e δ é a espessura da camada limite. Pequenas espessuras no filme utilizado como fase de extração levam a um menor tempo para que ocorra o equilíbrio entre as fases. Maiores áreas superficiais possibilitam também uma maior taxa de transferência de analito para o sorvente, sem sacrificar assim o tempo de extração, de acordo com a equação. (JIANG; PAWLISZYN, 2012).

$$\frac{dn}{dt} = \left(\frac{DA}{\delta}\right) C_s \quad (8)$$

Onde dn/dt é a taxa de extração, DA é a área superficial da fase extratora e C_s é a concentração do analito na amostra.

Bruheim et al (2003), utilizaram esta nova abordagem para a determinação de HPAs (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos), utilizando um filme fino de PDMS (polidimetilsiloxano) na amostra, fazendo experimentos tanto no modo DI como no HS, ilustrado na Figura 4. Após ocorrer a extração, o filme foi enrolado no suporte e inserido diretamente no GC – MS. Além dos bons resultados obtidos, foi possível constatar que a utilização do filme fino proporcionou altas taxas de transferência devido a alta área superficial sem comprometer o tempo de extração, comparado a outras técnicas. (CARASEK; MERIB, 2015)

Figura 4 – Configuração utilizada por Bruheim et al (2003). A) Extração em filme fino no modo headspace, B) Membrana após extração, enrolada para a inserção no injetor do cromatógrafo . 1 – suporte, 2 – filme fino, 3 – amostra, 4 – agitador magnético e 5 membrana enrolada.



Fonte: adaptado de (CARASEK; MERIB, 2015)

Após o trabalho de Bruheim et al (2003), onde foi demonstrado que é possível utilizar geometrias diferentes da SPME convencional, atingindo maiores sensibilidades sem sacrificar o tempo da análise, uma grande variedade de geometrias e aplicações para a TF – SPME foram desenvolvidas, como é listado na Tabela 3. (PIRI-MOGHADAM; ALAM; PAWLISZYN, 2017)

Tabela 3 - Recentes trabalhos descritos na literatura que utilizam o conceito TF – SPME.

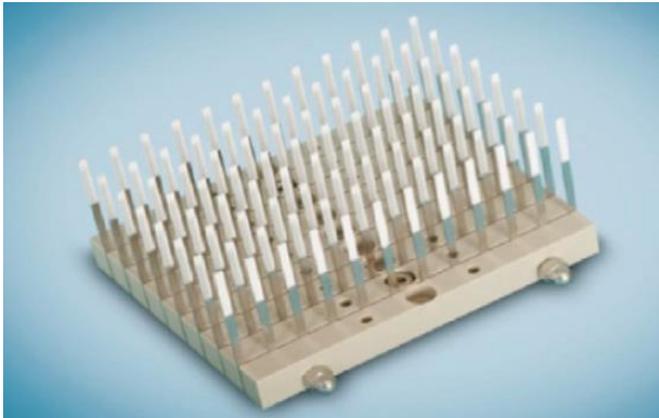
Analitos	Matriz	Referência
Resíduos Farmacêuticos - Carbamazepina, fluoxetina, sertralina e paroxetina	Água Tratada	(TOGUNDE; et al, 2012)
Benzodiazepinas - Diazepam, lorazepam, oxazepam, nordiazepam e diazepam-d5	Plasma humano	(MIRNAGHI; et al, 2012)
Aminoácidos	Polpa de uva	(MOUSAVI; PAWLISZYN, 2013)
Compostos fenólicos – 2-nitrofenol, 2,4- diclorofenol e 2,4,6- triclorofenol	Água de rio	(KUESENG; PAWLISZYN, 2013)
Carboidratos	Hidrólise ácida de polímeros de carboiratos	(RÜHMANN; SCHMID; SIEBER, 2014)
Aldeídos – Butanal, pentanal, hexanal, heptanal e nonanal.	Condensados de expiração humana	(HUANG, et al, 2015)
Ácidos benzóicos fluorados	Água de mar	(BOYACđ et al., 2016)
Pesticidas	Água de rio	(PIRI-MOGHADAM; et al, 2017)

Filtros UV e Biocidas	Sedimentos	(AHMADI; SPARHAM; PAWLISZYN, 2017)
Aldeídos - Butanal, pentanal, hexanal, heptanal, octanal e nonanal.	Urina	(LIU; XU, 2017)

Fonte: O autor (2017)

Uma das mais recentes abordagens da SPME e suas técnicas derivadas, como a TF – SPME, para a aplicação em HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência) é sua associação com o sistema 96-well plate (placa de 96 poços). Nesta metodologia o preparo de amostras é automatizado e possibilita o preparo simultâneo de até 96 amostras. A automatização de métodos analíticos promove uma série de vantagens, tais como: a redução do tempo da análise, tanto para a análise de rotina como para o desenvolvimento de novos métodos, maior frequência analítica e reprodutibilidade (JIANG; PAWLISZYN, 2012)

A primeira utilização deste sistema para preparo de amostras foi realizado por Pawliszyn e Cudjoe (2009), onde os autores fixaram recortes de fase extratora originalmente confeccionada para SPE (extração em fase sólida, *solid phase extraction*) em pinos de aço, para determinação de benzodiazepinas em sangue. Após aperfeiçoar a estabilidade e a reprodutibilidade do sistema, foram desenvolvidas diferentes formas de recobrimento e novas geometrias, chegando-se ao 96-blade TF - SPME, Figura 5, denominação dada pelos autores. Nesta configuração pequenas lâminas são recobertas com o material sorvente, o que possibilitou maior área de contato da fase extratora com a amostra, mais facilidade na agitação do sistema e estabilidade do mesmo, desta forma foi duplicado a taxa de extração, comparando aos métodos iniciais. (JIANG; PAWLISZYN, 2012)

Figura 5 - Sistema 96-blade.

Fonte: Adaptado de (JIANG; PAWLISZYN, 2012)

1.5 Terra diatomácea como biossorvente

A busca por materiais que ofereçam elevadas capacidades de adsorção/absorção na etapa de extração é um campo promissor em técnicas de microextração. A caracterização e o desenvolvimento de novos sorventes abrange uma vasta gama de áreas da ciência e tecnologia. Características como estabilidade química e térmica para uma elevada vida útil, morfologia que proporcione uma elevada taxa de transferência de massa para uma melhor sensibilidade e detectabilidade da análise e seletividade na extração dos analitos são desejadas para uma nova fase extratora. Destaca-se a utilização de CNT (nanotubos de carbono, *carbon nanotubes*), MIPs (polímeros molecularmente impressos, *molecularly imprinted polymers*), recobrimentos baseados em Sol-gel para SPME, e IL (líquidos iônicos, *ionic liquids*) para extração em DLLME (microextração líquido-líquido dispersiva, *dispersive liquid-liquid microextraction*) como novas classes de sorventes. (AUGUSTO; et al, 2009; YU; MERIB; ANDERSON, 2016)

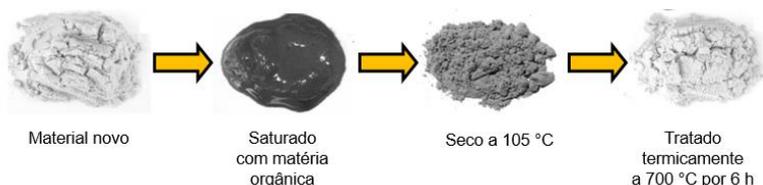
A terra diatomácea é um sedimento amorfo que é gerado pela sedimentação das carapaças ou paredes celulares de organismos unicelulares vegetais, tais como algas microscópicas aquáticas, tanto em mares como em lagos após a decomposição destes seres. É um material particulado, que possui coloração que vai do branco ao cinza, e a principal substância constituinte é a sílica opalina, mas também se

encontram em sua composição vestígios de minerais secundários, como argilominerais, areias quartzosas, gipsita, mica, calcita, feldspato e carbonatos de cálcio e magnésio, com a presença de traços de matéria orgânica. A capacidade sorvente da diatomácea se deve a sua estrutura microscópica com alta porosidade e área superficial específica. (DOTTO; et al, 2011; GOURLAT, et al, 2011)

A presença de grupos silanóis (Si – OH) na superfície da sílica é conhecida desde 1936, e sua concentração estimada atualmente é de 5,0 OH/nm². Estes grupos atuam como ácido de Brønsted e podem adsorver diferentes espécies químicas, como amidas, proteínas, álcoois e fosfatos biologicamente ativos. O hidrogênio contido no grupo silanol permite ligações de hidrogênio com átomos de elementos eletronegativos e elétrons π de moléculas orgânicas, possibilitando a adsorção de compostos orgânicos pela sílica. (AIROLDI; FARIAS, 2000; SANTOS JÚNIOR, 1985)

A terra diatomácea é empregada pela indústria cervejeira para filtração e clarificação de seu produto. Uma indústria pode gerar toneladas por mês deste material, que após sua aplicação fica saturado com matéria orgânica. Goulart et al (2011) desenvolveram uma metodologia capaz de reciclar este material e devolver suas propriedades sorventes, como mostra Figura 6, tornando possível sua reutilização e diminuindo a quantidade de resíduo gerado durante o processo de fabricação da cerveja. O tratamento térmico desobstrui os poros do material e elimina a matéria orgânica anteriormente retida na superfície da terra diatomácea, Figura 7. Seu baixo custo aliado à alta disponibilidade tornam este sorvente passível de aplicação na purificação de água e remoção de corantes orgânicos presentes em efluentes industriais. (DOTTO; et al, 2011; GOURLAT; et al, 2011)

Figura 6 - Esquema do processo de reciclagem através de tratamento térmico da terra diatomácea utilizada na filtração da cerveja.



Fonte: Adaptado de (GOULART; et al, 2011).

Figura 7 - A) Micrografia referente à terra de diatomácea nova; B) micrografia que representa a terra de diatomácea saturada com matéria orgânica; C) micrografia que indica a terra de diatomácea tratada termicamente a 700 °C.



Fonte: Adaptado de (GOULART; et al, 2011).

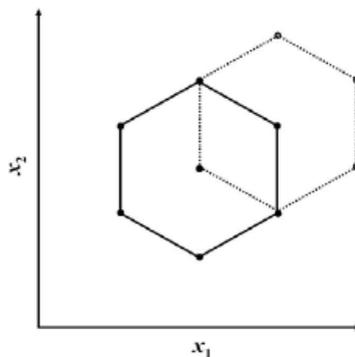
1.6 Otimização Multivariada

Em química analítica, a otimização refere-se a um meio para se alcançar a melhor resposta em um procedimento experimental. Tradicionalmente é escolhido uma variável para ser estudada, mantendo-se constante as outras envolvidas, este método é denominado de otimização univariada e possui como principal desvantagem não avaliar as possíveis interações que as diferentes variáveis envolvidas no processo possuem entre si. Desta forma pode-se não chegar ao real conhecimento do efeito desta variável em um experimento. As técnicas estatísticas multivariadas surgiram para melhor avaliar os efeitos que diferentes variáveis possuem entre si, de forma que sejam necessários menos experimentos para se otimizar estes parâmetros em comparação com a metodologia univariada. Entre estas técnicas destaca-se a metodologia de superfície de resposta, onde é utilizado funções estatísticas para se chegar a uma equação polinomial. (BEZERRA; et al, 2008)

As etapas do preparo da amostra de uma análise cromatográfica, junto com a separação dos compostos, podem ser otimizadas utilizando-se técnicas estatísticas multivariadas. Estes métodos de otimização requerem um valor mínimo e um máximo dos fatores estudados, denominados níveis, que vão estabelecer o domínio experimental da otimização (FERREIRA; et al, 2007)

A matriz Doehlert é um artifício muito eficaz para otimização de duas variáveis em conjunto, onde a equação polinomial é gerada através de níveis que se situam nos vértices de um hexágono na matriz, tendo a possibilidade de ampliação do domínio experimental, como é mostrado na Figura 8. (TEÓFILO; FERREIRA, 2006)

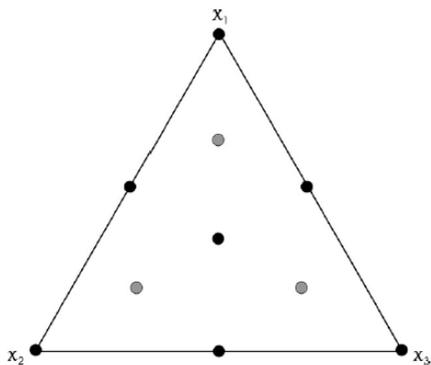
Figura 8 - Planejamento Doehlert, onde o hexágono pontilhado indica a possibilidade de ampliação do domínio experimental.



Fonte: Adaptado de (TEÓFILO; FERREIRA, 2006)

Para otimizar misturas de três componentes, pode-se utilizar um design como é mostrado na Figura 9, para se obter a superfície resposta, onde cada vértice do triângulo representa um ponto onde a proporção do componente em questão relacionado aos outros dois é de 1:0:0. No ponto que se situa no meio de dois vértices a proporção é de 1:1:0, para os fatores que se situam nestes pontos. E no ponto central a relação entre os três componentes que formam a mistura é de 1:1:1.

Figura – 9. Superfície triangular utilizada para otimizar mistura de três componentes.



Fonte: Adaptado de (FERREIRA; et al, 2007)

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolvimento de método analítico para determinação de desreguladores endócrinos em amostras aquosas com separação/detecção por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (HPLC - DAD) utilizando terra diatomácea reciclada como fase extratora da técnica de microextração em filme fino (TF - SPME) no preparo de amostras associado ao sistema 96-well plate.

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar através de MEV e IF a terra diatomácea utilizada neste trabalho para reconhecer os mecanismos de interação dos analitos com este sorvente na etapa de extração
- Produzir pinos recobertos com terra diatomácea reciclada para a TF-SPME e avaliar sua estabilidade
- Otimizar fatores envolvidos na etapa de extração: pH da amostra, concentração de sal e tempo, e na etapa de dessorção: solvente e tempo
- Determinar os parâmetros analíticos de mérito do método utilizando amostras de água de rio.
- Analisar amostras de água de rio

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Instrumentação e Condições cromatográficas

Um cromatógrafo líquido da Shimadzu LC-20AT (Kyoto, Japão) com detector por arranjo de diodos, modelo SPD M20A, foram utilizados para a separação/deteção.

Um injetor Rheodyne modelo 7725i contendo 20 μL de loop (Rohnert Park, CA, EUA) e uma coluna C18 Eclipse XDB (250 mm x 4,6 mm i.d., 5 μm de espessura de filme) obtida da Agilent Technologies (Santa Clara, CA, EUA). Fluxo de 1 mL min^{-1} , com eluição em gradiente iniciando com uma mistura de ACN:H₂O 50:50 (v/v), mantido por 4 min. A seguir a proporção dos solventes passa para ACN:H₂O 90:10 (v/v) até 18 min., retomando a proporção ACN:H₂O 50:50 (v/v) até o final da corrida, ou seja, mais três minutos, conforme apresentada a Tabela 4. O método utilizado para a separação das substâncias foi baseado a partir da metodologia desenvolvida por Raimundo (2007).

Tabela 4 - Gradiente de solventes utilizado durante a corrida cromatográfica.

Tempo (min)	H ₂ O %	ACN %
0,0	50	50
4,0	10	90
18,0	50	50
22,0	50	50

Fonte: O autor (2017)

Os analitos bisfenol A (BPA), 3-(4-metilbenzilideno) cânfora (4-MBC), 2-etilhexil-p-metoxicinamato (EHMC), benzofenona (BzP) e triclorocarban (TCC) foram monitorados em 226- 298- 307- 255- 265 nm, respectivamente.

Para caracterização da fase extratora foi utilizado um espectrômetro Varian 3100 (Santa Clara, CA, EUA), para a espectroscopia no infravermelho (IR), e um microscópio Hitachi 3030 (Tóquio, Japão) para obtenção da microscopia eletrônica de varredura.

Para obtenção das superfícies resposta obtidas através de otimização multivariada, foi utilizado o software Statistica 8.0 (STATSOFT, EUA). Na construção dos gráficos de barras e da curva analítica utilizou-se o software Microsoft Excel 2016.

3.2 Reagentes, Solventes e Materiais

Os analitos BPA, 4-MBC, EHMC, BzP e TCC foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Acetonitrila e metanol também foram adquiridos da Sigma-Aldrich com purezas iguais ou superiores a 99%, cloreto de sódio foi obtido a partir de Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Água ultrapura foi obtida a partir de um sistema Mega Purity (Billerica, MA, EUA). Hidróxido de sódio e ácido hidrocloreídrico foram adquiridos da Vetec. O sistema 96-well plate de preparo de amostras utilizado tem como fabricante Brüder Mannesmann Werkzeuge (Remscheid, Alemanha).

A terra diatomácea reciclada, utilizada neste trabalho, foi preparada de seguindo a metodologia de Goulart et al. (2011). Inicialmente, utilizou-se o material para filtração de cerveja em escala industrial, após este procedimento a diatomácea foi submetida a um tratamento térmico a 700 °C por 6 h para eliminar o conteúdo orgânico e obter a fase extratora reciclada para este estudo.

3.3 Amostras

As amostras foram coletadas em cinco pontos diferentes no rio Itajaí-açu, entre os municípios de Itajaí e Navegantes – SC. Também foi coletado cinco amostras de água, em diferentes pontos, no porto de São Francisco do Sul – SC. Os pontos da coleta assim como suas coordenadas geográficas são apresentados nas Figuras 10 e 11, e na Tabela 5. As amostras foram armazenadas em frascos de 1 L, devidamente selados, e mantidos sob temperatura de 4 °C até a sua análise.

Tabela 5 - Coordenadas UTM dos pontos (P) onde foram realizadas a coleta (C) das amostras.

	São Francisco – SC (C1)	Itajaí – SC (C2)
P1	22J 735924 7095573	22J 732584 7023584
P2	22J 736970 7094942	22J 734692 7021014
P3	22J 736032 7095538	22J 731361 7024578
P4	22J 736209 7095292	22J 731723 7023561
P5	22J 736446 7097179	22J 732147 7022550

Fonte: O autor (2017)

Figura 10 - Coleta de amostras no porto de São Francisco do Sul.



Fonte: O autor (2017)

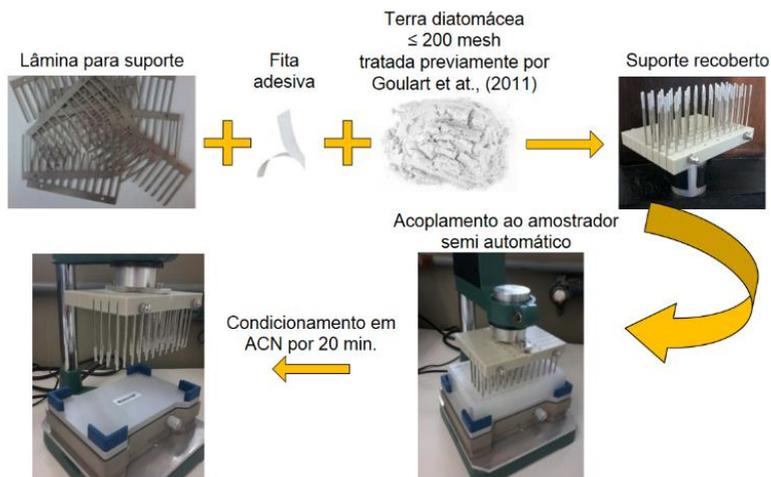
Figura 11 - Coleta de amostras no rio Itajaí-açu.

Fonte: O autor (2017)

3.4 Confeção e limpeza dos pentes

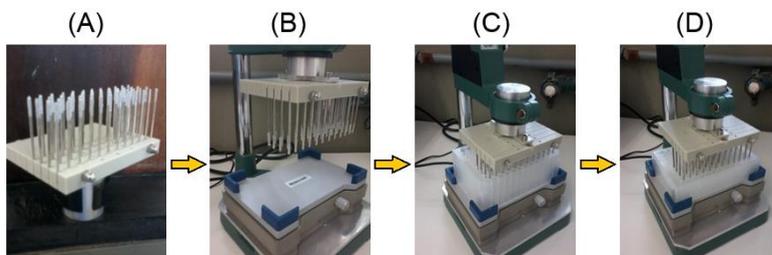
Os pentes, conjunto de doze pinos utilizados como suporte, foram recobertos com a terra diatomácea através de uma fita adesiva comercial com aderência nas duas faces. Cada pino ficou com 1 cm de recobrimento, a partir da extremidade inferior. Para o condicionamento e remoção do excesso de material foi deixado o pente 20 min no poço de dessorção sob agitação com ACN, seguido de passagem de H₂O U. P. (água ultra pura) com uma pisseta nos pinos. Um esquema do processo de confecção do sistema de extração é ilustrada pela Figura 12. Após um ciclo de extração/dessorção, apresentado na Figura 13, é necessária uma limpeza do pente para uma análise posterior, visando evitar o efeito memória. Este procedimento foi realizado com a mesma solução otimizada de dessorção, através de 300 µL em cada poço e sob agitação orbital por 20 min, seguido de passagem de H₂O U. P. pelos pinos do pente.

Figura 12 - Esquema do recobrimento do suporte com a terra diatomácea.



Fonte: O autor (2017)

Figura 13 - Representação de um ciclo de extração/dessorção: A) Pentes encaixados na escova, B) Amostrador automático 96-well plate com a escova, C) Pinos em contato com 1500 μ L da amostra dentro dos poços de extração, D) Etapa de dessorção, com 300 μ L de solvente.



Fonte: O autor (2017)

3.5 Otimizações

Todas as otimizações foram realizadas com uma mistura dos analitos numa concentração de 50,0 μ g L⁻¹ sob intensidade constante de

agitação orbital da placa. Os experimentos a seguir seguem a ordem no qual foram realizados.

1) Etapa de dessorção

O solvente de dessorção foi avaliado com uma otimização multivariada, através da superfície triangular. Os solventes usados foram ACN, MeOH e H₂O U. P., a Tabela 6 traz os experimentos realizados para esta otimização assim como os volumes usados para fazer as misturas dos solventes antes de colocar na placa de poços.

Tabela 6 - Experimentos realizados para escolha do solvente de dessorção através da superfície triângulo.

Experimento	H ₂ O		MeOH		ACN	
	(v/v)	V (μL)	(v/v)	V (μL)	(v/v)	V (μL)
1	1,0	300	0,0	0	0,0	0
2	0,0	0	1,0	300	0,0	0
3	0,0	0	0,0	0	1,0	300
4	0,5	250	0,5	250	0,0	0
5	0,5	250	0,0	0	0,5	250
6	0,0	0	0,5	250	0,5	250
7	0,667	333	0,167	64	0,167	84
8	0,167	84	0,667	333	0,167	84
9	0,167	84	0,167	64	0,667	333
10 (P. C.)	0,333	400	0,333	400	0,333	400
11(P. C.)	0,333	“	0,333	“	0,333	“
12(P. C.)	0,333	“	0,333	“	0,333	“

Fonte: O autor (2017)

O P. C. (ponto central), foi realizado em triplicata para obtenção do coeficiente de correlação gerado pelo software. Nesta otimização foi feito uma extração de 60 min e uma dessorção de 30 min.

Já utilizando o solvente que proporcionou melhor dessorção dos analitos foi otimizado na sequência o fator tempo, avaliando os níveis de 10, 20 e 30 min, através do uso de gráfico de barras e com a média da área dos picos cromatográficos em cada nível, feito em triplicata ($n = 3$).

2) Etapa de extração

Três níveis de pH foram avaliados: 4, 5 e 6, com $n = 3$. Para o ajuste do pH foi utilizado solução tampão de ácido acético (H_3CCOOH) e acetato de sódio ($H_3CCOONa$) e pHmetro. Através de gráficos de barras se obteve o valor de pH no qual se gerava uma melhor média da área dos picos para cada analito.

Para otimização do tempo e do efeito salino na extração foi utilizada uma matriz Dohler. Onde o tempo foi avaliado em cinco níveis, entre 60 -240 min e o domínio de NaCl % ficou entre 0 – 15 %. Foi realizada a triplicata do P. C., em 7,5 de NaCl % e 150 min, para obtenção do R^2 (coeficiente de determinação) da função, conforme apresentado na Tabela 7.

Tabela 7 - Experimentos realizados para construção da superfície resposta, onde se avaliou o tempo de extração em conjunto com a NaCl %.

Experimento	Tempo (min.)	NaCl %.
1	60	7,5
2	105	0
3	105	15,0
4	195	0
5	195	15,0
6	240	7,5
7 (P. C.)	150	7,5
8 (P. C.)	150	7,5
9 (P. C.)	150	7,5

Fonte: O autor (2017)

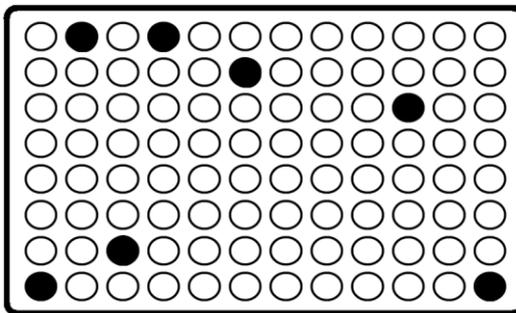
3.6 Durabilidade dos pentes

Após cerca de 20 ciclos, quantidade necessária para otimização do método, foi produzido novos pentes e comparado suas capacidades de extração com os usados a fim de averiguar se houve perda no desempenho da fase extratora, e qual foi a intensidade desta perda. Para tal, foi realizado um comparativo entre quatro pinos novos e quatro pinos usados, utilizando a média da área dos picos para cada analito através de um gráfico de barras.

3.7 Reprodutibilidade entre os poços

Para avaliar a repetibilidade dos poços foi realizado extrações em sete poços aleatoriamente distribuídos na placa. As extrações foram realizadas com os fatores otimizados, tanto na etapa de extração como na de dessorção. Uma mistura dos analitos numa concentração de $150,0 \mu\text{g L}^{-1}$ foi utilizada para este estudo, avaliando os valores de RSD para cada substância presente no trabalho. A Figura 14 demonstra os poços selecionados dentre os 96.

Figura 14 - Poços escolhidos para análise da reprodutibilidade inter-poços. O experimento foi realizado com condições otimizadas tanto na etapa de extração como na de dessorção. Extração feita com uma mistura dos analitos a $150,0 \mu\text{g L}^{-1}$.



Fonte: O autor (2017)

3.8 Parâmetros Analíticos de mérito

Os parâmetros analíticos de mérito foram determinados utilizando as condições previamente otimizadas. Para este estudo foi realizada a avaliação da faixa linear, limites de detecção (LOD), limites de quantificação (LOQ), coeficiente de determinação (R^2), precisão e exatidão. As curvas analíticas foram realizadas por adição de padrão em amostra de água de rio previamente filtrada com membrana de $0,45 \mu\text{m}$ de diâmetro dos poros.

Seis diferentes pontos foram utilizados: 5,0; 25,0; 50,0; 75,0; 100,0 e $150,0 \mu\text{g L}^{-1}$ para a montagem da curva analítica, e a precisão foi avaliada através do RSD com $n = 4$ nestes pontos, para cada analito.

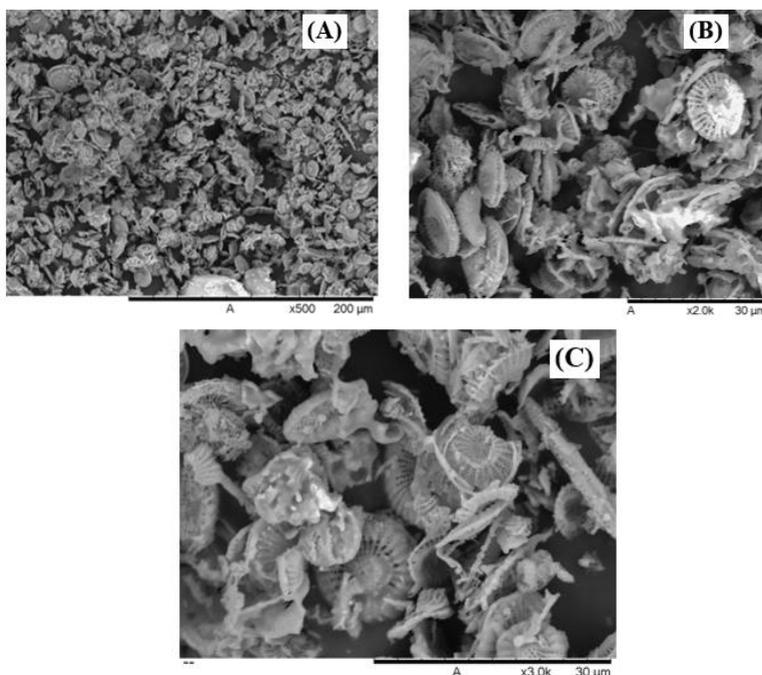
A exatidão do método proposto foi avaliada utilizando a recuperação relativa, através das extrações realizadas com concentrações conhecidas dos analitos adicionados em amostras de água de rio a 5, 25, 50 e $150 \mu\text{g L}^{-1}$ para cada analito. No estudo da exatidão para cada concentração avaliada, foi realizado $n = 4$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Caracterização da diatomácea como fase extratora para TF - SPME

Analisando as imagens obtidas pela MEV (microscopia eletrônica de varredura) da diatomácea utilizada no estudo, através da Figura 15, observam-se as carapaças dos microrganismos. Constatando ser um material extremamente poroso e com alta área superficial. Estas características são interessantes em fases extratoras sólidas utilizadas em microextração, pois geram grande possibilidade de adsorção dos analitos pelo sorvente, aumentando a taxa de transferência do analito para a fase extratora, assim como a cinética da extração.

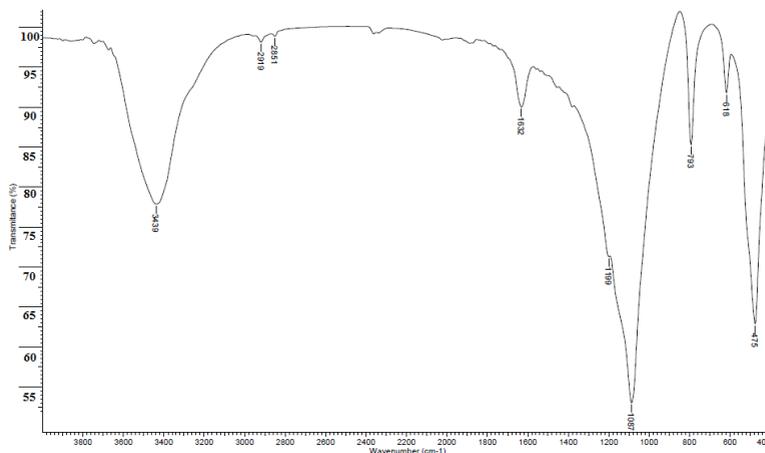
Figura 15 - Imagens obtidas por MEV, com A) 500x, B) 2000x e C) 3000x de ampliação da terra diatomácea.



Fonte: O autor (2017). Realizada na CERMAT, Departamento de Engenharia dos Materiais UFSC. Marca: HITACHI. Modelo: TM3030

A terra diatomácea é um material majoritariamente inorgânico formado por sílica, conforme Goulart *et al* (2011). Através do espectro no infravermelho, Figura 16, foi observado um pico largo desde 3200 - 3600 cm^{-1} , o que possivelmente é proporcionado pelas ligações O-H de alguma camada de água sobre a superfície da fase extratora ou adsorvida, bem como dos grupos silanóis presente na estrutura porosa do material. O pico característico e intenso de 1000 - 1300 está relacionado com o alongamento da ligação Si-O-Si, comumente encontrada a partir de materiais de silicato.

Figura 16 - Espectro no Infra Vermelho da diatomácea.



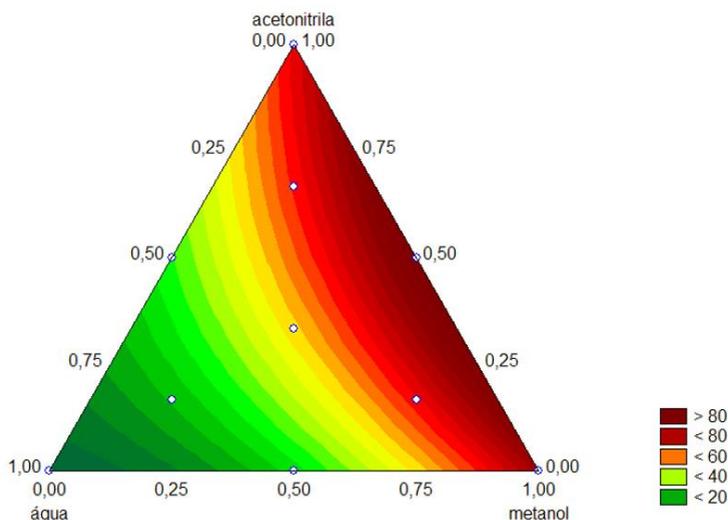
Fonte: O autor (2017). Realizada na Central de Análises do departamento de química UFSC através de pastilha de KBr.

4.2 Otimizações da etapa de dessorção

A etapa de dessorção requer algumas otimizações, dentre elas o solvente a ser utilizado. Os solventes utilizados foram H₂O U. P., MeOH e ACN.

O solvente que promoveu a melhor extração dos analitos do sorvente foi uma mistura ACN:MeOH 50:50 (v/v), como é mostrado na Figura 17. O ponto central, que possui 1/3 de cada solvente, foi realizado em triplicata para obtenção do R², que ficou com um valor de 0,830. Um resultado semelhante, quanto ao solvente, foi obtido por Dias et al. (2015), que também utilizaram BzP e TCC em seu método. É interessante observar através da superfície triangular que a água é o solvente mais fraco para promover a dessorção das substâncias orgânicas utilizadas neste estudo.

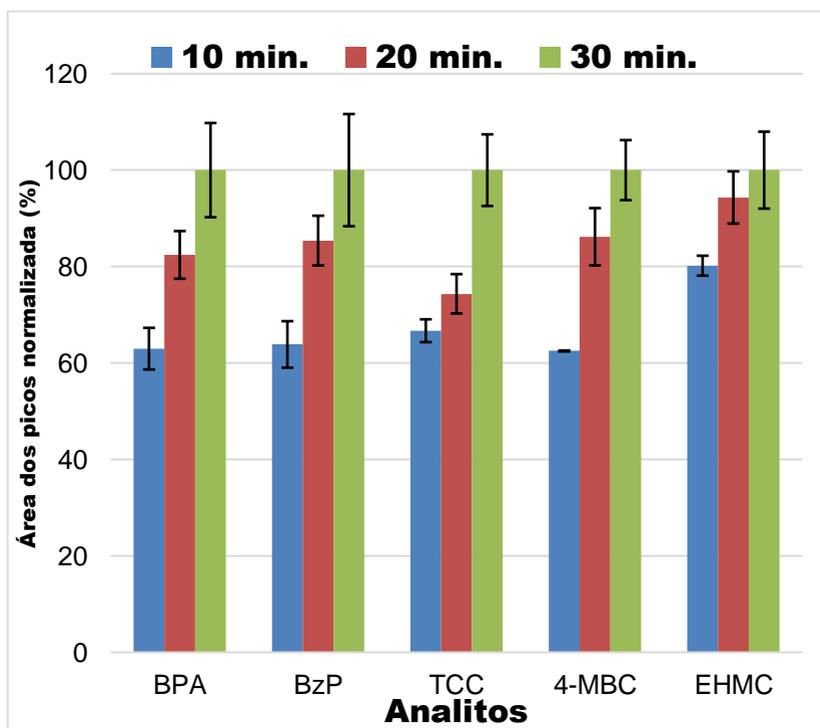
Figura 17 - Superfície triângulo para escolha do solvente de dessorção. Neste experimento realizou-se uma extração de 60 min. e uma dessorção de 30 min, através de uma mistura dos analitos numa concentração de 50,0 µg L⁻¹. A superfície resposta foi obtida através da soma das áreas dos picos dos analitos em cada experimento, seguido de normalização.



Fonte: Autoria própria.

Outro importante fator a ser otimizado numa técnica de preparo de amostras que possui a etapa de dessorção, é o tempo necessário para que haja a melhor transferência das substâncias de interesse para o solvente de dessorção. Quanto ao fator tempo, pode-se observar através da Figura 18, que 30 min proporcionaram uma melhor dessorção dos analitos do sorvente, em comparação com os outros dois níveis analisados, 10 e 20 min. Principalmente ao se observar as áreas normalizadas do TCC e da 4-MBC. Também não se obteve RSD (desvio padrão relativo, do inglês *relative standart deviation*) maiores que 20 % neste intervalo de tempo, o que justifica sua escolha como tempo ótimo. Intervalos de tempo maiores não foram avaliados, devido à elevada volatilidade do solvente de dessorção utilizado, o que poderia diminuir a precisão do método.

Figura 18 - Resultados do tempo de dessorção, utilizando 60 min de extração e uma mistura ACN:MeOH 50:50 (v/v), para dessorção.



Fonte: O autor (2017)

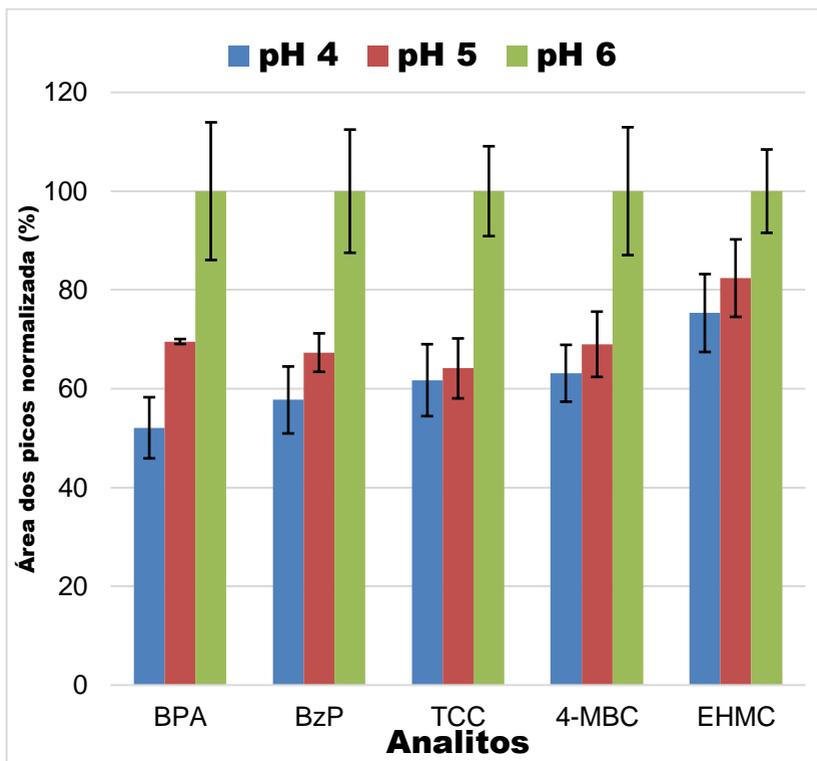
4.3 Otimizações da etapa de extração

Das substâncias incluídas no método duas são ionizáveis, o BPA e o TCC, possuindo pKas de 9,73 e 12,77, respectivamente. O BPA é majoritariamente neutro numa faixa de pH de 2,0 – 9,0, sem grandes alterações no equilíbrio. (HAERI, 2016; CHU; METCALFE, 2007)

Para que se consigam melhores extrações, é necessário que as substâncias de interesse estejam na forma neutra, pois com as espécies químicas carregadas sua tendência é permanecer na solução aquosa. A utilização de valores de pH na amostra, com cerca de duas unidades abaixo dos valores pKa das substâncias de interesse, permite que se obtenha estas substâncias na forma não ionizada. (PAWLISZYN, 2009)

Para avaliar o efeito do pH na extração foi escolhido três níveis de; 4, 5 e 6. Este estudo foi realizado fazendo uma extração de 60 min e uma dessorção em condições já otimizadas. Como pode ser observado através do gráfico de barras da Figura 19, extrações realizadas em pH 4 e 5 não tiveram grandes diferenças quanto aos resultados. Entretanto, é claramente visível que o pH 6 possibilitou as melhores extrações, justificando sua escolha como pH ótimo para os experimentos realizados futuramente.

Figura 19 - Efeito do pH na etapa de extração. Dessorção realizada sob condições ótimas.



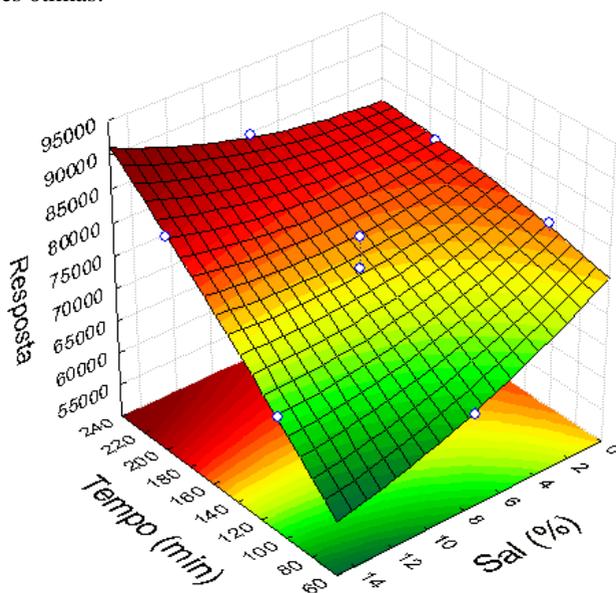
Fonte: O autor (2017)

O tempo necessário para que ocorra o equilíbrio entre os analitos presentes na amostra com a fase extratora é sem dúvida um dos principais parâmetros a serem estudados em uma microextração, pois depende da natureza das substâncias a serem determinadas e do material escolhido como sorvente. Neste estudo diferentes tempos de extração foram avaliados, em uma faixa de 60 min a 240 min, buscando um tempo que proporcionasse baixos LOQ sem comprometer a frequência analítica.

Como ilustra a Figura 20, tempo de extração mais longo (240 min) apresentou as melhores extrações, baseado na soma da área dos picos dos analitos neste ponto. Este resultado dá uma noção da relação entre o tempo requerido para que se obtenha o equilíbrio das substâncias

entre as fases. Pode-se dizer que até 240 min não se estabeleceu o equilíbrio, pois não se teve uma constância na resposta a partir de um determinado valor de tempo avaliado. Entretanto maiores intervalos de tempo não foram avaliados para não comprometer a frequência analítica do método. O R^2 da superfície resposta foi de 0,9177.

Figura 20 - Superfície Resposta obtida pela matriz Doehler. Análise do tempo e da % NaCl na etapa de extração. A etapa de dessorção foi realizada sob condições ótimas.



Fonte: O autor (2017)

Para melhores extrações, pode-se utilizar o efeito *salting out*, que acarreta uma melhor transferência de determinados analitos para o sorvente, devido à redução da solubilidade destas substâncias na amostra aquosa. Entretanto elevadas concentrações de sal podem levar ao efeito oposto, diminuindo a quantidade de analito extraído, pelo aumento da viscosidade da solução, desta forma valores superiores a 15 % de NaCl não foram utilizados neste experimento. Através da análise da Figura 20, observa-se que a concentração que permitiu maiores áreas nos picos cromatográficos foi a de 15% de NaCl na amostra.

Desta forma as condições ótimas de extração foram fixadas em 240 min e 15% de NaCl. Deve ser considerada a alta frequência analítica do método, devido a utilização do 96-well plate, que compensa o longo tempo de extração. Esta é sem dúvida uma das maiores vantagens desta abordagem

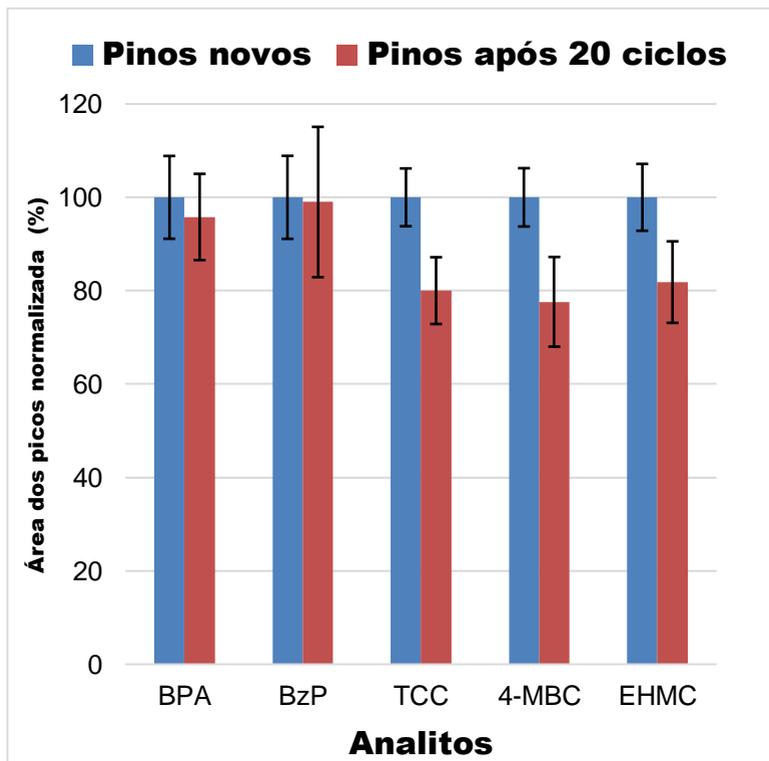
4.4 Estabilidade da diatomácea como fase extratora e reprodutibilidade entre os poços

Depois de realizado todos os experimentos necessários para a otimização do método, o que requereu cerca de 20 ciclos, foi confeccionado novos pentes e feito um comparativo da eficiência de extração com os usados.

Em técnicas de preparo de amostras, a fase extratora entra em contato com a amostra e com o solvente de dessorção, neste caso solvente orgânico, sucessivas vezes, o que pode acarretar uma perda na sua eficiência. Deste modo é necessário que o sorvente possua elevada estabilidade para que possa ser utilizado várias vezes sem alterar sua performance.

Através do gráfico de barras, Figura 21, observa-se que não houve uma perda significativa na eficiência do material utilizado neste estudo para as substâncias BPA e BzP. Para os demais analitos percebe-se uma redução de cerca de 20 % na capacidade de extração, em comparação aos novos. Tendo em vista a facilidade da confecção dos pentes e o baixo custo do material, fica claro que a utilização de até 20 ciclos de extração/dessorção de pente é totalmente viável e recomendado. Um dos motivos que podem ocasionar a perda na capacidade de extração está relacionado com as possíveis interações irreversíveis que as substâncias tendem a fazer com os sítios ativos, reduzindo o número dos mesmos no sorvente.

Figura 21 - Comparativo entre pinos com cerca de 20 ciclos realizados, com recém confeccionados. Para este experimento se utilizou quatro pinos novos e quatro usados sob condições ótimas do ciclo.



Fonte: O autor (2017)

A precisão entre os poços é visualizada através da Tabela 8, onde percebe-se, que, com exceção do TCC que está apenas uma unidade acima, todas as demais substâncias encontram-se dentro da faixa de até 15 %, valor considerado satisfatório de RSD para a concentração na qual foi realizado o experimento. Atestando desta forma a reprodutibilidade entre os poços. (AOAC, 2012)

Tabela 8 - Presição entre poços. Valores referentes a extrações realizadas em uma concentração de 150,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, sob condições otimizadas do ciclo de extração/dessorção em sete poços aleatoriamente distribuídos sobre a placa de 96 poços.

Substância	RSD %
BPA	11,2
BzP	9,4
TCC	16,0
4-MBC	15,6
EHMC	12,3

Fonte: O autor (2017)

4.5 Figuras analíticas de mérito e análise de amostra real

Os experimentos para obtenção das figuras analíticas de mérito foram feitos sob condições otimizadas. Para a BzP a curva analítica ficou com seis diferentes pontos, para BzP e TCC, e com cinco, e para as demais substâncias. O LOQ foi obtido através da concentração mais baixa contida na curva analítica, e o valor do LOD foi obtido pela divisão do LOQ por 3,3.

Tabela 9 – Parâmetros analíticos de mérito obtidos através de curva analítica em matriz (água de rio)

Composto	Faixa Linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Coefficiente de Determinação	Curva analítica	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	RSD ^a (%)	RSD ^b (%)
BPA	25-150	0,9988	$y = 169x - 140,35$	8,0	25,0	15,1	17,9
BzP ^c	5-285	0,9975	$y = 188,37x + 49,51$	1,0	5,0	3,5	3,9
TCC ^c	5-150	0,9970	$y = 251,63x - 2003,1$	1,0	5,0	10,2	7,9
4-MBC	25-285	0,9926	$y = 88,819x - 1129,7$	8,0	25,0	17,5	10,0
EHMC	25-150	0,9929	$y = 93,175x - 776,11$	8,0	25,0	23,5	9,4

^aRSD – 25 $\mu\text{g L}^{-1}$

^bRSD – 50 $\mu\text{g L}^{-1}$

^cPara BzP e TCC o primeiro RSD foi calculado em 5 $\mu\text{g L}^{-1}$

Fonte: O autor (2017)

Analisando a Tabela 9, percebe-se que o método atingiu LOQs na ordem $\mu\text{g L}^{-1}$ para as substâncias, tornando o método viável para a análise de traços. Também uma boa linearidade das curvas foi obtida variando entre 0,9926 e 0,9988, para 4-MBC e BPA, respectivamente. A repetibilidade do método também foi satisfatória, com base nos valores de RSD, que não ultrapassaram 23,5 %, neste caso para o EHMC em $25 \mu\text{g L}^{-1}$.

Para análise do efeito matriz e a exatidão do método, foi avaliado a recuperação dos analitos relativamente aos valores obtidos na curva analítica, fortificando amostra de água de rio em diferentes concentrações como é mostrado na Tabela 10.

Recuperações entre 60% e 115% são consideradas satisfatórias para análise de traços, na faixa de concentração obtida neste trabalho. Os valores referentes a precisão também podem ser considerados satisfatórios, levando-se em consideração que a grande maioria está abaixo de 21%. (AOAC, 2012)

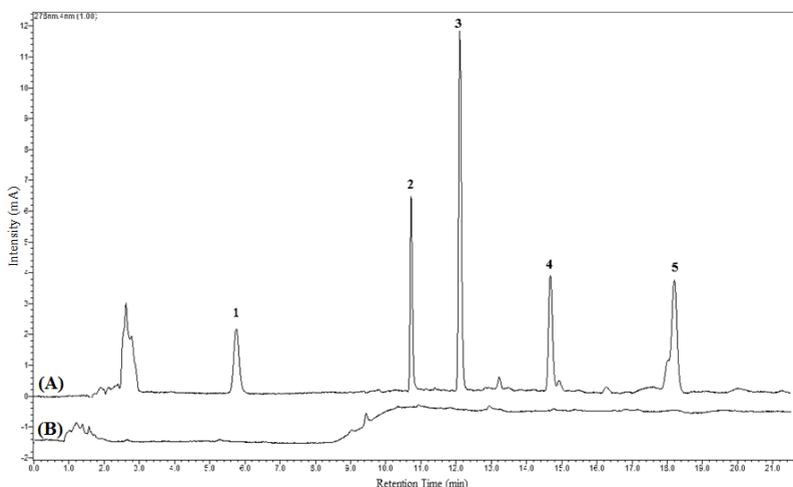
Tabela 10 - Recuperação relativa em amostra de água de rio

Composto	Rec.	RSD	Rec.	RSD	Rec.	RSD	Rec.	RSD
	5 µg L ⁻¹ (%)	(%)	25 µg L ⁻¹ (%)	(%)	50 µg L ⁻¹ (%)	(%)	150 µg L ⁻¹ (%)	(%)
BPA	-		70	20	82	15	75	1
BzP	117	17	95	19	93	7	91	17
TCC	85	20	95	12	105	11	99	21
4-MBC	-		113	8	96	5	90	16
EHMC	-		99	20	89	10	97	17

Fonte: O autor (2017).

A análise das cinco amostras coletadas rio Itajaí-açu indicaram valores de concentrações abaixo do LOQ para BPA e inferiores ao LOD para os demais analitos. No caso das cinco amostras coletadas no porto de São Francisco do Sul os níveis de concentração dos compostos em estudo estão abaixo do LOD do método. Na Figura 22 é exposto um cromatograma obtido com H₂O U. P. fortificada a 150 µg L⁻¹, e um com a água do rio.

Figura 22 - Cromatograma obtido por HPLC-DAD com H₂O U. P. fortificada a 150 µg L⁻¹ dos analitos A) e em água de rio B). Ordem de eluição: 1) BPA; 2) BzP; 3) TCC; 4) 4-MBC; 5) EHMC.



Fonte: Autoria própria.

4.6 Comparação com outras técnicas de microextração

Através da Tabela 11, onde é comparado a TF - SPME 96-well plate utilizando terra diatomácea com outras técnicas de microextração que também se propunham a determinar EDs em amostras aquosas, algumas constatações podem ser feitas. Primeiramente o volume de amostra que se utiliza neste trabalho é bem inferior aos demais. Outra vantagem que fica evidente é a maior frequência analítica do método proposto, tendo em vista que a técnica de preparo de amostra que possui

tempo médio por amostra mais próximo, desenvolvida por GUO et al. (2009), leva cerca o dobro de tempo para preparar uma amostra.

A utilização de fases extratoras que necessitam de funcionalização ou modificações, como as utilizadas por LI et al (2013) e ALMEIDA et al (2013), requerem uma etapa elaborada de preparo destes materiais, e também levam a um maior custo associado a análise, o que não se observa com a utilização da terra diatomácea reciclada. Ao se comparar a fase extratora utilizada neste estudo com a de GUO et al (2009), para a determinação de TCC em amostras aquosas, conclui-se que a metodologia proposta utiliza um material não tóxico e que não necessita de um tratamento para descarte, ao contrário do 1,3 diclorobenzeno ($C_6H_4Cl_2$).

Entretanto os LODs dos outros estudos possuem valores inferiores a TF – SPME 96 well-plate com terra diatomácea, tornando-os mais sensíveis. Esta desvantagem pode ser contornada utilizando um maior fator de pré-concentração, fazendo extrações com um volume maior de amostra, por exemplo. Outras alternativas para a diminuição dos valores de LOD e LOQ da metodologia proposta, seria incrementar um etapa de concentração dos analitos após a dessorção, através da evaporação de solvente, ou a utilização de detectores mais sensíveis, como o espectrômetro de massa (MS)

Tabela 11 - Comparação da TF - SPME 96 well plate com outros métodos de microextração da literatura para a análise de desreguladores endócrinos em amostras aquosas utilizados neste trabalho.

Técnica de preparo	Composto	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Fase extratora	V amost. (mL)	t extração (min)	t dessorção (min)	t médio por amost. (min)	Referência
SPME ^a	BzP	0,58	MPTS funcionalizada	10	60	10	70	(LI; et al, 2013)
SPME ^a	BPA	1,0	PILs	10	45	30	75	(PACHECO; et al, 2016)
DLLME ^b	TCC	0,042	1,3-dicloro-benzeno	5	5	-	5	(GUO; et al, 2009)
BaμE ^a	BzP	0,5	Pirrolidona modificada	25	240	15.	255	(ALMEIDA; et al, 2013)
IL-HF-LPME ^c	BzP	0,2	Ils	10	50	-	50	(GE; LEE, 2012)
TF – SPME ^a 96 well-plate	4-MBC	0,3						
	BPA	8,0	Terra	1,5	240	30	2,8	Este método
	BzP	1,0	Diatomácea					
	TCC	1,0	Reciclada					
4-MBC	8,0							

a = HPLC DAD, b = UHPLC UV, c = HPLC UV, MPTS = 3-mercaptopropil- trimetoxisilano, PIL = Líquidos Iônicos Poliméricos, IL = Líquidos Iônicos, V = volume, t = tempo.

Fonte: O autor (2017)

5. CONCLUSÃO

Este trabalho desenvolveu um método de determinação simultânea de cinco contaminantes emergentes em amostras aquosas, onde é possível preparar até 96 amostras em um intervalo de tempo de 4,5 h, cerca de 2,8 min por amostra, sendo o método de microextração com maior frequência analítica encontrado na literatura para as substâncias utilizadas. A utilização do 96-well plate automatiza o processo de extração, o que é interessante para a análise de rotina. O método também possui outras vantagens como o de utilizar uma fase extratora de baixo custo e fácil, e simplicidade na confecção do sistema de extração.

A caracterização da terra diatomácea utilizada na indústria cervejeira e reciclada através de tratamento térmico que foi utilizada neste trabalho, demonstrou, através dos resultados, se tratar de um material extremamente poroso e composto majoritariamente de sílica, confirmando portanto se tratar de um sorvente recuperado com propriedades semelhantes ao do original, desta forma tornando sua utilização em técnicas de microextração viável. A utilização de um material reciclado, a possibilidade de reutilização da fase sorvente após limpeza, o pequeno volume de amostra e de solventes orgânicos, e a elevada frequência analítica do método atendem vários preceitos da química analítica verde, tornando a metodologia desenvolvida ambientalmente amigável.

A metodologia proposta possui boa precisão, constatada através de valores de RSD inferiores a 20 % nos pontos analisados, e uma exatidão adequada, com recuperações variando entre 70 – 117. Os LODs variaram entre 1,0 a 8,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, o que permite a utilização da metodologia deste trabalho para a determinação de traços dos EDs em amostras aquosas.

REFERÊNCIAS

AHMADI, F.; SPARHAM, C.; PAWLISZYN, J. A flow-through aqueous standard generation system for thin film microextraction investigations of UV filters and biocides partitioning to different environmental compartments. **Environmental Pollution**, v. 230, p. 663-673, 2017.

AIROLDI, C.; FARIAS, R. F. **O uso de sílica gel organofuncionalizada como agente sequestrante para metais.** Química Nova, v. 23, n. 4, p. 486 – 503, 2000.

ALMEIDA, C.; et al. Determination of trace levels of benzophenone-type ultra-violetfilters in real matrices by bar adsorptive microextraction usingselective sorbent phases. **Journal of Chromatography A**, v. 1311, p 1-5, 2013.

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

AUGUSTO, F.; et al. New materials and trends in sorbents for solid-phase extraction. **Trends In Analytical Chemistry**, v. 43, p. 14 - 23, 2013.

BEZERRA, M. A.; et al. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v. 76, p. 965–977, 2008.

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

BOYACđ, E. et al. A study of thin film solid phase microextraction methods for analysis of fluorinated benzoic acids in seawater. **Journal Of Chromatography A**, v. 1436, p.51-58, mar. 2016..

BRUHEIM, I.; LIU, X.; PAWLISZYN, J. Thin-Film Microextraction. **Analytical Chemistry**, v. 75, p.1002-1010, 2003.

CABALLERO-CASERO, N.; LUNAR L.; RUBIO, S. Analytical methods for the determination of mixtures of bisphenols and derivatives in human and environmental exposure sources and biological fluids. A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 908, p. 22-53, 2016.

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

CHU, S.; METCALFE, C. D. Simultaneous determination of triclocarban and triclosan in municipal biosolids by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal Chromatography A**, v. 1164, p. 212-218, 2007.

COLLINS, C. H.; BRAGA G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Editora Unicamp, 2006. 453 p.

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

DOTTO, G. L.; et al. Remoção dos corantes azul brilhante, amarelo crepúsculo e amarelo tartrazina de soluções aquosas utilizando carvão ativado, terra ativada, terra diatomácea, quitina e quitosana: estudos de equilíbrio e termodinâmica. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p.1193-1199, 2011.

EKPEGHERE, K. I.; et al. Distribution and seasonal occurrence of UV filters in rivers and wastewater treatment plants in Korea. **Science of the Total Environment**, v. 542, p. 121-128, 2016.

FERREIRA, S. L. C. **Introdução às técnicas de planejamento de experimentos**. Ed. Vento Leste, 2015. 190 p.

FERREIRA, S. L. C.; et al. Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, p. 2-14, 2007.

GE, D.; LEE, H. K. Ionic liquid based hollow fiber supported liquid phase microextraction of ultraviolet filters. **Journal of Chromatography A**, v.1229, p 1-5, 2012.

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

GIOKAS, D. L.; SALVADOR A.; CHISVERT, A. UV filters: From sunscreens to human body and the environment. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 25, p 360-374, 2007.

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

GUO, J.; et al. Determination of triclosan, triclocarban and methyltriclosan in aqueous samples by dispersive liquid-liquid microextraction combined with rapid liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 3038-3043, 2009.

HAERI, A. S. Bio-sorption based dispersive liquid-liquid microextraction for the highly efficient enrichment of trace-level bisphenol A from water samples prior to its determination by HPLC. **Journal of Chromatography B**, v. 1028, p.186-191, 2016.

HUANG, J.; et al. Electrospun polystyrene/graphene nanofiber film as a novel adsorbent of thin film microextraction for extraction of aldehydes in human exhaled breath condensates. **Analytica Chimica Acta**, v. 878, p.102-108, jun. 2015.

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

JARDIM, I. S. F. J. Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas. **Scientia Chromatographica**, v.2, n.1, p.13-25, 2010.

JIANG, R.; PAWLISZYN J. Thin-film microextraction offers another geometry for solid-phase microextraction. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 39, p.245-253. 2012.

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

LANÇAS, F. M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”?. **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 2, p. 35-51, 2009.

LI, J.; et al. C₁₂-Ag wire as solid-phase microextraction fiber for determination of benzophenone ultraviolet filters in river water. **Journal of Chromatography A**, v. 1298, p. 1-8, 2013.

LIU, F.; XU, H. Development of a novel polystyrene/metal-organic framework-199 electrospun nanofiber adsorbent for thin film microextraction of aldehydes in human urine. **Talanta**, v. 162, p.261-267, jan. 2017.

LOCATELLI, M.; et al. Analytical methods for the endocrine disruptor compounds determination in environmental water samples. **Journal of Chromatography A**, p.1-18, 2016.

LUIZ, A. L.; MACIEL, E. V. S.; LANÇAS, F. M. Uma abordagem conceitual das técnicas miniaturizadas de preparo de amostra e suas aplicações na análise de resíduos e contaminantes em matrizes alimentares. **Scientia Chromatographica**, v. 7,n. 3, p.157-182, 2015.

MANOVÁ, E.; VON GOETZ, N.; HUNGERBUEHLER, K. Aggregate consumer exposure to UV filter ethylhexyl methoxycinnamate via personal care products. **Environment International** , v. 74, p. 249-257, 2015.

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

MIRNAGHI, F. S.; et al. Optimization of the Coating Procedure for a High-Throughput 96-Blade Solid Phase Microextraction System

Coupled with LC MS/MS for Analysis of Complex Samples. **Analytical Chemistry**, v. 83, p. 6018-6025, 2011.

MIRNAGHI, F. S.; MONTON, M. R. N.; PAWLISZYN, J. Thin-film octadecyl-silica glass coating for automated 96-blade solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography–tandem mass spectrometry for analysis of benzodiazepines. **Journal Of Chromatography A**, v. 1246, p. 2-8, 2012.

MOHAMED, H. M. Green, environment-friendly, analytical tools give insights in pharmaceuticals and cosmetics analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 66, p. 176-192, 2015.

MOUSAVI, F.; PAWLISZYN, J. Silica-based ionic liquid coating for 96-blade system for extraction of aminoacids from complex matrixes. **Analytica Chimica Acta**, v. 803, p. 66-74, 2013.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa na ciência e na indústria**. Ed. Unicamp, 2001. 401 p.

O'REILLY, J.; et al. Automation of solid-phase microextraction. **Journal of Separation Science**, v. 28, p. 2010-2022, 2005.

PACHECO-FERNÁNDEZ, I.; et al. Utilization of highly robust and selective crosslinked polymeric ionic liquid-based sorbent coatings in direct-immersion solid-phase microextraction and high-performance liquid chromatography for determining polar organic pollutants in waters. **Talanta**, v. 158, p.125-133, 2016.

PAWLISZYN, J. **Handbook of Solid Phase Microextraction**. Elsevier, 2012. 478 p.

PAWLISZYN, J.; CUDJOE, E. A new approach to the application of solid phase extraction disks with LC–MS/MS for the analysis of drugs on a 96-well plate format. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 50, p. 556-562, 2009.

PAWLISZYN, J.; ARTHUR, C. L. Solid-Phase Microextraction with Thermal-Desorption Using Fused-Silica Optical Fibers. **Analytica Chimica Acta**, v. 62, p. 2145-2148, 1990.

PAWLISZYN, J.; Theory of Solid-Phase Microextraction. **Journal of Chromatographic Science**, v. 38, p. 270 – 278, 2000.

PIRI-MOGHADAM, H.; et al. Inter-laboratory validation of a thin film microextraction technique for determination of pesticides in surface water samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 964, p. 74-84, 2017.

PIRI-MOGHADAM, H.; ALAM, Md. N.; PAWLISZYN, J. Review of geometries and coating materials in solid phase microextraction: Opportunities, limitations, and future perspectives. **Analytica Chimica Acta**, v. 984, p.42-65, 2017.

QUEIROZ, M. E. C. Microextração em fase sólida para análise de fármacos em fluidos biológicos. **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 3, p.11-19 2009.

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

RÜHMANN, B.; SCHMID, J.; SIEBER, V. Fast carbohydrate analysis via liquid chromatography coupled with ultra violet and electrospray ionization ion trap detection in 96-well format. **Journal Of Chromatography A**, v. 1350, p. 44-50, jul. 2014.

SANTOS JUNIOR, S. L. . **Interação de sítios ácidos da sílica gel com algumas bases orgânicas**. Dissertação de Mestrado, UNICAMP, Campinas, 1985.

SKOOG, A. D., WEST, D. M., HOLLER, F. J., CROUCH, R. S. **Fundamentos de química analítica**. Editora Thomson, Learning, 2006.

SOUCHIER, M.; et al. Screening triclocarban and its transformation products in river sediment using liquid chromatography and high resolution mass spectrometry, **Science of the Total Environment**, v. 502, p. 199-205, 2015.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos. Experimentais, um tutorial. **Química nova**, v. 29, n. 2, p. 338-350, 2006.

TOGUNDE, O. P.; et al. Determination of selected pharmaceutical residues in wastewater using an automated open bed solid phase microextraction system. **Journal Of Chromatography A**, v. 1262, p. 34-42, 2012.

VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F. Microextração em fase sólida. **Química Nova**, v.23, n. 4, p. 523-530, 2000.

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

