



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

Sângela Nascimento do Carmo

**EXPLORANDO A BRÁCTEA DA *ARAUCÁRIA ANGUSTIFOLIA* EM
PROCEDIMENTOS DE MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA**

FLORIANÓPOLIS
2019

Sângela Nascimento do Carmo

**EXPLORANDO A BRÁCTEA DA *ARAUCÁRIA ANGUSTIFOLIA* EM
PROCEDIMENTOS DE MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA**

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

FLORIANÓPOLIS
2019

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

do Carmo, Sângela Nascimento
Explorando a bráctea da *Araucária angustifolia* em
procedimentos de microextração em fase sólida / Sângela
Nascimento do Carmo ; orientador, Eduardo Carasek da
Rocha, 2019.
159 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas,
Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Química. 2. Preparo de amostras. Microextração em fase
sólida, Biosorvente, Bráctea. I. da Rocha, Eduardo Carasek
. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de
Pós-Graduação em Química. III. Título.

Sângela Nascimento do Carmo

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

Prof. Dr. Eduardo Costa de Figueiredo
Universidade Federal de Alfenas

Prof^ª. Dr^ª. Renata Dias de Mello Castanho Amboni
Universidade Federal de Santa Catarina

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

Prof^ª. Dr^ª. Gabrieli Bernardi
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutora em química analítica.

Prof. Dr. Vanderlei Gageiro Machado
Coordenador do Programa

Prof. Dr. Eduardo Carasek da Rocha
Orientador

Florianópolis, 21 de agosto de 2019.

Dedico este trabalho aos meus pais, Valdir e Zélia, e à minha irmã, Mariana, que são os amores da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente e principalmente aos meus pais, Valdir e Zélia, pois sem eles nada disso seria possível. Muito obrigada por todo o amor, confiança e educação que sempre me dedicaram e por sempre me incentivarem a estudar e me apoiarem nas minhas decisões. Amo vocês mais que tudo;

À minha irmã, Mariana, por sempre estar do meu lado e me incentivar a correr atrás dos meus objetivos. Ter você comigo nessa caminhada deixa tudo mais fácil. Amo você;

Ao meu namorado, Loris, por sempre estar do meu lado, seja nos momentos bons ou não, me encorajando e me apoiando. Obrigada por todo o companheirismo, paciência e compreensão;

Ao professor Eduardo Carasek, por ter me acolhido em seu laboratório e me orientado da melhor maneira possível. Muito obrigada por todo o suporte e ensinamento para realização deste trabalho;

À minha amiga Dâmaris e sua família, por terem me acolhido quando cheguei em Florianópolis. Obrigada por toda a ajuda, sou eternamente agradecida a vocês;

À toda minha família que sei torcem por mim e pelo meu sucesso;

Aos amigos do laboratório de Cromatografia e Espectroscopia de Absorção Atômica, vocês são os melhores. Vocês com certeza deixaram esses 4 anos bem mais leves. Obrigada por todos os momentos de descontração e por toda a ajuda;

Às minhas amigas do laboratório, vizinhas e amigas de vida, Leila e Gabriela, por toda a parceria, pelas conversas e por sempre estarem comigo em todos os momentos;

Aos meus amigos que estão em Uberlândia. Obrigada por manterem e afirmarem nossos laços de amizade mesmo com a distância;

A todos os amigos que fiz em Florianópolis por me ajudarem nesta caminhada;

À Adriana Neves Dias, nosso tempo de convivência no laboratório foi pouco, mas foi você que junto comigo deu os primeiros passos deste trabalho. Sou muito grata a você;

Ao Josias Merib, por ter sido tão prestativo e me ajudado no que necessário. Você foi de fundamental importância para a realização deste estudo. Muito obrigada;

Aos professores Luciano Vitali, Pedro Migowski, Daniela Zambeli e Vanderlei Machado pela participação e sugestões no Exame de Qualificação;

Aos membros da Comissão Examinadora deste trabalho, professores Eduardo Figueiredo, Renata Amboni, Luiz Madureira e Gabrieli Bernardi, pelas valiosas críticas e sugestões.

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

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

À CAPES pela bolsa concedida;

À UFSC pelo ensino gratuito e de qualidade

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

RESUMO

Neste estudo, foi proposto o uso de um bioissorvente, a bráctea da *Araucária angustifolia*, como fase extratora para a microextração em fase sólida (SPME). Essa abordagem foi utilizada no desenvolvimento, validação e aplicação de três metodologias. Na primeira metodologia, a bráctea foi utilizada, pela primeira vez, como recobrimento para fibra de SPME. A fibra proposta foi avaliada para determinação de agrotóxicos organoclorados em amostras de água de lagoa por cromatografia gasosa acoplada ao detector por captura de elétrons. A caracterização do bioissorvente foi realizada e as condições de extração foram otimizadas, bem como a eficiência da fibra de bráctea foi comparada a uma fibra comercial com recobrimento de DVB/Car/PDMS. A fibra à base de bioissorvente forneceu resultados muito promissores, incluindo limites de detecção no nível de partes por trilhão e estabilidade térmica altamente satisfatória. Na segunda metodologia, a fibra de bráctea foi explorada para determinação multiclases de contaminantes em amostras de água de rio por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Nesse caso, foram determinados simultaneamente 32 compostos com propriedades físico-químicas distintas. Da mesma forma, as condições de extração foram otimizadas e a eficiência de extração dos compostos foi comparada com o revestimento DVB/Car/PDMS. Nessa abordagem, a bráctea se mostrou extremamente útil como fase extratora em aplicações nas quais os analitos exibam diferentes polaridades e volatilidades. Por fim, na terceira metodologia desenvolvida, a bráctea foi utilizada como recobrimento em uma configuração diferente da fibra tradicional de SPME. Nesse caso, a microextração em filme fino (TF-SPME) acoplada ao sistema *96-well plate* foi usada para determinação de hormônios estrogênicos em urina humana por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência. A otimização das condições de extração e dessorção foi realizada e o aspecto mais interessante desse estudo foi que considerando um ciclo de extração/dessorção, o tempo total de preparo de amostra foi de apenas 1,7 min por amostra quando o sistema *96-well plate* opera na capacidade máxima, o que contribuiu para um alto rendimento do método. As metodologias desenvolvidas foram avaliadas através de parâmetros analíticos de mérito e aplicação em amostras reais. De acordo com os resultados obtidos, a bráctea representa uma fase extratora promissora para técnicas de microextração.

Palavras-chave: Bráctea. *Araucária angustifolia*. SPME. TF-SPME. Agrotóxicos organoclorados. Multiclases. Hormônios estrogênicos. Amostras de água. Urina humana.

ABSTRACT

In this study, it was proposed the use of bract from *Araucária angustifolia*, a biosorbent as extractive phase for solid phase microextraction (SPME). This approach was used in the development, validation and application of three different methodologies. In the first methodology, the bract was used for the first time as coating for SPME fiber. The proposed fiber was evaluated for the determination of organochlorine pesticides in lake water samples by gas chromatography coupled to electron capture detection. The characterization of the biosorbent was carried out, the extraction conditions were optimized and the efficiency of the bract fiber was compared to a commercial fiber with DVB/Car/PDMS coating. The biosorbent-based fiber provided very promising results, including detection limits at parts per trillion level and highly satisfactory thermal stability. In the second methodology, the bract fiber was explored for the determination of a multiclass of contaminants in river water samples by gas chromatography–mass spectrometry. In this case, 32 compounds with different physicochemical properties were determined simultaneously. Likewise, the extraction conditions were optimized and the extraction efficiencies were compared with the DVB/Car/PDMS coating. In this approach, the bract has proved extremely useful as an extractive phase in applications that the analytes exhibit different polarities and volatilities. Finally, in the third methodology, the bract was used as coating in a different configuration of the traditional SPME fiber. In this case, thin film SPME (TF-SPME) coupled to the 96-well plate system was used for the determination of estrogen hormones in human urine by high performance liquid chromatography with fluorescence detector. The optimization of the extraction and desorption conditions was performed and the most interesting aspect of this study was that considering an extraction/desorption cycle, the sample preparation time was 1.7 min per sample when the 96-well plate system operates at maximum capacity, which contributed to the high-throughput of the method proposed. The methodologies developed were evaluated through analytical parameters of merit and application in real samples. According to the results obtained, the bract represents a promising extractive phase for microextraction techniques.

Keywords: Bract. *Araucária angustifolia*. SPME. TF-SPME. Organochlorine pesticides. Multiclass. Estrogen hormones. Water samples. Human urine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – (A) Dispositivo da fibra de SPME com a fibra recolhida (dentro da agulha) (B) dispositivo da fibra de SPME com a fibra exposta (fora da agulha) e (C) vista interna do <i>holder</i> com a fibra exposta.....	28
Figura 2 – Modos de extração em SPME: (A) DI-SPME e (B) HS-SPME.....	29
Figura 3 – Etapas do processo de microextração em fase sólida: (A) extração dos analitos e (B) dessorção térmica no GC.....	30
Figura 4 – Sistema SPME seta com o sorvente exposto.....	39
Figura 5 – Representação da mudança da geometria de haste cilíndrica da SPME para a geometria plana retangular da TF-SPME.....	40
Figura 6 – Esquema da configuração experimental para TF-SPME (extração no <i>headspace</i>) utilizada por (Bruheim <i>et al.</i> , 2003). Legenda: (1) haste de aço inoxidável (2) filme fino de membrana polimérica (3) amostra aquosa (4) barra de agitação magnética (5) membrana enrolada no injetor do GC (6) entrada do injetor (7) membrana enrolada (8) revestimento de vidro e (9) coluna capilar.....	42
Figura 7 – Dispositivo de 96- <i>well plate</i> automatizado utilizado por (Boyac <i>et al.</i> , 2014) em conjunto com a TF-SPME e HPLC.....	43
Figura 8 – Principais partes constituintes da TF-SPME acoplada ao sistema 96- <i>well plate</i> (A) amostrador Manual de 96- <i>well plate</i> com agitador embutido (B) escova contendo as 96 lâminas (C) pentes de aço inoxidável contendo 12 lâminas e (D) poços de extração.....	44
Figura 9 – Sequência de procedimentos para a realização da extração, e posteriormente da dessorção, utilizando o sistema 96- <i>well plate</i> semiautomático.....	45
Figura 10 – Constituintes majoritários dos biossorventes lignocelulósicos.....	50
Figura 11 – Composição química média de alguns materiais lignocelulósicos típicos.....	51
Figura 12 – Conífera <i>Araucária angustifolia</i>	55
Figura 13 – Pinha e seus constituintes (A) pinha no ápice de um ramo (B) imagem de uma pinha aberta (C) sementes desenvolvidas (pinhão) da <i>Araucária angustifolia</i> e (D) sementes não desenvolvidas (bráctea) da <i>Araucária angustifolia</i>	56

Figura 14 – Procedimento utilizado para a fabricação da fibra de bráctea.....	65
Figura 15 – Espectro de FTIR do pó da bráctea (200 mesh).....	71
Figura 16 –TGA obtido do pó da bráctea (200 mesh).....	72
Figura 17 – Micrografias eletrônicas de varredura obtidas pó de bráctea (200 mesh) em ampliações de (A) 1000x e (B) 2000x.....	73
Figura 18 – Micrografias eletrônicas de varredura obtidas da superfície da fibra de bráctea em (A) ampliação de 1500x (B) de 3000x e (C) uma seção transversal da fibra na ampliação de 300x.....	74
Figura 19 – Superfícies de resposta obtidas na extração de agrotóxicos organoclorados em água por SPME com a fibra de bráctea (A) tempo versus temperatura e (B) temperatura versus % de NaCl.....	76
Figura 20 – Superfícies de resposta obtidas na extração de agrotóxicos organoclorados por SPME com a fibra comercial (DVB/Car/PDMS) (A) tempo versus temperatura e (B) temperatura versus % de NaCl.....	77
Figura 21 – Comparação da eficiência de extração utilizando a fibra de bráctea e a fibra comercial (DVB/Car/PDMS).....	78
Figura 22 – Cromatogramas para as amostras de água de lagoa (A) fortificada (20 ng L ⁻¹) e (B) não fortificada com agrotóxicos organoclorados após extração por SPME com a fibra de bráctea. Analitos: (1) δ -BHC (2) aldrin (3) heptacloro epóxido (4) α -endosulfan (5) endrin e (6) 4,4'-DDD.....	83
Figura 23 – Estudo da influência do pH da amostra na extração dos analitos em água utilizando a fibra de bráctea.....	100
Figura 24 – Superfícies de resposta obtidas na extração dos analitos em água por SPME com a fibra de bráctea (A) temperatura versus % de NaCl e (B) tempo versus temperatura.....	102
Figura 25 – Superfícies de resposta obtidas na extração dos analitos em água por SPME com a fibra de comercial (DVB/Car/PDMS) (A) temperatura versus % de NaCl e (B) tempo versus temperatura.....	103
Figura 26 – Comparação da eficiência de extração utilizando a fibra de bráctea e a fibra comercial (DVB/Car/PDMS).....	105

Figura 27 – Gráfico de Lenth obtido para análise da robustez do método. Fatores: P1 – tempo de extração; P2 – temperatura de extração; P3 - % de NaCl; P4 – volume da amostra; P5 – velocidade de agitação; P6 – tempo de dessorção e P7 – temperatura de dessorção.....	112
Figura 28 – Cromatogramas para as amostras de água de rio (A) fortificada (50 µg L ⁻¹) e (B) não fortificada com os analitos após extração por SPME com a fibra de bráctea. Analitos: (1) benzeno; (2) tolueno; (3) etilbenzeno; (4) <i>m,p</i> -xileno; (5) <i>o</i> -xileno; (6) diclofenol; (7) triclorofenol; (8) acenaftaleno; (9) molinato; (10) benzofenona; (11) trifuralina; (12) fenantreno; (13) antraceno; (14) alaclor; (15) metalacloro; (16) clorpirifós; (17) pendimentalina; (18) 4-MBC; (19) pireno; (20) BaA; (21) OD-PABA; (22) criseno; (23) estrona; (24) 17-β-estradiol; (25) permetrina; (26) BbF; (27) BkF; (28) BaP; (29) InPy; (30) DiahA e (31) BghiP.....	114
Figura 29 – Esquema do preparo das lâminas recobertas de bráctea para serem utilizadas no sistema 96-well plate.....	121
Figura 30 – (A) Pente contendo 12 lâminas recobertas com o pó da bráctea (200 mesh) e (B) sistema 96-well plate com as lâminas recobertos com a bráctea.....	121
Figura 31 – Posições aleatórias do sistema 96-well plate escolhidas para avaliar a reprodutibilidade (RSD) dos poços.....	126
Figura 32 – Resultado da avaliação da diluição da urina na extração dos hormônios.....	127
Figura 33 – Superfície triangular obtida para a dessorção líquida dos hormônios.....	129
Figura 34 – Resultado da avaliação do tempo de dessorção líquida.....	130
Figura 35 – Superfície de resposta obtida para a otimização do tempo de extração e % de NaCl na influência da extração dos hormônios em urina humana.....	131
Figura 36 – Cromatogramas obtidos a partir da extração da amostra de urina diluída utilizando o método proposto (A) urina em branco e (B) amostra de urina diluída (40 vezes) fortificada com 100 µg L ⁻¹ de cada analito. Analitos: (1) E3; (2) E2; (3) EE2 e (4) E1.....	133
Figura 37 – Gráfico de Lenth para avaliação da robustez do método. Fatores: P1 – tempo de extração; P2 – tempo de dessorção; P3 – diluição da urina; P4 - % de NaCl; P5 – solvente de dessorção; P6 – volume de MeOH para a dessorção e P7 – volume da amostra.....	134
Figura 38 – Avaliação da estabilidade da bráctea como fase sorvente para TF-SPME após 15 ciclos de extração/dessorção.....	135

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tipos de recobrimento das fibras de SPME disponíveis comercialmente.....	34
Tabela 2 – Trabalhos reportados na literatura e suas aplicações em análises utilizando as técnicas de SPME e TF-SPME como preparo de amostra.	47
Tabela 3 – Características dos materiais lignocelulósicos.	51
Tabela 4 – Trabalhos desenvolvidos pelo Laboratório de Cromatografia e Espectrometria Atômica (CROMAAS-UFSC) utilizando biossorventes em técnicas de microextração.....	54
Tabela 5 – Estrutura e características físico-químicas dos agrotóxicos organoclorados estudados.....	61
Tabela 6 – Limites máximos de resíduos de agrotóxicos organoclorados em águas superficiais estabelecidos pela Diretiva 2013/39/EU.....	62
Tabela 7 – Planejamento composto central empregado para otimização da extração dos agrotóxicos organoclorados por SPME utilizando a fibra de bráctea e uma fibra comercial (DVB/Car/PDMS).....	68
Tabela 8 – Faixa linear de trabalho, coeficiente de correlação (R), limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) para determinação de agrotóxicos organoclorados em água utilizando o método proposto com a fibra de bráctea.	80
Tabela 9 – Faixa linear de trabalho, coeficiente de correlação (R), limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) para determinação de agrotóxicos organoclorados em água utilizando o método proposto com a fibra DVB/Car/PDMS.	80
Tabela 10 – Ensaios de recuperação relativa e precisão (RSD) usando o método proposto com a fibra de bráctea.	81
Tabela 11 – Comparação do método proposto utilizando a fibra de bráctea com outros métodos reportados na literatura que utilizam SPME para determinação de agrotóxicos organoclorados em matrizes aquosas.....	83
Tabela 12 – Estrutura e características físico-químicas dos compostos estudados.....	86
Tabela 13 – Relação de <i>m/z</i> monitoradas para a identificação e quantificação dos analitos. Os valores em negrito representam os fragmentos utilizados para a quantificação.....	94

Tabela 14 – Localizações geográficas das amostras de água de rio utilizadas neste estudo. ...	97
Tabela 15 – Relação entre as condições nominais e variações dos parâmetros analisados para avaliação da robustez do método.	98
Tabela 16 – Combinação dos parâmetros e suas variações nos experimentos realizados para avaliação da robustez do método.	98
Tabela 17 – Faixa linear de trabalho, coeficiente de correlação (R), limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) para determinação de contaminantes em água utilizando o método proposto utilizando a fibra de bráctea.	106
Tabela 18 – Comparação dos limites máximos permitidos dos analitos em águas superficiais pela Diretiva 2013/39/EU com o LOQ obtido do método utilizando a fibra de bráctea.	108
Tabela 19 – Ensaio de recuperação relativa e precisão (RSD) usando o método proposto com a fibra de bráctea.	108
Tabela 20 – Comparação do método proposto utilizando a fibra de bráctea com outros métodos reportados na literatura que utilizam SPME para determinação de contaminantes em matrizes aquosas.	115
Tabela 21 – Estrutura química e propriedades físico-químicas dos compostos estudados.	118
Tabela 22 – Planejamento <i>Simplex-centroide</i> utilizado para otimização do solvente e do tempo de dessorção.	124
Tabela 23 – Planejamento <i>Doehlert</i> utilizado para otimização do tempo de extração e de adição de NaCl.	124
Tabela 24 – Relação entre as condições nominais e variações dos parâmetros analisados para avaliação da robustez do método.	126
Tabela 25 – Faixa linear de trabalho, coeficiente de correlação (R), limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) para determinação de hormônios estrogênicos em urina humana utilizando o método proposto.	132
Tabela 26 – Recuperação relativa e precisões intradia e interdia obtidas para determinação de hormônios estrogênicos em urina humana usando o método proposto.	132
Tabela 27 – Resultados obtidos nas análises de urina humana utilizando o método proposto.	138

Tabela 28 – Comparação do método proposto utilizando o filme fino de bráctea com outros métodos reportados na literatura para determinação de hormônios estrogênicos em urina humana.	139
--	-----

SIGLAS E ABREVIATURAS

BA μ E – Microextração Adsorptiva em Barra, do inglês *Bar Adsorptive Microextraction*

BaA – Benzo[a]antraceno

BaP – Benzo[a]pireno

BbF – Benzo[b]fluoranteno

BET – Braunauer, Emmet e Telle

BghiP – Benzo[g,h,i]pirileno

BkF – Benzo[k]fluoranteno

BTEX – Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xileno

Car/PDMS – Carboxen/Dimetilpolisiloxano

C-PDA – Polidopamina Carbonizada.

DDD – Diclorodifenildicloroetano

DDE – Diclorodifenifeniletileno

DDT – Diclorodifeniltricloroetano

DI – Imersão direta, do inglês *Direct Immersion*

DiahA – Dibenzo[a,h]antraceno

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

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

DVB/Car/PDMS – Divinilbenzeno/Carboxen/Dimetilpolisiloxano

E1 – Estrona

E2 – 17- β -Estradiol

E3 – Estriol

ECD – Detector por Captura de Elétrons, do inglês *Electron Capture Detection*

EE2 – 17- α -Etinilestradiol

FTIR – Espectrômetro de Infravermelho com Transformada de *Fourier, do ingles Fourier Transform Infrared*

GC – Cromatografia Gasosa, do inglês *Gas Chromatography*

GC-ECD – Cromatografia Gasosa acoplada ao Detector por captura de elétrons, do inglês *Gas Chromatography-Electron Capture Detection*

GC-MS – Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massa, do inglês *Gas Chromatography with Mass Spectrometry*

GC-NPD – Cromatografia gasosa com detector de nitrogênio-fósforo, do inglês *Gas Chromatography With Nitrogen-Phosphorous Detection*

HCH – Hexaclorociclohexano

HLB – Partículas Poliméricas Hidrofílicas-Lipofílicas.

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

HPAs – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

HS – do inglês *Headspace*

InPy – Indeno[1,2,3-cd]pireno

LC – Cromatografia Líquida, do inglês *Liquid Chromatography*

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

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

LOQ – Limite de quantificação, do inglês *Limit of Quantification*

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

4-MBC – 3-(4-Metil)-Benzilideno Cânfora

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

MIPs – Polímeros Molecularmente Impressos, do inglês *Molecular Imprinted Polymers*

MMT – Montmorillonita

MOFs – Estruturas Metal-Orgânicas

OCPs – Agrotóxicos Organoclorados, do inglês *Organochlorine Pesticides*

OD-PABA – 2-Etilhexil 4-(Dimetilamino) Benzoato

ODS – Octadecilsilano Magnético

PA – Poliacrilato

PAN – Poliacrilonitrilo

PDMS – Polidimetilsiloxano

PDMS/DVB – Polidimetilsiloxano/Divinilbenzeno

PIL – Líquidos Iônicos Poliméricos, do inglês *Polymeric Ionic Liquids*

PI/PVP – Poliimida/Polivinilpirrolidona

R – Coeficiente de Correlação

R² – Coeficiente de Determinação

RDSE – Extração Sortiva em Disco Rotativo, do inglês *Rotating-Disk Sorptive Extraction*

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

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

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

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

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

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

TGA – Análise Termogravimétrica, do inglês *Thermogravimetric Analysis*

UV – Ultravioleta

SUMÁRIO

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO	23
CAPÍTULO II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1 PREPARO DE AMOSTRAS	25
2.1.1 Técnicas clássicas de preparo de amostra	26
2.1.2 Técnicas de microextração	27
2.2 MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA – SPME	27
2.2.1 Aspectos teóricos da SPME	31
2.2.2 Parâmetros a serem otimizados no desenvolvimento de métodos de SPME	33
2.2.2.1 Recobrimento da fibra de SPME	33
2.2.2.2 Seleção do modo de extração	35
2.2.2.3 Tempo de extração	35
2.2.2.4 Velocidade de agitação da amostra	36
2.2.2.4 Temperatura de extração	36
2.2.2.5 Adição de sal	37
2.2.2.6 Variação do pH	37
2.2.3 Desenvolvimento de novos suportes e recobrimentos para SPME	38
2.2.4 Desenvolvimento de novas configurações para SPME	38
2.3 MICROEXTRAÇÃO EM FILME FINO – TF-SPME	40
2.3.1 TF-SPME acoplada ao sistema 96-well plate	42
2.4 APLICAÇÕES UTILIZANDO A SPME	46
2.5 BIOSORVENTES	49
2.5.1 Biossorventes lignocelulósicos	50
2.5.2 Aplicações dos biossorventes em análises químicas	52
2.6 BRÁCTEA DA ARAUCÁRIA ANGUSTIFOLIA	54

CAPÍTULO III – OBJETIVOS	58
3.1 OBJETIVO GERAL	58
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	58
CAPÍTULO IV – NOVO RECOBRIMENTO À BASE DE BIOSSORVENTE (BRÁCTEA) PARA MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS ORGANOCLORADOS EM ÁGUA POR CROMATOGRAFIA GASOSA COM DETECTOR DE CAPTURA DE ELÉTRONS.	60
4.1 INTRODUÇÃO	60
4.2 EXPERIMENTAL	63
4.2.1 Reagentes e materiais	63
4.2.2 Instrumentação e condições cromatográficas	64
4.2.3 Preparo da fibra de bráctea.....	65
4.2.4 Caracterização da bráctea	65
4.2.5 Otimização da metodologia.....	66
4.2.5.1 <i>Condições selecionadas inicialmente</i>	67
4.2.5.2 <i>Otimização do tempo e temperatura de extração e adição de NaCl</i>	67
4.2.6 Preparo de amostra otimizado	68
4.2.7 Comparação das eficiências de extração da fibra de bráctea com a fibra DVB/Car/PDMS	69
4.2.8 Amostras de água	69
4.2.9 Parâmetros analíticos de mérito.....	69
4.2.10 Reprodutibilidade e durabilidade da fibra de bráctea	70
4.2.11 Programas utilizados na análise dos dados	70
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES	70
4.3.1 Caracterização da bráctea.....	70
4.3.2 Otimização do tempo e temperatura de extração e adição de NaCl.....	75

4.3.3	Comparação das eficiências de extração da fibra de bráctea com a fibra DVB/Car/PDMS	78
4.3.4	Parâmetros analíticos de mérito.....	79
4.3.5	Reprodutibilidade e durabilidade da fibra de bráctea.....	82
4.3.6	Aplicação do método proposto utilizando a fibra de bráctea.....	82
4.3.7	Comparação do método proposto com métodos descritos na literatura.....	83
4.4	CONCLUSÕES PARCIAIS	84
CAPÍTULO V – EXPANDINDO A APLICABILIDADE DA BRÁCTEA COMO FASE EXTRATORA PARA MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA PARA DETERMINAÇÃO MULTICLASSES DE CONTAMINANTES EM ÁGUA POR CROMATOGRAFIA GASOSA COM ESPECTROMETRIA DE MASSAS		
5.1	INTRODUÇÃO.....	85
5.2	EXPERIMENTAL.....	92
5.2.1	Reagentes e materiais	92
5.2.2	Instrumentação e condições cromatográficas	93
5.2.3	Condições selecionadas inicialmente.....	95
5.2.4	Otimização da metodologia.....	95
5.2.4.1	<i>Otimização da variação do pH na amostra</i>	95
5.2.4.2	<i>Otimização do tempo e temperatura de extração e adição de NaCl.....</i>	95
5.2.5	Preparo de amostra otimizado	96
5.2.6	Comparação das eficiências de extração da fibra de bráctea com uma fibra comercial.....	96
5.2.7	Amostras de água	96
5.2.7	Parâmetros analíticos de mérito.....	97
5.2.8	Robustez do método.....	98
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	99
5.3.1	Otimização da metodologia.....	99

5.3.1.1	<i>Variação do pH da amostra</i>	99
5.3.1.2	<i>Otimização do tempo e da temperatura de extração e da adição de sal</i>	101
5.3.2	Comparação da eficiência de extração utilizando a fibra de bráctea e a fibra DVB/Car/PDMS	104
5.3.3	Parâmetros analíticos de mérito	105
5.3.4	Robustez	112
5.3.5	Aplicação do método proposto utilizando a fibra de bráctea	113
5.3.6	Comparação do método proposto com métodos descritos na literatura	115
5.4	CONCLUSÕES PARCIAIS.....	116
 CAPÍTULO VI – BRÁCTEA COMO FASE EXTRATORA PARA TF-SPME COMBINADA COM O SISTEMA 96-WELL PLATE PARA DETERMINAÇÃO DE ESTROGÊNIOS EM URINA HUMANA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À DETECÇÃO POR FLUORESCÊNCIA		
6.1	INTRODUÇÃO	117
6.2	EXPERIMENTAL	119
6.2.1	Reagentes e materiais	119
6.2.2	Instrumentação e condições cromatográficas	120
6.2.3	Preparo dos filmes finos de bráctea	120
6.2.4	Amostras de urina	122
6.2.5	Condições selecionadas inicialmente	122
6.2.6	Otimização da metodologia	122
6.2.6.1	<i>Otimização da diluição da urina</i>	123
6.2.6.2	<i>Otimização do solvente e tempo de desorção</i>	123
6.2.7	Preparo de amostra otimizado	125
6.2.8	Parâmetros analíticos de mérito	125
6.2.9	Robustez do método	125
6.2.10	Reprodutibilidade dos poços do sistema 96-well plate	126

6.2.11	Estabilidade da bráctea como recobrimento para a TF-SPME.....	127
6.3	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	127
6.3.1	Otimização do procedimento.....	127
<i>6.3.1.1</i>	<i>Otimização da diluição da urina.....</i>	<i>127</i>
<i>6.3.1.2</i>	<i>Otimização de dessorção líquida.....</i>	<i>128</i>
<i>6.3.1.3</i>	<i>Otimização das condições de extração.....</i>	<i>130</i>
6.3.2	Parâmetros analíticos de mérito.....	131
6.3.3	Robustez do método.....	134
6.3.4	Reprodutibilidade dos poços do sistema <i>96-well plate</i>.....	135
6.3.5	Estabilidade da fase extratora.....	135
6.3.6	Aplicação do método desenvolvido.....	136
6.3.7	Comparação do método proposto com outros reportados na literatura.....	139
6.4	CONCLUSÕES PARCIAIS.....	139
CAPÍTULO VII – CONCLUSÃO FINAL E SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS		
.....		141
7.1	CONCLUSÃO FINAL.....	141
7.2	SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS.....	142
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	143

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO

Técnicas de preparo de amostras têm sido amplamente utilizadas em metodologias analíticas para realizar a limpeza da amostra, concentrar os analitos e/ou transformar a amostra em uma forma adequada antes da análise instrumental (Guo e Lee, 2011; Hu e He, 2012; Melnyk *et al.*, 2014; Katarzyna *et al.*, 2018; Garwolińska *et al.*, 2019). Técnicas clássicas de preparo de amostra, como a extração líquido-líquido (LLE, do inglês *Liquid-liquid Extraction*) e a extração em fase sólida (SPE, do inglês *Solid Phase Extraction*) são frequentemente utilizadas em procedimentos de análises químicas. No entanto, essas apresentam algumas desvantagens, como a utilização de solventes orgânicos tóxicos e a excessiva manipulação da amostra, o que pode ocasionar contaminações e perda de analitos (Clement *et al.*, 2001). Além disso, esses procedimentos envolvem um grande número de etapas, o que aumenta a possibilidade de erros, além de maior tempo envolvido nas análises.

Com o crescente interesse mundial na conservação dos meios naturais, aumentou-se na mesma proporção a demanda por métodos que se adequassem às exigências das análises ao nível de traços em matrizes complexas, incluindo alta precisão e exatidão e baixos níveis de quantificação. Buscou-se então, procedimentos mais rápidos e com menor geração de resíduos e menor consumo de solventes orgânicos caros e nocivos, ao mesmo tempo sejam eficientes (Pawliszyn, 2003; Dórea *et al.*, 2008). Nesse contexto, técnicas de preparo de amostra miniaturizadas que consideram os princípios da química verde, sendo menos prejudiciais ao meio ambiente, vêm ganhando espaço na química analítica

A microextração em fase sólida (SPME, do inglês *Solid Phase Microextraction*) é uma técnica de preparo de amostras que representou um avanço nessa direção, uma vez que, não é necessário a utilização de solventes e a extração e o enriquecimento do analito ocorrem em uma mesma etapa, atendendo assim, os princípios da química verde (Kaykhaii *et al.*, 2010). Além disso, características como, simplicidade de aplicação, possibilidade de pré-concentração dos analitos e *cleanup* das amostras, aliadas a altas eficiências de extração, fazem com que essa técnica possibilite determinações em nível de traço de analitos em matrizes complexas.

Nosso grupo de pesquisa, propôs, pela primeira vez, o uso de um biossorvente, a cortiça, como recobrimento para SPME, o que reforça o aspecto ambientalmente amigável da técnica, uma vez que, biossorventes são fases extratores verdes de origem natural, renovável e biodegradável. Desde então, biossorventes têm sido utilizados com êxito em nosso grupo em diferentes técnicas de microextração. Devido a isso, neste trabalho, foi proposto o uso de um

novo biossorvente, a bráctea da *Araucária angustifolia* (Bertol.) O. Kuntze, como fase extratora para SPME. A bráctea foi escolhida por ser um material lignocelulósico facilmente encontrado na região sul do Brasil que não tem finalidade definida, sendo normalmente descartada. E por ser um material lignocelulósico constituído majoritariamente de lignina, hemicelulose e celulose. Essas macromoléculas possuem em sua estrutura grupos químicos polares e apolares capazes de interagir com uma grande diversidade de compostos (Madrid e Cámara, 1997).

Dessa forma, este trabalho propôs o desenvolvimento, validação e aplicação de metodologias que empreguem a bráctea da *Araucária angustifolia* como fase extratora alternativa para SPME para determinação de agrotóxicos organoclorados e de contaminantes multiclasses em amostras de água e para determinação de hormônios estrogênicos em amostras de urina humana.

CAPÍTULO II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PREPARO DE AMOSTRAS

Tipicamente, o procedimento analítico para avaliação de amostras complexas consiste em uma série de etapas, incluindo definição do problema, amostragem, preparo de amostras, separação, identificação e quantificação, validação analítica, avaliação dos resultados e tomadas de decisões (Pawliszyn, 2012). Dentre essas, o preparo de amostras é uma das etapas mais laboriosas e fundamentais para o desenvolvimento de métodos com sensibilidade e seletividade analítica adequadas (Laaks *et al.*, 2012).

O preparo de amostras consiste em um procedimento de extração que resulta no isolamento e enriquecimento de componentes de interesse de uma matriz (Rezaee *et al.*, 2006). Esse é empregado antes das análises instrumentais, pois apesar dos avanços da tecnologia no campo analítico, a maioria dos instrumentos ainda não pode operar diretamente com matrizes complexas (Rezaee *et al.*, 2006).

Dessa forma, os principais objetivos do preparo de amostras são remoção dos componentes da matriz que interferem na separação e/ou detecção, o enriquecimento do analito, aumentando a sensibilidade do método, e, por fim, a conversão do analito numa forma adequada para a separação e detecção (Laaks *et al.*, 2012). Idealmente, a técnica de preparo de amostras deve ser rápida, de baixo custo, de fácil execução e ser compatível com o instrumento analítico (Borges *et al.*, 2015).

Diversas técnicas de preparo de amostras vêm sendo desenvolvidos para proporcionar determinações eficientes em amostras com diferentes graus de complexidade. Dentre as diversas técnicas existentes, deve-se considerar uma série de fatores para a escolha da mais adequada. É de fundamental importância a obtenção de uma boa combinação entre a técnica escolhida e a instrumentação analítica empregada. Além disso, é necessário avaliar as propriedades físico-químicas dos constituintes da amostra (analitos, interferentes, matriz), tais como a polaridade, solubilidade, estabilidade química e térmica, entre outros (Pawliszyn, 2012; Borges *et al.*, 2015).

As técnicas de preparo de amostras podem ser divididas entre técnicas clássicas e modernas, nas quais essas últimas envolvem as técnicas de microextração.

2.1.1 Técnicas clássicas de preparo de amostra

Dentre as técnicas clássicas de preparo de amostras mais difundidas, destacam-se a LLE e a SPE. A LLE é amplamente empregada no preparo de amostras líquidas ou solúveis. Essa técnica fundamenta-se na partição de um analito que possui diferentes solubilidades entre duas fases imiscíveis, sendo uma fase orgânica e outra fase aquosa. No procedimento experimental envolvendo a LLE, um solvente orgânico é misturado à amostra, posteriormente, essa mistura é agitada e, após um curto período, ocorre a separação de duas fases. Quando necessário, esse procedimento deverá ser repetido usando novas alíquotas do solvente orgânico. Dentre as vantagens dessa técnica, destacam-se a simplicidade e o fácil manuseio do sistema de extração. Por outro lado, as desvantagens incluem a probabilidade de formação de emulsões, resultando em grande consumo de tempo, e também as amostras com alta afinidade pela água podem ser parcialmente extraídas pelo solvente orgânico, resultando em perda do analito. Em adição, a principal desvantagem da LLE é a necessidade de utilizar grande quantidade de solventes orgânicos tóxicos, muitas vezes com subsequente evaporação para uma concentração significativa do analito. Dessa forma, essa técnica resulta em quantidades significativas de resíduos que são prejudiciais ao meio ambiente, além de expor o analista a compostos tóxicos (Queiroz *et al.*, 2001; Bidari *et al.*, 2011; Guo e Lee, 2011; Borges *et al.*, 2015)

A SPE é outra técnica clássica de preparo de amostra que tem sido amplamente empregada, principalmente para extração de amostras líquidas e fluidas, mas também pode ser utilizada para amostras sólidas pré-extraídas por solventes. A SPE é uma técnica de extração líquido-sólido, e em sua forma mais comum, emprega fases sólidas, denominadas sorventes, recheadas em cartuchos. Em geral, o procedimento experimental relacionado à SPE pode ser dividido em quatro etapas: (1) condicionamento do sorvente com solvente adequado; (2) introdução da amostra no cartucho para retenção dos analitos e às vezes de alguns interferentes; (3) limpeza da coluna para retirar os interferentes da matriz menos retidos que o analito e (4) eluição e coleta do analito (Queiroz *et al.*, 2001; Borges *et al.*, 2015). A SPE utiliza menores quantidades de solventes orgânicos quando comparada à LLE, além de não haver formação de emulsões, porém, apresenta como principais desvantagens os altos custos dos cartuchos e dos dispositivos comerciais. Além disso, os cartuchos são utilizados uma única vez, o que gera grande quantidade de resíduos (Nováková e Vlčková, 2009).

Em adição, tanto a LLE quando a SPE envolvem várias etapas para sua execução, o que as torna laboriosas, demoradas e propensas a perdas de analito e maior probabilidade de erros (Laaks *et al.*, 2012).

2.1.2 Técnicas de microextração

Tendências recentes de preparo de amostra enfatizam a importância da simplificação e miniaturização das técnicas clássicas, reduzindo a quantidade de amostra, o volume de solventes orgânicos utilizados e também visando a diminuição dos custos de análise, para incentivar o uso de alternativas ambientalmente amigáveis (Huang e Lee, 2012). Diante disso, várias técnicas de microextração estão ganhando espaço nos laboratórios de análises desde que foram desenvolvidas pela primeira vez na década de 1990 (Zgoła-Grześkowiak e Grześkowiak, 2011). Essas técnicas foram desenvolvidas não apenas para atender à necessidade de redução no uso de solventes, quantidade de amostras e custo das análises, mas também para explorar a capacidade dessa abordagem para tornar o preparo de amostra mais simples, rápido e permitir o acoplamento com uma variedade de instrumentação analítica (Pawliszyn, 2012).

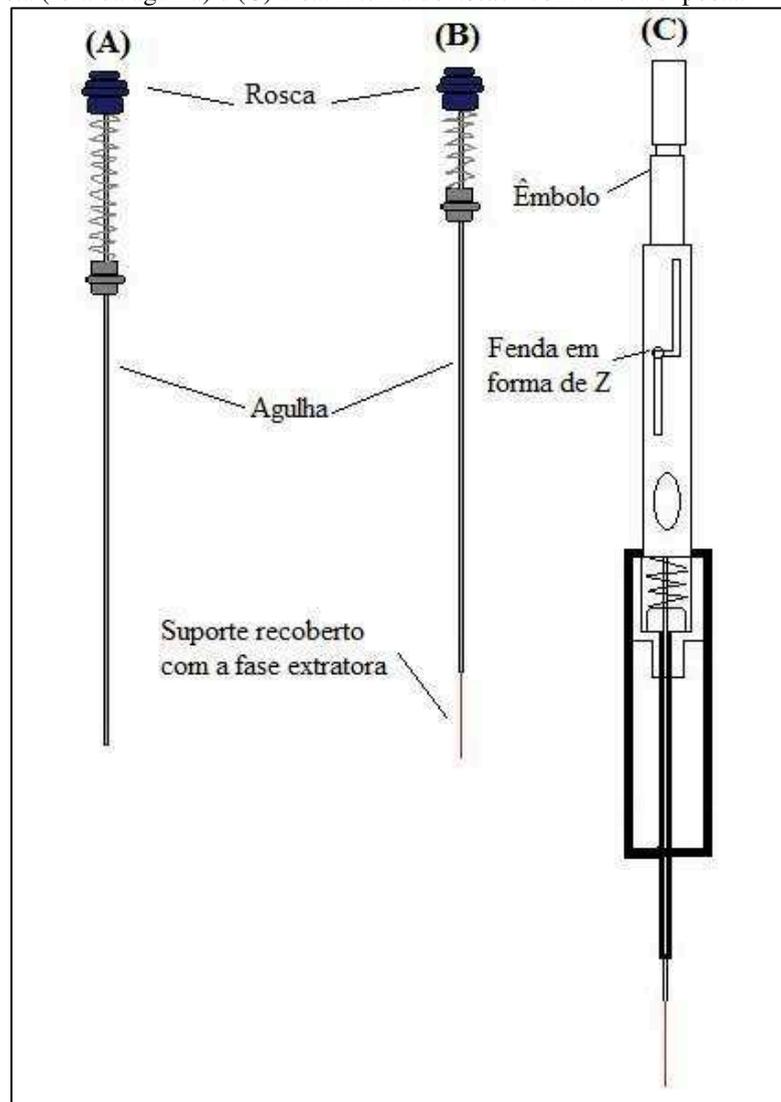
Exemplos de técnicas de microextração incluem a SPME, a extração sortiva em barra de agitação (SBSE do inglês, *Stir Bar Sorptive Extraction*), a microextração em filme fino (TF-SPME, do inglês *Thin-Film Microextraction*), a microextração adsortiva em barra (BA μ E do inglês, *Bar Adsorptive Microextraction*), a extração em ponteira descartável (DPX do inglês, *Disposable Pipette Extraction*), a extração sortiva em disco rotativo (RDSE do inglês *Rotating-Disk Sorptive Extraction*), a microextração líquido-líquido (LPME do inglês *Liquid Phase Microextraction*), a microextração em gota única (SDME, do inglês *Single Drop Microextraction*) e a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME, do inglês *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*). Dentre essas, a SPME foi utilizada no presente estudo, em duas configurações diferentes, que são a fibra da SPME e o filme fino da TF-SPME.

2.2 MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA – SPME

A SPME é uma técnica de preparo de amostra miniaturizada proposta por Pawliszyn e colaboradores no começo dos anos 1990 (Arthur e Pawliszyn, 1990) como uma alternativa livre de solventes e ambientalmente amigável às técnicas clássicas.

O dispositivo básico de SPME, denominado fibra, consiste em um suporte cilíndrico, de 1 ou 2 cm de comprimento, recoberto com uma fina camada de fase extratora (Balasubramanian e Panigrahi, 2011). O suporte tradicionalmente utilizado é de sílica fundida, mas também existem suportes de *Stableflex* e liga metálica. A fase extratora utilizada pode ser um material polimérico ou um sorvente sólido (Pawliszyn, 1999). A fibra de SPME é protegida dentro de um tubo capilar hipodérmico de aço inoxidável, denominado agulha, como ilustrado na Figura 1. Esse dispositivo, que não pode ser manipulado diretamente, possui uma rosca em sua extremidade para possibilitar seu acoplamento a um aplicador para amostragem manual, denominado *holder*. Um desenho do dispositivo completo pode ser verificado na Figura 1-C

Figura 1. (A) Dispositivo da fibra de SPME com a fibra recolhida (dentro da agulha), (B) dispositivo da fibra de SPME com a fibra exposta (fora da agulha) e (C) vista interna do *holder* com a fibra exposta.

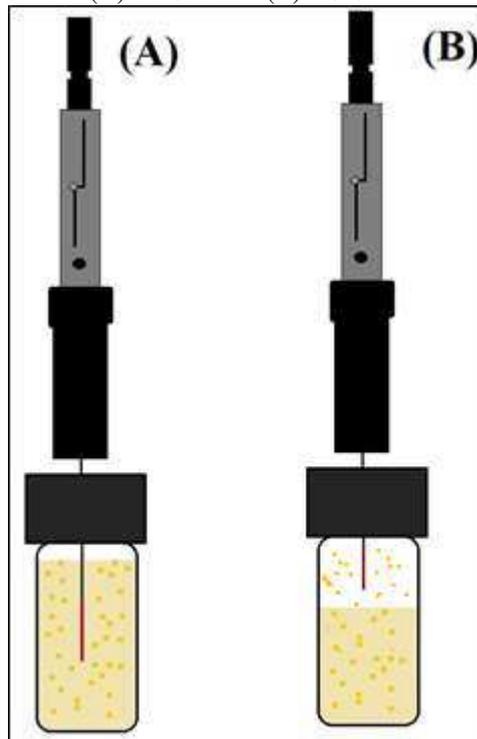


Fonte: Adaptado de (Valente e Augusto, 2000).

Através de um sistema tipo êmbolo, o *holder* permite que a fibra seja exposta ou retraída nas etapas de extração e dessorção do método. Na Figura 1-C é mostrado que no corpo do amostrador existe uma fenda em forma de “Z”, na qual corre um pino que, preso ao êmbolo, guia o seu deslocamento. No movimento de exposição da fibra, quando o pino atinge o corte transversal da fenda, um pequeno giro do êmbolo trava a fibra na posição exposta (Valente e Augusto, 2000).

Existem dois modos de extração mais comumente utilizados na SPME, o modo de imersão direta (DI, do inglês *Direct Immersion*) e o *headspace* (HS). A Figura 2 ilustra as diferenças entre esses modos. No modo DI-SPME (Figura 2-A), a fibra de SPME é inserida na amostra e os analitos são transportados diretamente da amostra para a fase extratora. Enquanto no modo HS-SPME (Figura 2-B), a fibra é inserida no espaço vazio acima da amostra. Desta forma, é estabelecido um equilíbrio entre a matriz da amostra, o espaço superior acima da amostra e a fase extratora da fibra de SPME (Pawliszyn, 2012).

Figura 2. Modos de extração em SPME: (A) DI-SPME e (B) HS-SPME.



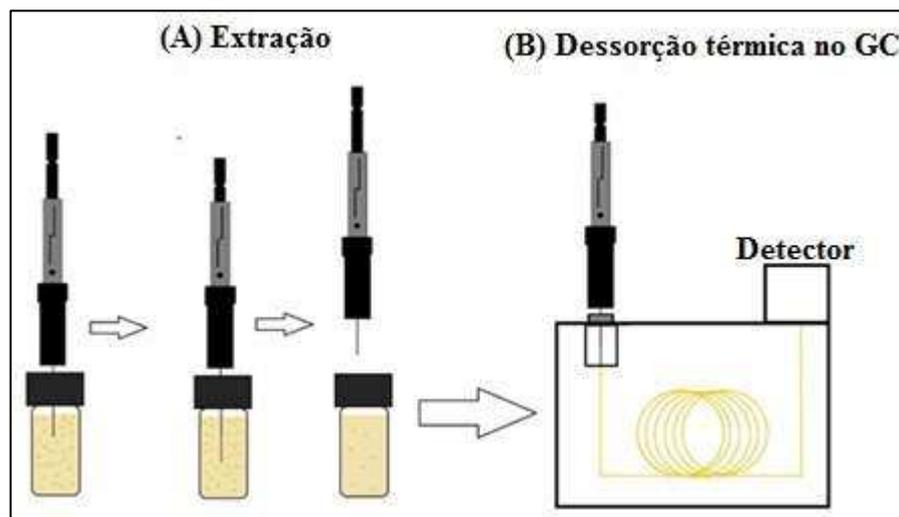
Fonte: Autoria própria.

O procedimento experimental da SPME inclui duas etapas. Na primeira, ocorre a extração e o enriquecimento dos analitos no recobrimento da fibra e na segunda etapa, ocorre a dessorção dos analitos que estão concentrados na fibra de SPME. A etapa de dessorção pode

ser térmica, quando se utiliza como técnica de separação a cromatografia gasosa (GC, do inglês *Gas Chromatography*), ou realizada mediante dessorção em um solvente, quando se utiliza a cromatografia líquida (LC, do inglês *Liquid Chromatography*). Na primeira etapa, com a fibra retraída na agulha, o septo do frasco de extração contendo a amostra é perfurado, e a fibra é exposta diretamente na amostra ou no seu *headspace*. Após atingir o tempo necessário para extração, a fibra é retraída para o interior da agulha e retirada do frasco. Essa etapa usualmente é realizada sob agitação constante. Na segunda etapa, quando se utiliza o GC, a agulha é inserida no injetor do GC e a fibra exposta para que ocorra a dessorção térmica dos analitos, terminada a dessorção, a fibra é retraída e a agulha retirada do injetor. Depois disso, a fibra está pronta para uma próxima extração (Alpendurada, 2000; Valente e Augusto, 2000). A sequência de procedimentos para a realização da extração, no modo DI-SPME, e da dessorção, utilizando o GC, é mostrada na Figura 3.

No caso da utilização da dessorção líquida, o sistema *in-tube* SPME foi desenvolvido em conjunto com a LC para a automação das análises SPME/LC (Eisert e Pawliszyn, 1997). O sistema *in-tube* SPME/LC pode ser montado fixando um capilar de sílica fundida aberto, revestido internamente com a fase extratora (ou uma coluna capilar de cromatografia gasosa), entre a alça de amostragem e a agulha do injetor automático do LC ou, simplesmente, substituindo a alça de amostragem (Queiroz, 2009).

Figura 3. Etapas do processo de microextração em fase sólida: (A) extração dos analitos e (B) dessorção térmica no GC.



Fonte: Adaptado de (Valente e Augusto, 2000).

As vantagens do uso de SPME incluem simplicidade de operação, reutilização das fibras extratoras, possibilidade de automação das análises, fácil acoplamento com cromatografia e extrações mais rápidas quando comparadas às técnicas tradicionais de preparo de amostra, já que envolve, em apenas duas etapas, a extração, enriquecimento e dessorção dos analitos no sistema de separação e detecção (Lord e Pawliszyn, 2000; Li, *et al.*, 2015). Além disso, os erros e perdas dos analitos são minimizados quando comparado aos processos com várias etapas (Ouyang e Pawliszyn, 2006).

2.2.1 Aspectos teóricos da SPME

Ao contrário das técnicas clássicas de preparo de amostra, a SPME é uma técnica não exaustiva, isto é, apenas uma pequena quantidade do analito é extraída da matriz. Assim, essa técnica é baseada no equilíbrio de partição, quando se usa recobrimentos líquidos, ou de adsorção, quando utiliza-se recobrimentos sólidos, do analito, entre matriz e a fase extratora (Lord e Pawliszyn, 2000; Ouyang e Pawliszyn, 2006). Para cada modo de extração empregado há um sistema de equilíbrio. Neste trabalho foi utilizado somente o modo de extração DI-SPME, que é considerado como um sistema bifásico, já que envolve duas fases, o recobrimento da fibra e a amostra. Portanto, serão apresentados nesta revisão bibliográfica somente os princípios referentes a esse modo de extração.

Em DI-SPME, o processo de extração é considerado completo quando a concentração do analito atinge o equilíbrio entre o recobrimento da fibra e a amostra (Pawliszyn, 2012).

O coeficiente de distribuição (K_{fs}) do analito entre o recobrimento da fibra e a amostra é descrito na equação (1).

$$C_{amostra} \rightleftharpoons C_{fibra} \quad K_{fs} = \frac{C_f^\infty}{C_s^\infty} \quad (1)$$

As condições de equilíbrio conforme a lei de conservação de massas para esse sistema, estão descritos na equação (2).

$$C_0 V_s = C_s^\infty V_s + C_f^\infty V_f \quad (2)$$

sendo:

C_0 = concentração inicial do analito

V_s = volume da amostra

C_s^∞ = concentração de equilíbrio na amostra

C_f^∞ = concentração de equilíbrio no recobrimento da fibra

V_f = volume do recobrimento da fibra

Rearranjando as equações (1) e (2) é possível determinar a equação (3), assim, é possível calcular a concentração de analito extraído pelo recobrimento (C_f^∞).

$$C_f^\infty = C_0 \frac{K_{fs}V_s}{K_{fs}V_f + V_s} \quad (3)$$

Através da equação (4), é possível relacionar a concentração, no equilíbrio, do analito no recobrimento da fibra (C_f^∞) com a quantidade de matéria do analito extraído pelo recobrimento no equilíbrio (n_f).

$$C_f^\infty = \frac{n_f}{V_f} \quad (4)$$

Rearranjando as equações (3) e (4), obtém-se a equação (5), que possibilita calcular a quantidade de matéria do analito extraído pelo recobrimento no equilíbrio (n_f).

$$n_f = C_0 \frac{K_{fs}V_s V_f}{K_{fs}V_f + V_s} \quad (5)$$

Em relação aos aspectos cinéticos da técnica, o tempo requerido para equilíbrio do analito entre o recobrimento da fibra e a amostra, t_e , no modo DI-SPME, depende apenas da espessura do revestimento da fibra (e), e do coeficiente de difusão do analito na fibra (D_f). Na condição de equilíbrio, o sistema fica estacionário, ou seja, o tempo de equilíbrio é definido como o tempo no qual a quantidade de analito extraída permanece constante e, corresponde, dentro do erro experimental, a quantidade extraída num tempo de extração infinito (Pawliszyn, 1999). O tempo para atingir o equilíbrio é infinitamente longo. Na prática, o tempo de equilíbrio é estabelecido, como a extração de 95% da quantidade de equilíbrio do analito, de acordo com a equação 6:

$$t_e = t_{95\%} = \frac{(e)^2}{2D_f} \quad (6)$$

sendo:

(e) = é a espessura do recobrimento.

D_f = coeficiente de difusão do analito no recobrimento

Assim, o tempo de equilíbrio (t_e) é proporcional à espessura do recobrimento da fibra (e) e inversamente proporcional ao coeficiente de difusão do analito na fibra (D_f). Sendo assim, aumentos na espessura do recobrimento, apesar de propiciar uma maior quantidade de analito retido pela fibra, gera maiores tempos de extração. (Valente e Augusto, 2000). No

entanto, se a sensibilidade analítica alcançada é suficiente para uma análise quantitativa, não é necessário alcançar o equilíbrio e pode-se trabalhar em condições de pré-equilíbrio, principalmente nos casos em que o tempo de extração é excessivamente longo.

2.2.2 Parâmetros a serem otimizados no desenvolvimento de métodos de SPME

A otimização dos parâmetros que afetam o procedimento de preparo de amostras é de fundamental importância para se obter resultados satisfatórios. A otimização visa maximizar a seletividade e sensibilidade do método, assim como minimizar o tempo de operação, manipulação da amostra e consumo de reagentes. As principais condições operacionais que devem ser otimizadas ou selecionadas no desenvolvimento de um método utilizando a SPME incluem o recobrimento fibra de SPME, o modo de extração, o tempo de extração, a velocidade de agitação da amostra, a temperatura de extração, a adição de sal e a variação do pH (Borges *et al.*, 2015).

2.2.2.1 Recobrimento da fibra de SPME

A eficiência da extração por SPME depende principalmente da escolha da fibra com recobrimento apropriado (Pawliszyn, 2012). Para isso, deve-se considerar, especialmente, a polaridade e a volatilidade dos analitos a serem avaliados, assim como a seletividade do recobrimento em relação aos analitos (Borges *et al.*, 2015). Tipicamente, na SPME utilizam-se fibras com diferentes recobrimentos para extrair uma ampla variedade de compostos, desde voláteis a não voláteis e apolares a polares. Como pode ser observado na Tabela 1, diversos tipos de fibras para SPME são disponíveis comercialmente, podendo exibir diferenças quanto a espessura, o tipo de recobrimento e o mecanismo de extração.

Como pode ser observado na Tabela 1, para análises em que os analitos possuem baixa polaridade, fibras recobertas com fases extratoras pouco polares, como o PDMS, são preferidas. Enquanto, se os analitos tiverem uma maior polaridade, o recobrimento de PA, que é uma fase polar, é preferido. Fibras com recobrimentos mistos, tais como DVB/Car/PDMS, PDMS/DVB e Car/PDMS são capazes de extrair efetivamente analitos com uma gama enorme de polaridades e volatilidades.

Em relação aos mecanismos de extração, nos baseados na absorção, as moléculas dos analitos cruzam a interface sorvente/matriz, se dissolvendo e se difundindo por todo volume do material extrator. Já nos mecanismos baseados por adsorção, as moléculas dos analitos são retidas por sítios ativos na superfície do sorvente ou no interior dos seus poros, os quais penetram por difusão. Em ambos os casos, o processo continua até que ocorra o equilíbrio entre o analito remanescente na amostra e/ou no *headspace* e a fase extratora (Pawliszyn, 2012).

O mecanismo de extração que atua sobre os recobrimentos mistos é referido como sendo de adsorção, pois, apesar desses recobrimentos serem dispersões de um sólido adsorvente em um polímero absorvente, foi observado que a contribuição do material absorvente é muito baixa na massa total extraída de analito, sendo a extração preponderantemente feita pelo adsorvente sólido presente (Borges *et al.*, 2015).

Tabela 1. Tipos de recobrimento das fibras de SPME disponíveis comercialmente.

Tipo de recobrimento	Espessura (μm)	Mecanismo de extração	Polaridade
Polidimetilsiloxano (PDMS)	7	Absorção	Apolar
PDMS	30	Absorção	Apolar
PDMS	100	Absorção	Apolar
Poliacrilato (PA)	85	Absorção	Polar
Divinilbenzeno/Carboxen/PDMS (DVB/Car/PDMS)	50/30	Adsorção	Polar/Apolar
PDMS/DVB	65	Adsorção	Polar/Apolar
Car/PDMS	85	Adsorção	Polar/Apolar

Fonte: (Pawliszyn, 2012).

Outro fator que deve ser considerado ao escolher a fibra de SPME a ser utilizada é a espessura do recobrimento da mesma. A esse respeito, quanto mais espesso for o recobrimento, mais lento é o atingimento do equilíbrio de extração, mas maior é a eficiência de extração no equilíbrio. Assim, se a sensibilidade e detectabilidade altas forem prioridades, fibras com recobrimentos mais espessos devem ser preferidas, por outro lado, análises mais rápidas, mas com limites de detecção mais altos, serão possíveis com fibras menos espessas (Borges *et al.*, 2015).

2.2.2.2 Seleção do modo de extração

Como já exposto anteriormente, existem dois modos de extração mais comumente usados em SPME, o DI-SPME e o HS-SPME. Esse parâmetro deve ser selecionado levando em consideração a pressão de vapor dos analitos e também a complexidade da amostra. O modo DI-SPME deve ser utilizado quando os analitos têm baixa pressão de vapor e/ou amostra não é danosa à fibra de SPME. Já o modo HS-SPME deve ser empregado quando os analitos têm alta pressão de vapor e/ou a amostra é danosa à fibra de SPME (Pawliszyn, 2012). É importante salientar que, se o analito tiver pressão de vapor suficientemente alta para se volatilizar, uma vez atingido o equilíbrio, a quantidade de analito extraída pelo recobrimento não depende de como esse se dispõe no sistema, isto é, se utilizar o modo de imersão direta, por exemplo, a quantidade de analito extraída seria exatamente a mesma se a extração fosse realizada no *headspace*, caso o volume de amostra, o recobrimento e as demais condições fossem as mesmas, o que iria alterar seria o tempo necessário para o equilíbrio ser atingido (Borges *et al.*, 2015).

2.2.2.3 Tempo de extração

O tempo de extração é um parâmetro muito importante a ser otimizado em procedimentos de SPME. Em tese, o tempo de extração deve ser ajustado para ser igual ou ligeiramente superior ao tempo de equilíbrio, considerando que, assim, a quantidade de analito extraída será a máxima possível e se manterá constante, sendo então proporcional à concentração do composto presente na amostra. Porém, como já exposto anteriormente nos aspectos cinéticos referentes à SPME, nem sempre é possível ou recomendado trabalhar em condições de equilíbrio, pois muitas vezes o tempo pode ser excessivamente longo, tornando inviável o procedimento experimental, sendo assim, pode-se trabalhar em condições de pré-equilíbrio. Em adição, essa variável sempre deve ser avaliada juntamente com outros parâmetros, a fim de se obter tempos de extrações mais curtos. Tempos de extração longos podem ser evitados, por exemplo, com o uso de agitação mecânica da amostra, temperaturas altas e/ou com a adição de um eletrólito forte na amostra (Dórea *et al.*, 2008).

2.2.2.4 Velocidade de agitação da amostra

No processo de extração, seja por absorção ou adsorção, o tempo necessário para que o equilíbrio seja atingido depende da velocidade que as moléculas dos analitos são transportadas para a fase extratora. Na ausência de agitação, o processo de transferência de massa é essencialmente por difusão, que é um processo essencialmente lento e levaria, na prática, a tempos de extração excessivamente longos. Dessa forma, para facilitar uma extração mais rápida, algum nível de agitação mecânica na amostra é necessário para transportar os analitos da solução para a vizinhança da fibra. Nessas condições, o transporte de moléculas dos analitos ocorre por convecção, que é muito mais rápido que a difusão. A agitação da amostra é tratada como perfeita, quando a amostra aquosa se move muito rapidamente em relação à fibra para que todas as moléculas se espalhem uniformemente pelo recobrimento, assim, quanto mais intensa a agitação do meio, mais rápida é a convecção e mais rapidamente é atingindo o equilíbrio de extração (Pawliszyn, 1999; Pawliszyn, 2012; Borges *et al.*, 2015).

2.2.2.5 Temperatura de extração

A variação da temperatura de extração afeta tanto a posição dos equilíbrios, quanto a velocidade com que eles são atingidos. Em relação à cinética das extrações, ao se aumentar a temperatura, aumenta-se a difusão dos analitos para a fase extratora, e, portanto, equilíbrios são atingidos mais rapidamente.

Em relação ao efeito do aumento da temperatura sobre as posições no equilíbrio, se a temperatura da amostra e da fibra muda de T_0 para T , o coeficiente de distribuição (K_{fs}) muda de acordo com a seguinte equação:

$$k_{fs} = k_0 \exp \left[\frac{-\Delta H}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right) \right] \quad (7)$$

sendo:

K_0 = é a constante de distribuição quando a fibra e a amostra estão em temperaturas T_0 (em Kelvin).

ΔH = é a alteração na entalpia molar do analito quando ele passa da amostra para o recobrimento da fibra.

R = constante universal dos gases.

Quando o valor de K_{fs} do analito é maior do que 1, o analito tem uma energia potencial menor no revestimento da fibra do que na amostra, de modo que a partição (ou adsorção) do analito na fibra deve ser exotérmica. Portanto, de acordo com a Equação (6), o aumento da temperatura irá diminuir K_{fs} , ou seja, diminuirá a sorção do analito pela fase extratora (Pawliszyn, 2012).

No entanto, o efeito global do aumento da temperatura da extração é de difícil previsão e pode ter comportamentos diferentes, mesmo pra espécies com estruturas químicas similares, dessa forma, é de fundamental importância uma otimização adequada da temperatura de extração em um procedimento de SPME (Borges *et al.*, 2015).

2.2.2.6 Adição de sal

A adição de eletrólitos fortes em amostras aquosas, que geralmente é realizada utilizando cloreto de sódio (NaCl), pode causar o chamado efeito *salting-out*, no qual os íons Na^+ e Cl^- são solvatados pelas moléculas de água, deixando-as menos disponíveis para solubilizar os analitos, viabilizando então a migração desses para o recobrimento extrator da fibra (Ulrich, 2000; Oliveira *et al.*, 2008; Pawliszyn, 2012; Silva *et al.*, 2013).

O efeito da adição de sal na SPME não foi examinado teoricamente, e tem sido determinado somente por experimentação. Geralmente, para compostos com polaridade intermediária a alta, a adição de NaCl normalmente aumenta a eficiência de extração. Já para compostos pouco polares, que já apresentam baixa solubilidade em amostra aquosa, a adição de NaCl pode diminuir a eficiência de extração. Nesse caso, pode acontecer chamado efeito *oil effect*, no qual os compostos podem ser repelidos para a interface água/*headspace* e não podem interagir com a fibra imersa na amostra. A redução da solubilidade dos compostos, pode também resultar em uma precipitação ou adsorção desses nas paredes de vidro do frasco que contém a amostra. A adição de sal num procedimento de SPME pode ser usada não somente para aumentar a eficiência de extração, mas também para normalizar a concentração de sal em matrizes naturais (Flórez Menéndez *et al.*, 2004; Pawliszyn, 2012).

2.2.2.7 Variação do pH

Em amostras aquosas, o pH do meio pode afetar a posição do equilíbrio de extração. Em teoria, somente a forma não dissociada de um composto pode ser extraída pelo revestimento

da fibra, portanto, deve-se ajustar o pH da amostra somente quando os analitos tiverem caráter ácido ou básico. Assim, para a análise de espécies ácidas, o pH da amostra deve ser ao menos duas unidades abaixo do pKa dos analitos estudados, já para espécies básicas, o pH deve ser no mínimo duas unidades acima do pKa, considerando que assim, a formas neutras dos compostos predominará (Pawliszyn, 2012; Borges *et al.*, 2015).

2.2.3 Desenvolvimento de novos suportes e recobrimentos para SPME

Apesar de todas as vantagens associadas ao uso da SPME, algumas desvantagens dessa técnica podem ser associadas à fragilidade do suporte de sílica fundida. Esse suporte é tradicionalmente utilizado em fibras de SPME comerciais, porém, em vista de sua fragilidade, o uso de materiais mais resistentes e flexíveis foi introduzido no mercado. Fibras começaram a ser comercializadas com suporte de *Stableflex* e de ligas metálicas, o que as tornaram bem mais duráveis em relação ao suporte tradicional, no entanto, os custos dessas fibras é cerca de 30 a 40% maior (Borges *et al.*, 2015). Desse modo, o elevado custo das fibras comerciais pode ser um empecilho para alguns laboratórios, assim, o desenvolvimento de novos materiais como suporte e recobrimentos para fibras de SPME faz-se necessário.

A liga de níquel e titânio (nitinol) tem sido relatada como alternativa para substituir os suportes comerciais (Budziak *et al.*, 2008; Di Pietro Roux *et al.*, 2016). Nitinol exhibe algumas vantagens, incluindo durabilidade, resistência à corrosão, memória de forma e superelasticidade, que faz com que a fibra mantenha sua integridade mesmo após aplicação de força mecânica excessiva, dessa forma, é possível dobrá-la sem que haja quebra da mesma (Tan e Crone, 2002; Di Pietro Roux *et al.*, 2016).

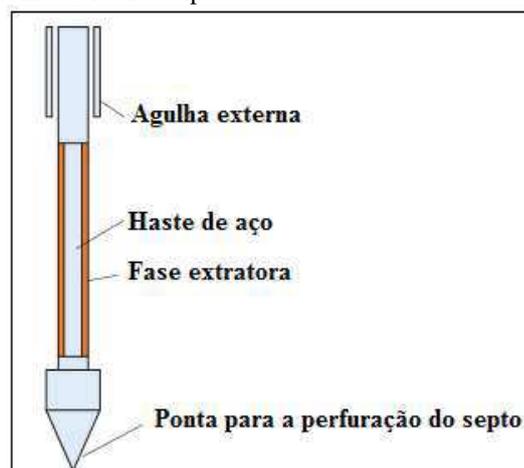
Além disso, diversos materiais têm sido desenvolvidos como revestimentos sorventes para fibras de SPME, como o carbono ativado (Zeng *et al.*, 2008; Carrera *et al.*, 2016), polímeros molecularmente impressos (MIPs, do inglês *Molecular Imprinted Polymers*) (Hu *et al.*, 2012; Mirzajani *et al.*, 2017), líquidos iônicos poliméricos (PIL, do inglês *Polymeric Ionic Liquids*) (Merib *et al.*, 2016; Yu *et al.*, 2016), nanomateriais (Romero *et al.*, 2011; Vatani e Sarafraz Yazdi, 2014) e biosorventes (Dias *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2013; Reinert *et al.*, 2018).

2.2.4 Desenvolvimento de novas configurações para SPME

A eficiência de extração da SPME, além de depender das interações da fase extratora com os analitos, depende também, em grande parte, das propriedades físicas do revestimento, incluindo a porosidade, área específica e espessura. Dessa forma, a sensibilidade dessa técnica pode ser melhorada aumentando o volume da fase extratora, no entanto, com esse aumento, é necessário um tempo de equilíbrio mais longo, impulsionado pela difusão de analitos para o recobrimento da fibra (Jiang e Pawliszyn, 2012; Wang *et al.*, 2017). Por conseguinte, várias configurações vêm sendo desenvolvidas com o intuito de aumentar a eficiência de extração da técnica e também obter extrações mais rápidas (Piri-Moghadam *et al.*, 2017).

Helin *et al.* (Helin *et al.*, 2015) introduziu a SPME seta, que contém um volume maior de sorvente comparado à fibra tradicional de SPME. A Figura 4 apresenta uma imagem desse dispositivo. Nesse estudo, os autores propuseram essa nova configuração de SPME pra determinação de alquilaminas voláteis no ar atmosférico e em águas residuais, utilizando o GC-MS para separação e detecção dos compostos. Os recobrimentos utilizados na SPME seta foram de PDMS/Car (100 μm), PDMS/Carbon WR (PDMS/Car WR, 100 μm), PA (125 μm) e PDMS (250 μm). O método desenvolvido com a fibra de PDMS/Car foi comparado com um método otimizado utilizando a fibra de SPME tradicional com recobrimento de DVB/Car/PDMS (50/30 μm). Nessa comparação, a SPME seta apresentou melhor robustez e sensibilidade, demonstrando sua capacidade de fornecer uma eficiência de extração mais elevada.

Figura 4. Sistema SPME seta com o sorvente exposto.



Fonte: (Helin *et al.*, 2015).

Piri-Moghadam *et al.* (Piri-Moghadam *et al.*, 2016) introduziu uma fibra miniaturizada de SPME, também chamada de ponta revestida, para extração rápida de compostos em matrizes

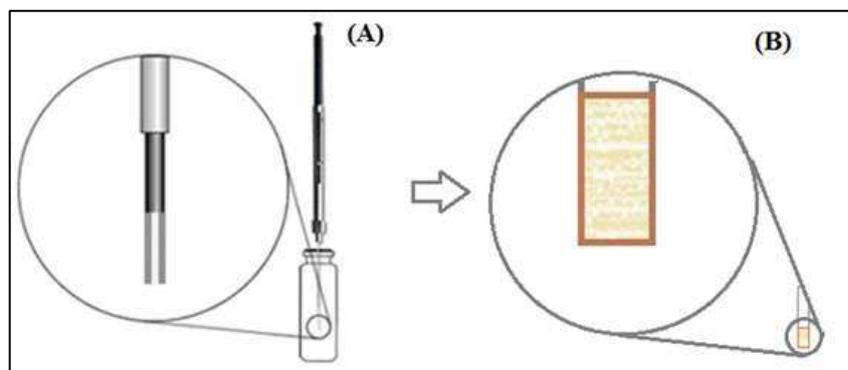
complexas. Esse dispositivo consiste em uma míni-ponta de aço inoxidável revestida com polipirrol. Utilizando revestimentos muito finos ($<5 \mu\text{m}$), um tempo muito curto de equilíbrio, de até 2 min, pôde ser alcançado na determinação de drogas de abuso em amostras de urina.

Ademais, como uma nova geometria para SPME, a TF-SPME foi introduzida em 2003 por Bruheim e colaboradores (Bruheim *et al.*, 2003) com o objetivo de aumentar a sensibilidade da técnica. Considerando que a TF-SPME foi utilizada no presente estudo, será dada uma atenção maior à essa configuração nesta revisão bibliográfica.

2.3 MICROEXTRAÇÃO EM FILME FINO – TF-SPME

A principal diferença entre a TF-SPME e a SPME tradicional é que um volume maior de fase extratora com uma área de superfície maior é usada na TF-SPME. Isso é devido a uma mudança da geometria de haste cilíndrica da fibra de SPME para uma geometria plana retangular e em forma de uma película fina (Vuckovic *et al.*, 2012; Olcer *et al.*, 2019). A Figura 5 apresenta um esquema representando a mudança de geometria da SPME para a TF-SPME. Com essa nova configuração, o volume da fase de extratora aumenta enquanto a espessura do revestimento permanece constante ou até mais fina do que da fibra (Jiang e Pawliszyn, 2012). Devido a maior área superficial apresentada pela película fina em relação à fibra, é possível extrair uma maior quantidade de analitos em um menor período de tempo, portanto, uma maior eficiência de extração e sensibilidade podem ser alcançados sem sacrificar o tempo de análise. Os princípios fundamentais da SPME permanecem o mesmo, independentemente da configuração geométrica que é usada (Bruheim *et al.*, 2003; Jiang e Pawliszyn, 2012; Boyac *et al.*, 2016).

Figura 5. Representação da mudança da geometria de haste cilíndrica da SPME para a geometria plana retangular da TF-SPME.



Fonte: Autoria própria.

Conforme apresentado no item 2.2.1, o cálculo da quantidade de matéria de analito extraído na forma de imersão direta por SPME, se aplica também para a TF-SPME. Assim, é possível avaliar os parâmetros que são alterados conforme a equação 5:

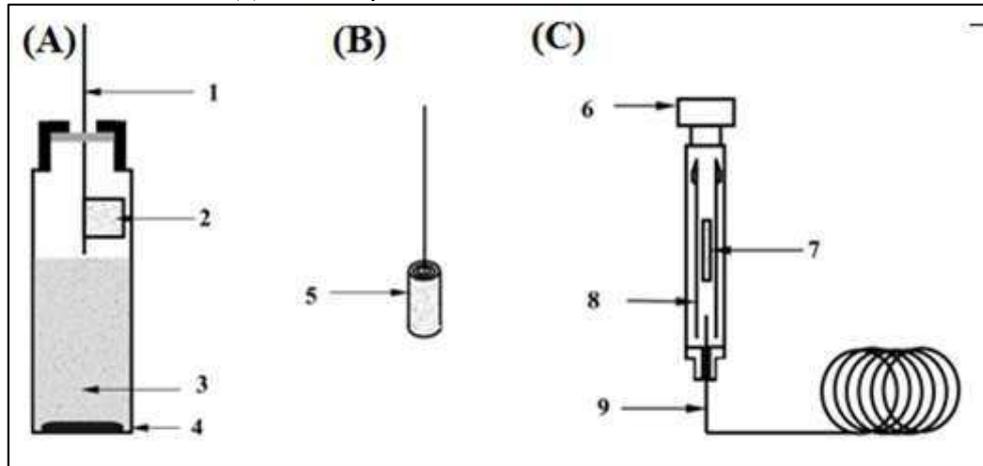
$$n_f = C_0 \frac{K_{fs} V_s V_f}{K_{fs} V_f + V_s} \quad (5)$$

Ao aumentar o volume da fase extratora, V_f , aumenta-se a quantidade de mols de analito extraído pelo recobrimento, o que é representado pela proporcionalidade do n_f e também da concentração inicial do analito na amostra, C_0 , provando a melhora na eficiência da extração e também demonstrando a quantificação da técnica.

O procedimento experimental utilizado na TF-SPME, assim como na SPME tradicional, consiste em duas etapas, na primeira ocorre a extração e o enriquecimento dos analitos na fase extratora e na segunda ocorre a dessorção dos analitos para posterior análise no sistema de separação e detecção. No processo de extração, o filme fino pode ser inserido diretamente na amostra ou no seu *headspace*, dependendo da pressão de vapor dos analitos e da complexidade da amostra. Os parâmetros operacionais a serem considerados utilizando os filmes finos são os mesmos que para a SPME utilizando a fibra, ou seja, escolha da fase extratora, modo de extração, velocidade de agitação, tempo de extração, temperatura de extração, adição de sal e variação do pH da amostra.

A TF-SPME é usada em vários formatos de amostragem. O primeiro formato desenvolvido (Bruheim *et al.*, 2003) consistiu em utilizar uma fina folha de membrana de PDMS fixada a uma haste de aço inoxidável. Na Figura 6 é mostrado um esquema da configuração experimental utilizada nesse estudo. A haste recoberta com a membrana foi posicionada dentro do recipiente de amostra, como mostrado na Figura 6-A e as extrações foram realizadas sob agitação constante. Após a extração, a membrana foi enrolada em torno da haste (Figura 6-B) e colocada no injetor do GC para dessorção térmica dos analitos (Figura 6-C). Nesse estudo, os autores compararam o filme fino de PDMS com uma fibra de SPME revestida com o mesmo recobrimento para determinação de analitos semivoláteis, nos modos direto e *headspace* e o filme fino mostrou taxas de extração muito mais elevadas em relação à fibra, sem sacrificar o tempo de análise. Na extração direta foi encontrada uma relação linear entre a taxa de extração e a área superficial da fase extratora. No entanto, para extrações no *headspace*, as taxas foram um pouco menores, provavelmente devido à resistência de transporte do analito na barreira matriz/*headspace*. Verificou-se que o efeito dessa barreira pôde ser reduzido aumentando, por exemplo, a agitação e a temperatura da amostra.

Figura 6. Esquema da configuração experimental para TF-SPME (extração no *headspace*) utilizada por (Bruheim *et al.*, 2003). Legenda: (1) haste de aço inoxidável (2) filme fino de membrana polimérica (3) amostra aquosa (4) barra de agitação magnética (5) membrana enrolada (6) entrada do injetor (7) membrana enrolada no injetor do GC (8) revestimento de vidro e (9) coluna capilar.



Fonte: (Bruheim *et al.*, 2003).

Desde o seu desenvolvimento, vários outros formatos de TF-SPME foram propostos (Jiang e Pawliszyn, 2012). O formato mais simples consiste em colocar o filme fino diretamente na matriz da amostra (Chen, 2011) ou no seu *headspace* (Golding *et al.*, 2009). Ou então, as fases extratoras podem ser revestidas em suportes de tecido (Grandy *et al.*, 2016), aço inoxidável (chamado de lâmina) (Cudjoe *et al.*, 2009) e contrapino (Riazi Kermani, 2012). Geralmente, esses suportes são fixados à tampa dos frascos que contêm a amostra.

Em relação aos recobrimentos utilizados, existe um filme fino comercialmente disponível de PDMS (127 μ m). Desse modo, há uma série de estudos desenvolvidos que utilizaram esse recobrimento como fase extratora para TF-SPME (Qin *et al.*, 2009; Qin *et al.*, 2010; Jiang e Pawliszyn, 2012). Filmes finos de fase mista também foram preparados para determinação de compostos com diferentes volatilidades e polaridades (Hu *et al.*, 2005). Além disso, diversos filmes finos foram desenvolvidos com diferentes recobrimentos, como nanofibra de poliimida (Li *et al.*, 2015), nanopartículas supermagnéticas (Li *et al.*, 2016), membranas de grafeno (Romero *et al.*, 2016), C18 (Ahmadi *et al.*, 2017) e biossorventes (Kirschner *et al.*, 2017).

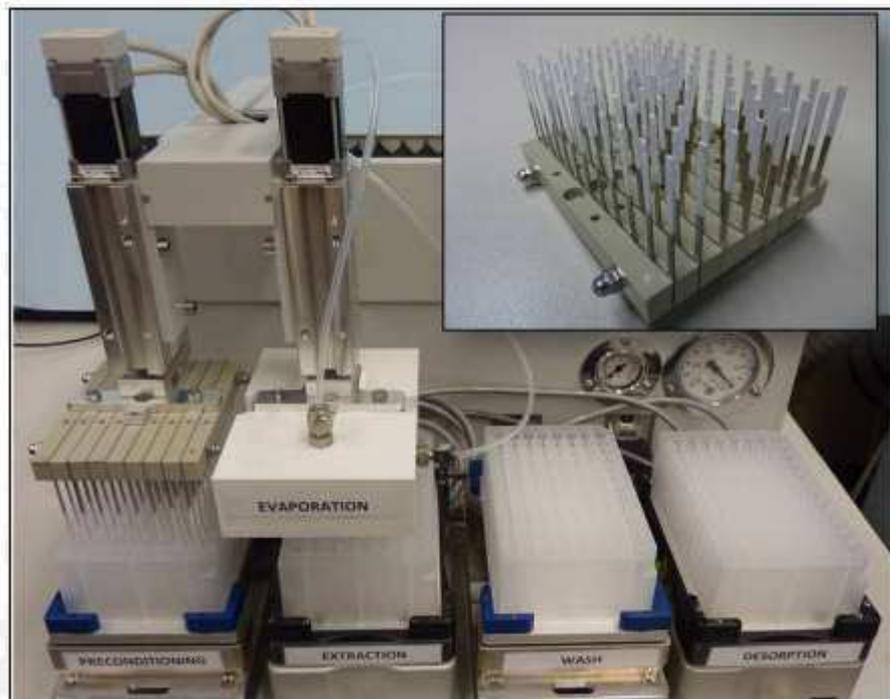
2.3.1 TF-SPME acoplada ao sistema 96-well plate

Um dos desenvolvimentos recentes da TF-SPME é sua associação com o sistema 96-well plate, que pode ser utilizado em conjunto com a cromatografia líquida de alta eficiência

(HPLC, do inglês *High-Performance Liquid Chromatography*) (Cudjoe *et al.*, 2009; Mirnaghi *et al.*, 2012; Kueseng e Pawliszyn, 2013). Esse sistema é composto por um amostrador, que pode ser automático ou semiautomático, que permite a realização simultânea de extrações, e posterior dessorções, de até 96 amostras (Hutchinson *et al.*, 2007).

A introdução desse sistema em conjunto com uma técnica de preparo de amostra, a SPE, foi realizada em 1996 (Kaye *et al.*, 1996), e desde então, diferentes sistemas *96-well plate* têm sido comercializadas a fim de serem operados sem nenhuma intervenção humana. Uma imagem que ilustra um sistema completamente automatizado de preparo de amostra disponível comercialmente (Professional Analytical Systems Technology, Magdala, Germany) é mostrada na Figura 7, no qual consiste em quatro agitadores que acomodam placas de *96-well plate*, cada uma usada em etapas subsequentes de um processo analítico, incluindo condicionamento, extração, limpeza e dessorção no sistema cromatográfico. Além disso, esse dispositivo contém um sistema de evaporação que permite a reconstituição opcional do extrato para concentração de analitos. Esse sistema totalmente automatizado foi utilizado em um estudo em que os autores utilizaram o *96-well plate* em conjunto com a TF-SPME e HPLC para a análise de alto rendimento de 110 compostos de dopagem em urina (Boyac *et al.*, 2014).

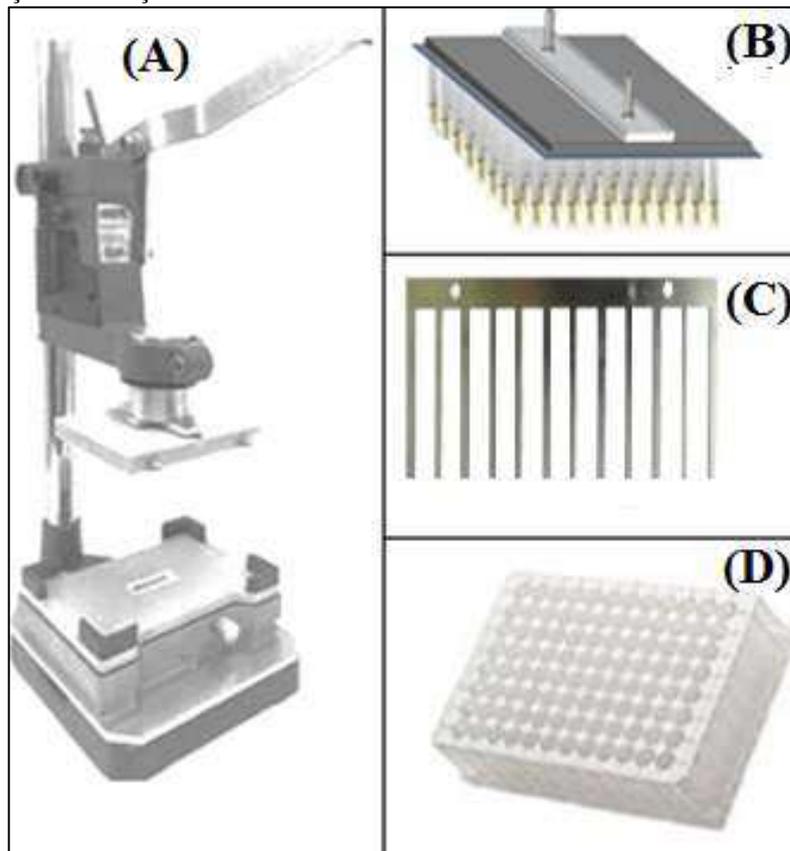
Figura 7. Dispositivo de *96-well plate* automatizado utilizado por (Boyac *et al.*, 2014) em conjunto com a TF-SPME e HPLC.



Fonte: (Boyac *et al.*, 2014).

Dispositivos semiautomáticos mais simples e economicamente acessíveis para o sistema *96-well plate* também são comercializados, porém não permitem a integração das etapas de preparo de amostra ao sistema cromatográfico e cada etapa deve ser processada individualmente, com o auxílio de um operador. Um sistema de *96-well plate* semiautomático foi utilizado no presente estudo. Uma representação dos constituintes desse sistema é mostrada na Figura 8. Esse sistema é composto por um amostrador (Figura 8-A), que é composto por um agitador orbital. Nesse amostrador é possível acoplar uma escova (Figura 8-B) que tem capacidade para 8 pentes de aço inoxidável (Figura 8-C), e cada pente possui 12 lâminas para colocação da fase extratora. Além disso, o sistema é composto por 96 poços de extração (Figura 8-D) que possui volume de 2 mL e 96 poços de dessorção com volume de 0,5 mL.

Figura 8. Principais partes constituintes da TF-SPME acoplada ao sistema *96-well plate* (A) amostrador Manual de *96-well plate* com agitador embutido (B) escova contendo as 96 lâminas (C) pentes de aço inoxidável contendo 12 lâminas e (D) poços de extração.

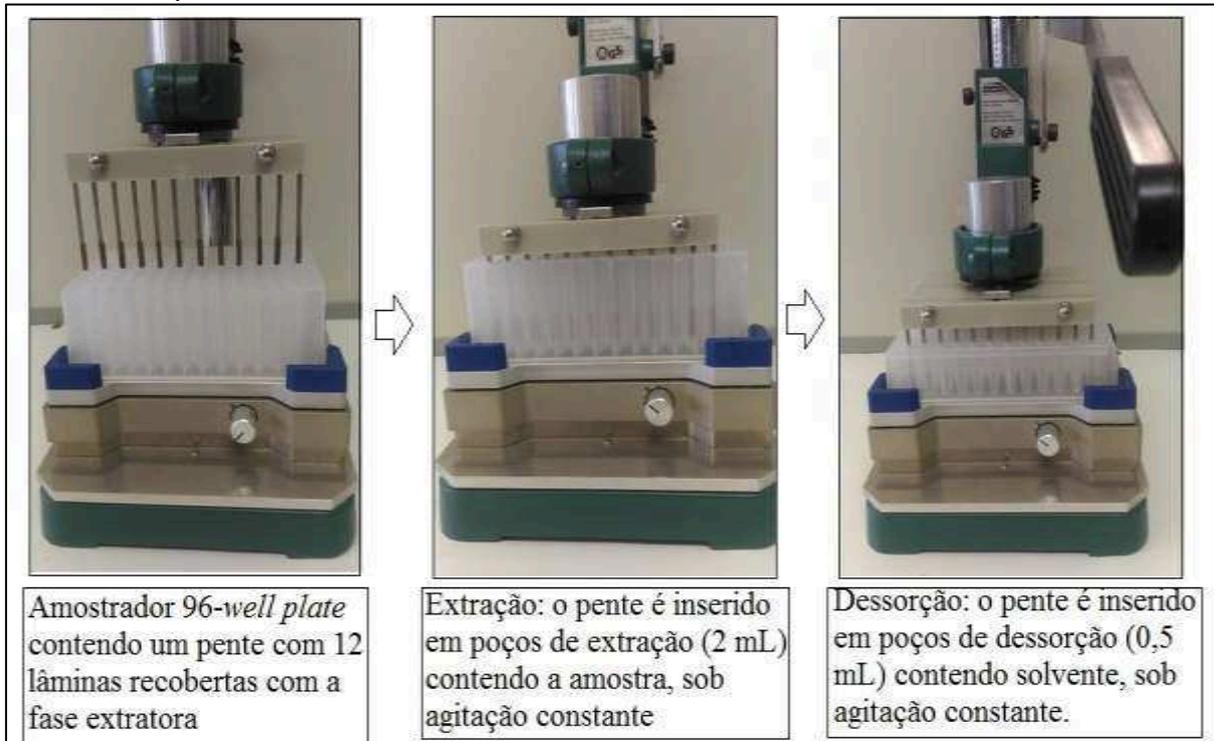


Fonte: Autoria própria.

No procedimento experimental envolvendo esse sistema semiautomático, a extração é realizada imergindo as lâminas contendo a fase extratora na amostra, sob agitação constante, após o tempo necessário para que a extração ocorra, as lâminas contendo os analitos

concentrados na fase extratora são retiradas dos poços de extração e então imersos nos poços de dessorção contendo um solvente adequado, essa etapa também acontece sob agitação constante. Após isso, o solvente é retirado dos poços e armazenados para posterior análise no sistema de separação e detecção. A sequência de procedimentos para a realização da extração, e posteriormente da dessorção, utilizando esse sistema é mostrada na Figura 9. Considerando que no procedimento é empregada a dessorção líquida, além da otimização dos parâmetros operacionais já mencionados anteriormente, a otimização de variáveis como solvente e tempo de dessorção são igualmente importantes.

Figura 9. Sequência de procedimentos para a realização da extração, e posteriormente da dessorção, utilizando o sistema *96-well plate* semiautomático.



Fonte: Autoria própria.

A utilização do TF-SPME em conjunto com o sistema *96-well plate* oferece uma série de vantagens, incluindo uma redução significativa no tempo de análise, uma vez que podem ser realizadas até 96 extrações/dessorções ao mesmo tempo, o que proporciona uma maior frequência analítica e também uma redução dos custos de análise, além de maior reprodutibilidade pela redução de erro humano (Mirnaghi *et al.*, 2012).

2.4 APLICAÇÕES UTILIZANDO A SPME

A técnica de SPME é estabelecida como uma das abordagens verdes de preparo de amostras mais populares para extração e enriquecimento de uma ampla gama de analitos em amostras complexas (Hashemi *et al.*, 2018). A Tabela 2 mostra uma série de aplicações utilizando a SPME. Conforme observado, seja na configuração de fibra ou na configuração de filme fino, a SPME tem apresentado uma vasta gama de aplicações nas mais diversas matrizes para a determinação de analitos pertencentes a diferentes grupos químicos, seja utilizando fases extratoras comerciais ou desenvolvidas. Dentre essas matrizes incluem-se águas de variadas fontes (rios, lagos, águas residuais), fluidos biológicos (urina, plasma), alimentos, bebidas, entre outros. Um grande campo de aplicação da SPME é na determinação de perfis aromáticos de plantas e alimentos, tendo em vista que esse tipo de análise é fundamental no controle de qualidade em diversos segmentos da indústria. Além disso, várias classes de compostos têm sido determinadas utilizando-se essa técnica, incluindo fármacos, agrotóxicos, filtros ultravioleta (UV), fenóis, entre outros.

Tabela 2. Trabalhos reportados na literatura e suas aplicações em análises utilizando as técnicas de SPME e TF-SPME como preparo de amostra.

Continua

Configuração	Analitos	Matriz	Separação/ detecção	Fase extratora	Referência
SPME	Agrotóxicos	Água	GC-FID	PA	(Boyd-Boland e Pawliszyn, 1995)
	Aminas	Ar e água	GC-FID	Carbowax/DVB, PDMS e PA	(Pan <i>et al.</i> , 1997)
	Alquilpirazinas	Licor de cacau	GC-FID	Carbowax/DVB	(Pini <i>et al.</i> , 2004)
	Aromas de maçã	Vinho de maçã	GC-MS	Car/PDMS	(Wang <i>et al.</i> , 2004)
	Ocratoxina A	Urina humana	HPLC-MS/MS	Fita de carbono	(Vatino <i>et al.</i> , 2008)
	Venlafaxina	Sangue humano	GC-NPD ^a	PDMS	(Mastrogianni <i>et al.</i> , 2012)
	HPA	Urina	GC-FID	Nanotubos de carbono com PDMS	(Vatani, 2014)
	Fármacos, fenóis e inseticidas	Água	HPLC-UV	PIL	(Yu <i>et al.</i> , 2016)
	Medicamentos antivirais	Água e urina	HPLC-MS	MIP	(Terzopoulou <i>et al.</i> , 2016)
	Ftalatos e agrotóxicos organoclorados	Água	GC-MS	Nanofibra de PI/PVP ^b	(Yan <i>et al.</i> , 2018)
	Nicotina	Urina e plasma humano	GC-FID	Polipirrol nanoestruturado	(Abdolhosseini <i>et al.</i> , 2017)
	Compostos voláteis	Carne bovina e suína	GC-MS	DVB/Car/PDMS	(Pavlidis <i>et al.</i> , 2019)

Configuração	Analitos	Matriz	Separação/ detecção	Fase extratora	Referência
TF-SPME	HPA	Água	GC-MS	PDMS	(Qin, 2008)
	Fármacos	Tecidos de peixes	HPLC-MS	C18	(Togunde, 2012)
	Fenóis	Água	GC-MS	Nanofibra de poliimida Nanopartículas	(Li <i>et al.</i> , 2015)
	Quetiapina e clozapina	Plasma e urina	HPLC-UV	superparamagnéticas de ODS ^c e PAN ^d	(Li <i>et al.</i> , 2016)
	Agrotóxicos organoclorados	Água	GC-FID	Nanopartículas de ZnO com poliamida	(Ayazi <i>et al.</i> , 2018)
	Nitrofenóis	Óleo de cozinha	HPLC-DAD	Celulose modificada com polidopamina	(Ye <i>et al.</i> , 2016)
	Biocidas e filtros UV	Água	HPLC- MS/MS	C18 e HLB ^e	(Ahmadi <i>et al.</i> , 2017)
	Metadona	Urina	GC-MS	Poliestireno	(Ríos-Gómez <i>et al.</i> , 2017)
Bifenilos policlorados	Suco, refrigerante, leite, cerveja e mel	GC-MS	Tira híbrida de alumínio reforçada com fenil-propil	(Darvishnejad e Ebrahimzadeh, 2019)	

Fonte: Autoria própria.

^aCromatografia gasosa com detector de nitrogênio-fósforo; ^bPoliimida/polivinilpirrolidona; ^cOctadecilsilano magnético; ^dPoliacrilonitrilo e ^ePartículas poliméricas hidrofílicas-lipofílicas.

2.5 BIOSORVENTES

Vários adsorventes naturais têm sido investigados a fim de se obter substitutos baratos e eficientes aos adsorventes sintéticos para extração de compostos orgânicos e inorgânicos. Essas matérias são denominadas biossorventes e as principais vantagens desses em relação aos adsorventes sintéticos relacionam-se ao seu baixo custo, não toxicidade e alta disponibilidade (Silva *et al.*, 2018). Dessa forma, biossorventes exibem potencial para serem utilizados como fases sorventes em processos de microextração e reforçam ainda mais o aspecto ambiental favorável a essas técnicas, considerando que são fases extratoras verdes de origem natural, renovável e biodegradável.

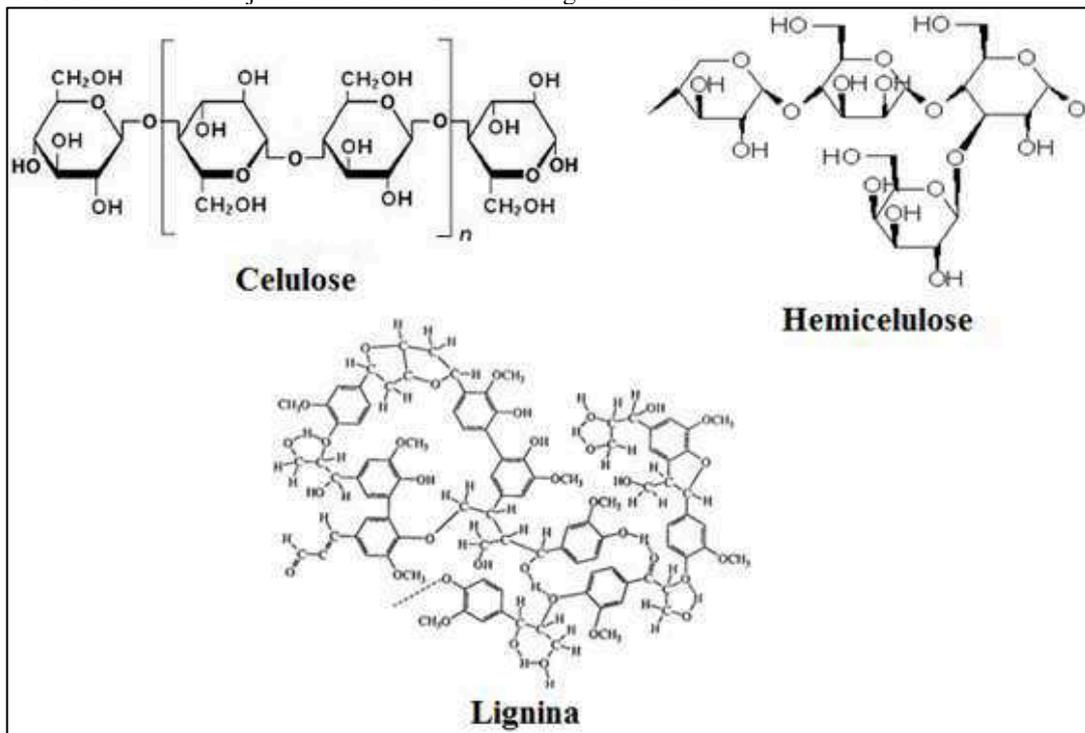
O termo biossorvente é designado a qualquer material que não seja produzido sinteticamente e que apresente propriedades adsorptivas de espécies químicas de origem inorgânica ou orgânica (Madrid e Cámara, 1997). Existem vários materiais naturais que podem ser usados como biossorventes, incluindo fungos, algas, leveduras, argilas e biomassas vegetais, denominadas materiais lignocelulósicos. Considerando que o biossorvente utilizado no presente trabalho trata-se de um material lignocelulósico, será dado um enfoque maior a esse material nesta revisão bibliográfica.

2.5.1 Biossorventes lignocelulósicos

Vários materiais lignocelulósicos podem ser usados como biossorvente, como resíduos agrícolas, subprodutos industriais ou biomassa derivada de materiais que geralmente são descartados (Araujo *et al.*, 2018). Materiais lignocelulósicos são constituídos majoritariamente por celulose, hemicelulose e lignina. Essas macromoléculas possuem em sua estrutura diversos grupos químicos polares e apolares, que são capazes de interagir com uma grande diversidade de compostos através de diferentes mecanismos como sorção, complexação e troca iônica (Madrid e Cámara, 1997; Šćiban *et al.*, 2006; Asgher, 2012). Além disso, esses materiais também são compostos de pequenas quantidades de pectina, vitaminas, lipídios, cinzas e extrativos que contêm um grande número de constituintes lipofílicos e hidrofílicos (Henning Jørgensen, 2007; Hutchinson *et al.*, 2007). A Figura 10 apresenta as estruturas químicas dos principais constituintes dos materiais lignocelulósicos.

A celulose é um homopolissacarídeo composto inteiramente de d-glicose ligados entre si. Aproximadamente 65% da celulose é altamente orientada e cristalina e a estrutura linear da sua cadeia permite a formação de ligações de hidrogênio intra e intermoleculares. Essa estrutura faz com que a celulose seja insolúvel na maioria dos solventes e é parcialmente responsável pela resistência da celulose à degradação microbiana (Ding e Himmel, 2006; Abdolali *et al.*, 2014). Com menor grau de polimerização em relação à celulose, as hemiceluloses são heteropolissacarídeos formados por polissacarídeos do tipo pentoses e hexoses e/ou ácidos glucurônicos e encontram-se intercaladas à celulose dando elasticidade e impedindo que elas se toquem, e são, caracteristicamente, não cristalinas. As ligninas são definidas como substâncias hidrofóbicas e apresentam uma estrutura polimérica complexa formada por grupos alifáticos e aromáticos, sem estrutura cristalina definida. Esse biopolímero é composto por unidades de carbono derivadas dos álcoois p-cumarílico, coniferílico, sinapílico e seus derivados substituídos (Hofrichter, 2002).

Figura 10. Constituintes majoritários dos biossorventes lignocelulósicos.



Fonte: (Ferreira e Rocha, 2009).

Considerando que os materiais lignocelulósicos são todos compostos de lignina, celulose e hemicelulose, o que irá diferenciá-los é a proporção dessas macromoléculas em cada biomassa vegetal. A distribuição dessas varia significativamente entre plantas diferentes e

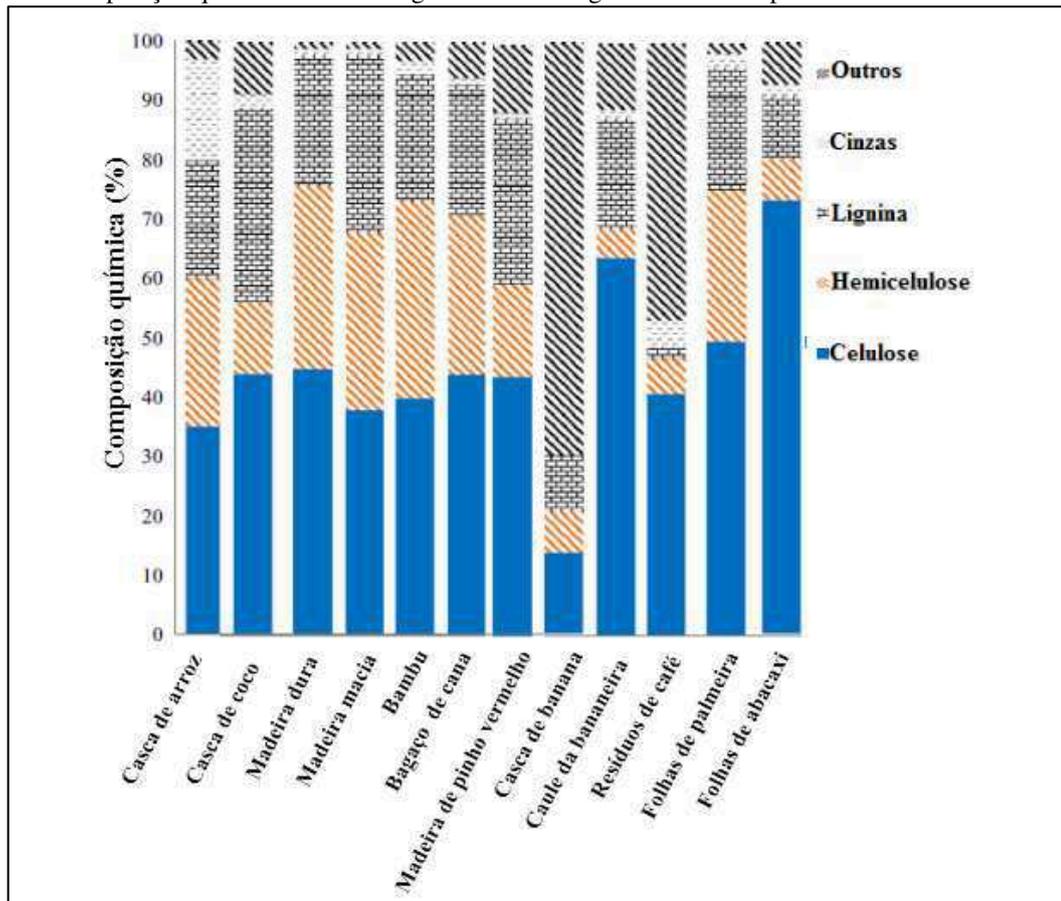
também entre diferentes partes de uma planta (Tran *et al.*, 2015). A Tabela 3 resume as características dos materiais lignocelulósicos e as composições químicas de alguns biossorventes são mostradas na Figura 11.

Tabela 3. Características dos materiais lignocelulósicos.

Composição química	Grupos funcionais	Área superficial
Celulose: 7-73%; Hemicelulose: 6 a 33%; Lignina: 2 a 33%; Cinza: 1 a 17%; Outros: 1 a 69%	(-OH), (-COOH), (Si-OH), alcino, anéis aromáticos, cetona, aldeídos e lactonas	Forma bruta: 3,41 a 25,97 m ² g ⁻¹ ; Forma modificada: 566 m ² g ⁻¹

Fonte: (Tran *et al.*, 2015).

Figura 11. Composição química média de alguns materiais lignocelulósicos típicos.



Fonte: (Tran *et al.*, 2015).

As principais características dos materiais lignocelulósicos, que determinam a extração de compostos orgânicos, incluem a sua área superficial, porosidade e sua composição química, nos quais englobam os grupos funcionais presentes no material. Considerando que a adsorção depende das características dos bio sorventes e também dos analitos, a característica mais significativa dos materiais lignocelulósicos, que afeta diretamente o seu comportamento de adsorção é a sua composição química (Tran *et al.*, 2015). De acordo com Xi e Chen (Xi e Chen, 2014), as capacidades de adsorção de bio sorventes podem ser afetadas por alguns fatores, como polaridade e aromaticidade, em que a lignina é considerada a principal responsável pela extração de poluentes orgânicos e um maior teor de lignina resulta em maior afinidade com poluentes orgânicos persistentes. Em adição, grupos funcionais presentes nos bio sorventes, como hidroxila (-OH), carboxila (-COOH) e silanol (Si-OH), têm sido relatados como os responsáveis pela sorção de poluentes orgânicos do meio aquático (Akhtar *et al.*, 2006; Pal, 2012; Tran *et al.*, 2015; Abdolali *et al.*, 2014).

O processo de adsorção de compostos orgânicos pode ser determinado por várias interações que governam a associação entre o analito e o bio sorvente, como Van der Waals, dipolo-dipolo, forças eletrostáticas e associações intermoleculares fracas (Pal, 2012). Ademais, a área superficial e a porosidade do bio sorvente também afetam grandemente suas capacidades de adsorção de compostos orgânicos, pois podem facilitar o processo de adsorção física dos analitos (Tran *et al.*, 2015).

2.5.2 Aplicações dos bio sorventes em análises químicas

Bio sorventes têm sido extensivamente utilizados para adsorção de metais em matrizes ambientais (Alves *et al.*, 2010; Araújo *et al.*, 2010; Alves e Coelho, 2013; Rao e Khan, 2017; Silva *et al.*, 2018; Nag *et al.*, 2019). Para extração de compostos orgânicos, bio sorventes têm sido explorados principalmente para remoção de contaminantes da água (Nadavala *et al.*, 2009; Olivella *et al.*, 2013; Tran *et al.*, 2015). Existem poucos trabalhos na literatura que propõe o uso de bio sorventes como fase extratora para compostos orgânicos em técnicas de preparo de amostras. A esse respeito, Zhao *et al.* (Zhao *et al.*, 2008) utilizaram o carvão de bambu como fase extratora para SPE para a extração de ésteres de ftalatos em amostras de água. Em outro trabalho, o uso de fibras naturais de algodão foi proposto por Wang *et al.* (Wang *et al.*, 2014) como bio sorvente em SPE para extração de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs).

Biossorventes também têm sido utilizados em técnicas de microextração. Um carvão ativado à base de cortiça foi utilizado como fase biossorvente em BaμE para análise de ibuprofeno e ácido clofíbrico em amostras de água e urina humana (Neng *et al.*, 2011). O uso de um biossorvente também foi proposto como fase extratora para μ-SPE (μ-extração em fase sólida) (Sajid *et al.*, 2016). Nesse estudo, os autores utilizaram sementes de *Moringa oleífera* como um sorvente ambientalmente amigável, não tóxico e biodegradável para a determinação de treze ésteres de ftalato em amostras de leite.

Nosso grupo de pesquisa, propôs, pela primeira vez, o uso de um biossorvente, a cortiça, como fase extratora pra SPME. Nesse estudo, a fibra de cortiça foi utilizada para extração de HPAs em amostras de água (Dias *et al.*, 2013). Desde então, biossorventes têm sido explorados em nosso grupo de pesquisa como fase extratora em diferentes técnicas de microextração, conforme mostrado na Tabela 4.

Como pode ser observado na Tabela 4, a cortiça vem sendo amplamente empregada como recobrimento em diferentes técnicas de microextração para determinação de diversas classes de compostos com diferentes propriedades em matrizes ambientais e biológicas. Esse biossorvente é um material lignocelulósico obtido da casca do sobreiro (*Quercus suber L.*) e é composta por 40% de suberina, 24% de lignina, 20% de celulose e hemicelulose e 15% de outros extrativos (Dias *et al.*, 2013). Outro material biossorvente que tem sido explorado em nosso grupo é a terra de diatomácea reciclada da indústria cervejeira. A terra diatomácea é um sedimento de silicato amorfo proveniente de microrganismos unicelulares fossilizados em algas da classe *Bacillariophyceae centricae*. Este material é constituído principalmente por dióxido de sílica e pequenas quantidades de alumínio, ferro, cálcio, magnésio, sódio e potássio (Kirschner *et al.*, 2017).

Devido ao grande êxito que os biossorventes têm apresentado como fase extratora em técnicas de microextração, este trabalho propôs o uso de um novo biossorvente, a bráctea da *Araucária angustifolia*, para ser utilizada como recobrimento em duas diferentes configurações da SPME, a fibra da SPME e o filme fino da TF-SPME.

Tabela 4. Trabalhos desenvolvidos pelo Laboratório de Cromatografia e Espectrometria Atômica (CROMAAS-UFSC) utilizando biossorventes em técnicas de microextração.

Técnica de microextração	Biossorvente	Analitos	Matriz	Referência
SPME	Cortiça	HPAs	Água	(Dias <i>et al.</i> , 2013)
SPME	Cortiça	Agrotóxicos organoclorados	Água	(Dias <i>et al.</i> , 2015)
BA μ E	Cortiça	Parabenos, benzofenona e triclorocarban	Água	(Dias <i>et al.</i> , 2015)
TF-SPME	Terra de diatomácea	Desreguladores endócrinos	Água	(Kirschner <i>et al.</i> , 2017)
TF-SPME	Cortiça	Contaminantes emergentes	Água	(Morés <i>et al.</i> , 2017)
BA μ E	Cortiça	Hexanal e heptanal	Urina humana	(Oenning <i>et al.</i> , 2017)
SPME	Cortiça	Filtros UV	Água	(Silva <i>et al.</i> , 2017)
RDSE	Cortiça e argila MMT ^a	Parabenos	Água	(Vieira <i>et al.</i> , 2018)
BA μ E	Terra de diatomácea	Parabeno, benzofenona e triclorocarban	Água	(Mafra <i>et al.</i> , 2018)
DPX	Cortiça	Fármacos	Urina humana	(Mafra <i>et al.</i> , 2018)
SPME	Terra de diatomácea	HPA	Água	(Reinert <i>et al.</i> , 2018)
DPX	Cortiça	Contaminantes emergentes	Água	(Morés <i>et al.</i> , 2019)

Fonte: Autoria própria.

^aMontmorillonita

2.6 BRÁCTEA DA *ARAUCÁRIA ANGUSTIFOLIA*

As brácteas são, no geral, estruturas relacionadas à reprodução das gimnospermas (Jain, 2000). Neste estudo, a bráctea utilizada foi obtida da *Araucária angustifolia* (Bertol.) O.

Kuntze, uma conífera pertencente à família das *Araucariaceas*, que ocupa áreas no sul e sudeste do Brasil e leste da Argentina (Brasil *et al.*, 2006). A maioria das populações de *A. angustifolia*, que é também conhecida como “pinheiro-do-paraná” ou “pinheiro-brasileiro”, está localizada nos estados do Sul do Brasil (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul) (Freitas *et al.*, 2009; Peralta *et al.*, 2016) A Figura 12 apresenta uma imagem de uma árvore de *A. angustifolia*.

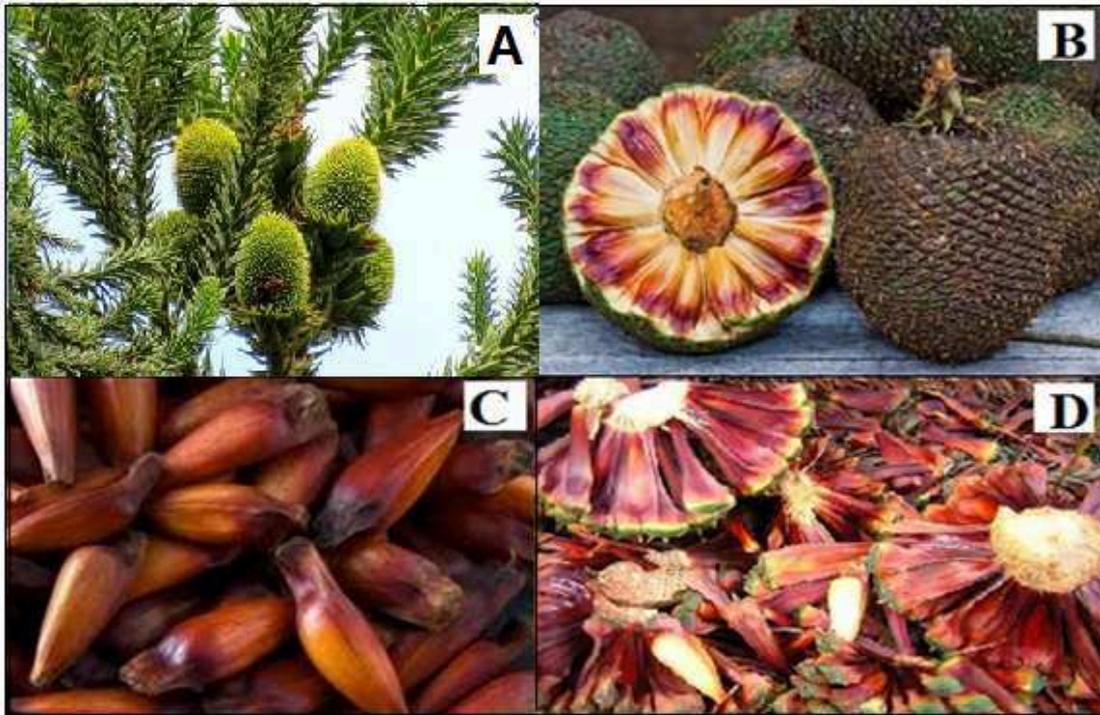
As árvores dessa espécie de conífera são dioicas, isto é, estróbilos masculinos e femininos originam-se em árvores separadas. Os estróbilos femininos, chamados de pinha, ficam protegidas no ápice de um ramo por numerosas folhas (Reitz, 1966), conforme apresentado na Figura 13-A. A pinha é constituída de sementes desenvolvidas, popularmente conhecidas como pinhões (Figura 13-C) e sementes não desenvolvidas, que são as brácteas (Figura 13-D), também conhecidas como falhas (Michelon *et al.*, 2012). Uma árvore de *A. angustifolia* produz a partir dos seus 15 a 20 anos, anualmente, uma média de 80 pinhas, sendo o rendimento de pinhão por pinha em torno de 15 a 20%, e o restante da pinha constituído por brácteas (Thomé, 1995; Michelon *et al.*, 2012). O pinhão geralmente é utilizado na alimentação humana e da fauna, o que confere a importância econômica e ecológica dessa espécie. Esses possuem forma cônica-arredondada, são carnosos e bastante apreciados na culinária do sul do País, enquanto as brácteas são, normalmente, descartadas no momento da debulha e separação dos pinhões, que comumente acontece nos meses de abril a julho (Cordenunsi *et al.*, 2004; Lima *et al.*, 2007; Michelon *et al.*, 2012).

Figura 12. Conífera *Araucária angustifolia*.



Fonte: Autoria própria.

Figura 13. Pinha e seus constituintes (A) pinha no ápice de um ramo (B) imagem de uma pinha aberta (C) sementes desenvolvidas (pinhão) da *Araucária angustifolia* e (D) sementes não desenvolvidas (bráctea) da *Araucária angustifolia*.



Fonte: Autoria própria.

Na literatura, foi encontrada uma avaliação do uso da casca de pinhão como bioissorvente para remoção de Cr(VI) (Brasil *et al.*, 2006) e de Cu(II) em água (Lima *et al.*, 2007). Nesse último, os autores realizaram a caracterização do bioissorvente proposto através de espectroscopia de infravermelho de transformada de *Fourier* (FTIR, do inglês *Fourier Transform Infrared*) e encontraram bandas de absorção atribuídas a grupos C=C de anéis aromáticos, O–H e CH₂.

Em outro trabalho relatado, a casca do pinhão foi utilizada na sua forma natural e também como carvão ativado para remoção de corantes têxteis de efluentes aquosos (Cardoso *et al.*, 2011). Os autores realizaram a caracterização dos materiais através de FTIR e também encontraram bandas similares a encontradas por Lima, *et al.*, além de pequenas bandas atribuídas a C–O da lignina. Os bioissorventes também foram caracterizados por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e foi observado que o carvão ativado da casca do pinhão possui área superficial bem mais elevada em relação à casca do pinhão natural, o que poderia levar a um aumento na quantidade máxima adsorvida dos analitos.

Em relação à bráctea, os poucos trabalhos que têm na literatura são sobre a atividade antioxidante, antimutagênica e antígenotóxica do extrato aquoso de brácteas da *A. angustifolia*,

devido ao alto teor de compostos fenólicos (conhecidos pela sua atividade antioxidante) presentes nesse material (Michelon *et al.*, 2012; Souza *et al.*, 2014). No entanto, o uso de bráctea em aplicações analíticas ainda não havia sido avaliado até o presente estudo.

CAPÍTULO III – OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Desenvolver, validar e aplicar metodologias que empreguem a bráctea da *Araucária angustifolia* como bioissorvente para fibras de SPME e filmes finos de TF-SPME.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o bioissorvente proposto por espectroscopia de infravermelho de transformada de *Fourier* (FTIR), análise termogravimétrica (TGA), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e pelo método Braunauer, Emmet e Telle (BET);
- Produzir fibras de SPME utilizando a bráctea como bioissorvente e liga de nitinol como suporte;
- Otimizar as condições de extração por SPME, incluindo tempo e temperatura de extração e adição de sal, para determinação de agrotóxicos organoclorados em amostras de água por cromatografia gasosa com detector de captura de elétrons;
- Otimizar as condições de extração por SPME, incluindo pH da amostra, tempo e temperatura de extração e adição de sal, para determinação multiclassas de contaminantes em amostras de água por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas;
- Comparar a eficiência de extração da fibra de bráctea com fibras comerciais de SPME;
- Avaliar a reprodutibilidade e durabilidade das fibras de bráctea;
- Produzir filmes finos de TF-SPME utilizando a bráctea como fase extratora;
- Otimizar as condições de extração e dessorção por TF-SPME acoplada ao sistema *96-well plate*, incluindo diluição da urina, solvente e tempo de dessorção, tempo de extração e adição de NaCl, para determinação de hormônios estrogênicos em amostras de urina humana por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência;
- Avaliar a reprodutibilidade dos poços de extração do sistema *96-well plate*;
- Avaliar a estabilidade dos filmes finos de bráctea;

- Determinar os parâmetros analíticos de mérito das metodologias desenvolvidas, incluindo limite de detecção, limite de quantificação, faixa linear de trabalho, coeficiente de correlação, exatidão (ensaios de recuperação relativa), precisões (desvio padrão relativo) intradia e interdía e robustez;
- Avaliar a aplicabilidade das metodologias desenvolvidas em amostras reais.

CAPÍTULO IV – NOVO RECOBRIMENTO À BASE DE BIOSORVENTE (BRÁCTEA) PARA MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS ORGANOCLORADOS EM ÁGUA POR CROMATOGRAFIA GASOSA COM DETECTOR DE CAPTURA DE ELÉTRONS

4.1 INTRODUÇÃO

Os agrotóxicos organoclorados (OCPs, do inglês *Organochlorine Pesticides*) são uma classe de compostos caracterizados por possuírem alto peso molecular e baixa volatilidade e solubilidade. São compostos orgânicos sintéticos que possuem pelo menos uma estrutura cíclica em sua composição, sendo ela aromática ou não, em que vários átomos de hidrogênio são substituídos por átomos de cloro, pertencendo assim ao grupo dos compostos halogenados. Essa classe de agrotóxicos inclui o diclorodifeniltricloroetano (DDT) e seus metabólitos (diclorodifenifeniletileno (DDE) e o diclorodifenildicloroetano (DDD)), os ciclodienoclorados (andrin, dieldrin, endrin, heptacloro, heptacloro epóxido e endosulfan) e os isômeros do hexaclorociclohexano (HCH) (Baptista Neto *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2010)

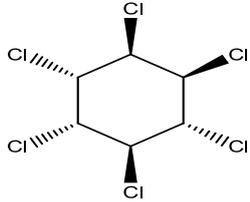
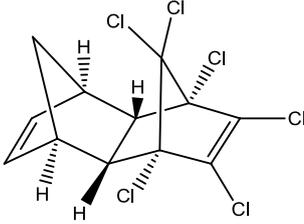
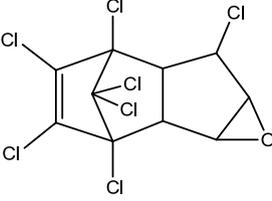
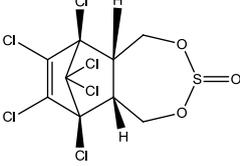
OCPs foram amplamente empregados em práticas agrícolas, no controle de vetores e em atividades industriais desde os anos 1940, porém, a maior parte deles foi banida ou tiveram o seu uso restringido a partir da década de 1970, quando foi constatado que poderiam causar danos à biota (Li *et al.*, 2014). No entanto, nos dias atuais, ainda pode-se verificar a utilização ou má estocagem de OCPs, principalmente em países tropicais ou subdesenvolvidos. Além disso, devido a características como estabilidade química, lipossolubilidade e baixas taxas de biotransformação e degradação, esses agrotóxicos são considerados poluentes orgânicos persistentes (POP) e se bioacumulam ao longo da cadeia trófica, podendo ser encontrados em níveis traços no meio ambiente. OCPs podem causar uma série de efeitos nocivos aos seres vivos, incluindo imunossupressão, teratogenia, doenças secundárias e tumores. Em adição, podem causar poluição em diferentes matrizes ambientais (Baptista Neto *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2013).

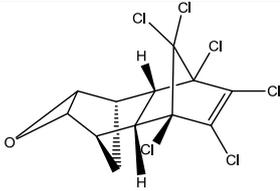
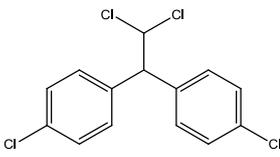
A distribuição dos OCPs no meio ambiente pode se dar por intermédio da atmosfera, sedimentos e corpos d'água superficiais ou subterrâneos (Chiarello *et al.*, 2017; Jabali *et al.*, 2019). A introdução desses compostos no meio aquático pode acontecer de forma direta ou indireta. Por via indireta, esses podem chegar ao ecossistema aquático através da lixiviação de regiões agrícolas ou através de efluentes industriais e domésticos. O transporte através da

volatilização para o meio atmosférico e a precipitação na água da chuva também são fontes de contaminação por esses compostos (Mason, 2002). Comumente, a dispersão pelo ar e pela água provoca a contaminação de regiões remotas, distantes até dezenas de milhares de quilômetros das fontes de produção ou uso (Baptista Neto *et al.*, 2008). A existência de resíduos de pesticidas na água pode causar efeitos nocivos à saúde humana, vida aquática e ao próprio ecossistema (Jabali *et al.*, 2019).

Em virtude disso, evidencia-se a importância no desenvolvimento de metodologias analíticas para a determinação de resíduos de agrotóxicos organoclorados em matrizes aquosas. Neste estudo, foram selecionados seis OCPs (δ -HCH, aldrin, heptacloro epóxido, α -endossulfan, endrin e 4,4'-DDD) para serem analisados em amostras de água. A Tabela 5 mostra a estrutura desses compostos, assim como algumas características físico-químicas dos mesmos.

Tabela 5. Estrutura e características físico-químicas dos agrotóxicos organoclorados estudados. Continua

Composto	Estrutura química	Pressão de	Solubilidade	Log Kow
		vapor a 25°C (mmHg)	em água a 25°C (mg L ⁻¹)	
δ -HCH		$1,9 \times 10^{-1}$	0,0021	3,7
Aldrin		$1,2 \times 10^{-4}$	0,19	6,5
Heptacloro epóxido		$1,9 \times 10^{-2}$	$2,8 \times 10^{-5}$	4,9
α -Endossulfan		$1,7 \times 10^{-7}$	$5,3 \times 10^{-5}$	3,8

				Conclusão
Composto	Estrutura química	Pressão	Solubilidade	Log Kow
		de vapor a 25°C (mmHg)	em água a 25°C (mg L ⁻¹)	
Endrin		$2,8 \times 10^{-6}$	0,26	5,2
4,4'-DDD		$1,3 \times 10^{-6}$	0,09	6,2

Fonte: (Mackay, 2000).

De acordo com a Tabela 5, quanto maior a pressão de vapor, mais passível será o composto de ser transportado atmosféricamente, e quanto menos solúvel em água, mais persistente será no ambiente. Através do log Kow é possível relacionar a persistência de um contaminante em relação ao grau de lipofilicidade, no qual substâncias altamente lipofílicas têm $Kow > 10^6$ e uma tendência à partição em lipídios (Baptista Neto *et al.*, 2008).

A Diretiva 2013/39/EU do Parlamento e do Conselho Europeu estabelece limites máximos de resíduos em águas superficiais para alguns dos agrotóxicos estudados, conforme apresentado na Tabela 6.

Tabela 6. Limites máximos de resíduos de agrotóxicos organoclorados em águas superficiais estabelecidos pela Diretiva 2013/39/EU.

Compostos	Limites máximos permitidos (ng L ⁻¹)
Aldrin + Dieldrin + Endrin + Isodrin	10
Heptacloro epóxido + Heptacloro	0,3
α -Endosulfan	10

Fonte: Diretiva (2013/39/Ue).

Para a detecção e quantificação de pesticidas em água, a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS, do inglês *Gas Chromatography with Mass Spectrometry*) é a técnica mais comumente empregada (Jabali *et al.*, 2019). No entanto, OCPs são tipicamente identificados por detector de captura de elétrons (ECD, do inglês *Electron*

Capture Detector), devido à alta sensibilidade desse detector para compostos halogenados (Zacharis *et al.*, 2010; Qi *et al.*, 2014). Porém, os baixos níveis de concentração desses poluentes em amostras ambientais e as possíveis incompatibilidades provenientes da matriz com a instrumentação analítica, não possibilitam a análise direta no GC. Portanto, a etapa de preparo de amostra antes da análise instrumental torna-se necessária.

Diante do exposto, neste capítulo, é mostrado um estudo em que a bráctea foi empregada, pela primeira vez, como fase extratora para a fibra de SPME suportada em liga de nitinol. A fibra de bráctea proposta foi utilizada para a determinação de agrotóxicos organoclorados em amostras de água com separação/detecção por cromatografia gasosa acoplada ao detector por captura de elétrons (GC-ECD, do inglês *Gas Chromatography-Electron Capture Detector*). A caracterização do biossorvente foi realizado por espectrometria de infravermelho com transformada de *Fourier* (FTIR), análise termogravimétrica (TGA, do inglês *Thermogravimetric Analysis*), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e pelo método Braunauer, Emmet e Telle (BET). Otimizações dos parâmetros que influenciam a extração dos OCPs, como temperatura, tempo de extração e adição de sal, foram investigadas simultaneamente usando um planejamento multivariado composto central. Em termos de comparação foi também otimizado um procedimento de extração com uma fibra comercial (DVB/Car/PDMS). A precisão e a exatidão do método proposto utilizando a fibra de bráctea foi avaliada por meio de extrações em amostras de água de rio. A metodologia desenvolvida com a fibra de bráctea foi avaliada através de parâmetros analíticos de mérito e aplicação em amostras de águas de lagoa.

Este trabalho foi publicado em uma revista indexada da área (Do Carmo *et al.*, 2017).

4.2 EXPERIMENTAL

4.2.1 Reagentes e materiais

Um padrão com concentração de $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$ contendo seis pesticidas organoclorados, incluindo δ -hexaclorociclohexano (δ -HCH), aldrin, heptacloro epóxido, α -endossulfan, endrin e 4,4-diclorodifenildicloroetano (4,4'-DDD) em hexano:tolueno (50:50, v/v) foi obtido da Supelco (Bellefonte, PA, EUA). A partir desse padrão, uma solução estoque

foi preparada em hexano (Sigma aldrich, Saint Louis, EUA) com uma concentração de $0,75 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada analito e armazenada a $-4 \text{ }^\circ\text{C}$.

Para as otimizações e a avaliação dos parâmetros analíticos de mérito, as soluções de trabalho foram preparadas por adição da solução estoque em água ultrapura com uma resistividade de $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ obtida a partir de um sistema de purificação (Mega purity, Billerica, MA, EUA).

Um moinho de facas e uma peneira com granulometria de 200 mesh foram empregados para preparar o pó da bráctea. No preparo das fibras de bráctea foram usados fios de nitinol com $0,2 \text{ mm}$ de diâmetro e 2 cm de comprimento, cola epóxi (Brascola, São Bernardo do Campo, SP, Brasil) e um bloco de aquecimento (Dist, Florianópolis, SC, Brasil).

Nas extrações por SPME foram empregados *holder* (Supelco) para amostragem manual com fibras de SPME, frascos de 22 mL com tampa de septo (Supelco), banho termostático (Microquímica Ind. E Com Ltda, Palhoça, SC, Brasil) e agitador magnético (Dist).

Para avaliar a influência da adição de sal na extração foi utilizado cloreto de sódio (Synth, São Paulo, SP, Brasil).

As amostras de rio e de lagoa foram filtradas através de filtros de PTFE com tamanho de poro de $0,45 \mu\text{m}$ da Allcrom (São Paulo, SP, Brasil).

Foi utilizada uma fibra comercial (DVB/Car/PDMS, $50/30 \mu\text{m}$), de 2 cm de comprimento, obtida da Supelco, para comparar com a fibra de bráctea a eficiência de extração dos compostos organoclorados estudados.

4.2.2 Instrumentação e condições cromatográficas

Para as análises cromatográficas utilizou-se um cromatógrafo gasoso Shimadzu GC-14B (Kyoto, Japão) acoplado a um detector de captura de elétrons e equipado com injetor *split/splitless*.

As separações cromatográficas foram realizadas em uma coluna capilar Agilent HP-5 ($30 \text{ m} \times 0,32 \text{ mm} \times 0,25 \mu\text{m}$, Santa Clara, CA, EUA). As condições cromatográficas utilizadas foram baseadas no trabalho de Dias *et al.* (Dias *et al.*, 2015). O programa de temperatura do forno foi ajustado a $100 \text{ }^\circ\text{C}$ (1 min), seguido por $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ até $180 \text{ }^\circ\text{C}$ e $3 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ até $260 \text{ }^\circ\text{C}$. A injeção foi realizada em modo *splitless*, a temperatura do injetor foi ajustada a $260 \text{ }^\circ\text{C}$, a temperatura do detector foi mantida em $270 \text{ }^\circ\text{C}$ e o tempo de dessorção foi de 7 min . Nenhum

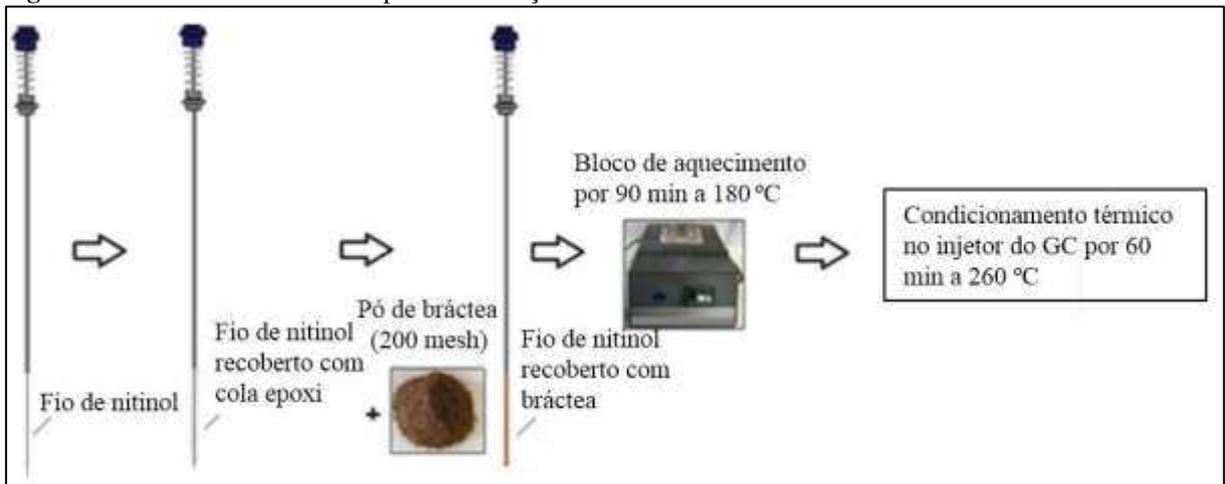
efeito de memória foi observado utilizando essas condições. Foi empregado gás nitrogênio como fase móvel a um fluxo de 1 mL min^{-1} .

4.2.3 Preparo da fibra de bráctea

As brácteas utilizadas para produzir as fibras da SPME foram obtidas de árvores cultivadas na cidade de Curitiba (Santa Catarina, Brasil). Antes do preparo, as brácteas foram lavadas com água ultrapura e secas em estufa a $110 \text{ }^\circ\text{C}$ por 8 h. Posteriormente, foram trituradas em um moinho de facas e peneiradas em uma peneira com granulometria de 200 mesh.

O procedimento utilizado no preparo das fibras de SPME está representado na Figura 14 e foi realizado conforme descrito anteriormente na literatura (Dias *et al.*, 2013). Primeiramente, cola epóxi foi aplicada para imobilizar o pó de bráctea em um fio de nitinol com $0,2 \text{ mm}$ de diâmetro e 2 cm de comprimento, em seguida o fio de nitinol contendo o biossorvente foi inserido num bloco de aquecimento a $180 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 90 min. As fibras de bráctea produzidas foram condicionadas termicamente a $260 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 60 min no injetor do GC.

Figura 14. Procedimento utilizado para a fabricação da fibra de bráctea.



Fonte: Autoria própria.

4.2.4 Caracterização da bráctea

Para uma melhor compreensão, a caracterização da bráctea será dividida entre a caracterização do pó da bráctea e caracterização da fibra de bráctea.

A caracterização do pó de bráctea, com granulometria de 200 mesh, foi realizada utilizando um espectrômetro de infravermelho com transformada de *Fourier* (FTIR) (ABB FTLA 2000, Guarulhos, SP, Brasil), a fim de obter os principais grupos funcionais presentes no material. Os espectros de infravermelho foram gerados a partir de pastilhas de KBr. A análise foi realizada na faixa de número de ondas entre 4000 e 400 cm^{-1} . Essa análise foi realizada na Central de Análises do Departamento de Química (UFSC).

Utilizou-se um analisador termogravimétrico (Shimadzu TGA-50, Tóquio, Japão) para avaliar a estabilidade térmica do biossorvente. Para tanto, o pó da bráctea foi previamente seco em estufa e massas de 7,5 g foram pesadas para análise, que foi realizada na faixa de temperatura de 21 a 800 °C, a uma taxa de aquecimento de 10 °C min^{-1} sob atmosfera inerte de nitrogênio. Essa análise foi realizada no Grupo de Estudo em Materiais Poliméricos (POLIMAT) do Departamento de Química (UFSC).

Um microscópio eletrônico de varredura (MEV) Hitachi TM 3030 (Tarrytown, NY, EUA) foi utilizado para avaliar a morfologia do pó da bráctea. As análises foram realizadas com voltagem de 30 kV sobre a amostra coberta com um filme de ouro. As análises foram efetuadas no Núcleo de Pesquisas em Materias Cerâmicos e Compósitos (CEMART) localizado no Departamento de Engenharia Mecânica (UFSC).

A área específica do pó da bráctea foi medida através da isoterma de adsorção de nitrogênio (N_2) a 77 K pelo método BET (Brunauer, Emmett e Teller), utilizando um ChemBET 3000 (Boynton Beach, FL, USA). Essa análise foi realizada no Laboratório de Catálise Heterogênea (LABOCATH) do Departamento de Química (UFSC).

A caracterização da fibra de bráctea foi realizada através da MEV para averiguar a morfologia da bráctea recoberta no fio de nitinol, assim como a espessura do recobrimento.

Em adição, em colaboração com o professor Joni Stolberg do Departamento de Ciências Naturais e Sociais da UFSC, Campus Curitiba, a composição da bráctea foi caracterizada quanto ao teor de cinzas, extrativos totais e teor de lignina, de acordo com a metodologia reportada por (Sjöström e Alén, 1999).

4.2.5 Otimização da metodologia

4.2.5.1 Condições selecionadas inicialmente

Antes de iniciar a otimização da metodologia proposta, algumas condições experimentais foram selecionadas. O modo de extração selecionado para esse estudo foi o modo DI-SPME, devido à baixa volatilidade dos agrotóxicos organoclorados estudados e também levando em conta que a amostra não é danosa a fibra de SPME. Considerando que o modo escolhido é bifásico, envolvendo somente a amostra e a fibra, e que utilizou-se frascos de 22 mL nas extrações, optou-se por utilizar 22 mL de amostra para que não houvesse nenhum espaço vazio acima da amostra, evitando assim que os analitos pudessem ir para o *headspace*. Ademais, considerando que algum nível de agitação é necessário para transportar os analitos da solução para a vizinhança da fibra para facilitar tempos de equilíbrios mais rápidas, todas as extrações foram realizadas com agitação magnética constante de 1000 rpm. Esse nível de agitação foi selecionado baseado em trabalhos anteriores (Dias *et al.*, 2013; Dias *et al.*, 2015). Por fim, como os compostos em estudo são analitos não ionizáveis, o efeito do pH sobre esses analitos não é considerado significativo, por isso, optou-se por não otimizar esse parâmetro e trabalhar com o pH da amostra de água (em torno de 6 a 7).

4.2.5.2 Otimização do tempo e temperatura de extração e adição de NaCl

Neste estudo, foram estudados os parâmetros da SPME que podem influenciar a extração dos agrotóxicos organoclorados utilizando a fibra de bráctea e uma fibra comercial (DVB/Car/PDMS, 50/30 μm). A fibra DVB/Car/PDMS foi escolhida com base em estudos que utilizaram este revestimento sorvente para análise de OCPs (Magdic e Pawliszyn, 1996; Prates *et al.*, 2011; Dias *et al.*, 2015). Essa fibra foi condicionada termicamente a 260 °C durante 60 min no injetor do GC antes de ser utilizada.

As extracões foram realizadas utilizando amostras contendo 100 ng L⁻¹ de cada analito em água ultrapura. Nos experimentos, a fibra foi inserida em frascos de 22 mL contendo 22 mL de amostra e as extrações foram realizadas sob agitação constante de 1000 rpm. Após as extrações, a fibra foi imediatamente inserida no injetor de GC para realizar a dessorção térmica a 260 °C durante 7 min. As estratégias de otimização usando ambas as fibras foram semelhantes. A temperatura de extração (20-80 °C), o tempo de extração (30-120 min) e a adição de NaCl (0-30%, m/v) foram investigados simultaneamente usando um planejamento

composto central, totalizando 17 experimentos, incluindo uma triplicata no ponto central, conforme apresentado na Tabela 7.

Tabela 7. Planejamento composto central empregado para otimização da extração dos agrotóxicos organoclorados por SPME utilizando a fibra de bráctea e a fibra comercial (DVB/Car/PDMS).

Experimentos	Temperatura de extração (°C)	Tempo de extração (min)	NaCl (%)
1	30	50	6
2	30	50	24
3	30	100	6
4	30	100	24
5	68	50	6
6	68	50	24
7	68	100	6
8	68	100	24
9	20	75	15
10	80	75	15
11	49	30	15
12	49	120	15
13	49	75	0
14	49	75	30
15, 16, 17 (ponto central)	49	75	15

Fonte: Autoria própria.

4.2.6 Preparo de amostra otimizado

Para as extrações utilizando a fibra de bráctea, a fibra foi imersa em frascos de 22 mL contendo 22 mL de amostras aquosas enriquecidas com os analitos e 15% (m/v) de NaCl a 80 °C durante 80 min. Para as extrações utilizando o revestimento DVB/Car/ PDMS, a fibra foi imersa em frascos de 22 mL contendo 22 mL de amostras aquosas fortificadas com os agrotóxicos sem adição de NaCl durante 100 min a 70 °C. As extrações utilizando ambas as fibras foram realizadas com agitação magnética constante de 1000 rpm. A dessorção dos analitos foi realizada de forma idêntica para as duas fibras estudadas. Imediatamente após as extrações, a fibra foi inserida no injetor do GC a 260 °C por 7 min.

4.2.7 Comparação das eficiências de extração da fibra de bráctea com a fibra DVB/Car/PDMS

Após realização das otimizações, a eficiência da fibra proposta foi comparada com a fibra comercial (DVB/Car/PDMS). Para essa avaliação, foi utilizada água ultrapura enriquecida com agrotóxicos organoclorados na concentração de 100 ng L^{-1} e extrações foram realizadas em triplicata utilizando as condições experimentais otimizadas para cada fibra.

4.2.8 Amostras de água

Os estudos de exatidão e precisão da metodologia utilizando a fibra de bráctea foram realizados utilizando uma amostra de água de Rio (Rio Cubatão, Palhoça, SC, Brasil) (-27,69393742, -48,7089750). A aplicabilidade da metodologia foi avaliada através de extrações utilizando as condições otimizadas em cinco diferentes amostras coletadas da Lagoa do Peri (Florianópolis, SC, Brasil) com as seguintes localizações geográficas: -27,7383, -48,5166; -27,7315, -48,5192; -27,7282, -48,5114; -27,7261, -48,5095 e -27,7167, -48,5333. As amostras foram estocadas em frascos de vidro âmbar propriamente selados e mantidas sob refrigeração a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ até as análises.

4.2.9 Parâmetros analíticos de mérito

Parâmetros analíticos de mérito foram empregados para avaliar a performance dos métodos propostos utilizando a fibra de bráctea e também a fibra DVB/Car/PDMS. Nessas etapas, foram empregados os preparos de amostra otimizados. Curvas analíticas foram construídas utilizando água ultrapura enriquecidas com os analitos em 6 níveis diferentes. Sendo cada nível fortificado realizado em triplicata. As curvas analíticas foram utilizadas para determinar a faixa linear de trabalho, coeficientes de correlação (R) e limites de quantificação (LOQ, do inglês *Limit of Quantification*) e detecção (LOD, do inglês *Limit of Detection*). Os valores de LOD e o LOQ foram calculados como três e dez vezes a razão sinal/ruído, respectivamente.

A exatidão e a precisão intradia do método proposto utilizando a fibra de bráctea foram avaliadas por meio de extrações em amostras de água de rio (Rio de Cubatão, Palhoça, SC,

Brasil) em dois níveis de fortificação, sendo o primeiro e um nível intermediário da faixa linear de trabalho (5 e 50 ng L⁻¹) e a precisão interdia avaliada apenas no nível intermediário (50 ng L⁻¹). Nessas etapas, foi utilizado o preparo de amostra otimizado. A exatidão foi verificada através da porcentagem de recuperação relativa dos analitos (n=3). A precisão foi calculada como a porcentagem do desvio padrão relativo (RSD, do inglês *Relative Standard Deviation*), sendo a precisão intradia avaliada em três determinações para cada nível fortificado no mesmo dia (n=3) e a precisão interdia foi estudada através de três determinações em três dias diferentes (n=9). Os valores considerados aceitáveis pela literatura para precisão e exatidão foram baseados na Associação Oficial de Químicos Analíticos (AOAC) (AOAC, 2016).

4.2.10 Reprodutibilidade e durabilidade da fibra de bráctea

A reprodutibilidade na produção das fibras e a durabilidade da fibra de bráctea também foram avaliadas. Para esses estudos, utilizou-se água ultrapura enriquecida com 100 ng L⁻¹ dos analitos e o preparo de amostra otimizado. A reprodutibilidade das fibras foi avaliada com base no valor de RSD obtido usando três fibras à base de biossorbente que foram recobertas nas mesmas condições, conforme apresentado na seção 4.2.3 e submetidas a extrações dos OCPs (n=3). Para a avaliação da durabilidade, uma fibra de bráctea foi submetida a até 50 ciclos de extração/dessorção e as áreas de picos cromatográficos de cada ciclo foram comparadas.

4.2.11 Programas utilizados na análise dos dados

Para a análise dos dados gerados nos experimentos deste trabalho, foram utilizados os seguintes programas: Microsoft Excel 2016, OriginLab 6 e *Statsoft Statistica* 8.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

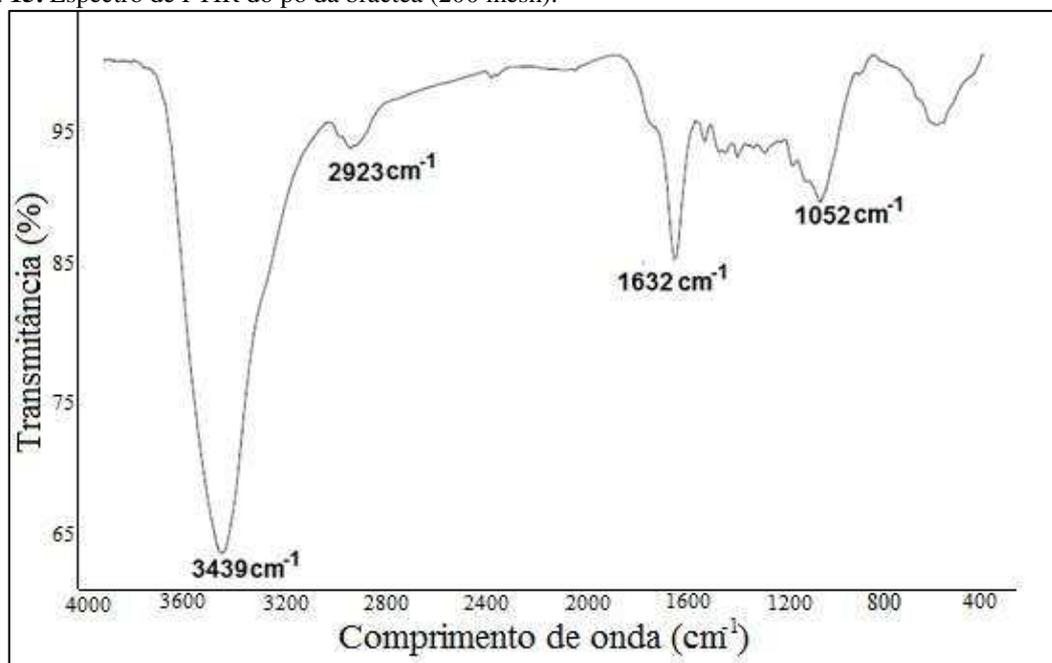
4.3.1 Caracterização da bráctea

Neste estudo, o FTIR foi utilizado para avaliar os grupos funcionais presentes no material biossorbente proposto. A Figura 15 mostra o espectro de FTIR obtido a partir do pó da bráctea (200 mesh). A banda larga em 3439 cm⁻¹ é atribuída à ligação O-H e a banda em 2923 cm⁻¹ corresponde ao estiramento C-H atribuído aos polissacarídeos e à lignina. A banda

observada em 1632 cm^{-1} é atribuída à ligação C=C de anéis aromáticos. A banda em 1052 cm^{-1} está relacionada com o alongamento da ligação C-O-C (Lima *et al.*, 2007; Razali *et al.*, 2016; Luo *et al.*, 2017). Esses resultados são característicos para os grupos químicos presentes na celulose, hemicelulose e lignina, que são os constituintes principais do bioissorvente utilizado e mostram uma composição química heterogênea desse material, proporcionando inúmeras possibilidades de interação para uma ampla gama de compostos.

A banda larga em 3439 cm^{-1} é atribuída à ligação O-H e a banda em 2923 cm^{-1} corresponde ao estiramento C-H atribuído aos polissacarídeos e à lignina. A banda observada em 1632 cm^{-1} é atribuída à ligação C=C de anéis aromáticos. A banda em 1052 cm^{-1} está relacionada com o alongamento da ligação C-O-C (Lima *et al.*, 2007; Razali *et al.*, 2016; Luo *et al.*, 2017). Esses resultados são característicos para os grupos químicos presentes na celulose, hemicelulose e lignina, que são os constituintes principais do bioissorvente utilizado e mostram uma composição química heterogênea desse material, proporcionando inúmeras possibilidades de interação para uma ampla gama de compostos.

Figura 15. Espectro de FTIR do pó da bráctea (200 mesh).



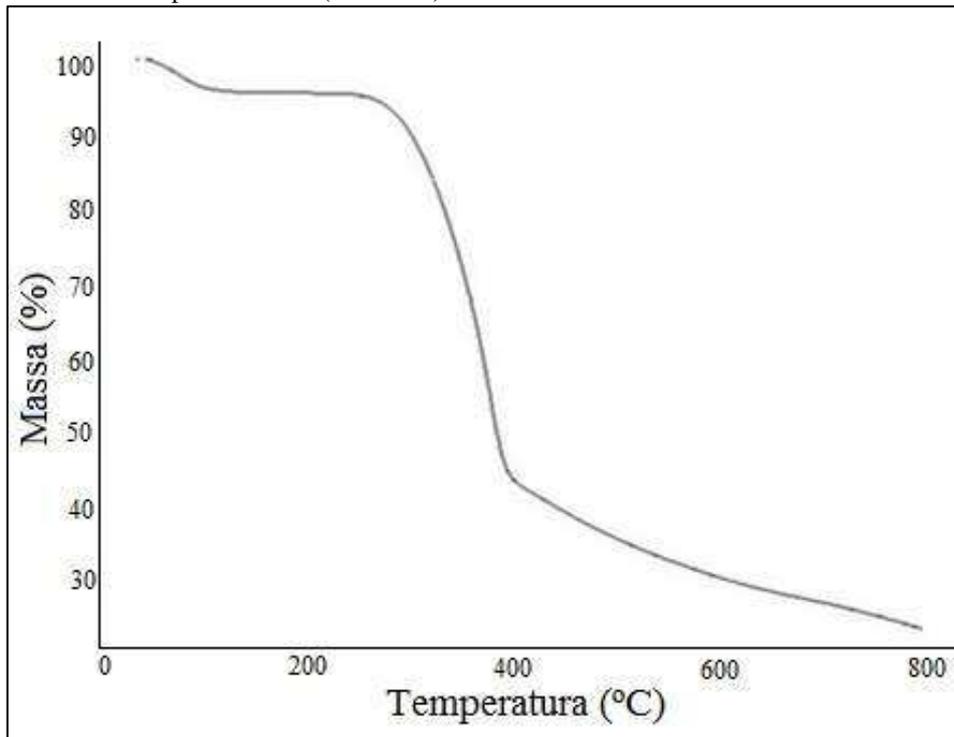
Fonte: Autoria própria.

Uma característica importante associada a esse material bioissorvente é a presença de grupos O-H em sua estrutura. Esses grupos polares podem interagir através de interações de ligação de hidrogênio e/ou dipolo-dipolo com compostos que possuem, por exemplo, O-H e N-

H, em suas estruturas químicas. Geralmente, a extração de compostos mais polares em amostras aquosas é um grande desafio e o revestimento à base de biossorvente proposto oferece essa característica importante. Além disso, a extração dos analitos pela bráctea pode ser realizada pelas interações de Van der Waals com os compostos. Ademais, a extração pode ocorrer através de interações π - π com os anéis aromáticos presentes na lignina os analitos que possuem anel aromático em sua estrutura.

A Figura 16 apresenta o comportamento térmico do biossorvente proposto.

Figura 16. TGA obtido do pó da bráctea (200 mesh).



Fonte: Autoria própria.

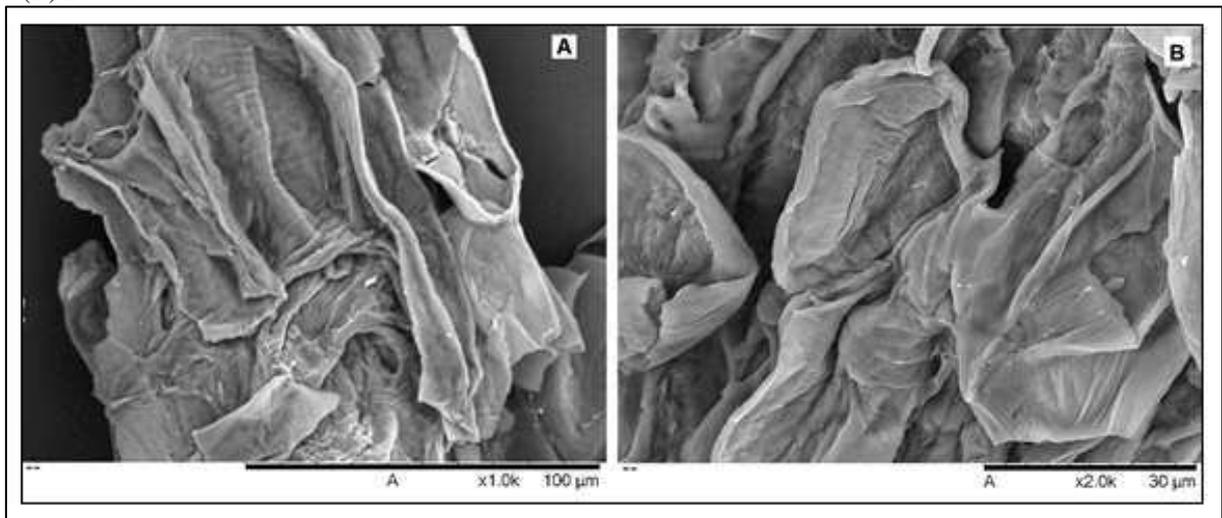
O gráfico de perda de massa observado na Figura 16 pode ser dividido em três estágios de decomposição térmica. No primeiro, entre 30 °C e 115 °C, aproximadamente, ocorre perda de massa associada com perda de umidade. No segundo, entre 300 °C a 400 °C, aproximadamente, ocorre a decomposição do conteúdo orgânico presente na bráctea. E por fim, a partir de 400 °C, ocorre perda de massa que pode estar associada à decomposição de óleos de ácidos graxos e outros extrativos. Ao final, em 800 °C, é observado cerca de 22,07% de massa restante, que podem ser considerados resíduos de queima (Macedo *et al.*, 2008; Calvete *et al.*, 2009). A estabilidade térmica do revestimento sorvente é um fator muito importante quando GC é utilizada como técnica de separação. O TGA mostrou que o material não sofre

decomposição até 300 °C, o que demonstra elevada estabilidade térmica e que o material não sofre degradação na temperatura utilizada no injetor do cromatógrafo (260 °C) em que a fibra é exposta para dessorção térmica dos analitos.

O MEV foi realizado para caracterizar a morfologia da superfície do biossorvente proposto. Os resultados obtidos para o pó da bráctea, em ampliações de 1000x e 2000x, são mostrados na Figura 17 (A e B, respectivamente). De acordo com essas figuras, a morfologia da bráctea apresenta uma matriz altamente porosa e rugosa, o que pode facilitar o processo físico de sorção dos analitos.

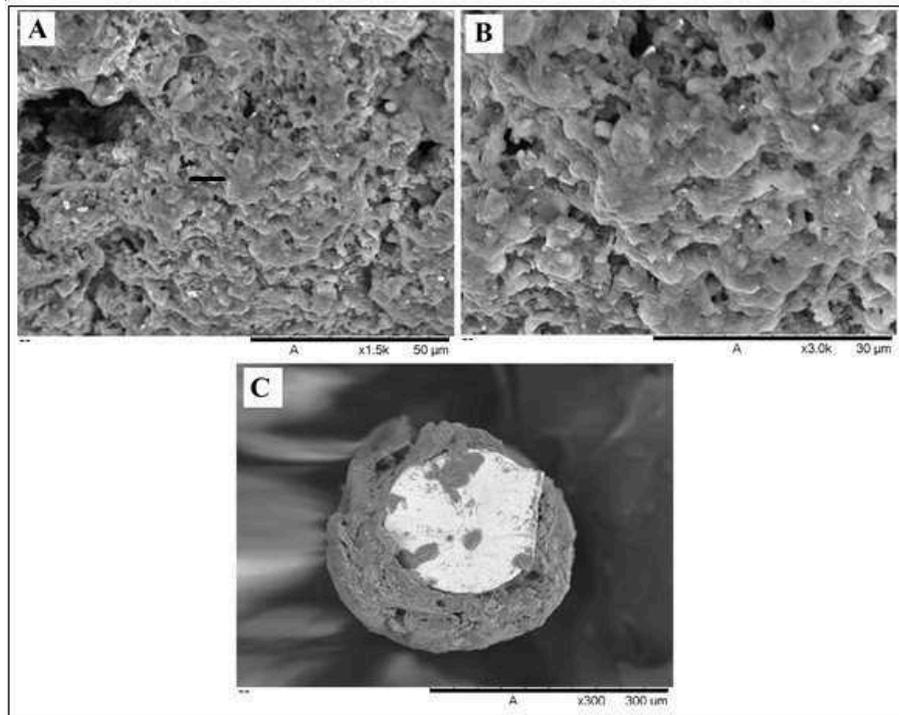
Em adição, MEV também foi realizado para caracterizar a morfologia da superfície da fibra de bráctea e para estimar a espessura do revestimento sorvente proposto. Os resultados obtidos para a avaliação da superfície da fibra em 1500x e 3000x de aumento são mostrados na Figura 18 (A e B, respectivamente) e a imagem correspondente a uma seção transversal da fibra é mostrada na Figura 18-C. A Figura 18 (A e B) confirma que a superfície do material se manteve porosa e rugosa mesmo depois de ser aderido ao suporte de nitinol. Além disso, a avaliação da seção transversal (Figura 18-C) também realçou uma estrutura porosa na parte interna do revestimento sorvente e, de acordo com essa imagem, obteve-se uma espessura de película de aproximadamente 60 μm . Assim, com base nesses resultados, esse material exibe um perfil morfológico adequado para reter fisicamente os analitos.

Figura 17. Micrografias eletrônicas de varredura obtidas pó de bráctea (200 mesh) em ampliações de (A) 1000x e (B) 2000x.



Fonte: Autoria própria.

Figura 18. Micrografias eletrônicas de varredura obtidas da superfície da fibra de bráctea em (A) ampliação de 1500x (B) de 3000x e (C) uma seção transversal da fibra na ampliação de 300x.



Fonte: Autoria própria.

Ademais, a partir da adsorção das isotermas de N₂ foi determinada a área específica do pó da bráctea pelo método BET, encontrando-se um valor de 65,29 m² g⁻¹. A área específica apresentada pela bráctea apresentou um valor superior quando comparado a outros bioissorventes relatados na literatura (Chen *et al.*, 2011; Sihem *et al.*, 2012; Mafra *et al.*, 2018). Em adição, considerando que a bráctea é um material natural, esse valor poderia ser melhorado após o bioissorvente ser submetido à modificação química ou térmica (Tran *et al.*, 2015).

Por fim, a composição química da bráctea foi avaliada para permitir uma caracterização mais abrangente do material proposto. Nessa avaliação, a bráctea exibiu 1,88% de cinzas, 6,06% de extrativos totais, 45,38% de lignina e 46,68% de holocelulose (celulose e hemicelulose). Esses resultados destacam a diferença na composição química do material proposto em comparação com o bioissorvente lignocelulósico (cortiça) que foi utilizado como fase extratora para SPME em estudos previamente relatados, considerando que a cortiça é composta por 40% de suberina, 24% de lignina e 20% de holocelulose (Dias *et al.*, 2013; Dias *et al.*, 2015).

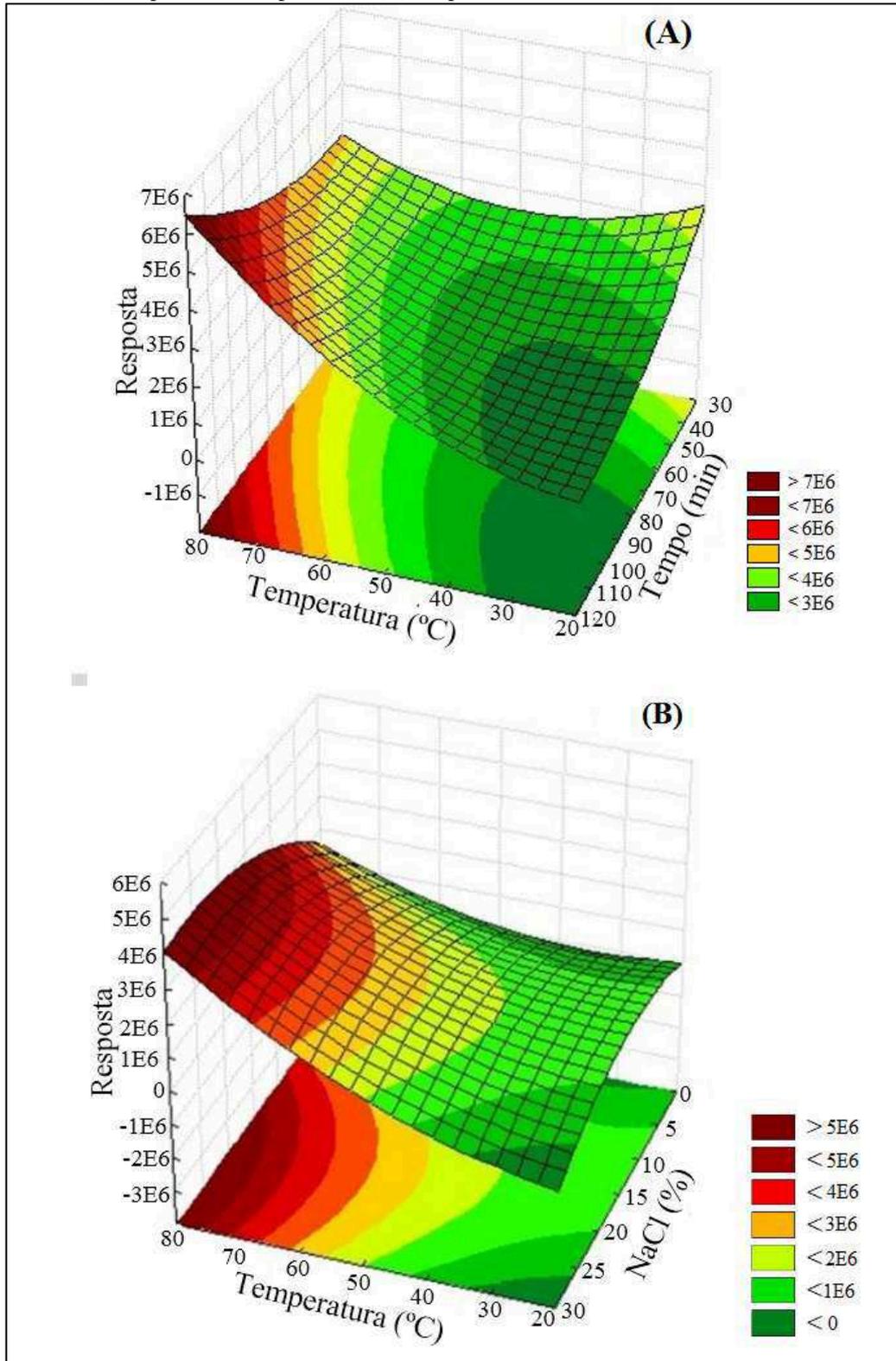
4.3.2 Otimização do tempo e temperatura de extração e adição de NaCl

Para a otimização da influência do tempo e temperatura de extração e da adição de sal na extração dos OCPs, foi realizado um planejamento composto central utilizando a fibra de bráctea e também uma fibra comercial, conforme descrito na seção experimental. Para as análises desse procedimento, foram adotadas as médias geométricas das áreas dos picos cromatográficos correspondentes aos seis analitos. A média geométrica foi usada devido ao fato que alguns compostos apresentarem áreas cromatográficas muito superiores a outros, o que poderia ocasionar alguns problemas para a determinação da condição otimizada de extração. Assim, a utilização da média geométrica reduz esse efeito.

As superfícies de resposta obtidas para a fibra de bráctea e para a fibra de DVD/Car/PDMS são mostradas nas Figuras 19 e 20, respectivamente. Essas representam uma resposta compromisso para todos os analitos. As equações quadráticas geradas nos planejamentos composto central pelo *Statsoft Statistica* apresentaram coeficientes de determinação (R^2) iguais a 0,9594 para a fibra de bráctea e a 0,8997 para a fibra comercial.

As condições ótimas de extração para a fibra de biossorvente foram obtidas utilizando um tempo de extração de 80 min a 80 °C e 15% (m/v) de NaCl (Figura 19). Para a fibra de DVB/Car/PDMS, os melhores resultados foram obtidos com o tempo de extração de 100 min a 70 °C sem adição de NaCl (Figura 20). Para as duas fibras estudadas, os agrotóxicos exibiram áreas crescentes de pico cromatográfico até 120 min de extração, provavelmente não atingindo o equilíbrio, no entanto, se a sensibilidade é suficiente para uma análise quantitativa, uma condição de pré-equilíbrio pode ser adotada. Além disso, tempos de extração mais longos podem ser evitados com o uso de altas temperaturas de extração, o que favorece a difusão dos analitos da matriz para a fibra (Ouyang e Pawliszyn, 2006). Por conseguinte, foram selecionados 80 min de extração combinados a uma temperatura de 80 °C para a fibra de bráctea e foram selecionados 100 min de extração combinados a uma temperatura de 70 °C para a fibra de DVB/Car/ PDMS.

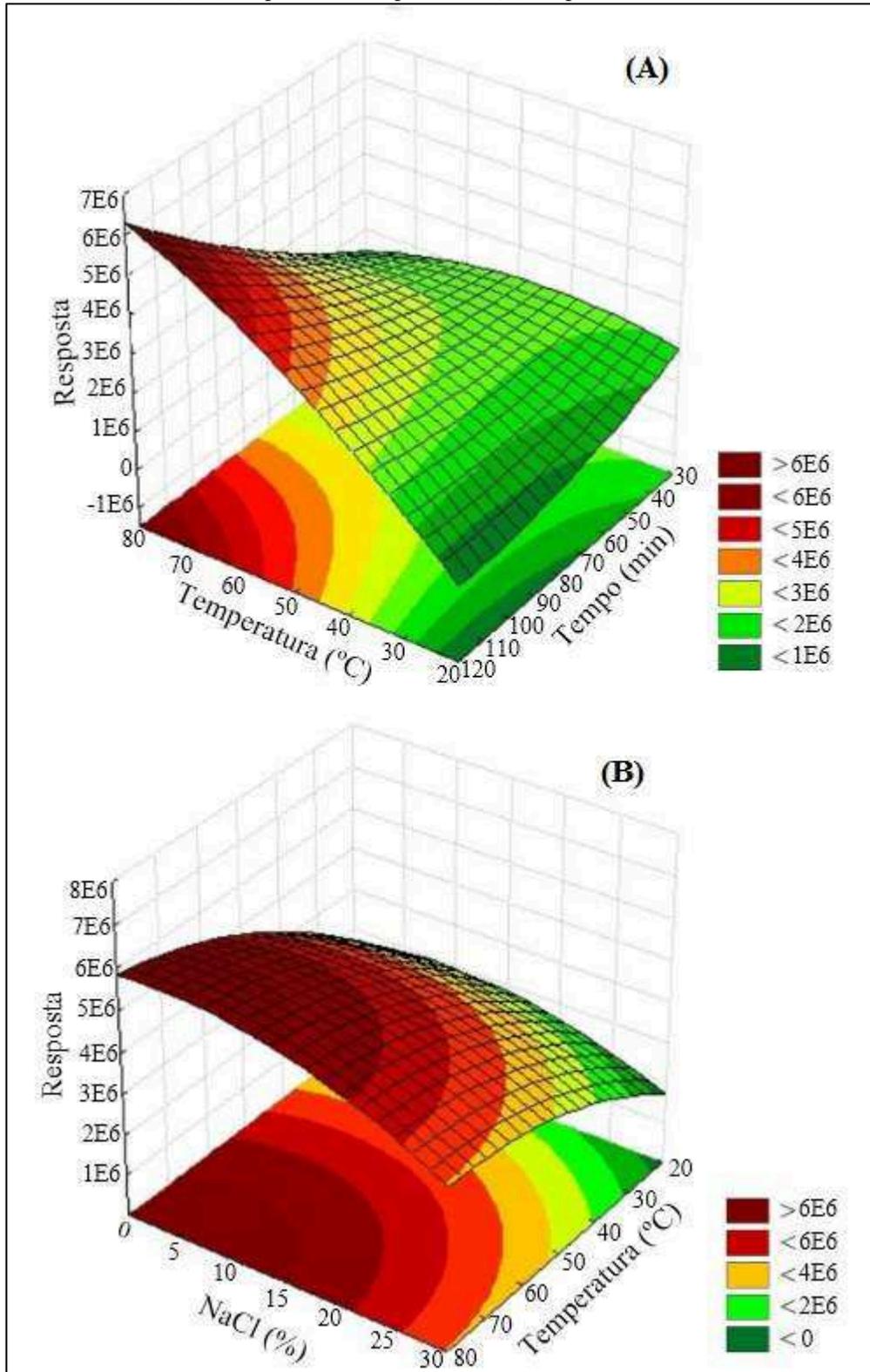
Figura 19. Superfícies de resposta obtidas na extração de agrotóxicos organoclorados em água por SPME com a fibra de bráctea (A) tempo versus temperatura e (B) temperatura versus % de NaCl.



Fonte: Autoria própria.

*Condições experimentais: 22 mL de água ultrapura enriquecida com 100 ng L⁻¹ dos OCPs.

Figura 20. Superfícies de resposta obtidas na extração de agrotóxicos organoclorados por SPME com a fibra comercial (DVB/Car/PDMS) (A) tempo versus temperatura e (B) temperatura versus % de NaCl.



Fonte: Autoria própria.

*Condições experimentais: 22 mL de água ultrapura enriquecida com 100 ng L⁻¹ dos OCPs.

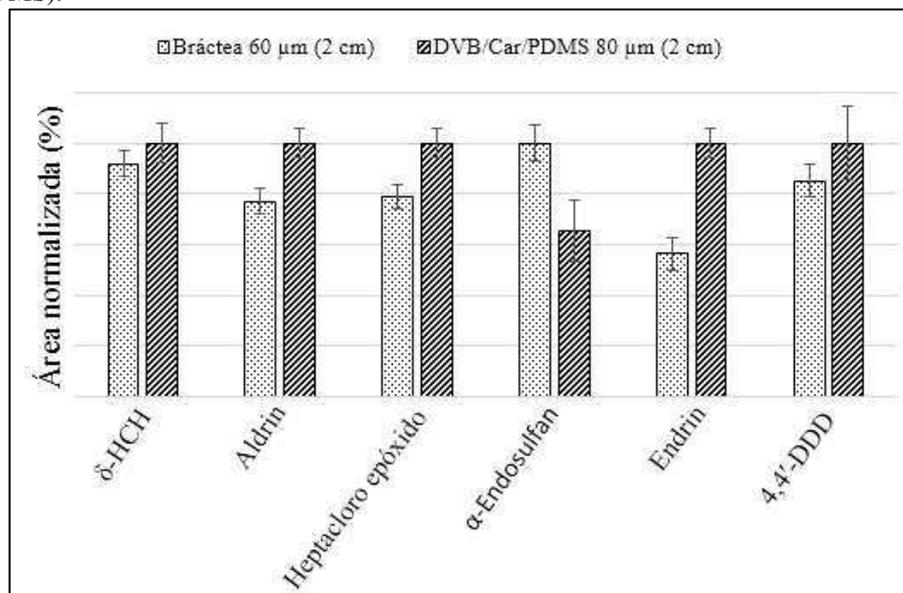
Em relação à avaliação da adição de sal, para a fibra de biossorvente, as melhores respostas foram obtidas utilizando uma concentração de NaCl a partir de 15% (m/v). Para a fibra DVB/Car/PDMS, obtiveram-se respostas mais elevadas com baixas concentrações de NaCl, dessa forma, não foi utilizado NaCl como condição otimizada para essa variável.

A fim de confirmar que a extração dos analitos foi realizada pela bráctea e não pela cola epóxi usada na produção de fibras, um fio de nitinol revestido apenas com cola epóxi foi preparado de acordo com o mesmo procedimento utilizado no preparo da fibra à base de biossorvente. Foram realizadas extrações utilizando a fibra recoberta com cola epóxi e não foram observados picos relacionados aos analitos.

4.3.3 Comparação das eficiências de extração da fibra de bráctea com a fibra DVB/Car/PDMS

Para avaliar o desempenho de extração da fibra proposta, a eficiência de extração da fibra de bráctea foi comparada com uma fibra comercial (DVB/Car/PDMS) usando as condições previamente otimizadas. Um gráfico de barras contendo a área do pico normalizada é mostrado na Figura 21.

Figura 21. Comparação da eficiência de extração utilizando a fibra de bráctea e uma fibra comercial (DVB/Car/PDMS).



Fonte: Autoria própria.

*Condições experimentais: 22 mL de água ultrapura enriquecida com 100 ng L⁻¹ dos OCPs. Fibra de bráctea: tempo de extração de 80 min; temperatura de 80 °C e 15% de NaCl. Fibra comercial: tempo de extração de 100 min e temperatura de 70 °C. (n=3).

Devido ao fato de as fibras possuírem espessuras diferentes, o valor correspondente à média das áreas dos picos cromatográficos para cada analito foi dividido pelo valor da espessura da fibra.

Pode-se observar que o revestimento de biossorvente apresentou comportamento muito promissor para a extração dos compostos estudados. De acordo com a Figura 21, utilizando o revestimento sorvente proposto, foram obtidas eficiências de extração em torno de 80% em relação à fibra comercial de SPME para o aldrin e o heptacloro epóxido. Em relação ao δ -HCH e 4,4'-DDD, os resultados obtidos com a fibra de bráctea foram semelhantes aos obtidos com fibra de DVB/Car/PDMS. Em relação ao α -endossulfan, o revestimento de biossorvente apresentou maior desempenho, enquanto que para endrin a fibra comercial apresentou maior eficiência de extração.

A bráctea é natural, renovável e biodegradável e apresentou excelentes resultados em comparação com um revestimento sorvente comercial (DVB/Car/PDMS) com alta capacidade de extração para uma ampla variedade de compostos. Além de apresentar um desempenho analítico muito satisfatório, a fibra de bráctea apresentou um processo de fabricação simples e rápido e oferece uma opção confiável em comparação com os revestimentos sorventes comercialmente disponíveis. Além disso, o custo de produção associado à fibra de SPME proposta é muito baixo em comparação com o custo de compra de uma fibra comercial (aproximadamente 200 vezes menor).

4.3.4 Parâmetros analíticos de mérito

Os parâmetros analíticos de mérito para os revestimentos de biossorvente e DVD/Car/PDMS são mostrados na Tabela 8 e Tabela 9, respectivamente. As curvas analíticas foram construídas em água ultrapura com concentrações conhecidas dos analitos, em 6 níveis diferentes. Alguns parâmetros importantes foram avaliados, incluindo faixa linear de trabalho, R, LOD e LOQ.

Como pode ser observado nas Tabelas 8 e 9, os resultados obtidos com os dois revestimentos sorventes estudados foram muito semelhantes. Em relação à fibra de bráctea (Tabela 8), os coeficientes de correlação (R) variaram de 0,9648 para endrin a 0,9981 para 4,4'-DDD, o que indica boas correlações lineares. Limites de quantificação (LOQ) variaram de 0,65 ng L⁻¹ para o aldrin a 2,38 ng L⁻¹ para o 4,4'-DDD.

Tabela 8. Faixa linear de trabalho, coeficiente de correlação (R), limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) para determinação de agrotóxicos organoclorados em água utilizando o método proposto com a fibra de bráctea.

Analito	Faixa linear (ng L⁻¹)	R	LOD^a (ng L⁻¹)	LOQ^b (ng L⁻¹)
δ-HCH	5 – 100	0,9821	0,43	1,44
Aldrin	5 – 100	0,9963	0,19	0,65
Heptachloro epóxido	5 – 100	0,9862	0,44	1,46
α-Endosulfan	5 – 100	0,9862	0,50	1,65
Endrin	5 – 100	0,9648	0,23	0,75
4,4'-DDD	5 – 100	0,9981	0,71	2,38

Fonte: Autoria própria.

*Condições experimentais: 22 mL de água ultrapura enriquecida com os OCPs; tempo de extração de 80 min; temperatura de 80 °C e 15% de NaCl. (n=3)

^aLOD: 3 vezes a razão sinal/ruído e ^bLOQ: 10 vezes a razão sinal/ruído.

Tabela 9. Faixa linear de trabalho, coeficiente de correlação (R), limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) para determinação de agrotóxicos organoclorados em água utilizando o método proposto com a fibra DVB/Car/PDMS.

Analito	Faixa linear (ng L⁻¹)	R	LOD (ng L⁻¹)	LOQ (ng L⁻¹)
δ-HCH	1 – 100	0,9934	0,16	0,56
Aldrin	5 – 100	0,9866	0,26	0,85
Heptacloro epóxido	5 – 100	0,9813	0,27	0,87
α-Endosulfan	5 – 100	0,9744	0,64	2,12
Endrin	5 – 100	0,9607	0,17	0,58
4,4'-DDD	10 – 100	0,9971	0,65	2,18

Fonte: Autoria própria.

*Condições experimentais: 22 mL de água ultrapura enriquecida com os OCPs; tempo de extração de 100 min; temperatura de 70 °C e sem adição de de NaCl. (n=3).

^aLOD: 3 vezes a razão sinal/ruído e ^bLOQ: 10 vezes a razão sinal/ruído.

Conforme foi anteriormente apresentado na Tabela 6, a Diretiva 013/39/UE da União Europeia estabelece limites máximos de resíduos para alguns dos compostos estudados em águas superficiais. Os limites máximos permitidos são 10 ng L⁻¹ para o α -endosulfan, 0,3 ng L⁻¹ para a soma do heptacloro epóxido com o heptacloro e 10 ng L⁻¹ para a soma do aldrin e do endrin com outros agrotóxicos (isoeldrin e dieldrin) (Diretiva 2013/39/UE). Sendo assim, o método proposto utilizando a fibra de bráctea exibiu um LOQ suficientemente baixo para analisar a maioria dos OCPs estudados, apenas para o heptacloro epóxido o método exibiu LOQ maior que a regulamentação do composto.

Em adição, a exatidão e a precisão intradia (RSD) do método utilizando a fibra de bráctea foram avaliadas pela fortificação de amostras de água de rio em duas concentrações diferentes dos analitos (5 e 50 ng L⁻¹), enquanto a precisão interdia (RSD) foi avaliada no nível de 50 ng L⁻¹. A exatidão do método foi avaliada através da porcentagem de recuperação relativa dos analitos. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Ensaio de recuperação relativa e precisão (RSD) usando o método proposto com a fibra de bráctea.

Analito	Nível de fortificação (ng L⁻¹)	Recuperação relativa (%) (n = 3)	Precisão intradia (RSD) (%) (n = 3)	Precisão interdia (RSD) (%) (n = 9)
δ -HCH	5	64	6	-
	50	110	6	11
Aldrin	5	69	8	-
	50	88	5	2
Heptacloro epóxido	5	93	15	-
	50	76	19	23
α -Endosulfan	5	75	11	-
	50	60	5	9
Endrin	5	94	12	-
	50	84	14	17
4,4'-DDD	5	79	15	-
	50	68	9	17

Fonte: Autoria própria.

*Condições experimentais: 22 mL de água de rio enriquecida os OCPs; tempo de extração de 80 min; temperatura de 80 °C e 15% de NaCl.

De acordo com a Tabela 10, a recuperação relativa e as precisões intradia e interdia (RSD) variaram de 60 a 110% e 2 a 19%, respectivamente. Segundo a AOAC, os valores aceitáveis de porcentagem de recuperação relativa para avaliar a exatidão do método estão entre 40 e 120% para concentrações até $1 \mu\text{g L}^{-1}$. E para a precisão (intradia e interdia), os valores de RSD aceitáveis são abaixo de 30% para concentrações até $1 \mu\text{g L}^{-1}$ (AOAC, 2016). Portanto, todos os valores de recuperação relativa e precisão obtidos estão de acordo com os limites aceitáveis pela AOAC.

4.3.5 Reprodutibilidade e durabilidade da fibra de bráctea

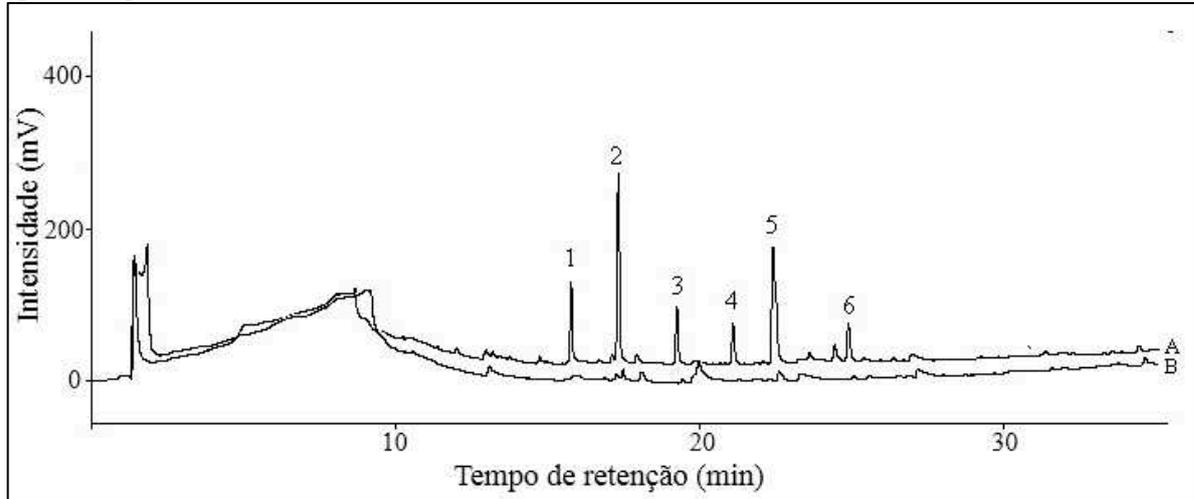
Na avaliação da reprodutibilidade da fibra de bráctea, três fibras foram recobertas nas mesmas condições e submetidas a extrações dos OCPs em água ultrapura. Os valores de RSD obtidos nesse estudo foram inferiores a 14%, confirmando que a produção de diferentes fibras de bráctea é reprodutível. Além disso, a durabilidade da fibra de bráctea foi verificada através de extrações utilizando amostras de água ultrapura fortificadas com os analitos na mesma concentração de 100 ng L^{-1} e pelo menos 50 ciclos de extração (extração/dessorção) foram realizados sem observar perda significativa da eficiência de extração. Esse número pode ser considerado baixo quando comparado com algumas fibras comerciais que possuem vida útil de até 100 extrações. Entretanto, deve ser considerado que a bráctea é um material natural, a produção da fibra à base de biossorbente é rápida, simples e reprodutível, além da fibra ter um baixo custo quando comparada a uma fibra comercial.

4.3.6 Aplicação do método proposto utilizando a fibra de bráctea

O método proposto utilizando a fibra de bráctea foi aplicado para analisar cinco amostras coletadas de diferentes áreas da lagoa do Peri (Florianópolis, Santa Catarina, Brasil) e as concentrações encontradas dos analitos foram abaixo dos valores de LOD.

Na Figura 22 são mostrados os cromatogramas para as amostras de água de lagoa não fortificada e fortificada (20 ng L^{-1}) com OCPs após realização da extração com a fibra de bráctea, nas condições otimizadas.

Figura 22. Cromatogramas para as amostras de água de lagoa (A) fortificada (20 ng L⁻¹) e (B) não fortificada com agrotóxicos organoclorados após extração por SPME com a fibra de bráctea. Analitos: (1) δ-HCH (2) aldrin (3) heptacloro epóxido (4) α-endosulfan (5) endrin e (6) 4,4'-DDD.



Fonte: Autoria própria.

*Condições experimentais: tempo de extração de 80 min; temperatura de 80 °C e 15% de NaCl.

4.3.7 Comparação do método proposto com métodos descritos na literatura

O método desenvolvido com a fibra de bráctea para determinação de OCPs utilizando SPME e GC-ECD foi comparado com outros métodos reportados na literatura que utilizam a mesma técnica de preparo de amostras para determinação de OCPs em matrizes aquosas, conforme mostrado na Tabela 11.

Tabela 11. Comparação do método proposto utilizando a fibra de bráctea com outros métodos reportados na literatura que utilizaram SPME para determinação de agrotóxicos organoclorados em matrizes aquosas.

Separação/deteção	Fase extratora	LOD (ng L ⁻¹)	Referência
GC-ECD	Bráctea	0,43 ^a ; 0,19 ^b ; 0,44 ^c 0,50 ^d ; 0,23 ^e ; 0,71 ^f	Este trabalho
GC-ECD	MOFs ^g	3,6 ^a ; 2,8 ^b ; 3,7 ^c ; 4,8 ^d ; 2,3 ^f	(Zhang <i>et al.</i> , 2013)
GC-MS/MS	PA	40 ^{a,c} ; 20 ^b ; 7 ^d ; 30 ^f	(Jabali <i>et al.</i> , 2019)
GC-MS	C-PDA ^h	8,7 ^b ; 1,3 ^c ; 8 ^f	(Huang <i>et al.</i> , 2015)

Fonte: Autoria própria.

^aδ-HCH; ^baldrin; ^cheptacloro epóxido; ^dα-endosulfan; ^eendrin; ^f4,4'-DDD; ^gestruturas metal-orgânicas e ^hpolidopamina carbonizada.

Como pode ser observado na Tabela 11, o método proposto usando a fibra de bráctea, quando comparado com estudos relatados anteriormente que empregaram SPME para

determinação de OCPs em amostras aquosas utilizando diferentes recobrimentos, fornece limites de detecção mais baixos. Além disso, apresenta a vantagem de utilizar um material natural, renovável e biodegradável como fase sorvente.

4.4 CONCLUSÕES PARCIAIS

Os resultados obtidos mostraram que a bráctea é um revestimento verde promissor para ser utilizado como fase extratora de SPME, tornando-se uma alternativa para o descarte desse material que não possui utilidade definida. O processo de fabricação da fibra de bráctea é simples, economicamente viável e contribui para minimizar impactos ambientais. O novo biossorvente permitiu a determinação de agrotóxicos organoclorados em nível ultra traço em amostras de água. O desempenho analítico foi semelhante a uma fibra comercial, indicando que este biossorvente oferece uma alternativa confiável e poderosa para ser utilizada como recobrimento para SPME. Além disso, a fibra de bráctea apresentou estabilidade térmica e mecânica satisfatória. Foram realizados pelo menos 50 ciclos de extração (extração/dessorção) sem perda de eficiência.

CAPÍTULO V – EXPANDINDO A APLICABILIDADE DA BRÁCTEA COMO FASE EXTRATORA PARA MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA PARA DETERMINAÇÃO MULTICLASSES DE CONTAMINANTES EM ÁGUA POR CROMATOGRAFIA GASOSA COM ESPECTROMETRIA DE MASSAS

5.1 INTRODUÇÃO

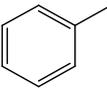
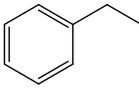
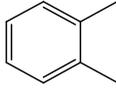
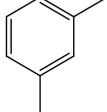
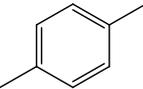
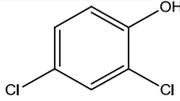
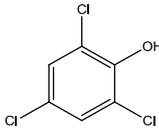
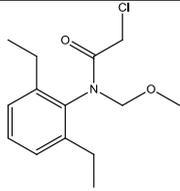
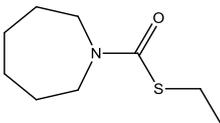
Ao longo da história, o desenvolvimento das atividades humanas, caracterizadas principalmente pela ocupação populacional, pelo desenvolvimento industrial e tecnológico e pela exploração dos recursos naturais, tem se intensificado. Essas atividades têm levado a uma introdução descontrolada de compostos orgânicos no meio ambiente que acabam atingindo os ambientes aquáticos (Borges *et al.*, 2015). Diante disso, diversos tipos de contaminantes que podem oferecer riscos à saúde humana e ao meio ambiente podem ser encontrados em águas superficiais. Como as águas de superfície muitas vezes são usadas para o consumo humano, os poluentes presentes nessas águas são motivo de preocupação (Asati *et al.*, 2017).

Dentre as principais fontes de poluição das águas pode-se citar o uso de insumos agrícolas, como agrotóxicos; a utilização diversificada de derivados de petróleo, que podem gerar resíduos contendo hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e compostos orgânicos voláteis tais como benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (conhecidos como BTEX); e o descarte inadequado de resíduos, efluentes domésticos, hospitalares e industriais, o qual introduz diversos contaminantes emergentes no ambiente, como os filtros UV utilizados em cosméticos e os hormônios estrogênicos.

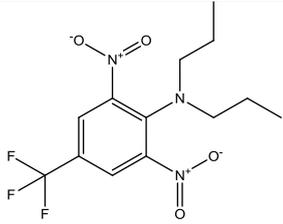
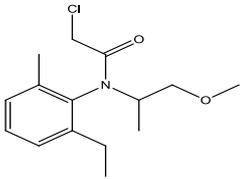
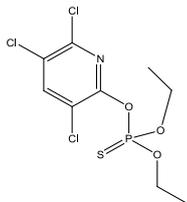
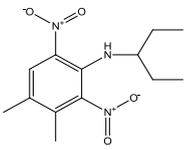
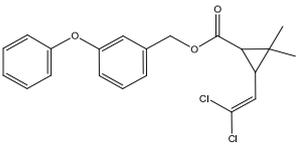
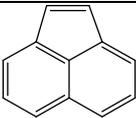
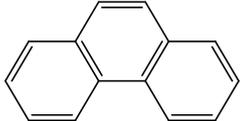
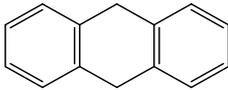
Dessa forma, existe um interesse no desenvolvimento de procedimentos para a detecção e quantificação dos mais diferentes contaminantes em águas. Nesse caso, uma metodologia que permita a determinação simultânea desses analitos é altamente desejada. Sendo assim, este trabalho selecionou 32 compostos com diferentes propriedades para serem analisados em águas superficiais. A Tabela 12 apresenta a estrutura dos analitos estudados, assim como algumas características dos mesmos.

Tabela 12. Estrutura e características físico-químicas dos compostos estudados.

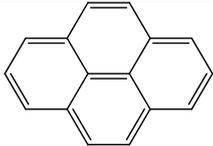
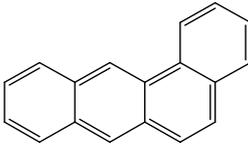
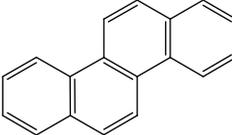
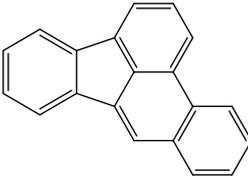
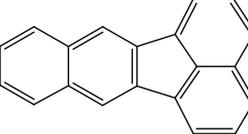
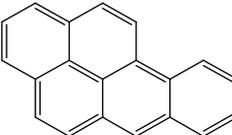
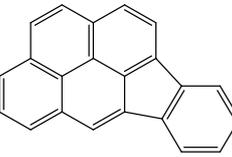
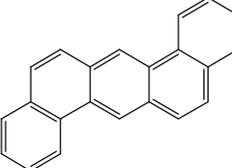
Continua

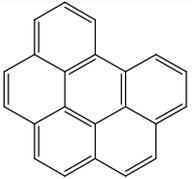
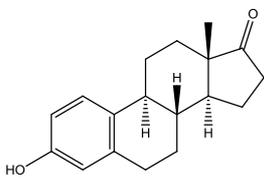
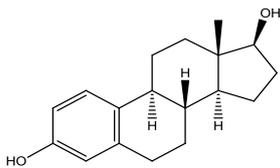
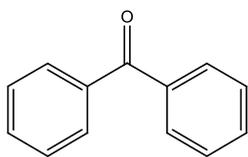
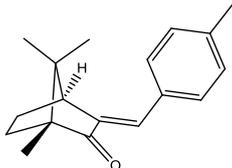
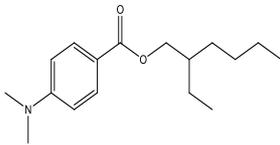
Composto	Estrutura química	Classe química	Log Kow	Pressão de vapor mmHg a 25°C	pKa
BTEX					
Benzeno		Hidrocarboneto aromático	2,1	98,8	–
Tolueno		Hidrocarboneto aromático	2,7	28,4	–
Etilbenzeno		Hidrocarboneto aromático	3,1	9,6	–
<i>o</i> -Xileno		Hidrocarboneto aromático	3,2	8,2	–
<i>m</i> -Xileno		Hidrocarboneto aromático	3,2	8,2	–
<i>p</i> -Xileno		Hidrocarboneto aromático	3,2	8,2	–
Clorofenóis					
2,4-Diclorofenol		Fenol	3,1	0,0562	8,1
2,4,6-Triclorofenol		Fenol	3,7	0,008	6,8
Agrotóxicos					
Alaclor		Cloroacetanilida	3,5	$2,2 \times 10^{-5}$	–
Molinato		Tiocarbamato	2,3	$5,6 \times 10^{-3}$	–

Continuação

Composto	Estrutura química	Classe química	Log Kow	Pressão de vapor mmHg a 25°C	pKa
Trifuralina		Dinitroanilina	5,3	$4,5 \times 10^{-5}$	—
Metalocloro		Cloroacetanilida	3,5	$3,1 \times 10^{-5}$	—
Clorpirifós		Organofosforado	4,9	2×10^{-5}	—
Pendimentalina		Dinitroanilina	5,2	$9,4 \times 10^{-6}$	10,5
Permetrina		Piretróide	6,5	$5,2 \times 10^{-8}$	—
HPAs					
Acenaftaleno		HPA	3,3	0,0048	—
Fenantreno		HPA	4,6	$1,2 \times 10^{-4}$	—
Antraceno		HPA	4,4	$6,5 \times 10^{-6}$	—

continuação

Composto	Estrutura química	Classe química	Log Kow	Pressão de vapor mmHg a 25°C	pKa
Pireno		HPA	4,9	$4,5 \times 10^{-6}$	–
Benzo[a]antraceno		HPA	5,6	$2,1 \times 10^{-7}$	–
Criseno		HPA	5,7	$6,2 \times 10^{-9}$	–
Benzo[b] fluoranteno		HPA	6,1	5×10^{-10}	–
Benzo[k] fluoranteno		HPA	6,1	$9,7 \times 10^{-10}$	–
Benzo[a]pireno		HPA	6,1	$5,5 \times 10^{-9}$	–
Indeno[1,2,3-cd]pireno		HPA	6,6	$1,3 \times 10^{-10}$	–
Dibenzo[a,h] antraceno		HPA	6,5	$9,6 \times 10^{-10}$	–

Composto	Estrutura química	Classe química	Log Kow	Conclusão	
				Pressão de vapor mmHg a 25°C	pKa
Benzo[g,h,i] pirileno		HPA	6,6	1×10^{-10}	–
Hormônios estrogênicos naturais					
Estrona		Estrogênio esteróide	3,4	$2,5 \times 10^{-10}$	10,4
17-β-Estradiol		Estrogênio esteróide	3,9	$6,4 \times 10^{-9}$	10,7
Filtros UV					
Benzofenona		Cetona aromática	3,2	$1,9 \times 10^{-3}$	–
3-(4-Metil)-benzilideno cânfora		Benzilideno cânfora	4,5	Dado não disponível	–
2-Etilhexil 4-(dimetilamino) benzoato		Ácido <i>p</i> -aminobenzoico (PABA)	5,7	$5,1 \times 10^{-4}$	2,9

Fonte: PubChem (2019).

Os BTEX são compostos associados a produtos de petróleo. Uma das fontes mais comuns de contaminação de águas por esses compostos são derramamentos envolvendo a liberação de gasolina, óleo diesel, óleo lubrificante, a partir do vazamento de tanques de petróleo. Devido a características como baixa polaridade e baixa solubilidade, eles são capazes

de entrar no ambiente e causar graves problemas de poluição, uma vez que apresentam efeitos agudo e/ou tóxico, a longo prazo (Mazzeo et al., 2010; Zhang et al., 2012). A exposição a essas substâncias pode causar efeitos nocivos ao fígado, rins, coração, pulmões e sistema nervoso (Durmusoglu et al., 2010; Hosseinzadeh et al., 2011). A diretiva 013/39/UE da União Europeia estabelece o limite máximo de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ de resíduo de benzeno em águas superficiais.

Os clorofenóis são amplamente utilizados em muitos processos industriais e acabam sendo distribuídos em águas naturais, muitas vezes através de efluentes provenientes de refinarias de petróleo; fabricação de plásticos, corantes, borracha, agrotóxicos e fármacos ou ainda como subprodutos do processo de cloração da água (Galán-Cano *et al.*, 2012; Tabaraki e Heidarizadi, 2019). Esses compostos são considerados substâncias químicas tóxicas de acordo com seus potenciais efeitos prejudiciais e sua alta tendência de bioacumulação. Eles podem afetar o fígado e o sistema imunológico e são, possivelmente, carcinogênicos (Galán-Cano *et al.*, 2012; Iarc, 2018).

Os agrotóxicos são compostos sintetizados que têm por finalidade a melhora na produção agrícola e controle de pragas, podendo ser classificados em herbicidas, fungicidas, inseticidas, entre outros (Baptista Neto *et al.*, 2008; Kudsk *et al.*, 2018). A introdução desses compostos no meio aquático pode ser através da lixiviação de regiões agrícolas, efluentes industriais e domésticos, transporte atmosférico e precipitação das águas das chuvas (Mason, 2002). Esses compostos apresentam efeito negativo na qualidade da água, uma vez que são considerados tóxicos com difícil degradação e podem causar mudanças adversas na qualidade ambiental (Claver *et al.*, 2006). Além de que, seu uso excessivo ou inapropriado, pode trazer riscos à saúde humana, pois podem causar efeitos adversos, incluindo diminuição da fertilidade e más-formações congênitas (Baptista Neto *et al.*, 2008). A Diretiva Européia estabelece limites máximos de resíduos em águas superficiais para o alaclor ($0,7 \mu\text{g L}^{-1}$), o clorpirifós ($0,1 \mu\text{g L}^{-1}$) e a trifuralina ($0,03 \mu\text{g L}^{-1}$).

Em relação aos HPAs, a principal forma de emissão dessas substâncias no meio ambiente é por meio da combustão incompleta da matéria orgânica, podendo ter origem natural através da erupção vulcânica e das queimas espontâneas, ou pela ação humana através do derramamento de petróleo, queima de combustíveis, produção e aplicação industrial de pesticidas, produção e processamento de plásticos, corantes e pigmentos, entre outros (Nikolaou *et al.*, 1984; Wegener *et al.*, 1992). Os HPAs são resistentes à biodegradação devido ao seu caráter lipofílico e apresentam elevada toxicidade ao meio ambiente (Baptista Neto *et*

al., 2008). Estudos epidemiológicos e em animais mostraram uma forte ação cancerígena e mutagênica dos HPAs, além de causarem danos renal, hepático, no sistema imunológico, entre outros (Ma *et al.*, 2010). A diretiva da União Europeia estabelece limites máximos de resíduos em águas superficiais para alguns HPAs estudados, incluindo o antraceno ($0,1 \mu\text{g L}^{-1}$), benzo[a]pireno ($0,27 \mu\text{g L}^{-1}$), o benzo[b]fluoranteno ($0,017 \mu\text{g L}^{-1}$), o benzo[k]fluoranteno e o benzo[g,h,i]perileno ($0,0082 \mu\text{g L}^{-1}$).

Os filtros UV e os hormônios estrogênicos naturais são considerados contaminantes emergentes, uma vez que não são regulamentados e são suspeitos de afetar o meio ambiente, cujos efeitos ainda não são totalmente conhecidos (Chang *et al.*, 2018; Sophia e Lima, 2018). Em relação aos hormônios naturais estrogênicos, esses compostos podem chegar aos corpos d'água através da excreção de humanos e animais (Chen *et al.*, 2013). Os filtros UV, que são substâncias capazes de absorver ou refletir raios solares, são amplamente utilizados em produtos comerciais como cosméticos, produtos de higiene pessoal, bloqueadores e protetores solares e podem atingir os ambientes aquáticos de forma direta (através de banhos de mar, rio, entre outros) e/ou indireta através de estações de tratamento de esgoto e águas residuais (Zhang e Lee, 2012). Normalmente, os sistemas convencionais de tratamento de águas residuais têm capacidade limitada para remover esses compostos. Sendo assim, o despejo desenfreado dos mesmos no ecossistema leva à sua acumulação no meio ambiente, tornando-se fonte de poluição, com efeito potencialmente prejudicial para a saúde humana e para o meio ambiente. Os hormônios e os filtros UV são consideradas desreguladores endócrinos, uma vez que interferem no sistema endócrino do corpo e produzem efeitos adversos imunológicos, neurológicos, no desenvolvimento e na reprodução em seres vivos (Prasertkulsak *et al.*, 2016; Monneret, 2017).

Muitos desafios têm sido encontrados quando são empregadas amostras contendo diversos analitos com características físico-químicas muito distintas. O procedimento analítico escolhido nesse tipo de análise deve apresentar características apropriadas de precisão, exatidão e detecção. Métodos baseados em cromatografia gasosa (GC) e cromatografia líquida (LC) têm um papel importante quando análises multirresíduos são necessárias em amostras aquosas (Martins *et al.*, 2016). No entanto, devido à complexidade das amostras de água agregado com os baixos níveis de concentração dos contaminantes nessas amostras, uma etapa de preparo de amostra eficiente antes da determinação dos compostos no instrumento analítico torna-se necessária (Donato *et al.*, 2015)

Diante disso, devido à composição química heterogênea da bráctea, a qual permite inúmeras possibilidades de interação para uma ampla gama de compostos com diferentes polaridades e volatilidades, este estudo propôs o uso da fibra de SPME de bráctea, introduzida no capítulo anterior, para determinação multiclases de contaminantes em amostras de água com separação/detecção por cromatografia gasosa com espectrometria de massas (GC-MS). Otimizações dos parâmetros que influenciam a extração dos contaminantes, como pH da amostra, temperatura, tempo de extração e adição de sal, foram investigadas simultaneamente usando um planejamento multivariado composto central. Em termos de comparação, também foi realizada uma otimização utilizando uma fibra comercial com recobrimento de DVB/Car/PDMS. Parâmetros analíticos de mérito foram empregados para avaliar o método proposto utilizando a fibra de bráctea. A precisão, exatidão e aplicabilidade da fibra proposta foi avaliada por meio de extrações em amostras de água de rio.

5.2 EXPERIMENTAL

5.2.1 Reagentes e materiais

Padrões sólidos individuais (> 98% de pureza) dos compostos 2,4-diclorofenol, triclorofenol, molinato, benzofenona, trifuralina, alaclor, metalocloro, clorpirifós, pendimentalina, 3-(4-metil)-benzilideno cânfora (4-MBC), 2-etilhexil 4-(dimetilamino) benzoato (OD-PABA), estrona, 17- β -estradiol e permetrina foram obtidos da Supelco (Bellefonte, PA, EUA). Um padrão contendo doze HPAs, incluindo acenaftaleno, fenantreno, antraceno, pireno, criseno, benzo[b]fluoranteno (BbF), benzo[k]fluoranteno (BkF), benzo[a]pireno (BaP), indeno[1,2,3-cd]pireno (InPy), dibenzo[a,h]antraceno (DiahA), benzo[g,h,i]pirileno (BghiP) e benzo[a]antraceno (BaA) a uma concentração de 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em acetona e um padrão de BTEX contendo benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno (*o*, *m* e *p*) a uma concentração de 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol (JT Baker, Mallinckrodt, NJ, USA) também foram obtidos Supelco. A partir dos padrões sólidos individuais, foram preparadas soluções estoque a uma concentração de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em MeOH de cada analito. E então, uma solução estoque contendo todos os analitos a uma concentração de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foi preparada em metanol através de diluições apropriadas das soluções dos padrões individuais e das soluções de HPAs e BTEX. Essa solução estoque foi utilizada para fortificação das amostras aquosas nos experimentos de otimização e na avaliação dos parâmetros analíticos de mérito.

Nas extrações por SPME foram empregados holder (Supelco), frascos de 40 mL com tampa de septo (Supelco), banho termostático (Microquímica Ind. E Com Ltda, Palhoça, SC, Brasil) e agitador magnético (Dist, Florianópolis, SC, Brasil).

Para avaliar a influência da variação do pH da amostra foram utilizados ácido clorídrico ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) e hidróxido de sódio ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) adquiridos da Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

Para avaliar a influência da adição de sal na extração foi utilizado cloreto de sódio obtido da Synth (São Paulo, SP, Brasil).

Para comparar a eficiência de extração da fibra de bráctea foi utilizada uma fibra comercial de DVB/Car/PDMS (50/30 μm de espessura e 2 cm de comprimento) obtida da Supelco.

5.2.2 Instrumentação e condições cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo gasoso acoplado à espectrometria de massas e equipado com injetor *split/splitless* modelo GC-MS QP2010 Plus (Shimadzu, Kyoto, Japão).

As separações cromatográficas foram realizadas em uma coluna capilar ZB-5MS (Zebron, Torrance, CA, EUA) com dimensões de 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm . As condições cromatográficas utilizadas foram adaptadas de um trabalho previamente relatado na literatura (Bianchin *et al.*, 2012). O programa de temperatura do forno foi ajustado a 40 °C (5 min), seguido por 15 °C min^{-1} até 80 °C e 6 °C min^{-1} até 300 °C (6 min). A injeção foi realizada em modo *splitless*, a temperatura do injetor foi ajustada a 260 °C, a da fonte de íons a 250 °C e da interface a 280 °C e o tempo de corte do solvente foi de 3 min. O tempo de desorção durou 15 min. Foi empregado gás hélio como fase móvel a um fluxo de 1 mL min^{-1} .

O espectrômetro de massa foi operado em modo de ionização por elétrons (EI) a 70 eV. As análises foram realizadas no modo de monitoramento seletivo de íons (SIM), utilizando os íons selecionados pela razão massa/carga (m/z), os quais foram determinadas baseadas nos espectros de massa fornecidos pelo Instituto Nacional de Padronização e Tecnologia (NIST). A quantificação dos analitos foi realizada utilizando o íon de maior intensidade. As informações das m/z monitoradas para a identificação e quantificação dos analitos estão mostradas na Tabela 13.

Tabela 13. Relação de m/z monitoradas para a identificação e quantificação dos analitos. Os valores em negrito representam os fragmentos utilizados para a quantificação.

Analito	m/z
Benzeno	78 /77/51
Tolueno	91 /91/65
Etilbenzeno	91 /106/51
<i>o, p, m</i> -Xileno	91 /106/105
Diclorofenol	162 /164/63
Triclorofenol	196 /198/200
Acenaftaleno	152 /153/151
Molinato	55 /126/182
Benzofenona	105 /77/182
Trifuralina	306 /143/264
Fenantreno	178 /179/177
Antraceno	178 /179/177
Alaclor	45 /160/188
Metalocloro	162 /238/45
Clorpirifós	97 /197/199
Pendimentalina	252 /162/281
4-MBC	211/ 239 /254
Pireno	202/ 203 /200
BaA	202 /203/200
OD-PABA	148 /277/165
Criseno	228 /226/229
Estriol	270 /146/185
17- β -Estradiol	272 /213/172
Permetrina	183 /163/165
BbF	252 /253/250
BkF	252 /253/250
BaP	252 /253/250
InPy	276 /277/274
DiahA	278 /279/276
BghiP	276 /277/138

Fonte: Autoria própria.

5.2.3 Condições selecionadas inicialmente

Antes de iniciar a otimização da metodologia proposta, algumas condições experimentais foram selecionadas. O modo de extração selecionado para esse estudo foi o modo DI-SPME, considerando a maioria dos analitos possuem baixa volatilidade e também que a amostra utilizada não é danosa à fibra. Como foi utilizado frascos de 40 mL nas extrações, optou-se por utilizar 40 mL de amostra. Baseado em trabalhos anteriores (Dias *et al.*, 2013; Dias *et al.*, 2015), todas as extrações foram realizadas com agitação magnética constante de 1000 rpm.

5.2.4 Otimização da metodologia

Os parâmetros que podem afetar a extração dos compostos foram otimizados por meio de estratégias multivariadas e univariadas. As otimizações foram realizadas utilizando água ultrapura fortificada com $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada analito. No procedimento experimental, em todos os ensaios, a fibra foi inserida em frascos de 40 mL contendo 40 mL de amostra e as extrações foram realizadas sob agitação constante de 1000 rpm. Após as extrações, a fibra foi imediatamente inserida no injetor de GC para realizar a dessorção térmica dos analitos a 280°C durante 15 min.

5.2.4.1 Otimização da variação do pH na amostra

Inicialmente, o efeito da variação do pH na amostra foi estudado de forma univariada, variando 3 valores de pH (3, 6 e 9), com cada pH sendo avaliado em triplicata. O pH da amostra foi ajustado utilizando HCl ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), quando necessário diminuir o valor do pH ou com NaOH ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), quando necessário aumentar. Neste estudo, as extrações foram realizadas durante 60 min a 60°C e sem adição de NaCl.

5.2.4.2 Otimização do tempo e temperatura de extração e adição de NaCl

Os parâmetros que podem influenciar a extração dos analitos, incluindo tempo e temperatura de extração e adição de NaCl na amostra, foram avaliados simultaneamente

utilizando a fibra de bráctea e em tempos de comparação, também foi feita uma otimização utilizando uma fibra comercial (DVB/Car/PDMS, 50/30 μm). A fibra DVB/Car/PDMS foi utilizada devido à grande aplicabilidade desse revestimento para a extração de compostos com uma ampla gama de polaridade/volatilidade (Pawliszyn, 2012). Essa fibra foi condicionada termicamente a 260 °C durante 60 min no injetor do GC antes de ser utilizada.

As estratégias de otimização utilizando ambas as fibras foram idênticas. O tempo de extração foi variado de 30 a 120 min, a temperatura de extração de 20 a 80 °C e a adição de NaCl de 0 a 30% (m/v) através de um planejamento composto central, totalizando 17 experimentos, incluindo uma triplicata no ponto central, conforme apresentado na Tabela 7 (seção 4.2.5.2) do Capítulo IV deste trabalho. Para esse estudo, o pH da amostra foi mantido em 6.

5.2.5 Preparo de amostra otimizado

Para as extrações utilizando a fibra de bráctea, a fibra foi inserida em frascos de 40 mL contendo 40 mL de amostra aquosa enriquecida com os analitos, ajustada em pH 6 e com 25% (m/v) de NaCl a 80 °C durante 40 min. Para as extrações utilizando o revestimento DVB/Car/PDMS, a fibra foi imersa em frascos de 40 mL contendo 40 mL de amostra aquosa fortificada com analitos durante 80 min a 60 °C e 30% de NaCl (m/v) e pH ajustado em 6. As extrações utilizando ambas as fibras foram realizadas com agitação magnética constante de 1000 rpm. A dessorção dos analitos foi realizada de forma idêntica para as duas fibras estudadas. Após as extrações, a fibra foi inserida no injetor do GC a 260 °C por 15 min.

5.2.6 Comparação das eficiências de extração da fibra de bráctea com uma fibra comercial

Para avaliar a comparação entre a fibra de bráctea e a fibra comercial com revestimento de DVB/Car/PDMS, foi utilizada água ultrapura enriquecida com analitos na concentração de 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ e extrações foram realizadas em triplicata utilizando as condições otimizadas para cada fibra.

5.2.7 Amostras de água

A aplicabilidade da metodologia utilizando a fibra de bráctea foi avaliada através de extrações utilizando as condições otimizadas em 6 diferentes amostras de água de rio, sendo 3 delas coletadas em pontos diferentes do Rio Tubarão (Orleans, SC, Brasil) e 3 delas coletadas em pontos diferentes do Rio Biguaçu (Biguaçu, SC, Brasil), conforme é indicado na Tabela 14. Os parâmetros analíticos de mérito foram avaliados utilizando o P1 e a exatidão e a precisão usando o P2 do Rio Tubarão. As amostras foram estocadas em frascos de vidro âmbar selados e mantidas sob refrigeração a 4 °C até as análises.

Tabela 14. Localizações geográficas das amostras de água de rio utilizadas neste estudo.

Ponto/Rio	Coordenada Geográfica
P1/Tubarão	-28.365245, -49.27956
P2/Tubarão	-28.364620, -49.335305
P3/Tubarão	-28.363555, -49.351351
P4/Biguaçu	-27.465399, -48.687015
P5/Biguaçu	-27.470449, -48.667047
P6/Biguaçu	-27.488040, -48.653398

Fonte: Autoria própria.

5.2.7 Parâmetros analíticos de mérito

Parâmetros analíticos de mérito foram empregados para avaliar o método proposto utilizando a fibra de bráctea. Nesta etapa, foi utilizado o preparo de amostra otimizado e curvas analíticas foram construídas pela adição de concentrações conhecidas dos analitos em amostra de água de rio (Rio Tubarão, Orleans, SC, Brasil) em 6 níveis de concentração, com cada nível realizado em triplicata. Neste procedimento foi determinado a faixa linear de trabalho, os coeficientes de correlação (R), limites de quantificação (LOQ) e limites de detecção (LOD). Para a determinação do LOD e LOQ, um método previamente relatado na literatura foi adotado (Merib *et al.*, 2015). O LOQ foi definido como a primeira concentração da curva analítica e o LOD como 3 vezes menor que o LOQ.

A exatidão (recuperação relativa) (n=3) e as precisões intradia (n=3) e interdia (n=9) do método proposto utilizando a fibra de bráctea foram avaliadas através da fortificação de amostras de água de rio (Rio Tubarão) em três níveis de concentração, sendo o primeiro nível correspondente ao LOQ, o segundo a uma concentração intermediária e o terceiro a maior

concentração da faixa linear de cada analito. Nesta etapa foi utilizado o preparo de amostra otimizado.

5.2.8 Robustez do método

Em adição, a robustez do método proposto utilizando a fibra de bráctea foi avaliada através do teste de Youden (Olson, 1968). Nesta avaliação, foram selecionados 7 parâmetros que foram utilizados no preparo de amostra otimizado e realizadas combinações desses fatores com pequenas variações dos mesmos (Tabela 15), totalizando 8 experimentos (Tabela 16).

Tabela 15. Relação entre as condições nominais e variações dos parâmetros analisados para avaliação da robustez do método.

Parâmetro	Condição nominal		Variação	
P1 – tempo de extração	40 min	A	45 min	A
P2 – temperatura de extração	80 °C	B	78 °C	B
P4 – % de NaCl	25%	C	23%	C
P5 – volume de amostra	40 mL	D	39,950 mL	D
P5 – Velocidade de agitação	1000 rpm	E	900 rpm	E
P6 – Tempo de dessorção	15 min	F	15,5 min	F
P7 – temperatura de dessorção	280 °C	G	270 °C	G

Fonte: Autoria própria.

Tabela 16. Combinação dos parâmetros e suas variações nos experimentos realizados para avaliação da robustez do método.

Efeito	Experimentos							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A/a	A	A	A	A	a	A	A	A
B/b	B	A	b	b	B	B	B	B
C/c	C	C	C	c	C	C	C	C
D/d	D	D	d	d	d	D	D	D
E/e	E	E	E	e	e	E	E	E
F/f	F	F	f	F	f	F	F	F
G/g	G	G	g	G	g	G	G	G

Fonte: Autoria própria.

Os experimentos foram realizados utilizando água ultrapura fortificada com $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada analito.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

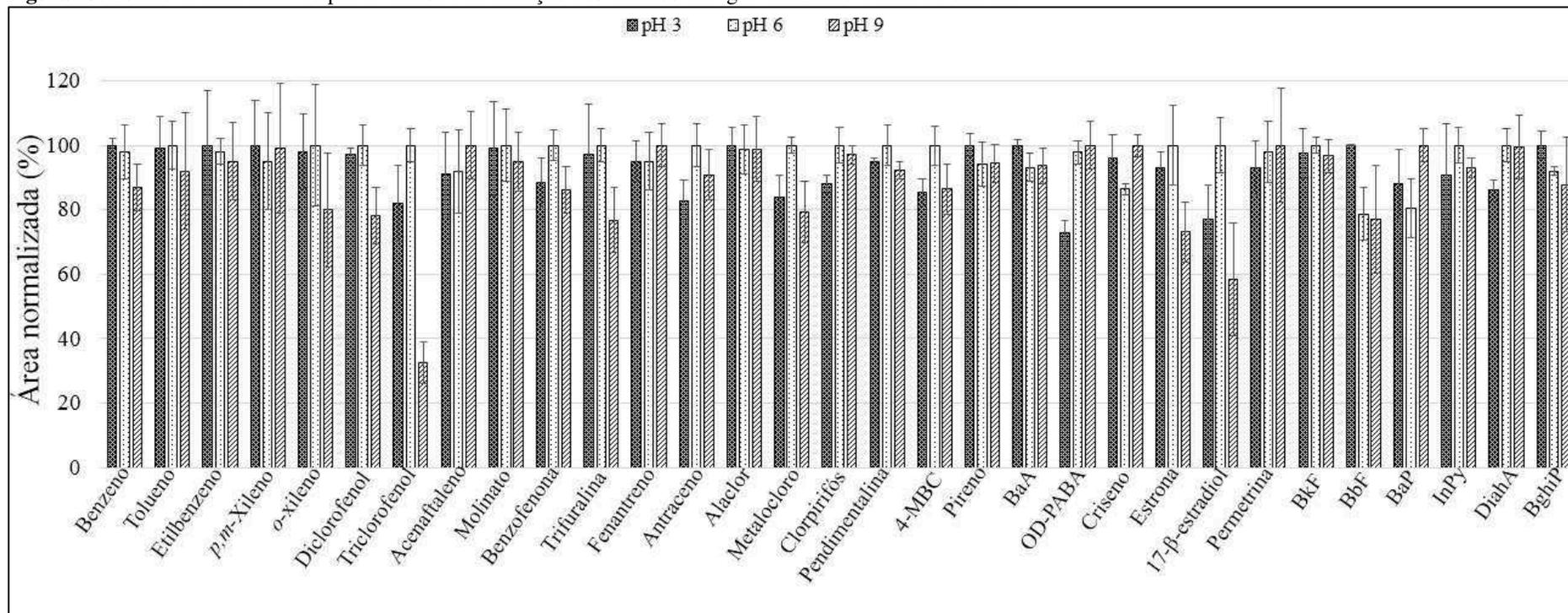
5.3.1 Otimização da metodologia

5.3.1.1 Variação do pH da amostra

O pH da amostra é um importante parâmetro a ser investigado durante o desenvolvimento de uma metodologia analítica, principalmente no que diz respeito à extração de compostos ionizáveis, considerando que, em teoria, são obtidas eficiências de extração mais elevadas para os analitos na forma neutra em comparação com os compostos na forma ionizada. No geral, para espécies ácidas, melhores eficiências de extração são obtidas quando o pH da amostra está abaixo do pKa dos analitos e para espécies básicas, quando o pH da amostra está acima do pKa dos analitos. Neste estudo, a maioria dos compostos não possuem valor de pka, como pode ser observado na Tabela 12, portanto, em teoria, o efeito da variação do pH pra esses compostos não seria significativo. No entanto, como alguns dos analitos estudados são ionizáveis (pka de 2,9 a 10,7), foi realizada uma otimização da variação do pH da amostra de forma univariada, variando o pH em 3, 6 e 9, e o resultado obtido é apresentado através de um gráfico de barras com a área normalizada dos analitos, conforme apresentado na Figura 23.

Conforme indica o gráfico apresentado na Figura 23, o pH da amostra, na faixa estudada, não exerce influência na extração da maior parte dos analitos, algumas exceções são o triclorofenol, a estrona e o 17- β -estradiol, os quais apresentaram um decréscimo na área em pH 9 e o OD-PABA que apresentou um decréscimo da área em pH 3. Sendo assim, considerando que todos os analitos apresentaram boa eficiência de extração quando o pH da amostra foi ajustado em 6, e que esse valor é similar ao pH da água ultrapura e da água de rio, esse valor de pH foi escolhido com condição otimizada.

Figura 23. Estudo da influência do pH da amostra na extração dos analitos em água utilizando a fibra de bráctea.



Fonte: Autoria própria.

*Condições experimentais: 40 mL de água ultrapura enriquecida com $50 \mu\text{g L}^{-1}$ dos compostos; tempo de extração: 60 min e temperatura de extração: $60 \text{ }^\circ\text{C}$. (n=3)

5.3.1.2 Otimização do tempo e da temperatura de extração e da adição de sal

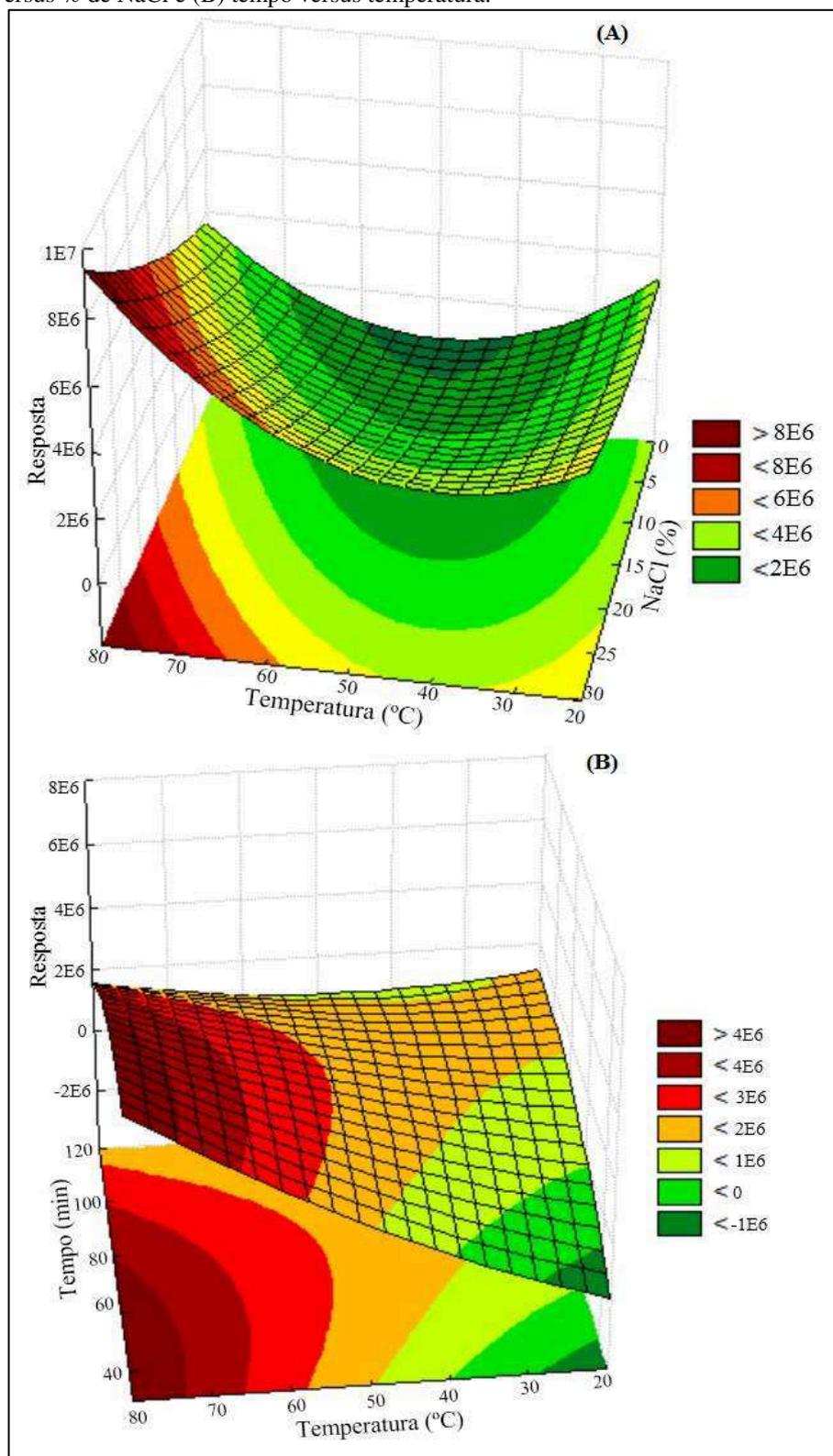
Nesta etapa foi realizado um planejamento composto central utilizando a fibra de bráctea e uma fibra comercial com recobrimento de DVB/Car/PDMS para avaliação simultânea da influência do tempo e da temperatura de extração e da adição de NaCl na eficiência do preparo de amostra. As superfícies de respostas obtidas para a fibra à base de biossorvente e a DVB/Car/PDMS são mostrados nas Figuras 24 e 25, respectivamente. Essas foram plotadas em função da média geométrica das áreas dos picos cromatográficos correspondentes aos 32 analitos e as equações quadráticas geradas pelos planejamentos apresentaram R^2 iguais a 0,9004 para a fibra de bráctea e a 0,9394 para a fibra comercial.

As condições ótimas de extração para a fibra de bráctea foram selecionadas utilizando um tempo de extração de 40 min a 80 °C e 25% (m/v) de NaCl (Figura 24) e para a fibra de DVB/Car/PDMS, foram selecionados o tempo de extração de 80 min a 60 °C e 30% de NaCl (m/v) (Figura 25). Figura 23.

Como pode ser observado na Figura 24, o tempo de extração utilizando a fibra de bráctea apresentou resultados similares de 30 até 80 min, após esse tempo, houve um decréscimo na quantidade de analitos extraída conforme o tempo aumentava, até 120 min. Em extrações utilizando fibras adsorventes, como no caso da fibra de bráctea, isso pode ser atribuído à competição entre moléculas dos analitos pelos sítios ativos, ou ainda devido à saturação dos sítios ativos do biossorvente, que fez com que após 80 min os analitos inicialmente extraídos retornassem para a solução (Borges *et al.*, 2015). Dessa forma, foi escolhido um tempo de extração de 40 min como condição otimizada para a fibra de bráctea. Em relação à fibra comercial, as melhores respostas foram obtidas com o tempo de 80 min, portanto esse tempo foi escolhido como condição otimizada para essa fibra.

Em relação à adição de NaCl e à temperatura, para as duas fibras estudadas, maiores eficiências de extração foram obtidas utilizando uma maior concentração de NaCl na amostra e uma temperatura mais elevada. Maiores temperaturas, em geral, aumentam a difusão dos analitos, resultando em maiores taxas de transferência de massa dos compostos presentes na matriz para a fibra de SPME (Pawliszyn, 2012). Em adição, o aumento da força iônica pode diminuir a solubilidade dos compostos e favorecer a migração para a fase extratora, em particular, para aqueles que têm polaridade intermediária a alta ($Kow < 3,5$) (Dias *et al.*, 2015).

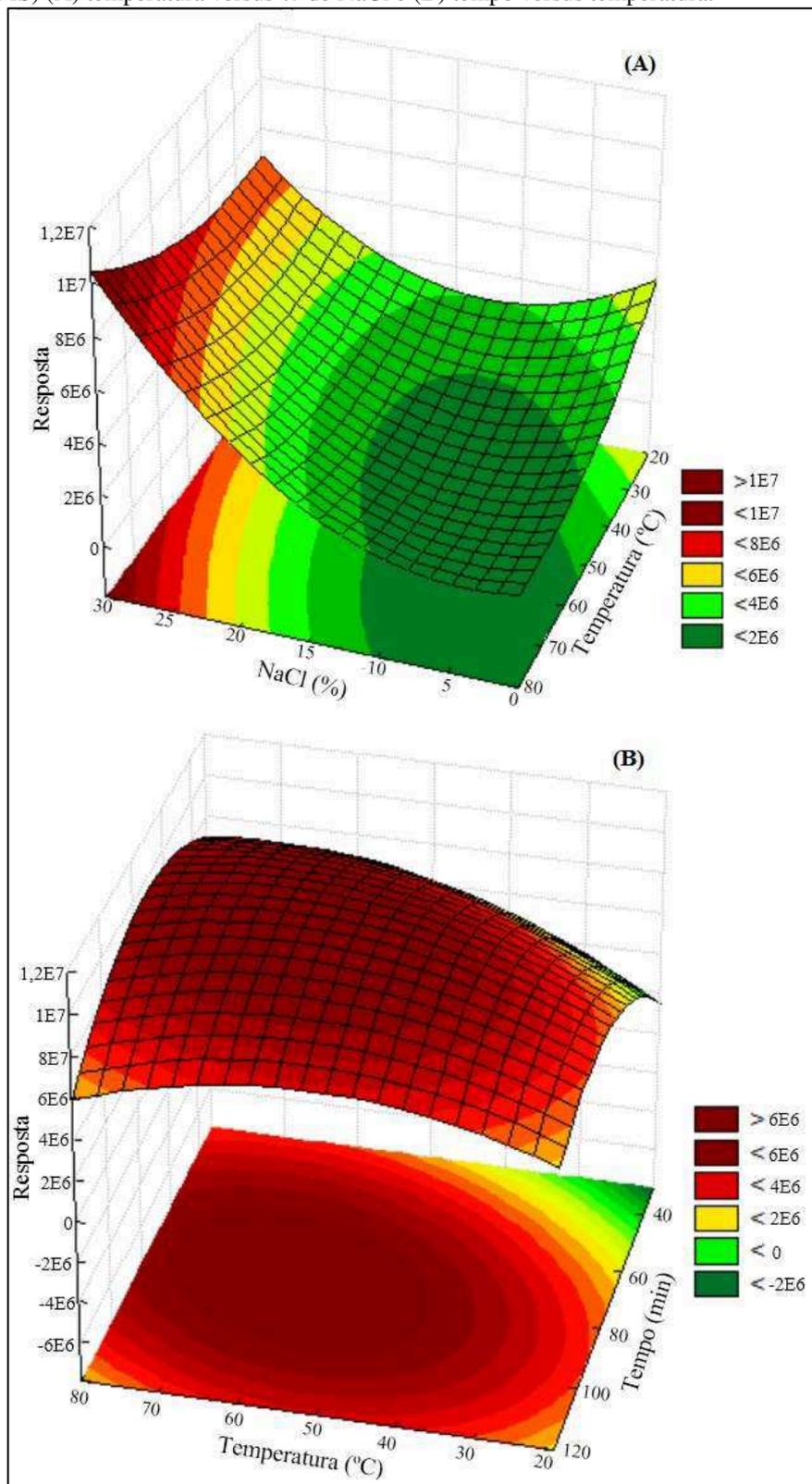
Figura 24. Superfícies de resposta obtidas na extração dos analitos em água por SPME com a fibra de bráctea (A) temperatura versus % de NaCl e (B) tempo versus temperatura.



Fonte: Autoria própria.

*Condições experimentais: 40 mL de água ultrapura enriquecida com $50 \mu\text{g L}^{-1}$ dos compostos.

Figura 25. Superfícies de resposta obtidas na extração dos analitos em água por SPME com a fibra de comercial (DVB/Car/PDMS) (A) temperatura versus % de NaCl e (B) tempo versus temperatura.



Fonte: Autoria própria.

*Condições experimentais: 40 mL de água ultrapura enriquecida com $50 \mu\text{g L}^{-1}$ dos compostos.

5.3.2 Comparação da eficiência de extração utilizando a fibra de bráctea e a fibra DVB/Car/PDMS

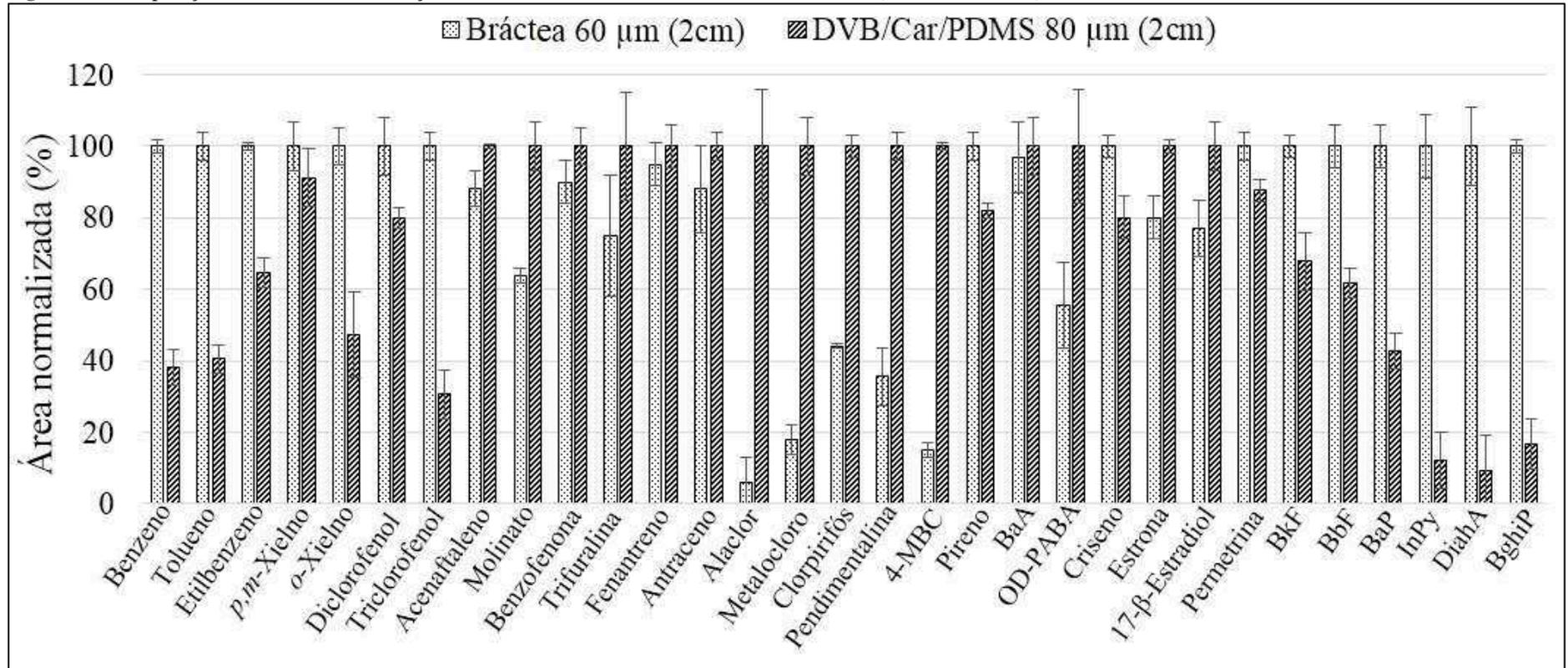
A eficiência de extração da fibra de bráctea foi comparada com uma fibra comercial com recobrimento DVB/Car/PDMS, utilizando as condições previamente otimizadas para ambas as fibras. O valor correspondente à média das áreas dos picos cromatográficos de cada analito foi dividido pelo valor da espessura de cada recobrimento. Os resultados obtidos são mostrados na Figura 26.

Como pode ser observado na Figura 26, o recobrimento de bráctea mostrou eficiência de extração superior à fibra de DVB/Car/PDMS para os clorofenóis, BTEX e para os HPAs de maior massa molar e que possuem um maior número de anéis aromáticos em sua estrutura. A elevada extração da fibra de biossorvente em relação a esses analitos pode ser explicada devido à presença de diversos anéis aromáticos no biopolímero lignina, aumentando assim as interações π - π entre os analitos e a fase extratora.

Em relação aos agrotóxicos, a fibra DVB/Car/PDMS apresentou desempenho bastante superior quando comparado à fibra proposta, com exceção da trifuralina, no qual o recobrimento à base de biossorvente mostrou eficiência de extração em torno de 80% em relação à fibra comercial e da permetrina, na qual a fibra de bráctea apresentou melhor desempenho. A fibra comercial também apresentou desempenho superior para os os filtros UV, com exceção da benzofenona, a qual a extração foi similar ao utilizar a fibra de bráctea. Para os hormônios estrogênicos, foram obtidas eficiências de extração utilizando a fibra de bráctea em torno de 80% em relação à fibra comercial.

Esses resultados reforçam que a composição química heterogênea da bráctea oferece a possibilidade de inúmeras interações para uma ampla faixa de compostos, já que se obteve resultados muito satisfatórios ao comparar com uma fibra comercial que é recomendada para extração de compostos com diferentes propriedades.

Figura 26. Comparação da eficiência de extração utilizando a fibra de bráctea e a fibra comercial (DVB/Car/PDMS).



Fonte: Autoria própria.

*Condições experimentais: 40 mL de água ultrapura enriquecida com 50 µg L⁻¹ dos analitos. Fibra de bráctea: tempo de extração de 40 min; temperatura de 80 °C e 25% de NaCl. Fibra comercial: tempo de extração de 80 min; temperatura de 60 °C e 30 % de NaCl. (n=3).

5.3.3 Parâmetros analíticos de mérito

O método proposto neste trabalho utilizando a fibra de bráctea foi avaliado a partir de parâmetros analíticos de mérito. Para tanto, curvas analíticas foram construídas utilizando amostras de rio fortificadas com concentrações conhecidas dos analitos e os resultados obtidos estão expostos na Tabela 17.

Tabela 17. Faixa linear de trabalho, coeficiente de correlação (R), limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) para determinação de contaminantes em água utilizando o método proposto. Continua

Analito	Faixa linear		LOD ^a ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ^b ($\mu\text{g L}^{-1}$)
	de trabalho ($\mu\text{g L}^{-1}$)	R		
Benzeno	5 – 100	0,9874	1,51	5
Tolueno	5 – 100	0,9719	1,51	5
Etilbenzeno	2,5 – 100	0,9919	0,76	2,5
<i>p,m</i> -Xileno	1 – 100	0,9965	0,3	1
<i>o</i> -Xileno	1 – 100	0,9932	0,3	1
Diclorofenol	0,5 – 100	0,9912	0,15	0,5
Triclorofenol	0,5 – 100	0,9976	0,15	0,5
Acenaftaleno	0,5 – 100	0,9812	0,15	0,5
Molinato	10 – 100	0,9943	3,03	10
Benzofenona	0,5 – 100	0,9898	0,15	0,5
Trifuralina	0,5 – 100	0,9934	0,15	0,5
Fenantreno	0,005 – 100	0,9991	0,0015	0,005
Antraceno	0,005 – 100	0,9978	0,0015	0,005
Alaclor	5 – 100	0,9765	1,51	5
Metalocloro	5 – 100	0,9997	1,51	5
Clorpirifós	0,01 – 100	0,9919	0,003	0,01
Pendimentalina	0,5 – 100	0,9893	0,15	0,5
4-MBC	0,5 – 100	0,9992	0,15	0,5
Pireno	0,005 – 100	0,9876	0,0015	0,005
BaA	0,005 – 100	0,9996	0,0015	0,005

				Conclusão
Analito	Faixa linear de trabalho ($\mu\text{g L}^{-1}$)	R	LOD^a ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ^b ($\mu\text{g L}^{-1}$)
OD-PABA	0,005 – 100	0,9994	0,0015	0,005
Criseno	0,005 – 100	0,9899	0,0015	0,005
Estriol	1 – 100	0,9754	0,3	1
17- β -Estradiol	2,5 – 100	0,9976	0,75	2,5
Permetrina	1 – 100	0,9995	0,3	1
BbF	0,005 – 100	0,9967	0,0015	0,005
BkF	0,005 – 100	0,9804	0,0015	0,005
BaP	0,01 – 100	0,9952	0,003	0,01
InPy	0,05 – 100	0,9976	0,015	0,05
DiahA	0,1 – 100	0,9934	0,03	0,1
BghiP	0,1 – 100	0,9888	0,03	0,1

Fonte: Autoria própria.

*Condições experimentais: 40 mL de água de rio enriquecida com os analitos; pH 6; tempo de extração de 40 min; temperatura de 80 °C e 25% de NaCl. (n=3)

^aLOQ: primeira concentração da curva analítica e ^bLOD: três vezes menor que o LOQ.

Como pode ser observado na Tabela 17, coeficientes de correlação satisfatórios ($R > 0,9719$), utilizando 6 níveis de concentração, foram obtidos para todos os compostos estudados. O LOD para todos os analitos variou de 0,0015 a 3,03 $\mu\text{g L}^{-1}$ e o LOQ de 0,005 a 10 $\mu\text{g L}^{-1}$. Ao comparar os limites máximos de resíduos permitidos pela Diretiva Europeia 2013/39/EU em águas superficiais com os valores de LOQ obtidos para o alaclor, a trifuralina e o BghiP, foram observados valores de LOQ insatisfatórios. No entanto, para os demais compostos que possuem legislação vigente, todos os LOQ obtidos estão abaixo dos valores permitidos, conforme mostra a Tabela 18.

Em adição, a exatidão e as precisões intradia e interdia da metodologia utilizando a fibra de proposta foram avaliadas utilizando água de rio fortificada com os analitos em três concentrações diferentes, conforme detalhado na metodologia. A exatidão foi avaliada mediante ensaios de recuperação relativa dos analitos e as precisões avaliadas através do RSD. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 19.

Tabela 18. Comparação dos limites máximos permitidos dos analitos em águas superficiais pela Diretiva 2013/39/EU com o LOQ obtido do método utilizando a fibra de bráctea.

Analito	Limites máximos permitidos	LOQ do método
	($\mu\text{g L}^{-1}$)	($\mu\text{g L}^{-1}$)
Benzeno	10	5
Alaclor	0,7	5
Clorpirifós	0,1	0,01
Trifuralina	0,003	0,5
Antraceno	0,1	0,005
BaP	0,27	0,01
BbF	0,017	0,005
BkF	0,0082	0,005
BghiP	0,0082	0,1

Fonte: Autoria própria.

Tabela 19. Ensaios de recuperação relativa e precisão (RSD) usando o método proposto com a fibra de bráctea. Continua

Analito	Nível de	Recuperação	Precisão intradia	Precisão interdia
	fortificação	relativa (%)	(RSD) (%)	(RSD) (%)
	($\mu\text{g L}^{-1}$)	(n = 3)	(n = 3)	(n = 9)
Benzeno	5	98	9	3
	50	103	2	9
	100	90	15	6
Tolueno	5	76	3	13
	50	92	3	7
	100	103	7	6
Etilbenzeno	2,5	87	0,7	4
	50	85	5	10
	100	107	15	9
<i>p,m</i> -Xileno	1	71	15	17
	50	87	3	13
	100	99	1	11

Continuação

Analito	Nível de fortificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação relativa (%) (n = 3)	Precisão intradia (RSD) (%) (n = 3)	Precisão interdia (RSD) (%) (n = 9)
	1	92	13	19
<i>o</i> -Xileno	50	95	5	12
	100	80	5	5
	0,5	96	3	7
Diclorofenol	50	100	0,8	9
	100	97	8	9
	0,5	120	2	4
Triclorofenol	50	89	2	5
	100	101	10	2
	0,5	79	8	16
Acenaftaleno	50	77	1	2
	100	102	4	7
	10	69	8	12
Molinato	50	71	9	10
	100	72	5	8
	0,5	101	6	7
Benzofenona	50	87	1	13
	100	108	12	3
	0,5	79	4	13
Trifuralina	50	70	19	8
	100	95	3	12
	0,005	105	7	2
Fenantreno	50	89	3	4
	100	105	0,6	3
	0,005	86	11	3
Antraceno	50	100	1	14
	100	95	10	12

Continuação

Analito	Nível de fortificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação relativa (%) (n = 3)	Precisão intradia (RSD) (%) (n = 3)	Precisão interdia (RSD) (%) (n = 9)
	5	92	3	4
Alaclor	50	110	5	17
	100	114	2	17
	5	101	7	11
Metalocloro	50	104	8	2
	100	96	7	14
	0,01	89	20	17
Clorpirifós	50	93	13	3
	100	105	5	11
	0,5	91	3	16
Pendimentalina	50	91	1	12
	100	78	17	4
	0,01	77	1	12
4-MBC	50	98	9	0,8
	100	74	3	10
	0,005	67	10	12
Pireno	50	103	8	8
	100	81	8	3
	0,005	101	12	3
BaA	50	73	3	6
	100	90	16	16
	0,005	96	1	15
OD-PABA	50	94	13	5
	100	100	10	1
	0,005	75	4	3
Criseno	50	99	12	5
	100	110	1	12

Analito	Nível de fortificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação relativa (%) (n = 3)	Conclusão	
			Precisão intradia (RSD) (%) (n = 3)	Precisão interdia (RSD) (%) (n = 9)
Estríol	1	70	12	14
	50	77	3	17
	100	77	16	8
17- β -Estradiol	2,5	80	8	10
	50	93	3	11
	100	119	4	7
Permetrina	1	90	8	12
	50	94	6	2
	100	84	3	7
BbF	0,005	88	3	10
	50	109	5	8
	100	99	2	4
BkF	0,005	67	13	2
	50	100	11	6
	100	87	1	7
BaP	0,01	80	14	17
	50	90	4	19
	100	76	16	12
InPy	0,05	78	13	13
	50	78	0,9	10
	100	88	12	13
DiahA	0,1	85	13	3
	50	107	3	6
	100	84	8	17
BghiP	0,1	69	10	7
	50	102	2	2
	100	82	6	14

Fonte: Autoria própria.

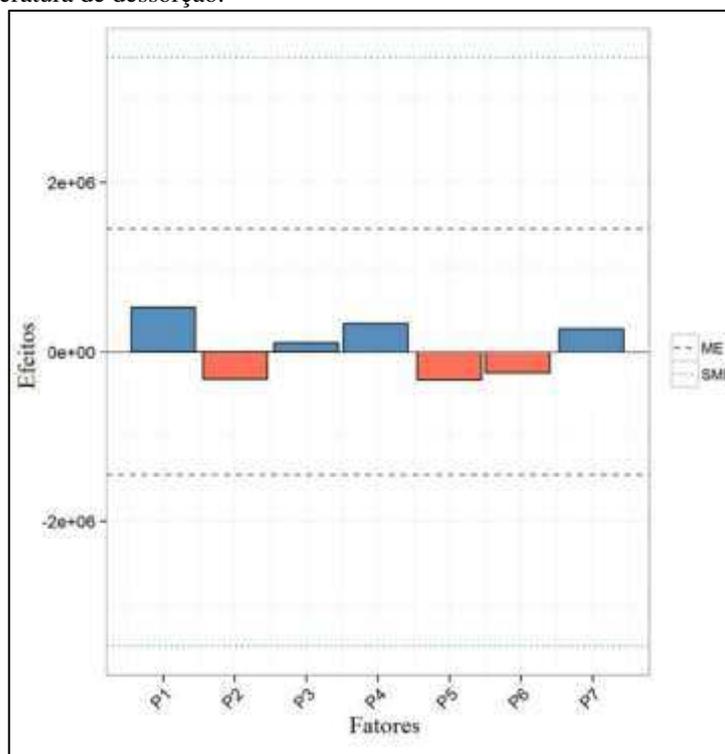
*Condições experimentais: 40 mL de água de rio enriquecida os analitos; pH 6; tempo de extração de 40 min; temperatura de 80 °C e 25% de NaCl.

A recuperação relativa dos analitos variou de 67% para o pireno a 119% para o 17- β -Estradiol. A precisão intradia variou de 0,6% para o fenantreno a 20% para o metalacloro e a precisão interdia variou de 0,8% para o 4-MBC e de 19% para o *o*-xileno e o BaP. Esses valores se enquadram dentro dos limites definidos pelas diretrizes da AOAC para faixas trabalhadas em parte por bilhão (AOAC, 2016).

5.3.4 Robustez

A robustez de um procedimento analítico reflete se os resultados são suscetíveis a pequenas mudanças na condição experimental (Mulholland e Waterhouse, 1988). Neste estudo, a robustez do método foi avaliada através do teste de Youden, utilizando algumas condições utilizadas no preparo de amostra otimizado, incluindo tempo e temperatura de extração, % de NaCl, volume da amostra, velocidade de agitação e tempo e temperatura de dessorção. Os resultados são mostrados na Figura 27, com dados expressos através do gráfico de Lenth, o qual foi obtido através do software *Action Stat 3*.

Figura 27. Gráfico de Lenth obtido para análise da robustez do método. Fatores: P1 - tempo de extração; P2 - temperatura de extração; P3 - % de NaCl; P4 - volume da amostra; P5 - velocidade de agitação; P6 - tempo de dessorção e P7 - temperatura de dessorção.



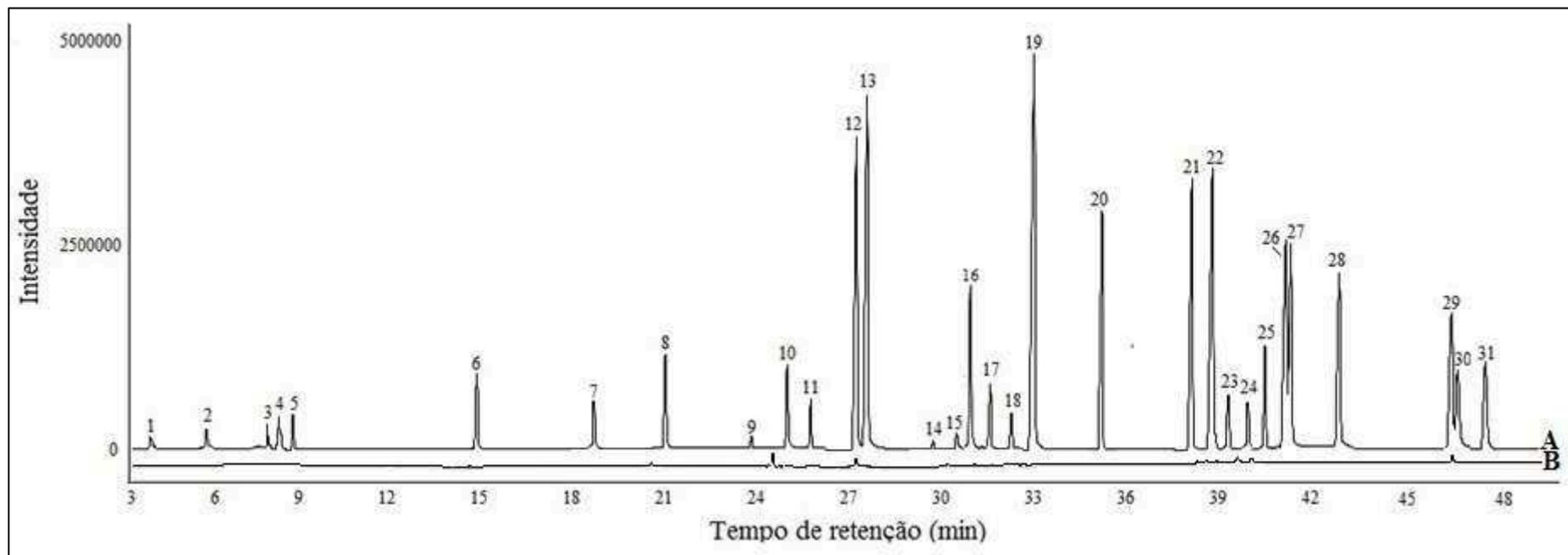
Fonte: Autoria própria.

No gráfico de Lenth mostrado na Figura 27, a ME (margem de erro) e a SME (margem de erro simultânea) são linhas de referência para avaliar a influência das variações, sendo que a ME é utilizada quando se avalia apenas um parâmetro por vez e a SME é usada quando se avalia mais de um parâmetro simultaneamente. Efeitos, quando avaliados de forma simultânea, que não excedam o valor de SEM são considerados inativos, uma vez que a variação dos mesmos não é considerada significativa; quando excedem, são considerados significativos com um nível de significância de 95% (Hund *et al.*, 2000). Portanto, de acordo com a Figura 27, como nenhum efeito excede a SEM, pequenas mudanças no procedimento não influenciaram o resultado global para a extração dos analitos, e pode-se afirmar que o método proposto é robusto.

5.3.5 Aplicação do método proposto utilizando a fibra de bráctea

O método proposto foi aplicado na determinação dos compostos em 3 amostras de água coletadas do Rio Tubarão (Orleans, SC, Brasil) e em 3 amostras coletadas do Rio Biguaçu (Biguaçu, SC, Brasil), conforme descrito na metodologia. No P3 do Rio Tubarão, foram detectados, porém não quantificados o fenantreno e o InPy, nas demais amostras não foram observados quaisquer sinais detectáveis dos analitos. Na Figura 28 são mostrados os cromatogramas no modo SIM referentes a uma amostra do Rio Tubarão fortificada (Figura 28-A) com $50 \mu\text{g L}^{-1}$ dos compostos e não fortificada (Figura 28-B) após extração utilizando a fibra de bráctea nas condições otimizadas.

Figura 28. Cromatogramas (modo SIM) para as amostras de água de rio (A) fortificada ($50 \mu\text{g L}^{-1}$) e (B) não fortificada com os analitos após extração por SPME com a fibra de bráctea. Analitos: (1) benzeno; (2) tolueno; (3) etilbenzeno; (4) *m,p*-xileno; (5) *o*-xileno; (6) diclofenol; (7) triclorofenol; (8) acenaftaleno; (9) molinato; (10) benzofenona; (11) trifuralina; (12) fenantreno; (13) antraceno; (14) alaclor; (15) metacloro; (16) clorpirifós; (17) pendimentalina; (18) 4-MBC; (19) pireno; (20) BaA; (21) OD-PABA; (22) criseno; (23) estrona; (24) 17- β -estradiol; (25) permetrina; (26) BbF; (27) BkF; (28) BaP; (29) InPy; (30) DiahA e (31) BghiP.



Fonte: Autoria própria.

5.3.6 Comparação do método proposto com métodos descritos na literatura

O método proposto utilizando a fibra de bráctea foi comparado com outras metodologias reportadas na literatura que utilizaram SPME na determinação de contaminantes em amostras de água, como mostrado na Tabela 20.

Tabela 20. Comparação do método proposto utilizando a fibra de bráctea com outros métodos reportados na literatura que utilizam SPME para determinação de contaminantes em matrizes aquosas.

Separação/ detecção	Fase extratora	Analitos	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Referência
			0,3 – 1,51 ^a	
			0,15 – 0,0015 ^b	
GC-MS	Bráctea	Todos os analitos	0,15 ^c 0,0015 – 0,15 ^d	Este estudo
			0,3 – 0,75 ^e	
			0,15 – 1,51 ^f	
GC-MS	PDMS	BTEX	0,75 – 10	(Es-Haghi <i>et al.</i> , 2012)
GC-MS	PDMS/DVB	HPAs	0,17 – 0,32	(Bianchin <i>et al.</i> , 2012)
HPLC-UV	Compósito de óxido de zinco e quitosana	Clorofenóis	0,1 – 2	(Alizadeh, 2016)
GC-MS/MS	DVB/Car/PDMS	Filtros UV	0,084 – 6,1	(Vila <i>et al.</i> , 2017)
	PA	Hormônios estrogênicos	0,3 – 0,7	(Peñalver <i>et al.</i> , 2002)
GC-MS/MS	PA	Agrotóxicos	0,01 – 0,25	(Jabali <i>et al.</i> , 2019)

^aBTEX; ^bHPAs; ^cClorofenóis; ^dFiltros UV; ^eHormônios estrogênicos; ^fAgrotóxicos e ^g cromatografia líquida de alta eficiência com detecção UV e eletroquímica

Como pode ser observado, este estudo apresentou faixas de limites de detecção mais baixas ou similares a encontradas na literatura. Além disso, deve-se considerar o método proposto determinou os analitos simultaneamente e foi comparado com metodologias que

determinaram os diferentes grupos químicos individualmente. Ademais, a fibra utilizada nesta abordagem exibe aspectos ambientais relacionados ao sorvente natural, o que apresenta uma grande benefício em relação as fibras que utilizam recobrimentos sintéticos.

5.4 CONCLUSÕES PARCIAIS

Através deste estudo, mais uma vez foi verificado que a fibra de bráctea tem potencial como recobrimento para SPME. Foi comprovado que a composição química heterogênea do biosorvente possui elevada capacidade de extração para determinação simultânea de 32 analitos com propriedades distintas. Sendo assim, a bráctea pode ser extremamente útil como fase extratora em aplicações que os analitos pertençam a diferentes classes químicas e exibam diferentes polaridades e volatilidades, o que é bastante interessante para amostras ambientais. Além disso, o método proposto exibiu satisfatórios parâmetros analíticos de mérito e apresentou capacidades de extrações semelhantes a obtidas quando o procedimento foi realizado com a fibra DVB/Car/PDMS para grande parte dos compostos estudados.

CAPÍTULO VI – BRÁCTEA COMO FASE EXTRATORA PARA TF-SPME COMBINADA COM O SISTEMA 96-WELL PLATE PARA DETERMINAÇÃO DE ESTROGÊNIOS EM URINA HUMANA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À DETECÇÃO POR FLUORESCÊNCIA

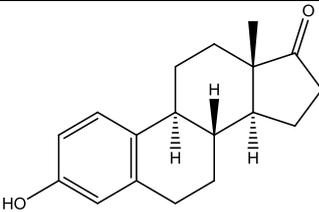
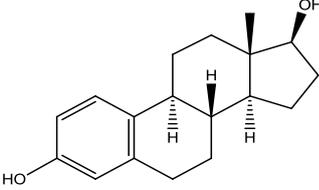
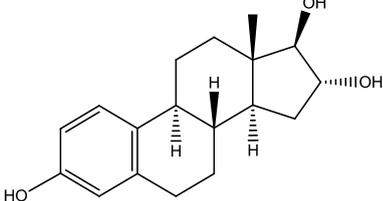
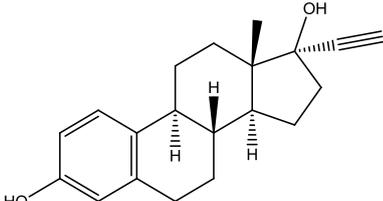
6.1 INTRODUÇÃO

Os estrogênios esteróides são, tradicionalmente, conhecidos como hormônios reprodutivos femininos e estão diretamente envolvidos no crescimento, reprodução e comportamentos sexuais da mulher. Essas moléculas podem ser classificadas como naturais (estrone, 17- β -estradiol, 17- α -estradiol e estriol) ou hormônios sintéticos (17- α -etinilestradiol (Adeel *et al.*, 2017).

Esses compostos são responsáveis pelo desenvolvimento de características sexuais secundárias femininas e oferecem um número de benefícios para as mulheres, incluindo proteção contra ataques cardíacos e osteoporose. Eles são também, juntamente com progestógenos, prescritos como medicamentos para contraceptivos orais e terapia hormonal, os quais são amplamente utilizados pelas mulheres para regular o ciclo reprodutivo, distúrbios menstruais e também para suplementar níveis insuficientes de estrogênios naturais (Tapiero *et al.*, 2002; Smy e Straseski, 2018; Zsarnovszky *et al.*, 2018). Sendo assim, o monitoramento desses compostos é de grande importância para o controle de certas condições clínicas, como funções ovarianas e placentárias (Lim, 1991). Estrogênios, sejam naturalmente produzidos ou administrados como medicamentos às mulheres, são excretados, principalmente através da urina (Ma e Yates, 2018). Portanto, a determinação de estrógenos na urina é uma importante ferramenta para monitorar a saúde das mulheres.

Ademais, a urina tem sido tradicionalmente usada para prognóstico ou diagnóstico de muitas doenças, pois são facilmente coletadas, uma vez que a coleta é realizada de forma não invasiva, além de possuírem fácil disponibilidade, em que a repetição da amostragem não se torna um problema (Fernández-Peralbo e Luque De Castro, 2012; Niu *et al.*, 2018). Dessa forma, neste capítulo, foram selecionados 4 hormônios, a estrone, o 17- β -estradiol, o estriol e o 17- α -etinilestradiol para serem determinados em amostras de urina humana. A estrutura química desses compostos e algumas características físico-químicas dos mesmos são mostradas na Tabela 21.

Tabela 21. Estrutura química e propriedades físico-químicas dos compostos estudados.

Compostos	Estrutura química	pKa	Log Kow
Estrona		10,34	3,43
17-β-Estradiol		10,71	3,94
Estriol		10,38	2,45
17-α-Etinilestradiol		10,76	4,12

Fonte: (Merib *et al.*, 2018).

Na literatura, diversas estratégias analíticas baseadas em técnicas cromatográficas têm sido propostas para determinar estrogênios em amostras de urina e em outras matrizes biológicas (Almeida e Nogueira, 2015; Lee *et al.*, 2017; Robles *et al.*, 2017; Gao *et al.*, 2018; Hashemi *et al.*, 2018). Nesse caso, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) geralmente é a mais utilizada devido à sua versatilidade e a não necessidade de etapas de derivatização (Almeida e Nogueira, 2006; Merib *et al.*, 2018). Entretanto, devido às baixas concentrações de estrogênios em amostras biológicas, e a alta complexidade dessas amostras, causada, por exemplo, pela presença de macromoléculas e sais, que podem dificultar a compatibilidade com o instrumento analítico, um procedimento de preparo da amostra é muitas vezes necessário antes das análises por HPLC (Ramos, 2012; He *et al.*, 2017; Niu *et al.*, 2018). Um método ideal de preparo de amostras biológicas deve ser reprodutível, simples e rápido, com o mínimo número de etapas possível. Além disso, aplicações em bioanálises demandam resultados

confiáveis, dessa forma, as técnicas de preparo de amostras devem se adequar para minimizar erros e proporcionar manuseio mínimo de amostra (Borges *et al.*, 2015)

Sendo assim, neste capítulo, foi proposta uma abordagem semiautomatizada de extração para a TF-SPME acoplada ao sistema *96-well plate*, utilizando a bráctea como fase extratora, para a determinação de estrona, 17- β -estradiol 17 α -etinilestradiol e estriol em urina humana por cromatografia líquida com detector de fluorescência (HPLC-FLD). Otimizações dos parâmetros de extração e dessorção, incluindo diluição da urina, tempo e solvente de dessorção, tempo de extração e adição de NaCl na amostra, foram realizadas através de abordagens univariadas e multivariadas. Parâmetros analíticos de mérito foram determinados e a precisão e a exatidão do método proposto utilizando o filme fino de bráctea foi avaliada por meio de extrações em urina. O método desenvolvido pôde ser utilizado com sucesso para a quantificação de estrogênios em amostras de urina humana.

Este trabalho foi publicado em uma revista indexada da área (Do Carmo *et al.*, 2019).

6.2 EXPERIMENTAL

6.2.1 Reagentes e materiais

Os solventes acetonitrila (ACN), metanol (MeOH) e acetona, todos de grau cromatográfico, foram adquiridos da JT Baker (Mallinckrodt, NJ, USA).

Padrões sólidos dos hormônios estudados (> 98% de pureza), incluindo estrona (E1), 17- β -estradiol (E2), estriol (E3) e 17- α -etinilestradiol (EE2), foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Foram preparadas soluções estoque dos padrões individuais a uma concentração de 1000 mg L⁻¹ em MeOH. As soluções de trabalho contendo uma mistura dos analitos foram preparadas por diluição apropriada da solução estoque em MeOH e armazenadas a -4 °C.

Água ultrapura com resistividade de 18,3 M Ω cm foi obtida de um sistema Mega Pureza (Billerica, MA, EUA).

A extração e a dessorção dos analitos foram realizadas utilizando um sistema *96-well plate* (Brüder Mannesmann Werkzeuge, Remscheid, Alemanha). Para a etapa de extração, foram utilizados poços de polipropileno de fundo redondo de 2 mL (Axygen Scientific, Union

City, CA, EUA) e para a etapa de dessorção, foram usados poços de polipropileno de fundo cônico de 0,5 mL (Axygen Scientific).

Para avaliar a influência da adição de sal na extração foi utilizado cloreto de sódio obtido da Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

6.2.2 Instrumentação e condições cromatográficas

Neste estudo, as análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo líquido modelo LC 20AT (Shimadzu, Kyoto, Japão) equipado com detector de fluorescência (série RF 20A), injetor manual Rheodyne 7725i (Rohnert Park, CA, EUA) e *loop* de injeção de 20 μ L.

A separação cromatográfica foi realizada em fase reversa em uma coluna C18 da Agilent (250 mm x 4,6 mm x 5 μ m) (Santa Clara, CA, EUA). As condições cromatográficas utilizadas foram baseadas em um trabalho relatado anteriormente (Merib *et al.*, 2018). A taxa de fluxo da fase móvel foi de 1 mL min⁻¹ e consistiu inicialmente de uma mistura de 35% de ACN (A) e 65% de água (B). O modo de eluição por gradiente foi adotado da seguinte forma: 35% de A por 6 min; depois disso, a proporção foi aumentada para 80% e mantida por 3 min; então a relação inicial (35% de A e 65% de B) foi restabelecida e mantida até 15 min de corrida.

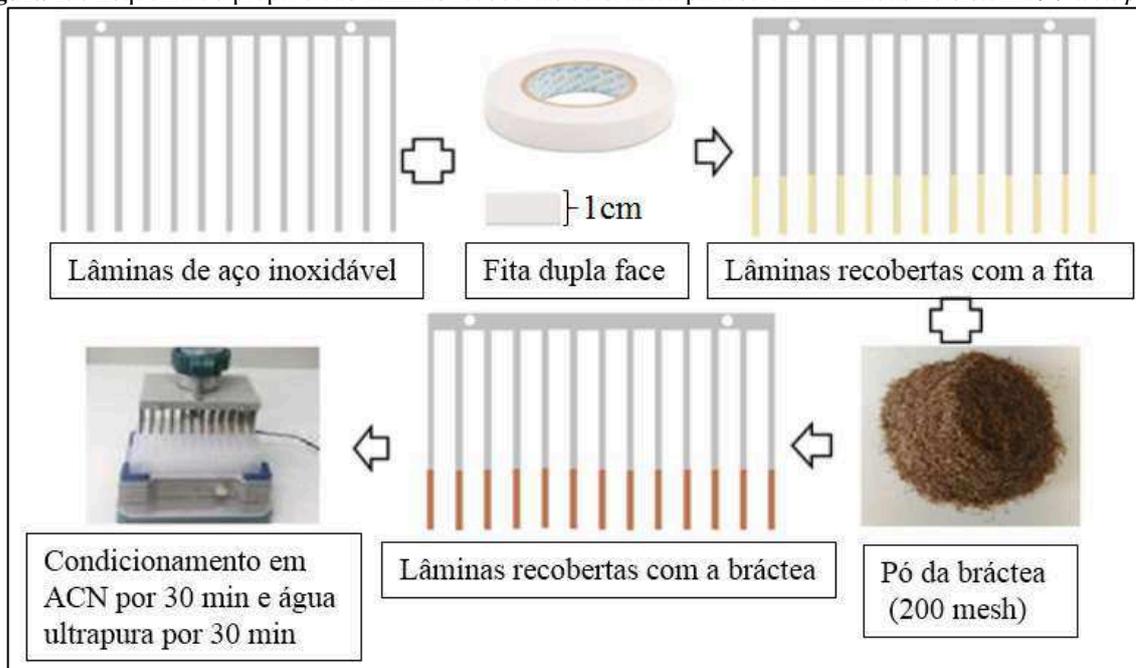
O detector de fluorescência foi ajustado para análises nos comprimentos de onda de excitação e de emissão de 280 e 310 nm, respectivamente.

6.2.3 Preparo dos filmes finos de bráctea

Os filmes finos contendo o biossorvente foram preparadas de acordo com um estudo prévio relatado na literatura (Kirschner *et al.*, 2017). Primeiramente, fitas adesivas de dupla face (Adelbras, Vinhedo, SP, Brasil), de 1 cm de altura e 0,2 cm de largura, foram fixados, da base para cima, em cada superfície das lâminas de aço inoxidável presentes nos pentes. Posteriormente, aproximadamente 2,5 mg do pó da bráctea (200 mesh) foram suportados na fita adesiva. Por fim, um procedimento de condicionamento foi realizado para remover o excesso de bráctea dos pentes. Para isso, as lâminas revestidas com biossorvente foram inseridas em 0,3 mL de ACN por 30 min e, em seguida, em 0,3 mL de água ultrapura por 30 min. Este procedimento foi realizado usando o sistema *96-well plate* sob agitação constante de 500 rpm.

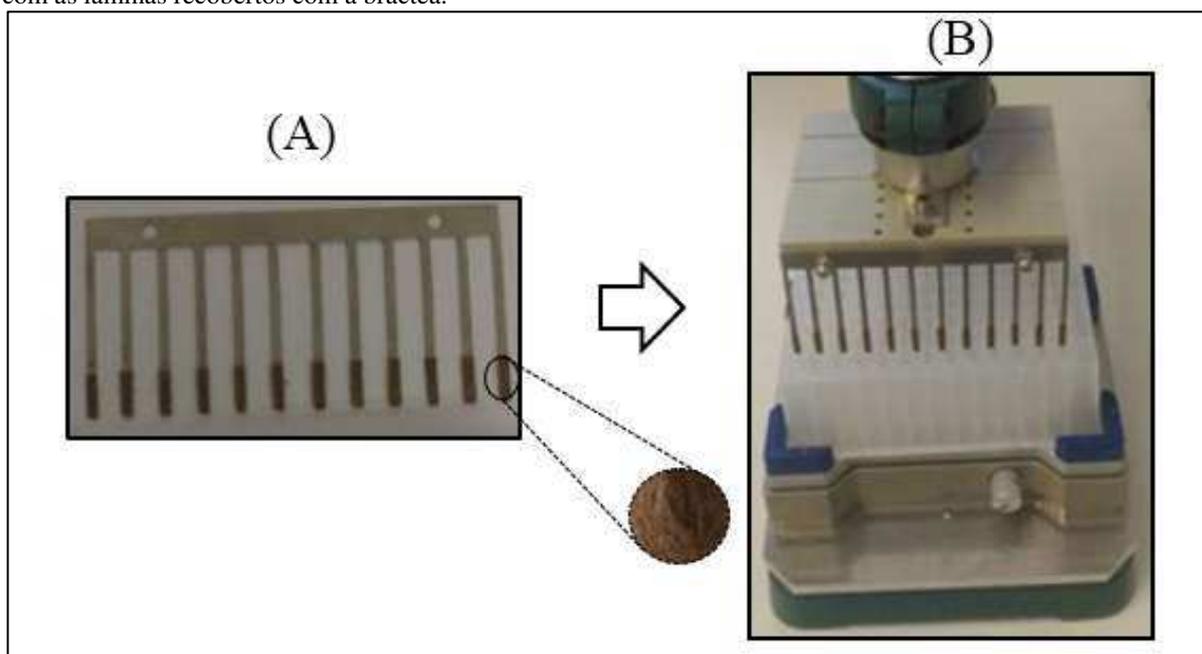
Um fluxograma do procedimento de preparo dos filmes finos é mostrado na Figura 28. Uma imagem de um pente contendo as lâminas recobertas com a bráctea no sistema 96-well plate é mostrada na Figura 29.

Figura 29. Esquema do preparo das lâminas recobertas de bráctea para serem utilizadas no sistema 96-well plate.



Fonte: Autoria própria.

Figura 30. (A) Pente contendo 12 lâminas recobertas com o pó da bráctea (200 mesh) e (B) sistema 96-well plate com as lâminas recobertas com a bráctea.



Fonte: Autoria própria.

6.2.4 Amostras de urina

Este estudo foi realizado utilizando amostras de urina doadas por um voluntário (homem) com 24 anos de idade e participante do nosso grupo de pesquisa. Além disso, para avaliar a aplicação da metodologia proposta, foram coletadas amostras de urina de 6 mulheres voluntárias, também integrantes do nosso grupo de pesquisa, com idades entre 21 e 29 anos e 2 amostras de urina (uma delas coletada em jejum) foram coletadas de uma gestante de 33 semanas, com 37 anos de idade, que previamente concordou em participar desta pesquisa. Nenhum desconforto ou riscos foram associados à coleta das amostras. As urinas foram coletadas em frascos de PTFE e armazenadas sob refrigeração a 4 °C até as análises. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Santa Catarina, sob o número 00913718.3.0000.0121.

6.2.5 Condições selecionadas inicialmente

Antes de iniciar a otimização da metodologia proposta, algumas condições experimentais foram selecionadas. Devido ao fato que o sistema *96-well plate* utilizado neste trabalho não vem acoplado com nenhum aparato para ajuste de temperatura, as extrações foram realizadas em temperatura ambiente. Além disso, considerando que algum nível de agitação é necessário para facilitar tempos de equilíbrios mais rápidas, todas as extrações foram realizadas com agitação constante de 500 rpm, sendo que a agitação foi realizada pelo próprio sistema. Por fim, optou-se por não otimizar o pH do método baseado em alguns trabalhos reportados na literatura que utilizaram técnicas de extração baseadas na sorção, os quais mostraram que a variação do pH da extração dos hormônios estudados em amostra de urina não é significativa até o pH 10, uma vez que nesse pH uma fração dos analitos começa a ser convertida nas suas formas ionizadas (Hu *et al.*, 2012; Luo *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2018). Como todos os compostos em estudo possuem valores de pK_a entre 10,34 e 10,76, esses se já encontram em sua forma neutra na amostra de urina humana, cujo o valor de pH pode ser de 6,5 a 8 (Niu *et al.*, 2018).

6.2.6 Otimização da metodologia

Os parâmetros que podem afetar a extração e a dessorção dos analitos foram otimizados por meio de estratégias multivariadas e univariadas. Nas otimizações, foram utilizadas amostras de urina coletadas de um voluntário homem, de 24 anos de idade. Sendo que, nas etapas de extração, foram utilizados poços de 2,0 mL com 1,5 mL da amostra fortificada com $200 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada analito e nas etapas de dessorção, foram utilizados poços de 0,5 mL com 0,3 mL de solvente para a dessorção líquida dos analitos. Em todos os ensaios foi empregada agitação constante de 500 rpm. Os parâmetros avaliados foram a diluição da urina, o tempo e o solvente de dessorção, a adição de NaCl na amostra e o tempo de extração.

6.2.6.1 Otimização da diluição da urina

Inicialmente, a influência da diluição da urina na eficiência de extração foi estudada usando uma otimização univariada. Para esse procedimento, realizou-se as etapas de extração sem adição de sal durante 90 min e as dessorções dos analitos foram realizadas com metanol durante 30 min. Foram estudadas a urina sem diluição e diluída 10, 20 e 40 vezes, com cada experimento realizado em triplicata.

6.2.6.2 Otimização do solvente e tempo de dessorção

Nestas otimizações, foram utilizadas a urina diluída 40 vezes. Para tanto, 37,5 μL de urina enriquecida com os analitos foram diluídas com água ultrapura até um volume de 1,5 mL. O melhor solvente de dessorção foi investigado usando ACN, MeOH, acetona e misturas desses solventes, de acordo com um planejamento *Simplex-centroide*, contendo 12 experimentos, incluindo triplicata no ponto central, conforme apresentado na Tabela 22. Para esse procedimento, realizaram-se as etapas de extração sem adição de sal durante 90 min e as etapas de dessorção foram realizadas variando os solventes de acordo com a Tabela 22, durante 30 min.

O tempo de dessorção foi analisado através de um ensaio univariado, utilizando 10, 20 e 30 min, com cada experimento realizado em triplicata. Para esse procedimento, realizaram-se as etapas de extração sem adição de sal durante 90 min e as dessorções foram realizadas com metanol.

Tabela 22. Planejamento *Simplex-centroide* utilizado para otimização do solvente e do tempo de dessorção.

Experimentos	Metanol (%)	Acetonitrila (%)	Acetona (%)
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	0,667	0,1667	0,167
8	0,167	0,667	0,167
9	0,167	0,667	0,667
10, 11, 12 (ponto central)	0,333	0,333	0,333

Fonte: Autoria própria.

6.2.6.3 Otimização do tempo de extração e da adição de NaCl

O tempo de extração (40-240 min) e a adição de NaCl na amostra (0-30%, m/v) foram investigados simultaneamente usando um planejamento *Doehlert*, totalizando 12 experimentos, incluindo triplicata no ponto central, conforme apresentado na Tabela 23. Para esse procedimento foi utilizada urina diluída 40 vezes e as etapas de dessorção foram realizadas com metanol durante 20 min.

Tabela 23. Planejamento *Doehlert* utilizado para otimização do tempo de extração e da adição de NaCl.

Experimento	Tempo de extração (min)	NaCl (%)
1	40	15
2	90	0
3	90	30
4	190	0
5	190	30
6	240	15
7, 8, 9 (ponto central)	140	15

Fonte: Autoria própria.

6.2.7 Preparo de amostra otimizado

Na etapa de extração, as lâminas recobertas com a bráctea foram inseridas em poços de 2 mL contendo 1,5 mL de urina diluída (40 vezes) com 20% de NaCl por 150 min. Após as extrações, as lâminas foram inseridas em poços de 0,5 mL com 0,3 mL de MeOH durante 20 min para a dessorção líquida dos analitos. Após cada ciclo de extração/dessorção, os filmes finos foram submetidos a uma etapa de limpeza por 30 min em MeOH e posteriormente 30 min em água ultrapura. Todas as etapas, incluindo extração, dessorção e limpeza, foram realizadas com agitação constante de 500 rpm. A agitação foi realizada pelo próprio sistema *96-well plate*.

6.2.8 Parâmetros analíticos de mérito

A faixa linear de trabalho, LOD, LOQ e o R da metodologia proposta foram determinados através de curvas analíticas realizadas diretamente em amostras de urina diluídas (40 vezes), enriquecidas com os analitos em 6 níveis diferentes, com cada nível realizado em triplicata. Nessa etapa, as condições previamente otimizadas foram adotadas. O LOQ foi definido como a primeira concentração da curva analítica e o LOD como 3 vezes menor que o LOQ.

Além disso, a exatidão ($n=3$) e as precisões (RSD) intradia ($n=3$) e interdia ($n=9$) foram avaliadas através de extrações em amostras de urina diluídas (40 vezes) enriquecidas com os analitos em três concentrações diferentes, sendo a primeira concentração correspondente ao LOQ, o segunda a uma concentração intermediária e a terceira a maior concentração da faixa linear de cada analito (1, 200 e 400 $\mu\text{g L}^{-1}$ para E3; 0,1, 200 e 400 $\mu\text{g L}^{-1}$ para E2; 0,5, 200 e 400 $\mu\text{g L}^{-1}$ para EE2 e 10, 200 e 400 $\mu\text{g L}^{-1}$ para E1). Os valores considerados aceitáveis pela literatura para precisão e exatidão foram baseados na AOAC.

Nessas etapas foi utilizado o preparo de amostra otimizado.

6.2.9 Robustez do método

Em adição, a robustez do método proposto foi avaliada através do teste de Youden. Os experimentos foram realizados utilizando 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada analito.

A Tabela 24 mostra uma relação dos parâmetros utilizados em suas condições nominais (condições utilizadas no preparo de amostra otimizado) e a variação dos mesmos. Os

experimentos realizados nesse teste são descritos através da Tabela 16, mostrada no Capítulo V (seção 5.2.8) deste trabalho.

Tabela 24. Relação entre as condições nominais e variações dos parâmetros analisados para avaliação da robustez..

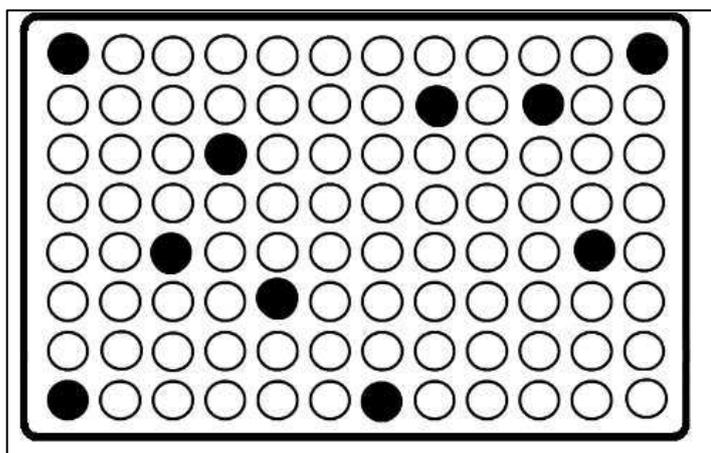
Parâmetro	Condição nominal	Variação		
P1 – tempo de extração	150 min	A	145 min	A
P2 – tempo de dessorção	20 min	B	22 min	B
P3 – diluição da urina	40 vezes	C	38 vezes	C
P4 – % de NaCl	20%	D	18%	D
P5 – solvente de dessorção	100% de MeOH	E	98% de MeOH e 2% de ACN	E
P6 – volume de MeOH	0,3 mL	F	0,310 mL	F
P7 – volume de amostra	1,5 mL	G	1,49 mL	G

Fonte: Autoria própria.

6.2.10 Reprodutibilidade dos poços do sistema 96-well plate

Uma avaliação da reprodutibilidade dos poços do sistema 96-well plate foi realizada através do RSD. Para isso, 10 posições dos poços do sistema foram escolhidas aleatoriamente, conforme apresentado na Figura 31 e 10 filmes finos de bráctea foram utilizadas na extração dos analitos em amostras de urina diluída (40 vezes) enriquecida com $200 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada composto. Neste estudo foi utilizado o preparo de amostra otimizado.

Figura 31. Posições aleatórias do sistema 96-well plate escolhidas para avaliar a reprodutibilidade (RSD) dos poços.



Fonte: Autoria própria.

6.2.11 Estabilidade da bráctea como recobrimento para a TF-SPME

A estabilidade da bráctea como nova fase sorvente para a TF-SPME foi avaliada através de sucessivas extrações utilizando as condições otimizadas. Nessa etapa, 15 ciclos de extração/dessorção foram realizados, e a eficiência de extração foi comparada com a eficiência de extração obtida com novos filmes finos de bráctea, utilizando as condições otimizadas. As análises foram realizadas com urina diluída (40 vezes) fortificada com cada analito na concentração de $200 \mu\text{g L}^{-1}$.

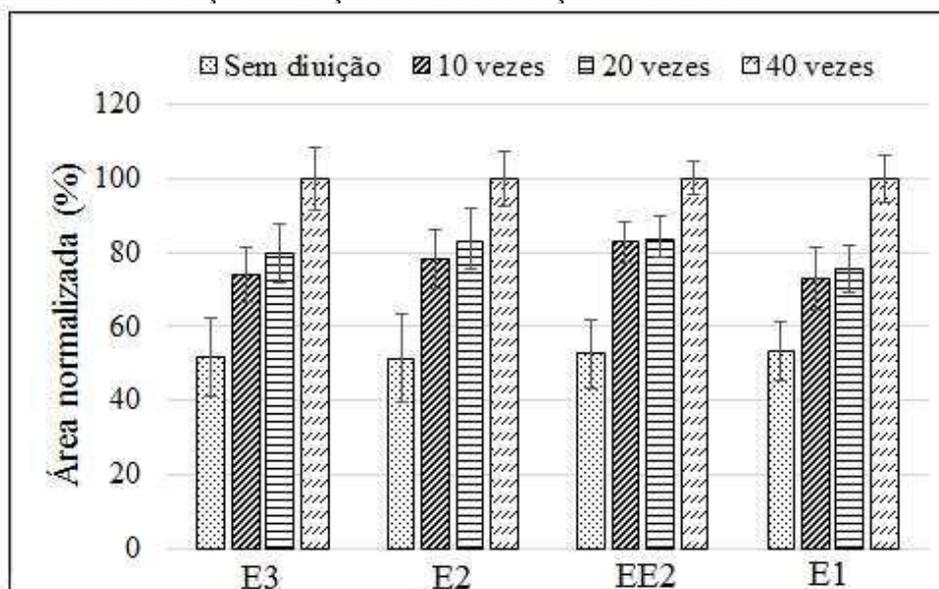
6.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.3.1 Otimização do procedimento

6.3.1.1 Otimização da diluição da urina

A influência da diluição da urina na extração dos analitos foi verificada usando a urina sem diluição e diluída 10, 20 e 40 vezes. Um gráfico de barras contendo as áreas normalizadas dos picos cromatográficos obtidos para cada analito é mostrado na Figura 32.

Figura 32. Resultado da avaliação da diluição da urina na extração dos hormônios.



Fonte: Autoria própria.

*Condições experimentais: $200 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada analito; 90 min de tempo de extração; 30 min de tempo de dessorção; $300 \mu\text{L}$ de metanol como solvente de dessorção e volume de amostra de 1,5 mL. (n=3)

Com base nesse gráfico, a medida que o fator de diluição aumenta, a resposta analítica também aumenta para todos os analitos. Portanto, uma diluição de 40 vezes foi escolhida como condição otimizada para os próximos experimentos. Esse resultado pode ser explicado considerando que a urina é uma matriz biológica complexa composta por mais de 95% de água, além de sais, creatinina, produtos processados pelo rim e fígado, incluindo drogas e metabólitos e macromoléculas, como proteínas (Fernández-Peralbo e Luque De Castro, 2012). Considerando essa composição complexa, a diluição é frequentemente necessária antes da extração (Niu *et al.*, 2018). Esse fato está de acordo com os resultados de alguns trabalhos reportados na literatura, nos quais obteve-se uma melhor eficiência de extração dos hormônios em estudo utilizando-se a urina diluída (Almeida e Nogueira, 2015; Luo *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2018; Mafra *et al.*, 2018).

6.3.1.2 Otimização de dessorção líquida

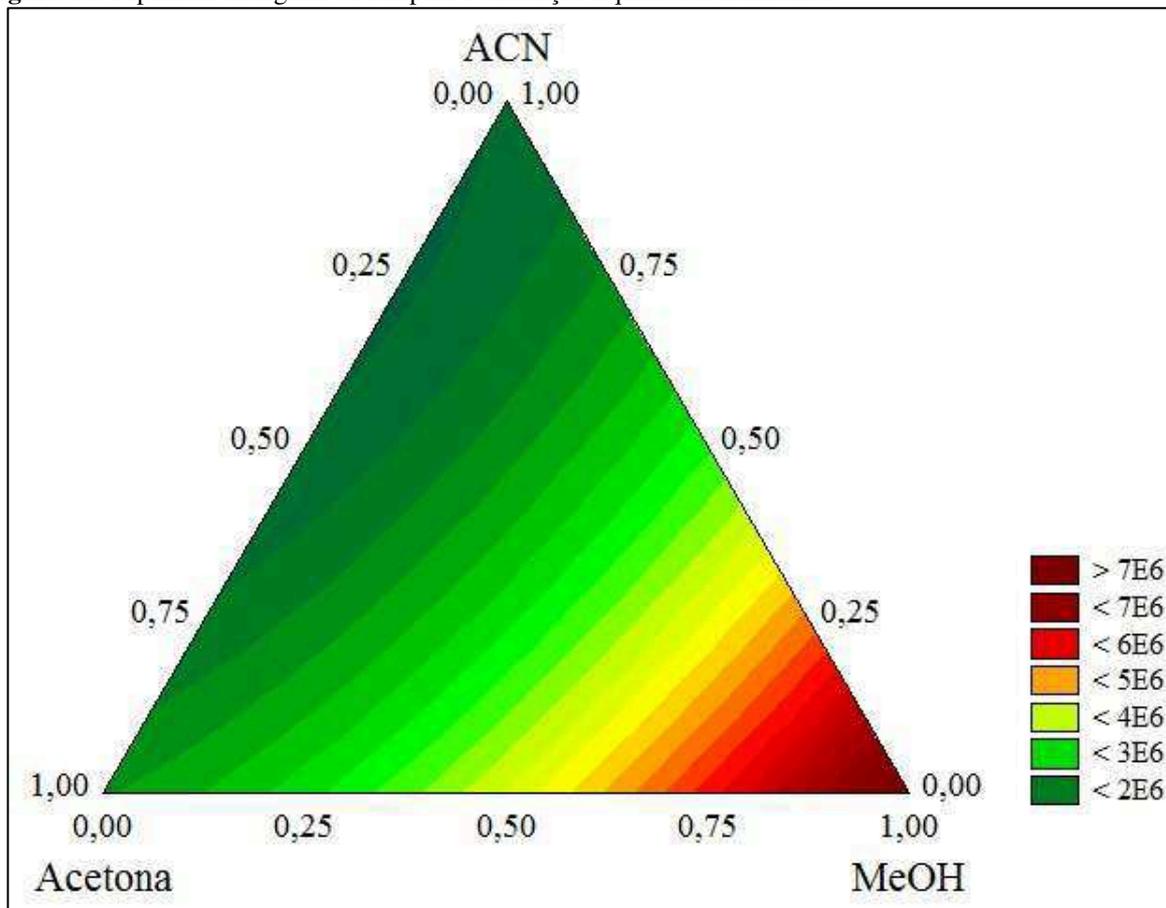
A otimização da dessorção líquida é uma etapa crucial para se obter boas eficiências de dessorção evitando, assim, possíveis efeitos de memória. Nessa etapa, o solvente de dessorção foi investigado utilizando ACN, MeOH, acetona e misturas desses solventes de acordo com a seção experimental. Os dados foram analisados através de um planejamento *Simplex-centroid* utilizando a média geométrica dos picos cromatográficos dos analitos e os resultados obtidos são mostrados na superfície triangular representada na Figura 33, a qual apresentou uma função quadrática com $R^2 = 0,9115$.

O solvente utilizado para a dessorção líquida precisa ser capaz de romper a interação analito-fase extratora (Mozañer Bordin *et al.*, 2016). Como pode ser visto na Figura 33, ao utilizar 100% de metanol como solvente, foi obtida uma maior quantidade dos compostos estudados dessorvidos do recobrimento à base de biossorvente, provavelmente devido à solubilidade dos analitos em metanol ser maior do que com os demais solventes. Sendo assim, esse solvente foi utilizado como condição otimizada para as próximas etapas.

Além disso, juntamente com o solvente de dessorção, é necessário selecionar um tempo de dessorção apropriado para estabelecer completa dessorção dos analitos, maximizando assim, a eficiência de extração (Gao *et al.*, 2018). Os tempos de dessorção de 10, 20 e 30 min foram avaliados de forma univariada e o resultado através de um gráfico de barras contendo as

médias das áreas cromatográficas normalizadas obtidas para cada analito é mostrado na Figura 34.

Figura 33. Superfície triangular obtida para a dessorção líquida dos hormônios.



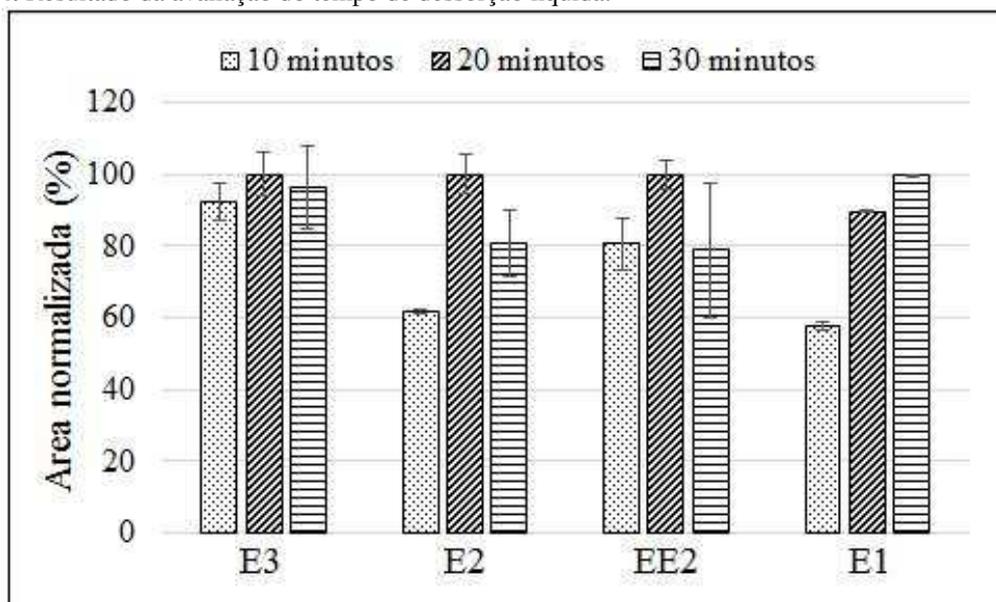
Fonte: Autoria própria.

*Condições experimentais: urina diluída 40 vezes com $200 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada analito; 90 min de tempo de extração; 30 min de tempo de dessorção; volume de solvente de dessorção de $300 \mu\text{l}$ e volume de amostra de $1,5 \text{ mL}$.

Com base nos resultados mostrados na Figura 34, no tempo de dessorção de 30 min, as respostas cromatográficas para o E3, E2 e EE2 foram menores em relação ao tempo de 20 min. Esse comportamento pode ser explicado devido à possibilidade de ocorrer uma retro-extração dos analitos inicialmente dessorvidos. Portanto, selecionou-se 20 min como o tempo de dessorção otimizado, pois esse tempo proporcionou os melhores resultados para a maioria dos analitos.

Utilizando-se o solvente metanol durante 20 min na dessorção líquida dos analitos, não foi observado nenhum efeito de memória.

Figura 34. Resultado da avaliação do tempo de dessorção líquida.



Fonte: Autoria própria.

*Condições experimentais: urina diluída 40 vezes com $200 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada analito; 90 min de tempo de extração; $300 \mu\text{L}$ de metanol como solvente de dessorção e volume de amostra de $1,5 \text{ mL}$. ($n=3$).

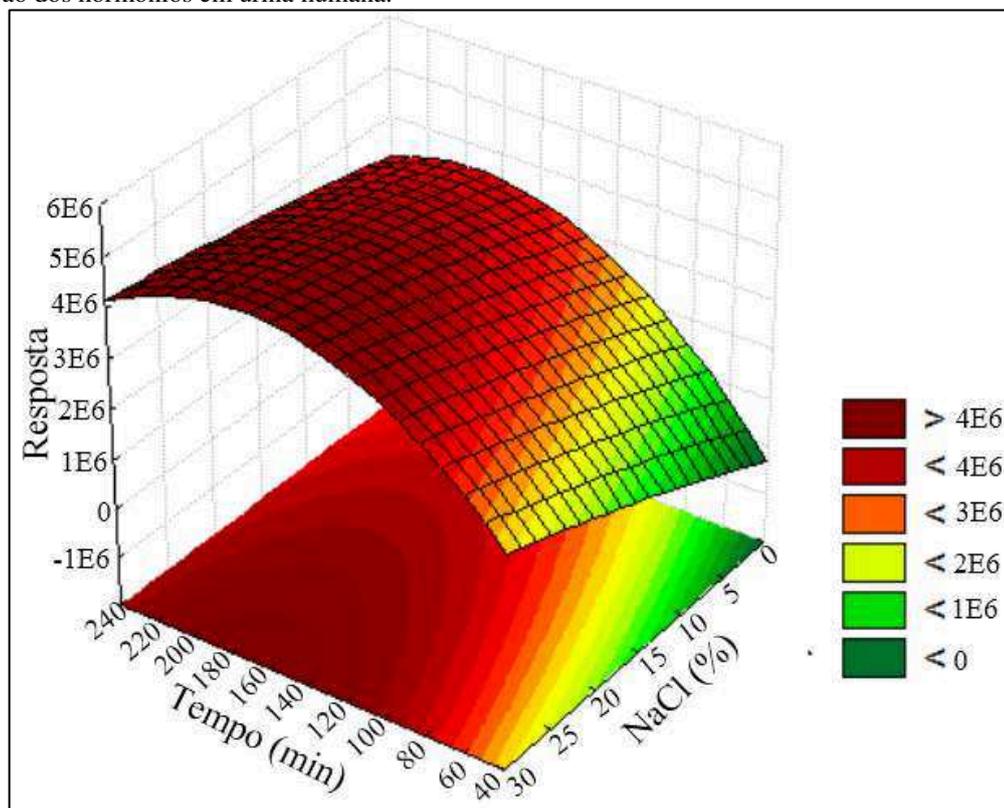
6.3.1.3 Otimização das condições de extração

Nesta etapa foi realizado planejamento *Doehlert* para avaliar a influência do tempo de extração (40-240 min) e da adição de NaCl (0-30%, m/v). Para a avaliação dos dados, as médias geométricas das áreas dos picos cromatográficos dos analitos foram adotadas, e os resultados são mostrados na superfície de resposta (com R^2 de 0,9928) apresentada na Figura 35.

De acordo com a Figura 35, as condições de extração otimizadas para os hormônios foram tempo de extração de 150 min e uma concentração de NaCl de 20% (m/v). Levando em consideração a capacidade máxima do sistema *96 well-plate*, o tempo total de extração foi de apenas 1,5 min por amostra, o que é uma excelente característica relacionada a um alto rendimento do procedimento proposto. Em relação à concentração de NaCl, à medida que a força iônica da amostra aumentou, também foi observado um aumento na extração dos analitos, o que pode ser explicado pelo efeito *salting-out*, no qual a solubilidade dos compostos orgânicos diminui com a adição de NaCl, facilitando sua migração para a fase sorvente (Dias *et al.*, 2015; Corazza *et al.*, 2017). Esse efeito é observado principalmente para compostos de polaridade média a alta. Como os analitos em estudo possuem polaridade intermediária ($\log P \leq 4,12$), houve um pronunciado efeito da adição de sal, principalmente para o estriol, que é o mais polar

dos compostos estudados, no qual a maior eficiência de extração foi obtida com uma concentração de sal maior que 20% (superfície de resposta individual não mostrada).

Figura 35. Superfície de resposta obtida para a otimização do tempo de extração e adição de NaCl na influência na extração dos hormônios em urina humana.



Fonte: Autoria própria.

*Condições experimentais: urina diluída 40 vezes com $200 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada analito; 20 min de tempo de dessorção; $300 \mu\text{L}$ de metanol como solvente de dessorção e volume de amostra de 1,5 mL.

6.3.2 Parâmetros analíticos de mérito

O desempenho da bráctea como fase extratora para TF-SPME para determinação dos hormônios estrogênicos em amostras de urina foi avaliado através de parâmetros analíticos de mérito. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 25.

Conforme mostrado na Tabela 25, excelentes linearidades foram obtidas com coeficientes de correlação (R) variando de 0,9947 para E1 a 0,9999 para E3. Os LOD variaram de 0,03 para E2 a $3,03 \mu\text{g L}^{-1}$ para E1 e os LOQ variaram de 0,1 para E2 a $10 \mu\text{g L}^{-1}$ para E1.

Tabela 25. Faixa linear de trabalho, coeficiente de correlação (R), limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) para determinação de hormônios estrogênicos em urina humana utilizando o método proposto.

Analitos	Faixa linear de trabalho ($\mu\text{g L}^{-1}$)	R	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)^a	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)^b
E3	1 – 40	0,9999	0,3	1
E2	0,1 – 400	0,9984	0,03	0,1
EE2	0,5 – 400	0,9953	0,15	0,5
E1	10 – 400	0,9947	3,03	10

Fonte: Autoria própria.

*Condições experimentais: urina diluída 40 vezes; 150 min de extração; 20% de NaCl; 20 min de tempo de dessorção; 300 μL de metanol como solvente de dessorção e volume de amostra de 1,5 mL. (n=3).

^aLOQ: primeira concentração da curva analítica e ^bLOD: três vezes menor que o LOQ.

Além disso, a exatidão em termos de recuperação relativa e a precisão (intradia e interdia) do método proposto também foram avaliadas. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 26.

De acordo com a Tabela 26, as recuperações relativas (n = 3) variaram de 71% para EE2 a 107% para E1, a precisão intradia (n = 3) variou de 1% para E2 a 17% para E1 e a precisão interdia (n = 9) variou de 2% para E3 a 19% para E1. Os valores obtidos estão de acordo com os limites aceitáveis segundo a AOAC.

Tabela 26. Recuperação relativa e precisões intradia e interdia obtidas para determinação de hormônios estrogênicos em urina humana usando o método proposto. Continua

Analitos	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação relativa (%) (n=3)	Precisão intradia (RSD) (%) (n=3)	Precisão interdia (RSD) (%) (n=9)
	1	80	5	7
E3	200	91	7	9
	400	87	3	2

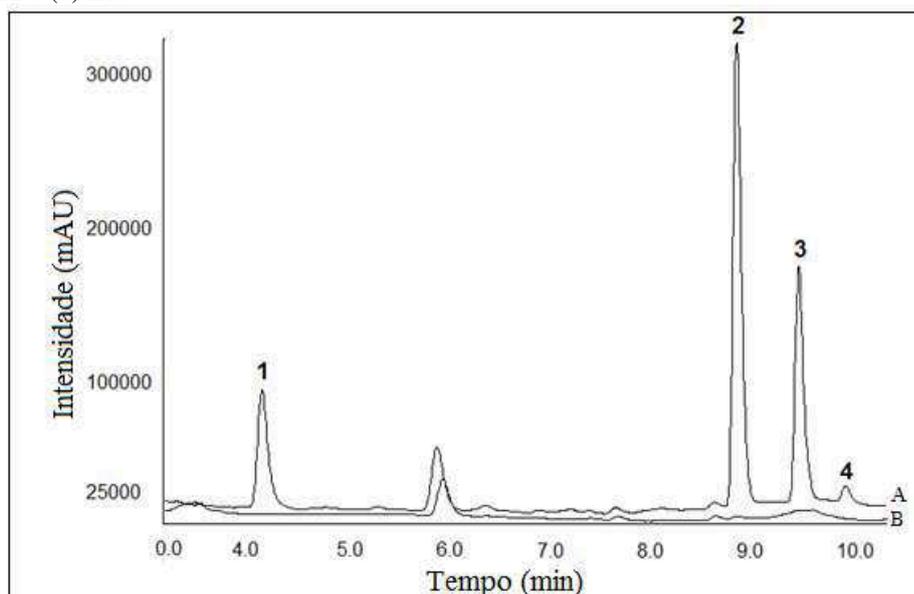
Analitos	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação relativa (%) (n=3)	Conclusão	
			Precisão intradia (RSD) (%) (n=3)	Precisão interdia (RSD) (%) (n=9)
E2	0,1	87	9	8
	200	101	1	4
	400	98	4	4
EE2	0,5	71	9	16
	200	89	2	7
	400	92	13	5
E1	10	107	4	3
	200	75	17	19
	400	103	9	11

Fonte: Autoria própria.

*Condições experimentais: urina diluída 40 vezes; 150 min de extração; 20% de NaCl; 20 min de tempo de dessorção; 300 μL de metanol como solvente de dessorção e volume de amostra de 1,5 mL.

Na Figura 36 são mostrados cromatogramas obtidos através de extrações da amostra de urina, de um voluntário homem, que foi utilizada neste estudo.

Figura 36. Cromatogramas obtidos a partir da extração da amostra de urina diluída utilizando o método proposto. (A) urina em branco e (B) urina diluída (40 vezes) fortificada com 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada analito. Analitos: (1) E3; (2) E2; (3) EE2 e (4) E1.



Fonte: Autoria própria.

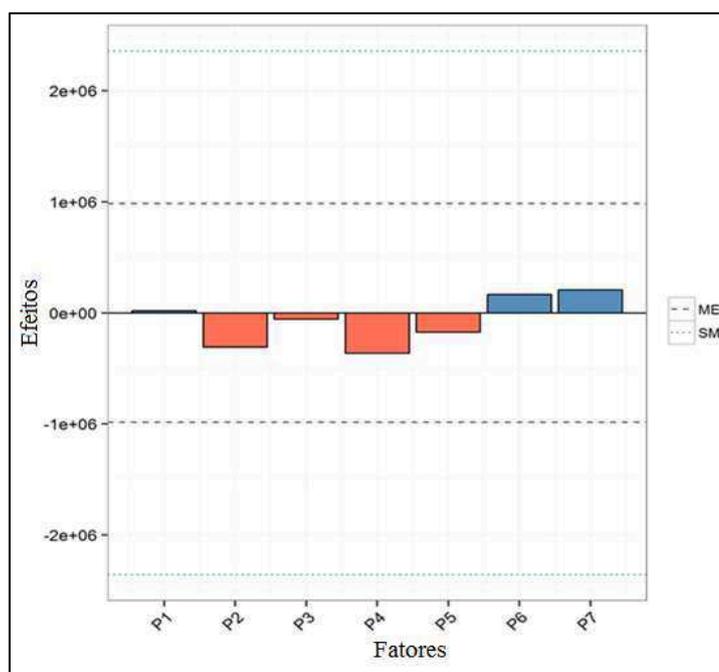
*Condições experimentais: 150 min de extração; 20% de NaCl; 20 min de tempo de dessorção; 300 μL de metanol como solvente de dessorção e volume de amostra de 1,5 mL.

Um dos cromatogramas referentes à amostra sem fortificar (Figura 36-A) e o outro referente à mesma urina fortificada com $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada analito (Figura 36-B).

6.3.3 Robustez do método

A robustez do método foi avaliada através do teste de Youden, utilizando algumas condições utilizadas no preparo de amostra otimizado, incluindo tempo de extração, tempo de dessorção, diluição da urina, % de NaCl, solvente de dessorção, volume de MeOH para a dessorção e volume da amostra. Os resultados obtidos são mostrados na Figura 37, com dados expressos através do gráfico de Lenth.

Figura 37. Gráfico de Lenth para avaliação da robustez. Fatores: P1 – tempo de extração; P2 – tempo de dessorção; P3 – diluição da urina; P4 – % de NaCl; P5 – solvente de dessorção; P6 – volume de MeOH para a dessorção e P7 – volume da amostra.



Fonte: Autoria própria.

No gráfico de Lenth, efeitos, quando avaliados de forma simultânea, que não excedam o valor de SEM (margem de erro simultânea) são considerados inativos, uma vez que a variação dos mesmos não é considerada significativa; quando excedem, são considerados significativos com um nível de significância de 95% (Hund *et al.*, 2000). Portanto, de acordo com a Figura 37, como nenhum efeito excede a EM, pequenas mudanças no procedimento não influenciaram

o resultado global para a extração dos estrogênios em estudo, e pode-se afirmar que o método proposto é robusto.

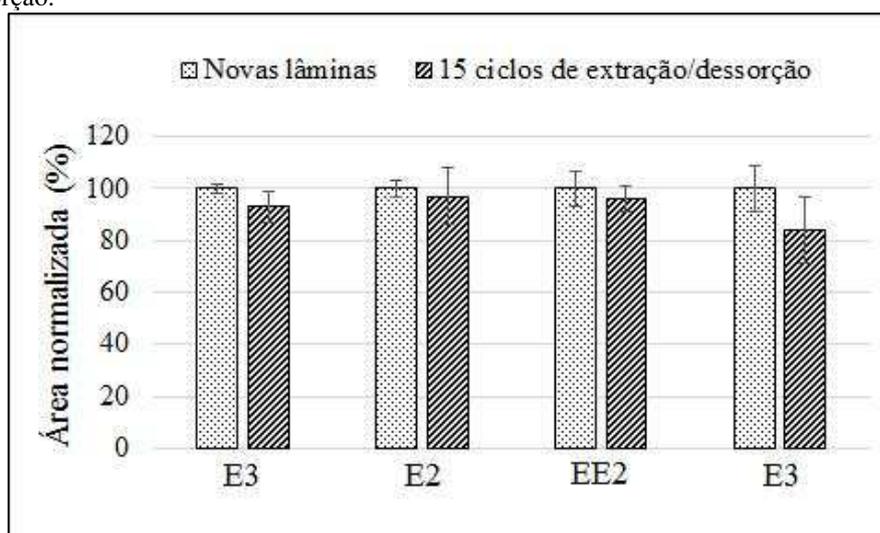
6.3.4 Reprodutibilidade dos poços do sistema 96-well plate

A reprodutibilidade dos poços foi avaliada através de extrações dos analitos em amostras de urina usando as condições otimizadas. Para isso, 10 posições diferentes escolhidas aleatoriamente do sistema sistema 96-well plate e 10 lâminas recobertas com a bráctea foram utilizadas utilizadas. Nesse estudo, o RSD obtido foi menor que 19%, o que indica que qualquer posição do sistema pode ser utilizada sem afetar os resultados do método proposto.

6.3.5 Estabilidade da fase extratora

A estabilidade do bráctea como um nova fase extratora para TF-SPME foi avaliada através de uma comparação das eficiências de extração usando uma lâmina nova recoberta com o biossorvente, e lâminas usadas em 15 ciclos sucessivos de extração/dessorção. Um gráfico de barras mostrando a área do pico cromatográfico normalizada para cada analito é mostrado na Figura 38.

Figura 38. Avaliação da estabilidade da bráctea como fase sorvente para TF-SPME após 15 ciclos de extração/dessorção.



Fonte: Autoria própria.

*Condições experimentais: urina diluída 40 vezes fortificada com $200 \mu\text{g L}^{-1}$ dos analitos; 150 min de extração; 20% de NaCl; 20 min de tempo de dessorção; 300 μL de metanol como solvente de dessorção e volume de amostra de 1,5 mL

De acordo com essa Figura, o desempenho de extração da lâmina usada em 15 ciclos de extração/dessorção para E3, E2 e EE2 foi de aproximadamente 90% do obtido com uma nova lâmina, enquanto para E1 a lâmina usada apresentou aproximadamente 80% de desempenho comparado à nova lâmina. Sendo assim, pode-se concluir que a nova fase sorvente apresentou estabilidade satisfatória, mostrando excelente resistência em solventes orgânicos.

6.3.6 Aplicação do método desenvolvido

A aplicabilidade da metodologia proposta foi avaliada através da análise de amostras de urina coletadas de sete voluntárias, que previamente concordam em participar deste estudo. Sendo que, a amostra 1 foi obtida de um voluntária que não faz uso de contraceptivos orais à base de estrogênio. As amostras 2, 3, 4, 5 e 6 foram coletadas de cinco voluntárias com ingestão regular de pílulas anticoncepcionais, e as amostras 7 e 8 foram obtidas de uma de um mulher grávida de 33 semanas. As amostras de urina foram diluídas (40 vezes) com água ultrapura antes das extrações e foi utilizado o preparo de amostra otimizado nas análises. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 27.

Como mostrado na Tabela 27, E1 não foi detectado em nenhuma das amostras de urina analisadas. EE2 foi detectado, mas não quantificado em 1 amostra de urina, enquanto esse composto não foi detectado nas outras amostras, apesar de 5 amostras serem de mulheres que ingerem esse hormônio diariamente através de pílulas anticoncepcionais. Isso pode ser explicado pelo fato de que esse hormônio é comumente excretado (40% pela urina e 60% pelas fezes) na sua forma conjugada (sulfatos e glicuronídeos). Além disso, esse composto é mantido no organismo das mulheres que o injerem através de contraceptivos por pelo menos 24 horas para garantir a eficiência das pílulas (Kumar *et al.*, 2009; Merib *et al.*, 2018). O E3 foi quantitativamente determinado em amostras de urina da gestante (Amostras 7 e 8) e detectado, mas não quantificado em quatro amostras (1, 2, 3 e 5). Esse resultado é esperado, uma vez que E3 é o principal esteróide estrogênico produzido durante a gravidez, e a quantidade desse composto na urina aumenta significativamente durante esse período (Neves e Castro, 1975). Concentrações de E3 correspondentes a $580,14 \mu\text{g L}^{-1}$ e $328,52 \mu\text{g L}^{-1}$ foram encontradas nas amostras 7 e 8, respectivamente. Uma concentração maior na amostra 7 é possivelmente porque essa amostra correspondeu à primeira urina coletada pela manhã (em jejum) e, portanto, estava mais concentrada. Finalmente, $139,81 \mu\text{g L}^{-1}$ e $126,37 \mu\text{g L}^{-1}$ de E2 foram encontrados nas

amostras 6 e 7, respectivamente. E2 também foi detectado, mas não quantificado nas amostras 1, 4 e 5. Esse comportamento é possível devido ao fato de que entre os estrogênios de ocorrência natural, o E2 é o mais abundante e largamente excretado por humanos e animais através da urina e das fezes, como formas livres ativas ou em sua forma conjugada, através de glucuronídeos e sulfatos inativos (Barreiros *et al.*, 2016).

Tabela 27. Resultados obtidos nas análises de urina humana utilizando o método proposto.

Amostra de urina	Idade e características	Concentração encontrada ($\mu\text{g L}^{-1}$)			
		E3	E2	EE2	E1
1	25 anos – sem consumo de contraceptivo oral à base de estrogênios	< LOQ	< LOQ	ND	ND
2	29 anos – ingestão regular de pílula contraceptiva (0,035 mg de EE2/dia)	< LOQ	ND	ND	ND
3	26 anos – ingestão regular de pílula contraceptiva (0,02 mg de EE2/dia)	< LOQ	ND	ND	ND
4	26 anos – ingestão regular de pílula contraceptiva (0,03 mg de EE2/dia):	ND	< LOQ	ND	ND
5	21 anos – ingestão regular de pílula contraceptiva (0,03 mg de EE2/dia)	< LOQ	< LOQ	ND	ND
6	26 anos – ingestão regular de pílula contraceptiva (0,03 mg de EE2/dia)	ND	126,37*	< LOQ	ND
7	37 anos – gestante de 33 semanas, amostra coletada em jejum	580,14*	139,81*	ND	ND
8	37 anos – gestante de 33 semanas.	328,52*	ND	ND	ND

Fonte: Autoria própria.

ND: não detectado; <LOQ: menor que o LOQ; *Concentrações encontradas após serem multiplidas pelo fator de diluição (40 vezes).

6.3.7 Comparação do método proposto com outros reportados na literatura

Uma comparação do método proposto com outros métodos previamente relatados na literatura para a determinação dos estrogênios em amostras de urina foi realizada. O tempo de extração e dessorção e o tempo total de preparo de amostra, quando o dispositivo é operado na capacidade máxima, foram comparados, de acordo com a Tabela 28.

Tabela 28. Comparação do método proposto utilizando o filme fino de bráctea com outros métodos reportados na literatura para determinação de hormônios estrogênicos em urina humana.

Método	Fase extratora	Tempo total de prepare de amostra/por amostra (min)	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)				Referência
			E1	E2	EE2	E3	
SBSE ^a /HPLC-DAD	PDMS	135	1	1	1	1	(Almeida e Nogueira, 2006)
DPX ^b /HPLC-FLD	Cortiça	2,5	3	3	3	–	(Mafra <i>et al.</i> , 2018)
SPE/HPLC-FLD	C18	60	–	2,7	4,6	8,3	(Mao <i>et al.</i> , 2004)
Este estudo	Bráctea	1,7	3,03	0,03	0,15	0,3	–

Fonte: Autoria própria.

Como pode ser observado na Tabela 28, o método proposto quando comparado com métodos previamente relatados, proporcionou limites de detecção mais baixos, exceto para E3 utilizando SBSE/HPLC-DAD. Além disso, este trabalho forneceu uma característica analítica muito atraente, com relação ao curto tempo total de preparo da amostra por amostra (1,7 min), quando o sistema *96-well plate* é operado utilizando a sua capacidade máxima.

6.4 CONCLUSÕES PARCIAIS

Neste estudo, uma metodologia analítica de alto rendimento baseada na bráctea como uma nova fase extratora para TF-SPME foi desenvolvida com sucesso e proposta para a

determinação de estrogênios em amostras de urina humana por HPLC-FLD. Desta forma, a bráctea também se mostrou eficiente para ser utilizada como biossorvente para análise de compostos em amostras biológicas. O procedimento proposto mostrou linearidade, LOD, LOQ, exatidão e precisão (intradia e interdia) satisfatórios, além de ser um método robusto. Ademais, com o uso do sistema *96-well plate*, o tempo total de preparo de amostra, incluindo a extração e a dessorção dos analitos, exigiu apenas 1,7 min por amostra, considerando a capacidade máxima de operação do sistema. Além disso, apenas 1,5 mL da amostra (37,5 µL de urina) foi utilizado para a abordagem proposta, oferecendo vantagens importantes quando não há grande quantidade de amostra disponível, o que é muito comum quando se utiliza amostras biológicas.

CAPÍTULO VII – CONCLUSÃO FINAL E SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

7.1 CONCLUSÃO FINAL

O processo de produção da fibra de SPME se mostrou simples e reproduzível (RSD < 19%). A fibra proposta apresentou excelente estabilidade térmica, a qual não sofre decomposição térmica até 300 °C. E utilizando o fio de nitinol como suporte, a fibra à base de bioissorvente apresentou também estabilidade mecânica muito satisfatória, podendo ser utilizada em até 50 ciclos de extração/dessorção sem apresentar perda na eficiência de extração.

Através da caracterização do bioissorvente foi possível verificar a composição química heterogênea da bráctea, o que a torna interessante para extração de compostos com diferentes propriedades. Ademais, através do MEV foi possível constatar que a bráctea possui uma superfície porosa e rugosa, o que contribui para a adsorção física dos analitos.

O método desenvolvido com a fibra de bráctea para determinação de OCPs em amostras de água mostrou resultados satisfatórios. As condições ótimas obtidas para a extração dos compostos foram 80 min de extração a 80 °C e concentração de cloreto de sódio de 15% (m/v). As recuperações relativas dos analitos variaram de 60% a 113% com RSD inferiores a 21%. Além disso, o método proposto mostrou elevada sensibilidade para a detecção dos compostos, com valores de LOD no nível de partes por trilhão. Ao comparar a eficiência de extração da fibra de bráctea com uma fibra comercialmente disponível (DVB/Car/PDMS) para extração de OCPS em amostras aquosas, foi observado que a bráctea apresentou resultados semelhantes à fibra comercial.

Na segunda metodologia desenvolvida que empregou a bráctea como recobrimento para fibra de SPME, o bioissorvente apresentou resultados muito promissores ao extrair simultaneamente 32 analitos de diversas classes químicas com diferentes polaridades e volatilidades em amostras de água. Neste estudo, as condições ótimas de extração foram 40 min de extração a 80° C, 25% de NaCl e pH da amostra igual a 6. Os limites de detecção variaram entre 0,0015 a 3,03 µg L⁻¹ e os valores de recuperação relativa entre 67 e 119% com RSD inferiores a 20%. A eficiência de extração obtida para o revestimento de bioissorvente foi comparada com a fibra DVB/Car/PDMS e forneceu bons resultados.

Na terceira e última metodologia desenvolvida foi comprovado que a bráctea possui também capacidade para ser utilizada como fase extratora em análises biológicas. Além disso,

a nova fase sorvente apresentou estabilidade satisfatória ao ser utilizada em um método que emprega a dessorção líquida, mostrando excelente resistência em solventes orgânicos. Nesse estudo, as condições ótimas foram 150 min de extração utilizando urina diluída 40 vezes e 20% de cloreto de sódio e a dessorção líquida em metanol por 20 min. Considerando um ciclo de extração/dessorção, usando a capacidade máxima do sistema *96-well plate*, o tempo total de preparo de amostra foi de apenas 1,7 min por amostra, o que mostra um alto rendimento do método proposto com uma frequência analítica muito eficaz. A recuperação relativa variou de 71 a 105% com RSD inferiores a 19%. O método desenvolvido pôde ser usado com sucesso para a quantificação de estrogênios em amostras de urina humana.

Diante dos resultados obtidos, este trabalho se destaca pela grande contribuição na linha da química analítica verde o qual proporcionou análises eficientes e com reduzido impacto ambiental, considerando que foram utilizadas técnicas de preparo de amostras miniaturizadas e que utilizam pouca ou nenhuma quantidade de solvente orgânico e o material utilizado como fase extratora é natural, renovável e biodegradável.

7.2 SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

- Utilizar a bráctea em outras técnicas de microextração, como a BaµE e a DPX;
- Estudo de outras classes de compostos a fim de estabelecer a diversidade de analitos a serem extraídos pela bráctea;
- Aplicabilidade em matrizes diferentes das estudadas, como alimentos ou outras matrizes biológicas, como a saliva;
- Realizar algum tratamento térmico ou químico da bráctea, a fim de promover melhoras na área específica do biossorvente, bem como na capacidade de extração de alguns analitos específicos;
- Avaliar a capacidade de extração de outros biossorventes lignocelulósicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

2013/39/UE, Directive of the European Parliament and of the Council. Official Journal of the European Union, 2013.

ABDOLALI, A. et al. Typical lignocellulosic wastes and by-products for biosorption process in water and wastewater treatment: A critical review. **Bioresource Technology**, v. 160, p. 57-66, 2014.

ABDOLHOSSEINI, S.; GHIASVAND, A.; HEIDARI, N. A high area, porous and resistant platinized stainless steel fiber coated by nanostructured polypyrrole for direct HS-SPME of nicotine in biological samples prior to GC-FID quantification. **Journal of Chromatography B**, v. 1061-1062, p. 5-10, 2017.

ADEEL, M. et al. Environmental impact of estrogens on human, animal and plant life: A critical review. **Environment International**, v. 99, p. 107-119, 2017.

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.

AKHTAR, M. et al. Sorption potential of rice husk for the removal of 2,4-dichlorophenol from aqueous solutions: Kinetic and thermodynamic investigations. **Journal of Hazardous Materials**, v. 128, p. 44-52, 2006.

ALIZADEH, R. Chlorophenol's ultra-trace analysis in environmental samples by chitosan-zinc oxide nanorod composite as a novel coating for solid phase micro-extraction combined with high performance liquid chromatography. **Talanta**, v. 146, p. 831-838, 2016.

ALMEIDA, C.; NOGUEIRA, J. M. F. Determination of steroid sex hormones in water and urine matrices by stir bar sorptive extraction and liquid chromatography with diode array detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, p. 1303-1311, 2006.

ALPENDURADA, M. D. F. Solid-phase microextraction: a promising technique for sample preparation in environmental analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 880, p. 3-14, 2000.

ALVES, V. N.; COELHO, N. M. M. Selective extraction and preconcentration of chromium using *Moringa oleifera* husks as biosorbent and flame atomic absorption spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 109, p. 16-22, 2013.

ALVES, V. N. et al. Determination of cadmium in alcohol fuel using *Moringa oleifera* seeds as a biosorbent in an on-line system coupled to FAAS. **Talanta**, v. 80, p. 1133-1138, 2010.

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

ARAÚJO, C. S. T. et al. Development of a flow system for the determination of low concentrations of silver using *Moringa oleifera* seeds as biosorbent and flame atomic absorption spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 96, p. 82-85, 2010.

ARAUJO, L. A. et al. Moringa oleifera biomass residue for the removal of pharmaceuticals from water. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 6, p. 7192-7199, 2018.

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

ASATI, A.; SATYANARAYANA, G. N. V.; PATEL, D. K. Comparison of two microextraction methods based on solidification of floating organic droplet for the determination of multiclass analytes in river water samples by liquid chromatography tandem mass spectrometry using Central Composite Design. **Journal of Chromatography A**, v. 1513, p. 157-171, 2017.

ASGHER, M. Biosorption of Reactive Dyes: A Review. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 223, p. 2417-2435, 2012.

AYAZI, Z.; SHEKARI ESFAHLAN, F.; MONSEF KHOSHHEBAB, Z. ZnO nanoparticles doped polyamide nanocomposite coated on cellulose paper as a novel sorbent for ultrasound-assisted thin film microextraction of organophosphorous pesticides in aqueous samples. **Analytical Methods**, v. 10, p. 3043-3051, 2018.

BALASUBRAMANIAN, S.; PANIGRAHI, S. Solid-Phase Microextraction (SPME) Techniques for Quality Characterization of Food Products: A Review. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, p. 1-26, 2011.

BAPTISTA NETO, J.A.W.; PATCHINEELAM, S. M. Poluição Marinha. Rio de Janeiro: Interciência, 2008.

BARREIROS, L. et al. Analysis of 17- β -estradiol and 17- α -ethinylestradiol in biological and environmental matrices - A review. **Microchemical Journal**, v. 126, p. 243-262, 2016.

BIANCHIN, J. N. et al. Simultaneous determination of polycyclic aromatic hydrocarbons and benzene, toluene, ethylbenzene and xylene in water samples using a new sampling strategy combining different extraction modes and temperatures in a single extraction solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry procedure. **Journal of Chromatography A**, v. 1233, p. 22-29, 2012.

BIDARI, A. et al. Sample preparation method for the analysis of some organophosphorus pesticides residues in tomato by ultrasound-assisted solvent extraction followed by dispersive liquid-liquid microextraction. **Food Chemistry**, v. 126, p. 1840-1844, 2011.

BORGES, K. B.; QUEIROZ, M. E.; FIGUEIREDO, E. C. Preparo de Amostras Para Análise de Compostos Orgânicos. ISBN 9788521626947, 2015.

BOYAC, E. et al. Introduction of solid-phase microextraction as a high-throughput sample preparation tool in laboratory analysis of prohibited substances. **Analytica Chimica Acta**, v. 809, p. 69-81, 2014.

BOYAC, 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, 2016.

- BOYD-BOLAND, A. A.; PAWLISZYN, J. Solid-phase microextraction of nitrogen-containing herbicides. **Journal of Chromatography A**, v. 704, p. 163-172, 1995.
- BRASIL, J. L. et al. Statistical design of experiments as a tool for optimizing the batch conditions to Cr(VI) biosorption on Araucária angustifolia wastes. **Journal of Hazardous Materials**, v. 133, p. 143-153, 2006.
- BRUHEIM, I.; LIU, X.; PAWLISZYN, J. Thin-Film Microextraction. **Analytical Chemistry**, v. 75, p. 1002-1010, 2003.
- BUDZIAK, D.; MARTENDAL, E.; CARASEK, E. Application of robust NiTi–ZrO₂–PEG SPME fiber in the determination of haloanisoles in cork stopper samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 629, p. 92-97, 2008.
- CALVETE, T. et al. Application of carbon adsorbents prepared from the Brazilian pine-fruit-shell for the removal of Procion Red MX 3B from aqueous solution - kinetic, equilibrium, and thermodynamic studies. **Chemical Engineering Journal**, v. 155, p. 627-636, 2009.
- CARDOSO, N. F. et al. Removal of remazol black B textile dye from aqueous solution by adsorption. **Desalination**, v. 269, p. 92-103, 2011.
- CARRERA, S.; SANTIAGO, G.; VEGA, M. Spectrophotometric determination of dithizone–mercury complex by solid phase microextraction in micropipette tip syringe packed with activated carbon xerogel. **Microchemical Journal**, v. 129, p. 133-136, 2016.
- CHANG, B.V. et al. Removal of emerging contaminants using spent mushroom compost. **The Science of the total environment**, v. 634, p. 922-933, 2018.
- CHEN, B. et al. Hollow fiber liquid-liquid-liquid microextraction combined with high performance liquid chromatography-ultraviolet detection for the determination of various environmental estrogens in environmental and biological samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1305, p. 17-26, 2013.
- CHEN, B.; YUAN, M.; LIU, H. Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from aqueous solution using plant residue materials as a biosorbent. **Journal of Hazardous Materials**, v. 188, p. 436-442, 2011.
- CHEN, L. et al. Facile synthesis of magnetic covalent organic framework nanobeads and application to magnetic solid-phase extraction of trace estrogens from human urine. **Journal of Chromatography A**, v. 1567, p. 136-146, 2018.
- CHIARELLO, M. et al. Determinação de agrotóxicos na água e sedimentos por HPLC-HRMS e sua relação com o uso e ocupação do solo. **Química Nova**, v. 40, p. 158-165, 2017.
- CLAVER, A. et al. Study of the presence of pesticides in surface waters in the Ebro River basin (Spain). **Chemosphere**, v. 64, p. 1437-1443, 2006.
- CLEMENT, R. E.; YANG, P. W.; KOESTER, C. J. Environmental Analysis. **Analytical Chemistry**, v. 73, p. 2761-2790, 2001.

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

CORDENUNSI, B. et al. Chemical Composition and Glycemic Index of Brazilian Pine (*Araucária angustifolia*) Seeds, **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 52, p. 3412-3416, 2004.

CUDJOE, E. et al. Investigation of the Effect of the Extraction Phase Geometry on the Performance of Automated Solid-Phase Microextraction. **Analytical Chemistry**, v. 81, p. 4226-4232, 2009.

DARVISHNEJAD, M.; EBRAHIMZADEH, H. Phenyl propyl functionalized hybrid sol-gel reinforced aluminum strip as a thin film microextraction device for the trace quantitation of eight PCBs in liquid foodstuffs. **Talanta**, v. 199, p. 547-555, 2019.

DI PIETRO ROUX, K. C. et al. Application of a robust solid-phase microextraction fiber consisting of NiTi wires coated with polypyrrole for the determination of haloanisoles in water and wine. **Analytical Methods**, v. 8, p. 5503-5510, 2016.

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

DIAS, A. et al. Use of green coating (cork) in solid-phase microextraction for the determination of organochlorine pesticides in water by gas chromatography-electron capture detection. **Talanta**, v. 134, p. 409-414, 2015.

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.

DING, S.-Y.; HIMMEL, M. E. The Maize Primary Cell Wall Microfibril: A New Model Derived from Direct Visualization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 597-606, 2006.

DO CARMO, S. N. et al. A low-cost biosorbent-based coating for the highly sensitive determination of organochlorine pesticides by solid-phase microextraction and gas chromatography-electron capture detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1525, p. 23-31, 2017.

DO CARMO, S. N.; MERIB, J.; CARASEK, E. Bract as a novel extraction phase in thin-film SPME combined with 96-well plate system for the high-throughput determination of estrogens in human urine by liquid chromatography coupled to fluorescence detection. **Journal of Chromatography B**, v. 1118-1119, p. 17-24, 2019.

DONATO, F. F. et al. Development of a Multiresidue Method for Pesticide Analysis in Drinking Water by Solid Phase Extraction and Determination by Gas and Liquid Chromatography with Triple Quadrupole Tandem Mass Spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, p. 2077-2087, 2015.

DÓREA, H. S.; GAUJAC, A.; NAVICKIENE, S. Microextração em fase sólida: aspectos termodinâmicos e cinéticos. **SCIENTIA PLENA** v. 4, p. 1-7, 2008.

DURMUSOGLU, E.; TASPINAR, F.; KARADEMIR, A. Health risk assessment of BTEX emissions in the landfill environment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 176, p. 870-877, 2010.

EISERT, R.; PAWLISZYN, J. Automated In-Tube Solid-Phase Microextraction Coupled to High-Performance Liquid Chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 69, p. 3140-3147, 1997.

ES-HAGHI, A.; HOSSEINI, S. M.; KHOSHESAB, Z. M. Development and application of a new solid-phase microextraction fiber by sol-gel technology on titanium wire. **Analytica Chimica Acta**, v. 742, p. 74-79, 2012.

FERNÁNDEZ-PERALBO, M. A.; LUQUE DE CASTRO, M. D. Preparation of urine samples prior to targeted or untargeted metabolomics mass-spectrometry analysis. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 41, p. 75-85, 2012.

FERREIRA, V.F.; ROCHA, D.R. Potencialidades e oportunidades na química da sacarose e outros açúcares. **Química Nova**, v. 32, p. 623-638, 2009.

FLÓREZ MENÉNDEZ, J. C. et al. Static headspace versus head space solid-phase microextraction (HS-SPME) for the determination of volatile organochlorine compounds in landfill leachates by gas chromatography. **Talanta**, v. 63, p. 809-814, 2004.

FREITAS, A. M. et al. Antiviral activity-guided fractionation from *Araucaria angustifolia* leaves extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 126, p. 512-517, 2009.

GALÁN-CANO, F. et al. Ionic liquid based in situ solvent formation microextraction coupled to thermal desorption for chlorophenols determination in waters by gas chromatography/mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1229, p. 48-54, 2012.

GAO, G. et al. Development and application of vortex-assisted membrane extraction based on metal-organic framework mixed-matrix membrane for the analysis of estrogens in human urine. **Analytica Chimica Acta**, v. 1023, p. 35-43, 2018.

GRANDY, J. J.; BOYAC, E.; PAWLISZYN, J. Development of a Carbon Mesh Supported Thin Film Microextraction Membrane As a Means to Lower the Detection Limits of Benchtop and Portable GC/MS Instrumentation. **Analytical Chemistry**, v. 88, p. 1760-1767, 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.

HASHEMI, B.; ZOHRABI, P.; SHAMSIPUR, M. Recent developments and applications of different sorbents for SPE and SPME from biological samples. **Talanta**, v. 187, p. 337-347, 2018.

HE, S. et al. Facile Synthesis of Magnetic Covalent Organic Framework with Three-Dimensional Bouquet-Like Structure for Enhanced Extraction of Organic Targets. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 9, p. 2959-2965, 2017.

HELIN, A. et al. Solid phase microextraction Arrow for the sampling of volatile amines in wastewater and atmosphere. **Journal of Chromatography A**, v. 1426, p. 56-63, 2015.

HENNING JØRGENSEN, J. B. K., CLAUS FELBY. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 1, p. 119-134, 2007.

HOFRICHTER, M. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 454-466, 2002.

HOSSEINZADEH, R. et al. Novel cationic surfactant ion pair based solid phase microextraction fiber for nano-level analysis of BTEX. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 84, p. 13-17, 2011.

HU, B.; HE, M. Pre-concentration and Sample Treatment Techniques for Trace Element Analysis. **Comprehensive Sampling and Sample Preparation**. V. 3, p.365-394, 2012.

HU, X. et al. Molecularly imprinted polymer coated solid-phase microextraction fiber prepared by surface reversible addition-fragmentation chain transfer polymerization for monitoring of Sudan dyes in chilli tomato sauce and chilli pepper samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 731, p. 40-48, 2012.

HU, Y.; FAN, Y.; LI, G. Preparation and evaluation of a porous monolithic capillary column for microextraction of estrogens from urine and milk samples online coupled to high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1228, p. 205-212, 2012.

HU, Y. et al. Preparation and application of poly(dimethylsiloxane)/ β -cyclodextrin solid-phase microextraction membrane. **Analytica Chimica Acta**, v. 543, p. 17-24, 2005.

HUANG, Z.; CHUA, P. E.; LEE, H. K. Carbonized polydopamine as coating for solid-phase microextraction of organochlorine pesticides. **Journal of Chromatography A**, v. 1399, p. 8-17, 2015.

HUANG, Z.; LEE, H. K. Materials-based approaches to minimizing solvent usage in analytical sample preparation. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 39, p. 228-244, 2012.

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

HUTCHINSON, J. P.; SETKOVA, L.; PAWLISZYN, J. Automation of solid-phase microextraction on a 96-well plate format. **Journal of Chromatography A**, v. 1149, p. 127-137, 2007.

IARC. The International Agency for Research on Cancer (IARC) Homepage. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, 2018.

GARWOLIŃSKA, D. et al. State of the art in sample preparation for human breast milk metabolomics—merits and limitations. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 114, p. 1-10, 2019.

GOLDING, C.; GOBAS, F.; BIRCH, G. Characterization of PAH bioavailability in estuarine sediments using thin-film extraction. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 26, p. 829-836, 2019.

JABALI, Y.; MILLET, M.; EL-HOZ, M. Optimization of a DI-SPME-GC–MS/MS method for multi-residue analysis of pesticides in waters. **Microchemical Journal**, v. 147, p. 83-92, 2019.

JAIN, S. M. Somatic embryogenesis in woody plants. v. 6, p. 458, 2000.

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

KATARZYNA, M. et al. Sample preparation and determination of pesticides in fat-containing foods. **Food Chemistry**, v. 269, p. 527-541, 2018

KAYE, B. et al. Rapid, Solid Phase Extraction Technique for the High-Throughput Assay of Darifenacin in Human Plasma. **Analytical Chemistry**, v. 68, p. 1658-1660, 1996

KAYKHAI, M. et al. Preparation and evaluation of solid-phase microextraction fibres based on functionalized latex nanoparticle coatings for trace analysis of inorganic anions. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 3452-3456, 2010.

KIRSCHNER, N. et al. Novel approach to high-throughput determination of endocrine disruptors using recycled diatomaceous earth as a green sorbent phase for thin-film solid-phase microextraction combined with 96-well plate system. **Analytica Chimica Acta**, v. 996, p. 29-37, 2017.

KUDSK, P.; JØRGENSEN, L. N.; ØRUM, J. E. Pesticide Load—A new Danish pesticide risk indicator with multiple applications. **Land Use Policy**, v. 70, p. 384-393, 2018.

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.

KUMAR, V. et al. Rapid determination of free and conjugated estrogen in different water matrices by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Chemosphere**, v. 77, p. 1440-1446, 2009.

LAAKS, J.; JOCHMANN, M. A.; SCHMIDT, T. C. Solvent-free microextraction techniques in gas chromatography. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 402, p. 565-571, 2012.

LEE, C. et al. Simultaneous determination of bisphenol A and estrogens in hair samples by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 1058, p. 8-13, 2017.

- LI, D. et al. Preparation of magnetic ODS-PAN thin-films for microextraction of quetiapine and clozapine in plasma and urine samples followed by HPLC-UV detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 125, p. 319-328, 2016.
- LI, J. et al. A simplified procedure for the determination of organochlorine pesticides and polychlorobiphenyls in edible vegetable oils. **Food Chemistry**, v. 151, p. 47-52, 2014.
- LI, J. et al. Advances in different configurations of solid-phase microextraction and their applications in food and environmental analysis. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 72, p. 141-152, 2015.
- LI, S. et al. Acetone-activated polyimide electrospun nanofiber membrane for thin-film microextraction and thermal desorption-gas chromatography–mass spectrometric analysis of phenols in environmental water. **Journal of Chromatography A**, v. 1411, p. 1-8, 2015.
- LI, Y.; CHEN, P.-S.; HUANG, S.-D. Water with low concentration of surfactant in dispersed solvent-assisted emulsion dispersive liquid–liquid microextraction for the determination of organochlorine pesticides in aqueous samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1300, p. 51-57, 2013.
- LIM, C. K. Chapter 1 Liquid Chromatography in Biomedical Analysis: Basic Approach. In: HANAI, T. (Ed.). **Journal of Chromatography Library**, v.50, p.1-20, 1991.
- LIMA, E. C. et al. Adsorption of Cu(II) on Araucaria angustifolia wastes: Determination of the optimal conditions by statistic design of experiments. **Journal of Hazardous Materials**, v. 140, p. 211-220, 2007.
- LORD, H.; PAWLISZYN, J. Evolution of solid-phase microextraction technology. **Journal of Chromatography A**, v. 885, p. 153-193, 2000.
- LUO, X.; LI, G.; HU, Y. In-tube solid-phase microextraction based on NH₂-MIL-53(Al)-polymer monolithic column for online coupling with high-performance liquid chromatography for directly sensitive analysis of estrogens in human urine. **Talanta**, v. 165, p. 377-383, 2017.
- LUO, Z. et al. Comparison of performances of corn fiber plastic composites made from different parts of corn stalk. **Industrial Crops and Products**, v. 95, p. 521-527, 2017.
- MA, J. et al. Determination of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental water samples by solid-phase extraction using multi-walled carbon nanotubes as adsorbent coupled with gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 5462-5469, 2010.
- MA, L.; YATES, S. R. Dissolved organic matter and estrogen interactions regulate estrogen removal in the aqueous environment: A review. **Science of The Total Environment**, v. 640-641, p. 529-542, 2018.
- MACEDO, J. S. et al. Biomorphic activated porous carbons with complex microstructures from lignocellulosic residues. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 107, p. 276-285, 2008.
- MACKAY, D. S., W.Y.,MA,K.C. Physical-Chemical Properties and Environmental Fate Hsndbook. **Chapman e Hall**, p. 84, 2000.

MADRID, Y.; CÁMARA, C. Biological substrates for metal preconcentration and speciation. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 16, p. 36-44, 1997.

MAFRA, G. et al. Low-cost approach to increase the analysis throughput of bar adsorptive microextraction (BA μ E) combined with environmentally-friendly renewable sorbent phase of recycled diatomaceous earth. **Talanta**, v. 178, p. 886-893, 2018.

MAFRA, G. et al. Expanding the applicability of cork as extraction phase for disposable pipette extraction in multiresidue analysis of pharmaceuticals in urine samples. **Journal of Chromatography B**, v. 1102-1103, p. 159-166, 2018.

MAGDIC, S.; PAWLISZYN, J. B. Analysis of organochlorine pesticides using solid-phase microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 723, p. 111-122, 1996.

MAO, L. et al. Determination of environmental estrogens in human urine by high performance liquid chromatography after fluorescent derivatization with p-nitrobenzoyl chloride. **Analytica Chimica Acta**, v. 522, p. 241-246, 2004.

MARTINS, M. L. et al. Dilution standard addition calibration: A practical calibration strategy for multiresidue organic compounds determination. **Journal of Chromatography A**, v. 1460, p. 84-91, 2016.

MASTROGIANNI, O. et al. Determination of venlafaxine in post-mortem whole blood by HS-SPME and GC-NPD. **Forensic Science International**, v. 215, p. 105-109, 2012.

MASON, C. F. **Biology of Freshwater Pollution**. Prentice Hall, 2002.

MAZZEO, D. E. C. et al. BTEX biodegradation by bacteria from effluents of petroleum refinery. **Science of The Total Environment**, v. 408, p. 4334-4340, 2010.

MELNYK, A. et al. Coacervative extraction as a green technique for sample preparation for the analysis of organic compounds. **Journal of Chromatography A**, v. 1339, p. 1-12, 2014.

MERIB, J. et al. Simultaneous Determination of Environmental Contaminants with Different Volatilities in Tap Water Samples Using a New Approach to Single-Drop Microextraction Procedure. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, p. 1674-1683, 2015.

MERIB, J. et al. Magnetic ionic liquids as versatile extraction phases for the rapid determination of estrogens in human urine by dispersive liquid-liquid microextraction coupled with high-performance liquid chromatography-diode array detection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 410, p. 4689-4699, 2018.

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

MICHELON, F. et al. *Araucaria Angustifolia*: A Potential Nutraceutical with Antioxidant and Antimutagenic Activities. **Current Nutrition & Food Science**, v. 8, p. 155-159, 2012.

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.

MIRZAJANI, R.; RAMEZANI, Z.; KARDANI, F. Selective determination of thidiazuron herbicide in fruit and vegetable samples using molecularly imprinted polymer fiber solid phase microextraction with ion mobility spectrometry detection (MIPF-SPME-IMS). **Microchemical Journal**, v. 130, p. 93-101, 2017.

MONNERET, C. What is an endocrine disruptor? **Comptes Rendus Biologies**, v. 340, p. 403-405, 2017.

MORÉS, L. et al. A natural and renewable biosorbent phase as a low-cost approach in disposable pipette extraction technique for the determination of emerging contaminants in lake water samples, **Journal of Separation Science**, v. 42, p. 1404-1411, 2019.

MORÉS, L.; NEVES DIAS, A.; CARASEK, E. Development of a high-throughput method based on thin-film microextraction using a 96-well plate system with a cork coating for the extraction of emerging contaminants in river water samples, **Journal of Separation Science**, v. 41, p. 697-703, 2017.

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

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

NADAVALA, S. K. et al. Biosorption of phenol and o-chlorophenol from aqueous solutions on to chitosan–calcium alginate blended beads. **Journal of Hazardous Materials**, v. 162, p. 482-489, 2009.

NAG, S.; BAR, N.; DAS, S. K. Sustainable bioremediation of Cd(II) in fixed bed column using green adsorbents: Application of Kinetic models and GA-ANN technique. **Environmental Technology & Innovation**, v. 13, p. 130-145, 2019.

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, 2011.

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

NIKOLAOU, K.; MASCLLET, P.; MOUVIER, G. Sources and chemical reactivity of polynuclear aromatic hydrocarbons in the atmosphere - A critical review. **Science of The Total Environment**, v. 32, p. 103-132, 1984.

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

NOVÁKOVÁ, L.; VLČKOVÁ, H. A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation. **Analytica Chimica Acta**, v. 656, p. 8-35, 2009.

OENNING, A. L. et al. A new configuration for bar adsorptive microextraction (BA μ E) for the quantification of biomarkers (hexanal and heptanal) in human urine by HPLC providing an alternative for early lung cancer diagnosis. **Analytica Chimica Acta**, v. 965, p. 54-62, 2017.

OLCER, Y. A. et al. Thin film microextraction: Towards faster and more sensitive microextraction. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 113, p. 93-101, 2019.

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

OLIVELLA, M. A. et al. Role of Chemical Components of cork on Sorption of Aqueous Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. **International Journal of Environmental Research**, v. 7, p. 225-234, 2013.

OLSON, T. N. T. Statistical techniques for collaborative tests. By W. J. Youden. The Association of Official Analytical Chemists, Box 540, Benjamin Franklin Station, Washington, **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 57, p. 194-194, 1968

OUYANG, G.; PAWLISZYN, J. Recent developments in SPME for on-site analysis and monitoring. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 25, p. 692-703, 2006.

PAL, D. Adsorption of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons using Agricultural Wastes-Effect of Lignin Content. **International Conference on Chemical, Ecology and Environmental Sciences**, v. 17, p. 162-165, 2012.

PAVLIDIS, D. E. et al. A volatilomics approach for off-line discrimination of minced beef and pork meat and their admixture using HS-SPME GC/MS in tandem with multivariate data analysis. **Meat Science**, v. 151, p. 43-53, 2019.

PAWLISZYN, J. Applications of Solid Phase Microextraction, Royal Society of Chemistry, Ontario, 1999.

PAWLISZYN, J. Sample Preparation: Quo Vadis? **Analytical Chemistry**, v. 75, p. 2543-2558, 2003.

PAWLISZYN, J. Handbook of Solid Phase Microextraction, Chemical Industry Press, Ontario, 2012.

PEÑALVER, A. et al. Method based on solid-phase microextraction–high-performance liquid chromatography with UV and electrochemical detection to determine estrogenic compounds in water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 964, p. 153-160, 2002.

PERALTA, R. M. et al. Biological activities and chemical constituents of *Araucaria angustifolia*: An effort to recover a species threatened by extinction. **Trends in Food Science & Technology**, v. 54, p. 85-93, 2016.

PINI, G.F. et al. A Headspace Solid Phase Microextraction (HS-SPME) Method for the Chromatographic Determination of Alkylpyrazines in Cocoa Samples. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 15, p. 267-271, 2004.

PIRI-MOGHADAM, H. et al. Fast quantitation of target analytes in small volumes of complex samples by matrix-compatible solid-phase microextraction devices. **Angewandtd Internation Edition Chemie**. v. 55, p. 1510-1514, 2016.

PIRI-MOGHADAM, H.; ALAM, M. 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.

PRASERTKULSAK, S. et al. Removals of pharmaceutical compounds from hospital wastewater in membrane bioreactor operated under short hydraulic retention time. **Chemosphere**, v. 150, p. 624-631, 2016.

PRATES, C. B.; GEBARA, S. S.; RÉ-POPPI, N. Análise de pesticidas organoclorados em água usando a microextração em fase sólida por headspace com cromatografia gasosa e espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 34, p. 1260-1264, 2011.

PUB CHEM DATABASE, P. National Center for Biotechnology Information, 2019.

QI, D. et al. A novel fully automated on-line coupled liquid chromatography–gas chromatography technique used for the determination of organochlorine pesticide residues in tobacco and tobacco products. **Journal of Chromatography A**, v. 1374, p. 273-277, 2014.

QIN, Z. et al. Comparison of thin-film microextraction and stir bar sorptive extraction for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous samples with controlled agitation conditions. **Journal of Chromatography A**, v. 1196-1197, p. 89-95, 2008.

QIN, Z. et al. Solid-phase microextraction under controlled agitation conditions for rapid on-site sampling of organic pollutants in water. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 6979-6985, 2009.

QIN, Z. et al. Partitioning and accumulation rates of polycyclic aromatic hydrocarbons into polydimethylsiloxane thin films and black worms from aqueous samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 667, p. 71-76, 2010.

QUEIROZ, M. E. Microextração em fase sólida no capilar (in-tube SPME) para automação das análises de fármacos em fluidos biológicos. **Scientia Chromatographica**, v. 1, p. 13-21, 2009.

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

RAMOS, L. Critical overview of selected contemporary sample preparation techniques. **Journal of Chromatography A**, v. 1221, p. 84-98, 2012.

RAO, R. A. K.; KHAN, U. Adsorption of Ni(II) on alkali treated pineapple residue (*Ananas comosus* L.): Batch and column studies. **Groundwater for Sustainable Development**, v. 5, p. 244-252, 2017.

RAZALI, N. et al. The effects of treatment on the structural and thermal, physical and mechanical and morphological properties of roselle fiber-reinforced vinyl ester composites. **Polymer Composites**, v. 39, p. 276-287, 2016.

REINERT, N. P. et al. A Low-Cost Approach Using Diatomaceous Earth Biosorbent as Alternative SPME Coating for the Determination of PAHs in Water Samples by GC-MS. **Separations**, v. 55, p. 1-9, 2018.

REITZ, R. K., R. M. Araucariaceae: Flora ilustrada catarinense. **Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues**, v. 21-24, 1966.

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

RIAZI KERMANI, F. Optimization of Solid Phase Microextraction for Determination of Disinfection By-products in Water. UWSpace, 2012.

RÍOS-GÓMEZ, J.; LUCENA, R.; CÁRDENAS, S. Paper supported polystyrene membranes for thin film microextraction. **Microchemical Journal**, v. 133, p. 90-95, 2017.

ROBLES, J. et al. Quantifying endogenous androgens, estrogens, pregnenolone and progesterone metabolites in human urine by gas chromatography tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 169, p. 20-29, 2017.

ROMERO, V. et al. Cold vapor-solid phase microextraction using amalgamation in different Pd-based substrates combined with direct thermal desorption in a modified absorption cell for the determination of Hg by atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 66, p. 156-162, 2011.

ROMERO, V. et al. Headspace thin-film microextraction onto graphene membranes for specific detection of methyl(cyclopentadienyl)-tricarbonyl manganese in water samples by total reflection X-ray fluorescence. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 126, p. 65-70, 2016.

SAJID, M. et al. Development of natural sorbent based micro-solid-phase extraction for determination of phthalate esters in milk samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 924, p. 35-44, 2016.

ŠĆIBAN, M.; KLAŠNJA, M.; ŠKRBIĆ, B. Modified softwood sawdust as adsorbent of heavy metal ions from water. **Journal of Hazardous Materials**, v. 136, p. 266-271, 2006.

SIHEM, A.; BENCHEIKH LEHOCINE, M.; MINIAI, H. A. Preparation and Characterisation of an Natural Adsorbent used for Elimination of Pollutants in Wastewater. **Energy Procedia**, v. 18, p. 1145-1151, 2012.

SILVA, A. C.; DIAS, A. N.; CARASEK, E. Exploiting Cork as Biosorbent Extraction Phase for Solid-Phase Microextraction to Determine 3-(4-Methylbenzylidene)camphor and 2-Ethylhexyl 4-(Dimethylamino)benzoate in River Water by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, p. 2341-2347, 2017.

SILVA, A. C. P. et al. Properties, characteristics and application of grinded *Malpighia emarginata* seeds in the removal of toxic metals from water. **Groundwater for Sustainable Development**, v. 6, p. 50-56, 2018.

SILVA, É. A. S.; LOPEZ-AVILA, V.; PAWLISZYN, J. Fast and robust direct immersion solid phase microextraction coupled with gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry method employing a matrix compatible fiber for determination of triazole fungicides in fruits. **Journal of Chromatography A**, v. 1313, p. 139-146, 2013.

SJÖSTRÖM, E., Alén, R. Analytical methods in wood chemistry, pulping and papermaking. Springer, Berlin., 1999.

SMY, L.; STRASESKI, J. A. Measuring estrogens in women, men, and children: Recent advances 2012–2017. **Clinical Biochemistry**, V. 62, P. 11-23, 2018.

SOPHIA A, C.; LIMA, E. C. Removal of emerging contaminants from the environment by adsorption. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 150, p. 1-17, 2018.

SOUZA, D.O. et al. Antioxidant and Antigenotoxic Activities of the Brazilian Pine *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze, **Antioxidants**, v. 3, p. 24-37, 2014.

TABARAKI, R.; HEIDARIZADI, E. Spectrophotometric determination of phenol and chlorophenols by salting out assisted liquid-liquid extraction combined with dispersive liquid-liquid microextraction. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 215, p. 405-409, 2019.

TAN, L.; CRONE, W. C. Surface characterization of NiTi modified by plasma source ion implantation. **Acta Materialia**, v. 50, p. 4449-4460, 2002.

TAPIERO, H.; NGUYEN BA, G.; TEW, K. D. Estrogens and environmental estrogens. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 56, p. 36-44, 2002.

TERZOPOULOU, Z. et al. Preparation of molecularly imprinted solid-phase microextraction fiber for the selective removal and extraction of the antiviral drug abacavir in environmental and biological matrices. **Analytica Chimica Acta**, v. 913, p. 63-75, 2016.

THOMÉ, N. Ciclo da madeira: História da devastação da Floresta de Araucária e do desenvolvimento da indústria da madeira em Caçador e na Região do Contestado no século XX. **Revista Ciclo da Madeireira**, p. 212, 1995.

TOGUNDE, O. P. et al. Optimization of solid phase microextraction for non-lethal *in vivo* determination of selected pharmaceuticals in fish muscle using liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1261, p. 99-106, 2012.

TRAN, V. S. et al. Typical low cost biosorbents for adsorptive removal of specific organic pollutants from water. **Bioresource Technology**, v. 182, p. 353-363, 2015.

ULRICH, S. Solid-phase microextraction in biomedical analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 902, p. 167-194, 2000.

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

VATANI, H.; SARAFRAZ YAZDI, A. Preparation of an ionic liquid-mediated carbon nanotube-poly(dimethylsiloxane) fiber by sol-gel technique for determination of polycyclic Ewith gas chromatography. **Journal of the Iranian Chemical Society**, v. 11, p. 969-977, 2014.

VATINNO, R. et al. Automated high-throughput method using solid-phase microextraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of ochratoxin A in human urine. **Journal of Chromatography A**, v. 1201, p. 215-221, 2008.

VIEIRA, C. M. S. et al. Exploiting green sorbents in rotating-disk sorptive extraction for the determination of parabens by high performance liquid chromatography tandem electrospray ionization triple quadrupole mass spectrometry. **Journal of Separation Science**, v. 41, p. 4047-4054, 2018;

VILA, M. et al. Simultaneous in-vial acetylation solid-phase microextraction followed by gas chromatography tandem mass spectrometry for the analysis of multiclass organic UV filters in water. **Journal of Hazardous Materials**, v. 323, p. 45-55, 2017.

VUCKOVIC, D.; RISTICEVIC, S.; PAWLISZYN, J. 13 - Solid-Phase Microextraction Protocols. In: (Ed.). **Handbook of Solid Phase Microextraction**. Oxford: Elsevier, p.455-478, 2012.

WANG, L. P.; XU, Y. M.; ZHAO, G. A. Rapid Analysis of Flavor Volatiles in Apple Wine Using Headspace Solid Phase Microextraction. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 110, p. 57-65, 2004.

WANG, J. et al. Natural cotton fibers as adsorbent for solid-phase extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples, **The analyst**, v. 139, p. 3593-3599, 2014.

WANG, T.; ANSAI, T.; LEE, S. W. Zeolite-loaded poly(dimethylsiloxane) hybrid films for highly efficient thin-film microextraction of organic volatiles in water. **Journal of Chromatography B**, v. 1041-1042, p. 133-140, 2017.

WEGENER, J. W. M.; VAN SCHAİK, M. J. M.; AIKING, H. Active biomonitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons by means of mosses. **Environmental Pollution**, v. 76, p. 15-18, 1992.

XI, Z.; CHEN, B. Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from aqueous solution by raw and modified plant residue materials as biosorbents. **Journal of Environmental Sciences**, v. 26, p. 737-748, 2014.

XU, X. et al. Associations of serum concentrations of organochlorine pesticides with breast cancer and prostate cancer in U.S. adults. **Environmental health perspectives**, v. 118, p. 60-66, 2010.

YAN, X. et al. Electrospun nanofiber cloud for ultrafast solid phase micro-extraction of trace organics in water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1574, p. 42-49, 2018.

YE, C.; WU, Y.; WANG, Z. Modification of cellulose paper with polydopamine as a thin film microextraction phase for detection of nitrophenols in oil samples. **RSC Advances**, v. 6, 2016.

YU, H.; MERIB, J.; ANDERSON, J. L. Crosslinked polymeric ionic liquids as solid-phase microextraction sorbent coatings for high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1438, p. 10-21, 2016.

ZACHARIS, C. K. et al. Solvent-based de-emulsification dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry for determination of trace organochlorine pesticides in environmental water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 5896-5900, 2010.

ZENG, J. et al. Application of ceramic/carbon composite as a novel coating for solid-phase microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1188, p. 26-33, 2008.

ZGOŁA-GRZEŚKOWIAK, A.; GRZEŚKOWIAK, T. Dispersive liquid-liquid microextraction. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, p. 1382-1399, 2011.

ZHANG, H.; LEE, H. K. Simultaneous determination of ultraviolet filters in aqueous samples by plunger-in-needle solid-phase microextraction with graphene-based sol-gel coating as sorbent coupled with gas chromatography-mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 742, p. 67-73, 2012.

ZHANG, S.; DU, Z.; LI, G. Metal-organic framework-199/graphite oxide hybrid composites coated solid-phase microextraction fibers coupled with gas chromatography for determination of organochlorine pesticides from complicated samples. **Talanta**, v. 115, p. 32-39, 2013.

ZHANG, Y. et al. Levels, sources and health risks of carbonyls and BTEX in the ambient air of Beijing, China. **Journal of Environmental Sciences**, v. 24, p. 124-130, 2012.

ZHAO, R.-S. et al. Bamboo charcoal as a novel solid-phase microextraction coating material for enrichment and determination of eleven phthalate esters in environmental water samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, p. 4993-4996, 2013.

ZHAO, R.-S. et al. Investigation of feasibility of bamboo charcoal as solid-phase extraction adsorbent for the enrichment and determination of four phthalate esters in environmental water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1183, p. 15-20, 2008.

ZSARNOVSZKY, A. et al. Thyroid hormone- and estrogen receptor interactions with natural ligands and endocrine disruptors in the cerebellum. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 48, p. 23-36, 2018.