



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

Daniela Lopes

**DETERMINAÇÃO DE CONTAMINANTES ORGÂNICOS EMERGENTES EM
AMOSTRAS DE ÁGUA POR MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA
ASSOCIADAS À NANOPARTÍCULAS FUNCIONALIZADAS COM HISTAMINA.**

Florianópolis, 2021.

Daniela Lopes

**DETERMINAÇÃO DE CONTAMINANTES ORGÂNICOS EMERGENTES EM
AMOSTRAS DE ÁGUA POR MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA
ASSOCIADAS À NANOPARTÍCULAS FUNCIONALIZADAS COM HISTAMINA.**

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

Florianópolis, 2021

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

Lopes, Daniela

Determinação de contaminantes orgânicos emergentes em amostras de água por microextração em fase sólida associadas à nanopartículas funcionalizadas com histamina / Daniela Lopes ; orientador, Eduardo Carasek da Rocha, 2022.
95 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Química. 2. Microextração em filme fino. 3. Microextração em barra adsorbtiva. 4. Nanopartículas funcionalizadas com histamina. 5. Desreguladores endócrinos . I. Rocha, Eduardo Carasek da. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

Daniela Lopes

Determinação de contaminantes orgânicos emergentes em amostras de água por microextração em fase sólida associadas à nanopartículas funcionalizadas com histamina.

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

Profa. Dra. Adriana Neves Dias
Instituto Federal Catarinense – Campus Brusque

Prof. Dr. Luciano Vitali
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dra. Vera Lúcia Azzolin Frescura Bascuñan
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que essa versão é **original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para a obtenção do título de Doutor em Programa de Pós-Graduação em Química.

Prof. Dr. Giovanni Finoto Caramori
Coordenador do programa de Pós-Graduação em Química

Prof. Dr. Eduardo Carasek da Rocha
Orientador

Dedico aos meus pais Diná e Laureci (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por permitir que eu chegasse até aqui. E também a todos os amigos que a fé me trouxe.

Aos meus amados pais, Laureci (*in memorian*) e Diná, por todo o apoio durante toda essa caminhada. E também a minha família.

A todos os amigos do grupo CROMAAS, que tornam os meus dias mais felizes e que levarei para a vida toda. A todos vocês, muito obrigada!

Ao professor Carasek pela orientação de longos anos e em especial neste trabalho, contribuindo muito para a minha formação acadêmica.

Ao grupo do laboratório de catálise e fenômenos interfaciais (LACFI) orientados pelo professor Dr. Bruno Silveira de Souza que realizaram a síntese das nanopartículas que foram utilizadas nesse trabalho.

Aos demais colegas e amigos que de uma maneira ou de outra contribuíram com este trabalho.

À Universidade Federal de Santa Catarina, pelo ensino de qualidade e por me permitir ingressar neste programa de pós-graduação.

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

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

E à banca, pelas contribuições nesta tese.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”. (Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

Neste estudo foi explorado o uso de nanopartículas magnéticas funcionalizadas com histamina (MNP-HIS) em técnicas de microextração. As nanopartículas apresentam uma elevada área superficial favorecendo o procedimento de extração além da possibilidade de reutilização e modificações em sua estrutura. A microextração em filme fino (TFME) e a microextração adsortiva em barra (BA μ E) são duas técnicas amplamente utilizadas e exibem diversas vantagens, tais como, facilidade no preparo, rapidez, sem necessidade de solventes adicionais e possibilidade de realizar extrações simultâneas. Em um primeiro trabalho, as MNP-HIS foram usadas como fase de extração associada à TFME e um sistema de placa de 96 poços de amostragem. Essa abordagem foi aplicada para determinação de estrona, estriol, 17- β -estradiol, 17- α -etinilestradiol, 4-octilfenol e 4-nonilfenol em amostras aquosas e separação/deteção por HPLC-FLD. As etapas de extração e dessorção líquidas foram otimizadas empregando procedimentos multivariados e univariados. As condições ótimas de extração foram 50 min de tempo de extração, sem adição de sal e amostra com pH 5. A dessorção líquida foi realizada por 30 min com 300 μ L de acetonitrila:metanol (50:50 v/v). Os limites de quantificação variaram entre 0,5 e 20 μ g L⁻¹. O método apresentou valores de recuperação entre 82 e 120%, e os desvios padrão relativos variaram de 0,1 a 13,6%. Em um segundo trabalho, as MNP-HIS foram utilizadas como fase extratora combinada com BA μ E para a determinação de metilparabeno (MP), etilparabeno (EP), propilparabeno (PP) e butilparabeno (BP) em amostras de água e separação/deteção por HPLC-DAD. As condições de extração e dessorção, incluindo tempo de dessorção e solvente, efeito da força iônica e tempo de extração, foram investigadas. As extrações foram realizadas por 90 min, 30% de NaCl e amostra com pH 5. A dessorção foi realizada com 250 μ L de acetonitrila:metanol (25:75 v/v) por 30 min. Os limites de deteção e quantificação foram de 1,5 μ g L⁻¹ e 5,0 μ g L⁻¹ para todos os analitos, respectivamente. A precisão intradia variou de 1% para EP, PP e BP a 3% para MP, EP, PP e BP. A precisão interdica variou de 3% para EP a 18% para BP. As recuperações relativas (R) variaram de 81% a 125%, e os desvios padrão relativos (RSD) variaram entre 1% e 16%. O emprego das MNP-HIS aliado às técnicas de microextração TFME e BA μ E apresentou diversas vantagens, tais como, fácil manuseio, possibilidade de realizar extrações simultâneas, reutilização da fase sorvente e consequentemente a diminuição do custo. Em ambos os métodos, obtiveram-se resultados satisfatórios de limites de deteção e quantificação, precisão e exatidão. Atrelado a isso, as técnicas foram ambientalmente amigáveis e demonstram serem promissoras para a utilização em diferentes tipos de aplicação.

Palavras-chave: HIS-MNP, TFME, BA μ E, desreguladores endócrinos, parabenos, água, HPLC.

ABSTRACT

In this work, the use of histamine-functionalized magnetic nanoparticles (HIS-MNP) in microextraction techniques was explored. Nanoparticles have a high surface area favoring the extraction procedure in addition to the possibility of reuse and changes in its structure. Thin film microextraction (TFME) and bar adsorptive microextraction (BA μ E) are two widely used techniques and show several advantages, such as, ease of preparation, rapidity, no need for additional solvents and the possibility of performing simultaneous extractions. In a first work, HIS-MNP are used as the extraction phase associated with TFME and a 96-well plate system. This approach was applied to the determination of estrone, estriol, 17- β -estradiol, 17 α -ethinylestradiol, 4-octylphenol and 4-nonylphenol in aqueous samples by HPLC-FLD. Extraction and liquid desorption steps were optimized employing multivariate and univariate procedures. The optimum extraction conditions were 50 min of extraction time, no salt addition and sample pH 5. Liquid desorption was carried out for 30 min with 300 μ L of acetonitrile:methanol (50:50 v/v). The quantification limits varied between 0.5 and 20 μ g L⁻¹. The method showed recovery values between 82% and 120%, and relative standard deviations varied from 0.1% to 13.6%. In a second study, HIS-MNP were used as sorbent phase combined with BA μ E for the determination of methylparaben (MP), ethylparaben (EP), propylparaben (PP), and butylparaben (BP) in water samples by HPLC-DAD. Extraction and desorption conditions, including desorption time and solvent, ionic strength effect and extraction time, were investigated. The extractions were performed for 90 min, 30% of NaCl and sample pH 5. Desorption was carried out using 250 μ L of acetonitrile:methanol (25:75 v/v) for 30 min. The limit of detection and quantification were of 1.5 μ g L⁻¹ and 5.0 μ g L⁻¹ for all analytes, respectively. The precision intra-day ranged from 1% for EP, PP and BP to 3% for MP, EP, PP and BP. The precision inter-day ranged from 3% for EP to 18% for BP. The relative recoveries (R) varied from 81% to 125%, and relative standard deviations (RSD) ranged between 1% and 16%. The use of MNP-HIS combined with TFME and BA μ E microextraction techniques presented several advantages, such as easy handling, possibility of performing simultaneous extractions, reuse of the sorbent phase and, consequently, cost reduction. In both methods, satisfactory results of limit of detection and quantification, precision and accuracy were obtained. Linked to this, the techniques showed to be environmentally friendly and proved to be promising for use in different types of applications.

Keywords: HIS-MNP, TFME, BA μ E, endocrine disruptors, parabens, water, HPLC.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - (A) Vista interna do amostrador de SPME com a fibra exposta; (B) vista com a fibra exposta e o êmbolo travado pelo pino no centro da fenda em “Z”.	24
Figura 2 - Uso do amostrador de SPME para o processo de extração e o de dessorção do material extraído para análise por CG.	24
Figura 3 - Representação esquemática dos modos de operação na SPME.	25
Figura 4 - (a) Dispositivo de 96 poços SPME recoberto com nanotubos de carbono de paredes múltiplas carboxilados/polidimetilsiloxano (MWCNTs-COOH/PDMS) (b) sistema manual 96-blade SPME (A) incluindo o dispositivo de 96-blade (B) placa de 96 poços (C) agitador orbital.	28
Figura 5 - Barra de SBSE comercialmente conhecida como <i>Twister</i>	29
Figura 6 - Exemplificação dos modos de extração em SBSE: (a) HS, (b) vortex, (c) amostra, (d) barra de agitação magnética de teflon e (e) <i>twister</i>	29
Figura 7 - Dispositivos para a determinação de analitos por técnicas de microextração adsortiva: (A) BA μ E; e, (B) MSA μ E. 1- frasco da amostra, 2- vortex, 3- amostra, 4- barra magnética, 5- μ -dispositivo de barra, 6 - μ -dispositivo de multiesferas.	30
Figura 8 - Representação esquemática: (a) imagem e (b) micrografia obtida por microscopia eletrônica por varredura do dispositivo analítico usado na técnica de BA μ E.	31
Figura 9 - Representação esquemática e imagens exemplificando o procedimento de extração por BA μ E. Legenda: (1) vortex, (2) amostra, (3) barra magnética de agitação e (4) dispositivo de BA μ E.	31
Figura 10 - Imagens mostrando a geometria dos dispositivos em barra, a) (1) BA μ E e (2) $\frac{1}{2}$ BA μ E e b) durante o processo de dessorção líquida.	32
Figura 11 – Comparação do tamanho dos nanomateriais com outros materiais comuns.	34
Figura 12 - Ilustração do comportamento dos materiais magnéticos.	35
Figura 13 – Ilustração de tipos de nanoestrutura. Núcleo (caroço) sem revestimento e núcleo com revestimento (casca).	37
Figura 14 - Nanopartículas funcionalizadas com histamina (MNP-HIS).	39
Figura 15 - Representação da preparação de nanopartículas magnéticas funcionalizadas com histamina.	45
Figura 16 - Preparo dos pentes para a TFME.	46
Figura 17 – Dispositivo de 96 poços (A), TFME com os pentes revestidos com HIS-MNP (B) e processo de extração com TFME (C).	47

Figura 18 - Fotos dos seis pontos de coleta das amostras de água.	49
Figura 19 - Microscopia eletrônica de transmissão de MNP-OA (A) e MNP-GMA (B, C)..	50
Figura 20 - Análise TGA da MNP-GMA.	51
Figura 21 - Espectro de infravermelho da NPM funcionalizada com histamina (MNP-HIS).	52
Figura 22 - Escolha do tempo de dessorção.	53
Figura 23 - Escolha do solvente de dessorção ($r^2 = 0,7937$).	54
Figura 24 - Superfície de resposta obtida tempo de extração versus % de sal ($r^2 = 0,9922$) na extração dos hormônios e alquilfenóis por TFME/MNP-HIS associado ao sistema 96- <i>well</i> <i>plate</i>	56
Figura 25 – Cromatograma obtido após a extração por MNP-HIS/TFME e determinação por HPLC-FLD para a amostra de água de rio no ponto 1 e a amostra fortificada com $10 \mu\text{g L}^{-1}$ dos analitos monitorados no comprimento de absorção 280 nm e comprimento de emissão 310 nm. Ordem de eluição: 1, estriol; 2, 17- β -estradiol; 3, 17- α -etinilestradiol; 4, estrona; 5, 4-octilfenol e 6, 4-nonilfenol.	59
Figura 26 - Preparo das barras adsorptivas com recobrimento de MNP-HIS.	65
Figura 27 – Esquema do procedimento de extração MNP-HIS/BA μ E.	67
Figura 28 – Córrego universitário (CU/UFSC) (A), lago (HU/UFSC) (B), e mangue do Itacorubi (C).....	69
Figura 29 - Escolha do tempo de dessorção.	70
Figura 30 - Escolha do solvente de dessorção ($r^2 = 0,9799$).	71
Figura 31 - Superfície de resposta obtida tempo de extração versus % de sal ($r^2 = 0,9464$) na extração dos parabenos por BA μ E /MNP-HIS.	72
Figura 32 – Cromatograma obtido após a extração por MNP-HIS/BA μ E e determinação por HPLC-DAD para a amostra de água do córrego universitário (CU/UFSC) e amostra fortificada com $50 \mu\text{g L}^{-1}$ dos parabenos monitorados em 254 nm. Ordem de eluição: 1, metilparabeno; 2, etilparabeno; 3, propilparabeno e 4, butilparabeno.....	74
Figura 33 - Gráfico de barras da estabilidade de HIS-MNP/BA μ E para os 4 analitos.	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Diferentes tipos de nanopartículas utilizadas no preparo de amostras.....	38
Tabela 2 - Estrutura e algumas propriedades físico-químicas dos analitos.	43
Tabela 3 - Experimentos do simplex centroide para escolha do(s) solvente(s) na etapa de dessorção líquida.....	48
Tabela 4 - Experimentos do planejamento Doehlert para escolha do tempo de extração e porcentagem de sal.....	48
Tabela 5 - Faixa linear de trabalho, coeficientes de determinação, limites de detecção e limites de quantificação obtidos para o método proposto para determinação de estriol, 17- β -estradiol, 17- α -etinilestradiol, estrona, 4-octilfenol e 4-nonilfenol em amostras de água usando TFME/MNP-HIS.	57
Tabela 6 - Recuperação (R%) e precisão (RSD%) usando o método proposto (n = 3).....	58
Tabela 7 - Comparação do método proposto com estudos previamente relatados na literatura.	61
Tabela 8 - Estrutura e algumas propriedades físico-químicas dos analitos.	63
Tabela 9 - Experimentos do <i>simplex lattice</i> para escolha do(s) solvente(s) na etapa de dessorção líquida.....	67
Tabela 10 - Experimentos do planejamento <i>Doehlert</i> para escolha do tempo de extração e porcentagem de sal.....	68
Tabela 11 – Faixa linear, limites de detecção (LOD), limites de quantificação (LOQ), coeficientes de determinação e precisão intradia e interdia obtidos para o método proposto para extração de parabenos em amostras de água usando HIS-MNP/BA μ E.	73
Tabela 12 – Recuperação (R%) e precisão (RSD%) usando o método proposto (n = 3).	75
Tabela 13 – Comparação do método proposto com estudos previamente relatados na literatura.	76
Tabela 14 – Reprodutibilidade da produção das barras com HIS-MNP.....	77

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

4-NP - 4-Nonilfenol

4-OP - 4-Octilfenol

17- α -EE - 17- α -Ethinilestradiol

17- β -EST - 17- β -Estriol

AA - Média anual, *do inglês Annual Average*

AALLME - Microextração Líquido-Líquido Assistida por Ar, *do inglês Air-Assisted Liquid-Liquid Microextraction*

ACN - Acetonitrila

A μ E - Microextração adsortiva, *do inglês Adsorptive Microextraction*

BA μ E - Microextração adsortiva em barra, *do inglês Bar Adsorptive Microextraction*

BP - Butilparabeno

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

DF- μ LPME - Microextração em fase líquida baseada em microfluídico de fluxo duplo, *do inglês Double-Flow Microfluidic-Based Liquid-Phase Microextraction*

DI - Imersão direta, *do inglês Direct Immersion*

DLLME - Microextração líquido-líquido dispersiva, *do inglês Dispersive Liquid-liquid Microextraction*

D μ SPE - Micro extração em fase sólida dispersiva, *do inglês Dispersive Micro Solid-Phase Extraction*

ECD - Detector de captura de elétrons, *do inglês Electron Capture Detection*

EDC - Compostos desreguladores endócrinos, *do inglês Endocrine Disrupting Chemicals*

EP – Etilparabeno

FLD – Detector de fluorescência, *do inglês Fluorescence Detector*

FT-IR - Espectroscopia no infravermelho por transformada de fourier, *do inglês Fourier Transform Infrared Spectroscopy*

GC - Cromatografia gasosa, *do inglês Gas Chromatography*

GMA - Glidicilmetacrilato

HF-LPME - Microextração em fase líquida com membrana oca, *do inglês Hollow Fiber – Liquid Phase Microextraction*

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

HS - *do inglês Headspace*

LLE - Extração líquido-líquido, *do inglês Liquid-Liquid Extraction*

LPME - Microextração em fase líquida, *do inglês Liquid Phase Microextraction*

LOD - Limite de detecção, *do inglês Limit of detection*

LOQ - Limite de quantificação, *do inglês Limit of quantification*

LVSS – Stacking com injeção de grande volume, *do inglês large volume sample stacking*

MAC - Concentrações máximas permitidas, *do inglês Maximum Allowable Concentrations*

MeOH - Metanol

MEPS – Microextração em sorvente empacotado, *do inglês Micro Extraction by Packed Sorbent*

MNP – Nanopartículas Magnéticas, *do inglês Magnetic Nanoparticles*

MNP-GMA - Nanopartículas magnéticas funcionalizadas com glidicilmetacrilato, *do inglês Magnetic Nanoparticles - Glydicilmetacrilate*

MNP-HIS – Nanopartículas magnéticas funcionalizadas com histamina, *do inglês Magnetic Nanoparticles-Histamine*

MNP-AO - Nanopartículas magnéticas estabilizadas com ácido oleico, *do inglês Magnetic Nanoparticles-Oleic Acid*

MP - Metilparabeno

MSA μ E - Microextração adsortiva em multiesferas, *do inglês Multi-spheres Adsorptive Microextraction*

MS - Espectrômetro de massas, *do inglês Mass Spectrometer*

MSPE – Extração em fase sólida magnética, *do inglês Magnetic Solid Phase Extraction*

NPs - Nanopartículas

Pa-SDME – Microextração em gota única paralela, *do inglês parallel single drop microextraction*

PDMS - Polidimetilsiloxano

PP - Propilparabeno

R (%) - Ensaio de recuperação

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*

Soxhlet - Extração sólido-líquido, *do inglês Solid-Liquid Extraction*

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

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

TEM - Microscopia eletrônica de transmissão, *do inglês Transmission Electron Microscopy*

TFME – Microextração em filme fino, *do inglês thin-film Microextraction*

TGA – Análise termogravimétrica, *do inglês Thermogravimetric Analysis*

UV – Ultravioleta, *do inglês ultravioleta*

SUMÁRIO

Capítulo I. Introdução	18
Capítulo II. Revisão da Literatura.....	20
1.1. Preparo de amostras em química analítica	20
1.2. Técnicas clássicas de preparo de amostras.....	21
1.3. Técnicas de microextração	22
1.3.1. Microextração em fase sólida (SPME)	23
1.3.2. Microextração em filme fino (TFME)	26
1.3.3. Extração sortiva em barra de agitação (SBSE).....	28
1.3.4. Microextração em barra adsortiva (BA μ E).....	31
1.4. Fases extratoras alternativas empregadas em microextração	33
1.4.1. Nanopartículas magnéticas (MNPs)	34
Capítulo III. Objetivos	40
3.1. Objetivo Geral	40
3.2. Objetivos Específicos.....	40
CAPÍTULO IV.....	41
NANOPARTÍCULAS FUNCIONALIZADAS COM HISTAMINA (MNP-HIS) COMO NOVO SORVENTE PARA MICROEXTRAÇÃO EM FILME FINO DE COMPOSTOS DESREGULADORES ENDÓCRINOS EM AMOSTRAS AQUOSAS E DETERMINAÇÃO POR HPLC-FLD.....	41
4.1. Introdução.....	41
4.2. Materiais e métodos	44
4.2.1. Materiais e reagentes	44
4.2.2. Instrumentação e condições cromatográficas	44
4.3. Preparação das nanopartículas magnéticas (MNPs).....	44
4.4. Fabricação dos filmes finos compostos pelas MNP-HIS	46
4.5. Etapas de otimização.....	46

4.6. Figuras analíticas de mérito.....	48
4.7. Resultados e discussões.....	50
4.7.1. Caracterização da fase extratora MNP-HIS.....	50
4.7.2. Otimização das etapas de dessorção.....	52
4.7.2.1. Tipo de solvente e tempo de dessorção.....	52
4.7.3. Otimização das condições de extrações.....	54
4.7.3.1. Otimização do tempo de extração e força iônica.....	54
4.7.4. Parâmetros analíticos de mérito e análise das amostras.....	56
4.8. Conclusões parciais.....	62
CAPÍTULO V.....	62
NANOPARTÍCULAS FUNCIONALIZADAS COM HISTAMINA (MNP-HIS) COMO NOVO SORVENTE PARA MICROEXTRAÇÃO EM BARRA ADSORTIVA DE PARABENOS EM AMOSTRAS AQUOSAS E DETERMINAÇÃO POR HPLC-DAD.....	62
5.1. Introdução.....	62
5.2. Materiais e métodos.....	64
5.2.1. Materiais e reagentes.....	64
5.2.2. Instrumentação e condições cromatográficas.....	64
5.3. Preparação das nanopartículas magnéticas (MNPs).....	65
5.4. Fabricação das barras adsortivas compostas pelas MNP-HIS.....	65
5.5. Etapas de otimização.....	66
5.6. Figuras analíticas de mérito.....	68
5.7. Resultados e discussões.....	69
5.7.1. Caracterização da fase extratora MNP-HIS.....	69
5.7.2. Reprodutibilidade e estabilidade das HIS-MNP como uma fase de extração para BAμE.....	76
5.7.3. Otimização das etapas de dessorção.....	69
5.7.3.1. Tipo de solvente e tempo de dessorção.....	69
5.7.4. Otimização das condições de extrações.....	71

5.7.4.1. Otimização do tempo de extração e força iônica	71
5.7.5. Parâmetros analíticos de mérito e análise das amostras	73
5.8. Conclusões parciais	78
CAPÍTULO VI – CONCLUSÃO FINAL E PERSPECTIVAS	79
REFERÊNCIAS.....	81

Capítulo I. Introdução

Uma das etapas mais importantes do procedimento analítico é o preparo da amostra. Esta etapa requer muita atenção, pois diversos erros podem acontecer influenciando no resultado final. Assim, um preparo de amostra adequado é imprescindível para se alcançar resultados confiáveis. Através do preparo da amostra é possível reduzir os interferentes da matriz, pré-concentrar os compostos e adequar os analitos aos instrumentos analíticos. As técnicas tradicionais de preparo de amostras, tais como a extração líquido-líquido, extração em fase sólida e *soxhlet*, ainda são amplamente utilizadas, porém requerem uma grande quantidade de solvente ou sorvente sendo esses muitas vezes tóxicos, além de serem laboriosas e deixar o laboratorista mais exposto, não sendo ambientalmente amigáveis.

Assim, buscam-se novos métodos que supram as deficiências das técnicas convencionais. Dessa forma, surgiram as técnicas de microextração, que estão fundamentadas na simplificação e miniaturização das técnicas analíticas. Dentre as vantagens das técnicas de microextração podem-se destacar a pré-concentração dos compostos que se encontra em nível traço e a limpeza das amostras, redução da quantidade de solvente e quantidade de fase extratora, tornando o método mais simples e rápido.

Cada vez mais se procuram técnicas que sejam mais sensíveis, exatas e precisas para uma determinação eficiente de compostos orgânicos em diversos tipos de amostra (ambientais, sangue, urina, saliva, alimentos, etc.). Dessa forma, nota-se uma constante necessidade de melhoria e aperfeiçoamento dos métodos para atender as crescentes exigências de análise. Dentro disso, o desenvolvimento e a busca por sorventes alternativos tem recebido grande atenção. As principais vantagens do emprego dessas fases extratoras são o aumento da durabilidade dos dispositivos, uma vez que se pode adotar sorventes com elevadas estabilidade mecânica, térmica e química. Também é possível selecionar a melhor fase extratora para um determinado analito e/ou grupo de compostos específicos, incrementando a seletividade e sensibilidade da técnica. Além disso, ainda pode-se utilizar biossorventes contribuindo assim com métodos analíticos ambientalmente amigáveis.

Com o uso dos sorventes alternativos tem-se a finalidade de aperfeiçoar e melhorar algumas limitações dos sorventes convencionais. Dentre esses, pode-se destacar as nanopartículas magnéticas (MNP) como fase extratora, sendo que as mesmas possuem uma boa eficiência e são de fácil preparação além de apresentar baixa toxicidade. As nanopartículas apresentam uma elevada área superficial e a sua superfície pode ser modificada para obter uma maior seletividade. As MNP também podem ser utilizadas na

forma dispersa ou ser aderida a uma superfície. A combinação das MNP com técnicas de microextração apresenta muitos benefícios, pois alia as vantagens de ambos, como o melhoramento da seletividade do método, bem como a facilidade e rapidez para sua aplicação.

Uma das técnicas que vem exibindo grande notoriedade é a microextração em filme fino (TFME) associada ao sistema de 96 poços de amostragem que apresenta diversas vantagens como, a redução do tempo de extração, pois possibilita a realização de até 96 extrações simultâneas além de aumentar a relação área-volume quando comparada a microextração em fase sólida (SPME). Outra técnica que vem sendo amplamente utilizada é a microextração adsortiva em barra (BA μ E), em que, diferentes tipos de sorventes podem ser empregados fazendo com que a mesma tenha uma vasta aplicação. Juntamente a isso, tem-se que o dispositivo usado nessa abordagem é de baixo custo e mostra uma boa durabilidade.

Dessa maneira, este trabalho tem como objetivo empregar nanopartículas funcionalizadas com histamina (HIS-MNP) em técnicas de microextração para extração de compostos orgânicos em amostras de água. No primeiro estudo foram empregados pela primeira vez HIS-MNP juntamente com a técnica de TFME para determinação de desreguladores endócrinos em água. No segundo estudo, as HIS-MNP foram usadas também pela primeira vez com a BA μ E para determinação de parabenos em matrizes aquosas. Além disso, busca-se explorar a utilização das nanopartículas aderidas a um suporte.

Capítulo II. Revisão da Literatura

1.1. Preparo de amostras em química analítica

O objetivo de um estudo analítico é adquirir informações sobre um objeto ou substância. Essa substância pode ser, por exemplo, um gás, um sólido, um material biológico ou um líquido. As informações a serem obtidas podem ser as mais diversas, desde a composição até a sequência de proteínas no material genético. Embora, exista um grande número de técnicas analíticas sofisticadas, não é possível obter todas as informações de uma quantidade muito pequena de amostra. Em sua maioria, o atual estado da instrumentação não evoluiu ao ponto em que uma amostra bruta possa ser levada ao instrumento e obtida todas as informações necessárias. Grande parte das análises ainda são realizadas utilizando uma porção da amostra e analisando em laboratório (ou no local). Algumas etapas geralmente fazem parte desse processo, são elas: amostragem, preservação da amostra, preparo da amostra e análise (WINEFORDNER, 2003).

Na maior parte das vezes, a amostra não está pronta para a sua introdução direta no equipamento. A determinação de agrotóxicos em fígado de peixe, por exemplo, não pode ser realizada diretamente. É necessário extrair os agrotóxicos em uma solução que poderá ser levada a análise instrumental, sendo, portanto indispensável o procedimento do preparo da amostra. A etapa de preparo da amostra pode compreender vários processos como: homogeneização, extração, concentração e limpeza. Contudo, o emprego desses processos vai depender do nível de concentração a ser analisado, da amostra e da matriz. Para a análise em concentrações traço, por exemplo, um preparo de amostra mais rigoroso é exigido quando comparado a uma análise de componentes majoritários (WINEFORDNER, 2003).

Em resumo, a etapa de preparo de amostra comumente se faz necessária na determinação de compostos em concentração traço, atuando na pré-concentração dos mesmos e/ou separando os analitos da matriz. Além de adequar as amostras ao instrumento analítico, quando estas não podem ser inseridas diretamente no equipamento, ainda pode-se modificar o composto para aumentar a sensibilidade do método como, por exemplo, através de uma derivatização. A etapa de preparo de amostra é tida como o “Calcanhar de Aquiles ou gargalo”, pois requer mais tempo, trabalho e podem ocorrer contaminação e perda de analito (CARASEK; MERIB, 2015; BERTON, *et al.*, 2016; XU, *et al.*, 2016).

Muitos avanços nas técnicas de preparo de amostras vêm sendo realizados no intuito de desenvolver métodos que sejam mais sensíveis, precisos e exatos. Como também, a aplicação em amostras complexas, tais como, alimentos, amostras biológicas (sangue, urina, etc.), solo, entre outras. As técnicas de preparo de amostras podem ser divididas em clássicas

e modernas (microextração). Atualmente, as pesquisas estão mais voltadas para as técnicas de microextração visto as suas vantagens quando comparada às técnicas tradicionais.

1.2. Técnicas clássicas de preparo de amostras

Entre as técnicas convencionais mais empregadas, pode-se destacar a LLE (extração líquido-líquido, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*) e a SPE (extração em fase sólida, do inglês *Solid Phase Extraction*). Apesar de serem muito utilizadas, elas são laboriosas e necessitam de uma grande quantidade de tempo, empregam um elevado volume de solventes, frequentemente envolvem mais de uma etapa deixando o analista mais exposto e geralmente utilizam solventes tóxicos (CARASEK; MERIB, 2015; BERTON, *et al.*, 2016; XU, *et al.*, 2016).

Na extração líquido-líquido (LLE), têm-se duas fases (A e B) líquidas e imiscíveis entre si. Geralmente, trata-se de um solvente orgânico e uma fase aquosa. O analito é particionado entre as fases e quanto maior a afinidade do mesmo pelo solvente de extração mais elevada será a eficiência do procedimento. Assim, a seletividade da LLE pode ser ajustada utilizando aditivos ou diferentes solventes de extração. É uma técnica versátil, uma vez que é possível ser empregada para a extração de compostos voláteis ou não voláteis, iônicos ou não iônicos e polares ou apolares. Embora possua uma grande aplicabilidade e simplicidade, a LLE apresenta muitas desvantagens. Os analistas ficam muito expostos a uma alta quantidade de solventes orgânicos que em sua maioria são tóxicos, formação de emulsões, difícil automatização (foram realizadas tentativas nesse sentido, porém tornam-se caros e de limitada flexibilidade), dentre outros (WINEFORDNER, 2003; YANG, 2018; BORGES, *et al.*, 2015; QUEIROZ, 2001).

A extração em fase sólida (SPE) é uma das técnicas mais difundidas e utilizadas para o preparo de diversos tipos de amostra. É considerada uma técnica tradicional e foi introduzida pela primeira vez em 1970. A SPE é uma técnica de não-equilíbrio em que ocorre a extração exaustiva dos constituintes químicos de uma amostra líquida através de uma fase sólida e posterior recuperação dos constituintes selecionados por eluição do solvente. A remoção de interferentes da matriz, o isolamento e concentração dos analitos são as principais finalidades da SPE. Os solventes usados em SPE são semelhantes aos empregados em cromatografia líquida em coluna e, portanto, os mecanismos envolvidos também são análogos. Troca iônica, adsorção, exclusão e partição (fase normal e reversa) são os principais tipos de mecanismos. As principais forças físicas e químicas que atuam entre as

moléculas do sorvente e do analito são as interações de dipolo-dipolo, dipolo-dipolo induzido, dipolo induzido-dipolo induzido, interações iônicas e ligações de hidrogênio (WINEFORDNER, 2003; BORGES, *et al.*, 2015; JARDIM, 2010; AZZOUZ, *et al.*, 2018).

Na SPE a configuração em cartucho é a mais comumente utilizada. Um cartucho contém cerca de 50 a 500 mg de sorvente, com 40 a 60 μm de tamanho de partícula, fixado no tubo por meio de dois filtros de tamanho de poros de 20 μm . Normalmente os procedimentos de extração envolvem as etapas de condicionamento do sorvente, introdução da amostra, limpeza da coluna e eluição do analito, sendo que os principais objetivos da SPE são o isolamento da matriz, estocagem da amostra, extração e/ou concentração do analito (WINEFORDNER, 2003; BORGES, *et al.*, 2015; JARDIM, 2010).

A SPE possui alguns benefícios frente a técnicas como LLE, tais como, a redução da mão de obra, menor consumo e descarte de solventes orgânicos que acarreta em uma menor exposição do laboratorista, baixo potencial para formação de emulsões, facilidade de automação e elevadas porcentagens de recuperação do analito. Porém, a extração em fase sólida apresenta algumas desvantagens como o alto tempo de análise, elevado custo dos cartuchos os quais são usados apenas uma única vez (BORGES, *et al.*, 2015; JARDIM, 2010).

Em resumo, apesar das técnicas citadas serem muito utilizadas, as mesmas necessitam de uma grande quantidade de tempo, empregam um elevado volume de solventes, frequentemente envolvem mais de uma etapa e geralmente usam solventes tóxicos. Com o intuito de minimizar essas limitações e tornar os métodos ambientalmente mais amigáveis, surgiram às técnicas de microextração, em que a quantidade de solvente usada é muito pequena (ou nenhuma), adotam solventes menos tóxicos, são menos laboriosas e reduzem o número de procedimentos necessários, sendo, portanto, consideradas mais “verdes” (CARASEK; MERIB, 2015; BERTON, *et al.*, 2016; XU, *et al.*, 2016).

1.3. Técnicas de microextração

As técnicas de microextração vêm sendo amplamente pesquisadas e utilizadas para a análise de diversos compostos. Dentre essas, pode-se destacar a LPME (microextração em fase líquida, do inglês *Liquid-Phase Microextraction*), a SDME (microextração em gota única, do inglês *Single-Drop Microextraction*), a DLLME (microextração líquido-líquido dispersiva, do inglês *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*), a SPME (microextração em fase sólida, do inglês *Solid-Phase Microextraction*), a TFME (microextração em filme fino,

do inglês *Thin-Film Microextraction*), a SBSE (extração sortiva em barra de agitação, do inglês *Stir-Bar Sorptive Extraction*) e a BA μ E (microextração em barra adsorptiva, do inglês *Bar Adsorptive Microextraction*). Neste estudo serão empregadas a TFME e a BA μ E.

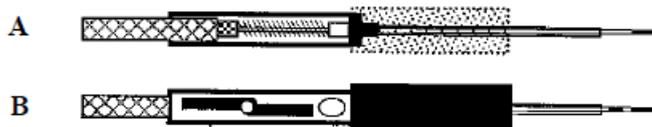
1.3.1. Microextração em fase sólida (SPME)

Pawliszyn e colaboradores introduziram na década de 1990 a microextração em fase sólida (SPME), como uma técnica alternativa livre de solventes e com o intuito de superar algumas desvantagens das técnicas convencionais. Na SPME o analito é pré-concentrado e isolado no recobrimento polimérico (fase extratora), além disso, podem-se realizar essas etapas juntamente com a amostragem ocorrendo tudo em uma etapa (PIRI-MOGHADAM, *et al.*, 2017; SILVA, *et al.*, 2013). A SPME é amplamente utilizada devido as suas inúmeras vantagens, tais como, sua natureza livre de solventes, possibilidade de automação, operação simples, tempo de extração relativamente pequeno, ou seja, é uma técnica eficaz, rápida, prática e simples. Além disso, existe a possibilidade de acoplamento com equipamentos cromatográficos (como GC e HPLC), diminuindo a perda de analitos e a contaminação da amostra. A técnica pode ser usada para diversos tipos de amostra: gasosas, aquosas e sólidas, produzindo resultados qualitativos e quantitativos satisfatórios (SILVA, *et al.*, 2013; LI, *et al.*, 2015).

A SPME baseia-se no equilíbrio de distribuição/partição dos analitos entre a matriz e a fase extratora. Na SPME, as amostras são analisadas após atingirem o equilíbrio ou em determinado tempo antes de atingir o mesmo. Assim, a SPME é uma técnica de microextração não exaustiva de equilíbrio ou pré-equilíbrio. Desta forma, se difere da SPE que é um procedimento exaustivo (WINEFORDNER, 2003, OUYANG; PAWLISZYN, 2008).

A SPME constitui-se de um bastão de fibra ótica, de sílica fundida de 100 mm de comprimento, com 10 mm de uma extremidade recoberto com um filme fino de um sólido adsorvente (Ex.: carvão ativo microparticulado - Carboxen) ou de um polímero (Ex.: polidimetilsiloxano - PDMS). Os volumes dos recobrimentos de fibras comerciais variam de 0,03 μ L a 0,7 μ L e suas espessuras de 7 μ m a 100 μ m. A fibra por sua vez, é fixada ao êmbolo do amostrador (uma espécie de seringa), o que facilita o manuseio das mesmas (Figura 1) (VALENTE; AUGUSTO, 2000).

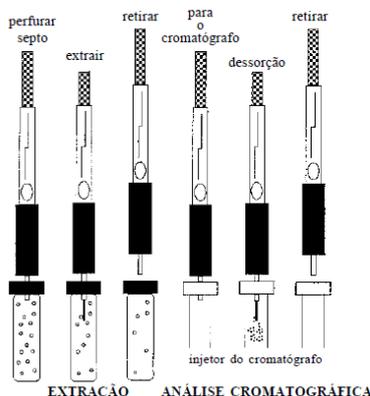
Figura 1 - (A) Vista interna do amostrador de SPME com a fibra exposta; (B) vista com a fibra exposta e o êmbolo travado pelo pino no centro da fenda em “Z”.



Fonte: Adaptado de Valente e Augusto (2000)

Na Figura 2 são exibidas as etapas seguintes para a realização da extração e da dessorção no injetor do cromatógrafo.

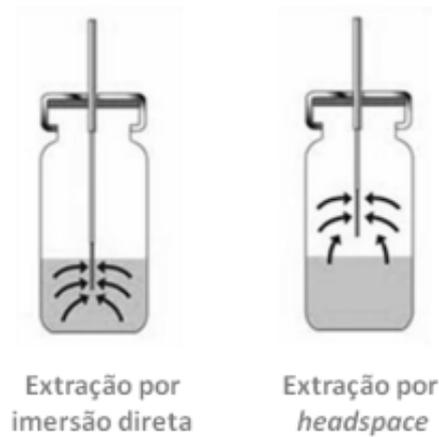
Figura 2 - Uso do amostrador de SPME para o processo de extração e o de dessorção do material extraído para análise por CG.



Fonte: Adaptado de Valente e Augusto (2000)

A extração dar-se-á ao imergir a seção recoberta da fibra no “*headspace*” ou na amostra (Figura 3). Esses dois diferentes modos são chamados de HS (do inglês *Headspace*) e DI (Imersão direta, do inglês *Direct Immersion*). Na DI-SPME, a fibra é imersa diretamente na amostra e os analitos são transferidos da matriz para a fase extratora. Na HS-SPME, os analitos são transferidos da amostra para a fase gasosa, que está em contato direto com a amostra. Assim, no modo de extração HS o revestimento da fibra não é danificado por contaminações não gasosa dos solventes e da amostra fazendo com que as fibras tenham uma maior durabilidade. A escolha do modo de extração é determinada levando-se em consideração a complexidade da amostra e/ou volatilidade do analito. A extração por HS é utilizada quando os analitos possuem elevada volatilidade e/ou a amostra é danosa à fibra de SPME. O modo DI é selecionado quando amostra não é danosa à fibra de SPME e os analitos possuem uma baixa volatilidade (PAWLISZYN, 2009; PŁOTKA-WASYLKA, *et al.*, 2015).

Figura 3 - Representação esquemática dos modos de operação na SPME.



Fonte: Adaptado de Alves (2014)

A transferência dos analitos diretamente da amostra para a fase extratora ocorre mais lentamente quando comparada ao transporte dos analitos da amostra para o revestimento da fibra no *headspace*. O equilíbrio termodinâmico demanda mais tempo, isso devido aos fatores de difusão na fase líquida serem muito menores que na fase gasosa (PAWLISZYN, 2009; PŁOTKA-WASYLKA, *et al.*, 2015). A constante de distribuição (K_{fs}) do analito entre o recobrimento da fibra e a matriz da amostra é dada pela Equação (1) (WINEFORDNER, 2003).

$$K_D = \frac{[X]_B}{[X]_A} = K_{fs} = \frac{C_f}{C_s} \quad \text{Equação (1)}$$

Em que, C_f é a concentração de analito no recobrimento da fibra e C_s é a concentração de analito na amostra. Se o valor de K_{fs} for alto, o grau de concentração dos analitos na fase extratora é maior, e o procedimento analítico torna-se mais sensível. Ao atingir as condições de equilíbrio, o número de mol (n) do analito extraído pelo recobrimento da fibra será independente dos aumentos no tempo de extração, de acordo com a Equação (2) (WINEFORDNER, 2003).

$$n = \frac{K_{fs}V_fV_sC_0}{K_{fs}V_f + V_s} \quad \text{Equação (2)}$$

Em que, V_f é o volume do recobrimento da fibra, V_s o volume da amostra e C_0 a concentração inicial de um determinado analito na amostra. Os valores de K_{fs} são influenciados pelo sal, pH, solventes orgânicos e temperatura. Analisando a equação acima se

pode concluir que quando o volume da amostra é muito grande (isto é, $K_{fs}V_f \ll V_s$), a quantidade de analito extraído é independente do volume da amostra, de modo a obter a Equação (3) (WINEFORDNER, 2003).

$$n = K_{fs}V_fC_0 \quad \text{Equação (3)}$$

Se a quantidade de analito extraído for independente do volume da amostra, a concentração extraída corresponderá diretamente à concentração da matriz. No entanto, não é necessário esperar até que o equilíbrio seja atingido. Tendo-se um controle cuidadoso da temperatura e do tempo de extração podem ser obtidos resultados quantitativos satisfatórios. Considerando questões cinéticas da relação entre concentração de analito e tempo tem-se que o tempo de extração independe da concentração de analito na amostra; o número relativo de moléculas extraídas em um dado momento não depende da concentração do analito e o número absoluto de moléculas extraídas em um determinado momento é linearmente proporcional à concentração do analito (WINEFORDNER, 2003).

Apesar de a SPME apresentar uma boa eficiência têm-se buscado melhorias nesse sentido. Para tal, vem sendo estudado diferentes abordagens como aumento no volume do revestimento ou área superficial. Dentre as técnicas que visam essa questão, pode-se destacar a TFME e SBSE (PIRI-MOGHADAM, *et al.*, 2017).

1.3.2. Microextração em filme fino (TFME)

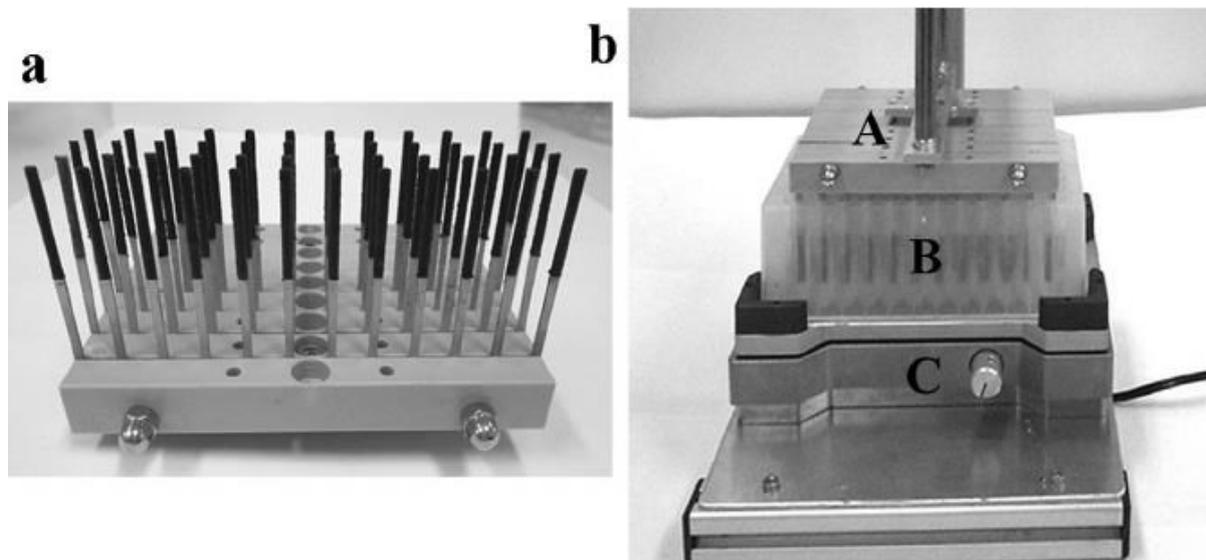
A microextração em filme fino é uma das geometrias para a SPME e tem atraído muita atenção. A TFME pode elevar a recuperação e sensibilidade da extração e diminuir o tempo de extração quando comparada a outras técnicas de microextração. Além disso, devido a sua grande relação área-volume a transferência de massa e a taxa de extração são melhoradas (CAI, *et al.*, 2015).

Na SPME, o volume de fase extratora é limitado pelo tamanho da agulha. Um revestimento mais grosso requer uma agulha de maior diâmetro e de acordo com a teoria cinética de uma extração aumentar a espessura do revestimento acarreta em um elevado tempo de equilíbrio. Na TFME, um filme fino com uma elevada razão área superficial-

volume é empregado como fase extratora, e com esta configuração, o volume da fase de extração aumenta enquanto a espessura do recobrimento é mantida constante ou mesmo menos espessa. Assim, diminuindo o tempo de equilíbrio quando a espessura da fase extratora for reduzida (JIANG; PAWLISZYN, 2012).

A TFME pode ser utilizada de diversos formatos de amostragem. O modo mais simples constitui em colocar o filme fino em contato direto com a amostra ou revestir com um filme fino a superfície de um frasco que contém a amostra. Recentemente, a SPME tem sido associada a uma placa de 96 poços com o intuito de alcançar um satisfatório preparo de amostra automatizado. Esse dispositivo é chamado de sistema de 96 poços (*96-well plate*) e possibilita a análise de até 96 amostras simultaneamente (Figura 4). Além de tornar a análise mais rápida e, portanto, favorecer a frequência analítica do método, o *96-well plate* exibe uma boa precisão e diminui os custos. Esse sistema é composto por uma escova que comporta 8 pentes de 12 pinos e possui agitador, realizando a agitação da amostra. Na TFME, o sorvente é aderido nas lâminas em forma de pente. Desta forma, tem-se um filme fino com elevada área superficial, sendo nomeado como extração com filme fino (JIANG; PAWLISZYN, 2012; BOYACI, *et al.*, 2014; MIRNAGHI, *et al.*, 2013; MIRNAGHI; PAWLISZYN, 2012).

Figura 4 - (a) Dispositivo de 96 poços SPME recoberto com nanotubos de carbono de paredes múltiplas carboxilados/polidimetilsiloxano (MWCNTs-COOH/PDMS) (b) sistema manual 96-blade SPME (A) incluindo o dispositivo de 96-blade (B) placa de 96 poços (C) agitador orbital.



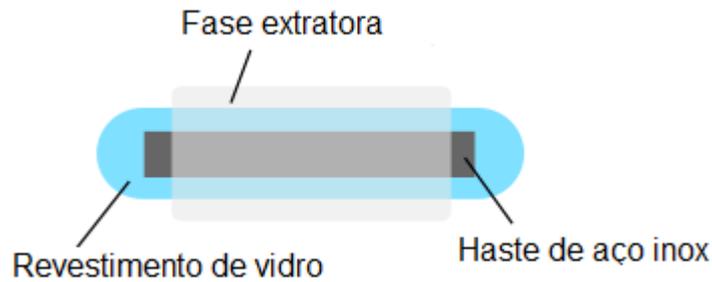
Fonte: Adaptado de Kueseng; Pawliszyn (2013)

A TFME tem sido relatada para a análise de diversos compostos em diferentes amostras, tais como, contaminantes emergentes em água (MORÉS, *et al.*, 2018), filtros UV e biocidas em sedimentos (AHMADI, *et al.*, 2017) e aminoácidos em polpa de uva (MOUSAVI; PAWLISZYN, 2013).

1.3.3. Extração sortiva em barra de agitação (SBSE)

A SBSE foi desenvolvida em 1999 e é uma abordagem similar à SPME. Esta técnica foi introduzida com objetivo de enriquecer compostos orgânicos em nível traço a partir de amostras aquosas biológicas, ambientais e alimentícias. Na SBSE, a barra de agitação é recoberta com uma fase extratora, assim integrando em um mesmo dispositivo o elemento de agitação e a fase sorvente (Figura 5). Essa barra é imersa na amostra para que ocorra a extração do analito na solução. Quando comparada a SPME, a SBSE exhibe uma maior capacidade quantitativa de extração (WINEFORDNER, 2003; BALTUSSEN, *et al.*, 1999; NAKAMURA; DAISHIMA, 2004; HUANG, *et al.*, 2018).

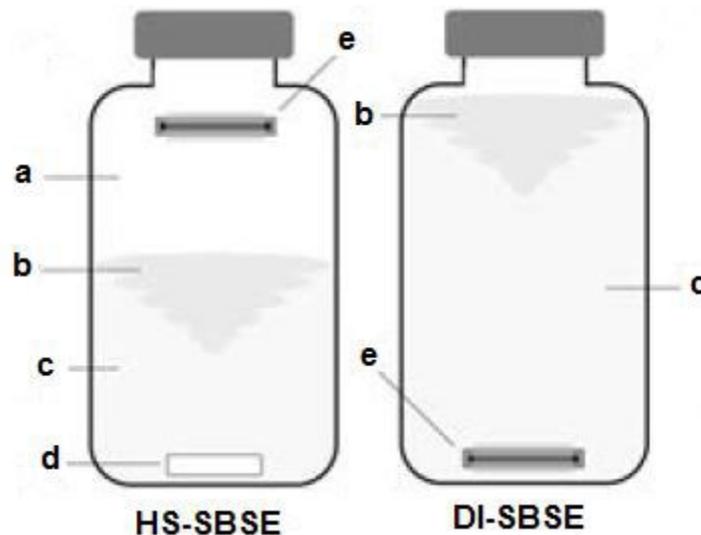
Figura 5 - Barra de SBSE comercialmente conhecida como *Twister*.



Fonte: Adaptado de Nogueira (2012)

Na extração, a amostra é agitada com a barra revestida durante um determinado tempo. A SBSE, assim como a SPME, pode ser utilizada no modo DI e HS (Figura 6).

Figura 6 - Exemplificação dos modos de extração em SBSE: (a) HS, (b) vortex, (c) amostra, (d) barra de agitação magnética de teflon e (e) *twister*.



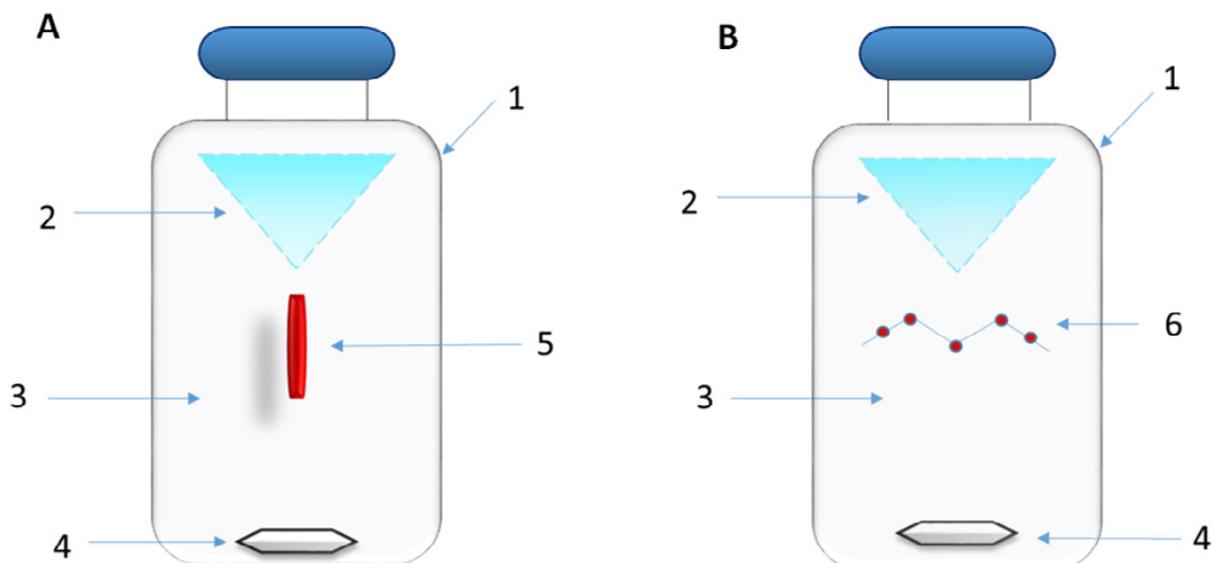
Fonte: Adaptado de Nogueira (2012)

A grande diferença entre a SBSE e a SPME é o alto volume de sorvente empregado na barra, na faixa de 50 a 250 vezes maior do que na SPME. Devido à difusão ser mais demorada por causa do aumento do volume de fase extratora, o tempo de equilíbrio é elevado e, portanto, os tempos de extração são maiores para SBSE (BALTUSSEN *et al.*, 2002; JELE'N *et al.*, 2012).

Apesar das vantagens da SBSE sobre a SPME, tal como, uma maior quantidade de massa de revestimento de polidimetilsiloxano (PDMS) que resulta em elevadas recuperações,

a fase sorvente de PDMS não é apropriada para a extração de compostos polares. Uma das saídas para esse problema é a derivatização dos analitos na fase aquosa antes da extração com a SBSE, como, por exemplo, a determinação de fenóis em água podendo-se realizar uma acetilação, o que tem melhorado a análise cromatográfica e o enriquecimento da amostra na fase extratora de PDMS (NAKAMURA; DAISHIMA, 2004). Outra possibilidade é o emprego de técnicas alternativas, como as de A μ E (Microextração adsortiva, *do inglês adsorptive microextraction*). Nessas técnicas, materiais sólidos são utilizados como fase extratora. Esses por sua vez, exibem altas áreas superficiais e textura porosa o que favorece a adsorção de moléculas orgânicas com maior polaridade. Comercialmente encontram-se fase sorventes como alumina, carvões ativados, entre outros. Na Figura 7, são mostradas as configurações geométricas propostas para as técnicas de A μ E que são a BA μ E (microextração em barra adsortiva, *do inglês Bar Adsorptive Microextraction*) e MSA μ E (Microextração Adsortiva em Multiesferas, *do inglês Multi-spheres Adsorptive Microextraction*) (NENG, *et al.*, 2010; NOGUEIRA, 2012; PŁOTKA-WASYLKA, *et al.*, 2015).

Figura 7 - Dispositivos para a determinação de analitos por técnicas de microextração adsortiva: (A) BA μ E; e, (B) MSA μ E. 1- frasco da amostra, 2- vortex, 3- amostra, 4- barra magnética, 5- μ -dispositivo de barra, 6 - μ -dispositivo de multiesferas.



Fonte: Adaptado de PŁOTKA-WASYLKA, *et al.* (2015)

A BA μ E tem recebido grande destaque, e vem sendo muito empregada para diversos estudos.

1.3.4. Microextração em barra adsortiva (BA μ E)

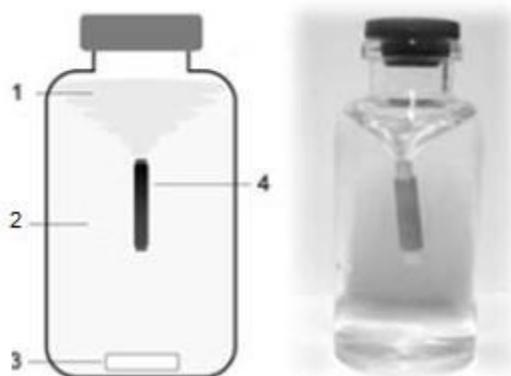
A BA μ E demonstra muitos benefícios, isso devido à ampla gama de sorventes que podem ser usados. Uma alternativa de destaque é o emprego de fases extratoras nanoestruturadas que pode possibilitar a análise de compostos traços com alta e média polaridade, tornando-se assim uma excelente alternativa quando comparada a outros métodos de sorção. Nessa técnica, emprega-se um filme adesivo para fixar a fase extratora no suporte de polipropileno (Figura 8), e como o suporte exibe uma baixa densidade, a microextração dar-se-á pela tecnologia de flutuação (Figura 9) (ALMEIDA, *et al.*,2014; NOGUEIRA, 2012).

Figura 8 - Representação esquemática: (a) imagem e (b) micrografia obtida por microscopia eletrônica por varredura do dispositivo analítico usado na técnica de BA μ E.



Fonte: Adaptado de Nogueira (2012)

Figura 9 - Representação esquemática e imagens exemplificando o procedimento de extração por BA μ E. Legenda: (1) vortex, (2) amostra, (3) barra magnética de agitação e (4) dispositivo de BA μ E.

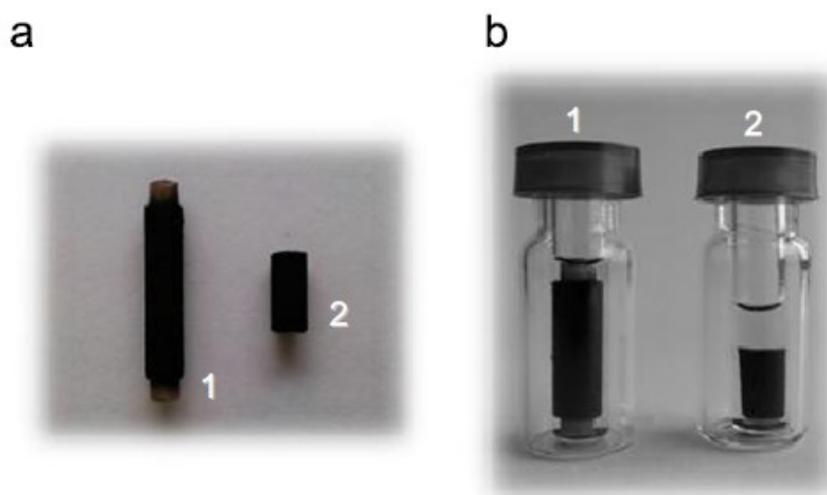


Fonte: Adaptado de Nogueira (2012)

A grande vantagem de ocorrer pelo processo de flutuação é que se evita o contato direto entre a barra e as paredes do frasco, fazendo com que o dispositivo possua uma maior durabilidade. Aliado a isso, a BA μ E é de fácil preparo e possibilita a escolha do sorvente mais apropriado para cada analito ou classe de compostos. A técnica de BA μ E abarca desde compostos com média até elevada polaridade ($\log K_{O/W} < 3,5$) e por este motivo alguns compostos possuem propriedades termolábeis, utilizando-se a dessorção líquida e sucessiva análise por HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, *do inglês High-Performance Liquid Chromatography*) como procedimento mais apropriado a ser realizado posteriormente a extração com a técnica (NOGUEIRA, 2012).

Recentemente, foram inseridas novas melhorias na BA μ E, diminuindo o tamanho do dispositivo analítico e diminuindo o volume de dessorção líquida para μ L. A miniaturização da técnica empregando uma menor quantidade de fase extratora demonstrou um satisfatório desempenho analítico, juntamente a isso diminuindo a quantidade de solvente, fornece características ambientalmente mais amigáveis (ALMEIDA, *et al.* 2014). Alguns trabalhos têm utilizado a chamada meia barra (Figura 10).

Figura 10 - Imagens mostrando a geometria dos dispositivos em barra, a) (1) BA μ E e (2) $\frac{1}{2}$ BA μ E e b) durante o processo de dessorção líquida.



Fonte: Adaptado de Almeida, *et al.* (2014)

Otimizações univariadas e multivariadas podem ser utilizadas para a avaliação de diversos parâmetros experimentais. Na BA μ E, pode-se estudar a força iônica, tempo de extração e dessorção, escolha da fase extratora, pH da amostra, entre outros. Deve-se tomar

cuidado para a temperatura máxima não exceder 40 °C, pois pode ocasionar a desagregação do filme adesivo fixado ao suporte de polipropileno (NENG, N. R. *et al.*, 2010).

Um dos processos importantes na BA μ E é o controle da velocidade de agitação com o intuito de facilitar o processo de difusão dos analitos, além de manter uma estabilidade para a flutuação da BA μ E. Em altas velocidades de agitação pode haver perda do sorvente em consequência dos atritos da barra com as paredes do frasco, sendo assim não é aconselhável o uso de elevadas velocidades (NOGUEIRA, 2013).

A força iônica é outra variável importante, sendo avaliada pela adição de um sal que pode aumentar, ser indiferente ou até mesmo limitar a eficiência de extração. A adição de sal é favorável para compostos polares devido ao efeito *salting-out*, em que a solubilidade dos analitos na amostra é diminuída, proporcionando sua migração para o sorvente (ALMEIDA; NOGUEIRA, 2014). Para realizar o estudo do pH deve-se levar em consideração se os analitos e/ou o sorvente possuem características ácidas ou básicas. (NOGUEIRA, 2012).

A BA μ E vem sendo amplamente estudada e aplicada para a extração de diferentes analitos e em diversas amostras, tais como, desreguladores endócrinos em água (MAFRA, *et al.*, 2018), biomarcadores (hexanal e heptanal) em urina humana (OENNING, *et al.*, 2017), e antidepressivos farmacêuticos em fluidos biológicos (IDE; NOGUEIRA, 2018).

1.4. Fases extratoras alternativas empregadas em microextração

Desde o desenvolvimento de técnicas de preparo de amostra que utilizam fase extratora, tem crescido os estudos e pesquisas sobre a possibilidade de escolher, modificar e/ou sintetizar um sorvente que viabilize uma análise mais seletiva e que esteja de acordo com os preceitos da química analítica verde. Além disso, dependendo das características dos compostos e do método adotado, busca-se elevar a capacidade sortiva das fases extratoras, com sorventes apresentando maior estabilidade mecânica, térmica ou química e dessa forma aumentando a sua durabilidade (AUGUSTO, *et al.*, 2010; SILVA, *et al.*, 2016). Sorventes alternativos como nanotubos de carbono, biossorventes (por exemplo, cortiça e terra diatomácea) e nanopartículas magnéticas tem chamado muita atenção (JAGIRANI; SOYLAK, 2020).

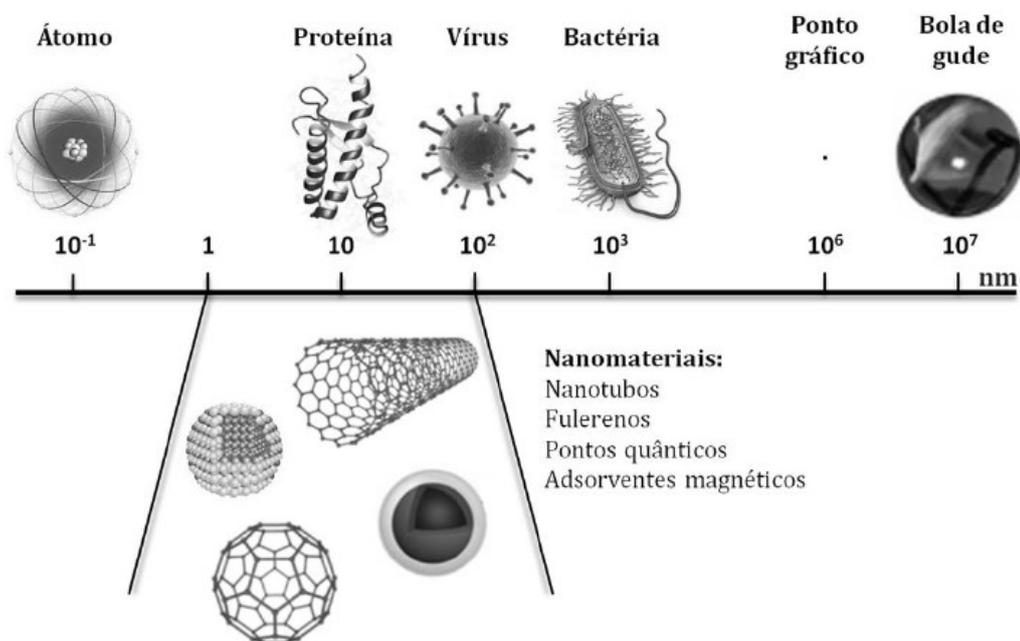
As nanopartículas magnéticas (do inglês *magnetic nanoparticles*, MNPs) tem recebido grande destaque nas técnicas de microextração, isso por causa de seu efeito não destrutivo dos analitos em matrizes biológicas e sua separação suave. Além disso, as

nanopartículas são comumente usadas devido à sua boa biocompatibilidade, propriedades magnéticas, baixa toxicidade e fácil preparação. Também é possível realizar modificações em sua estrutura permitindo que se alcance uma maior seletividade para o analito alvo (AHMADI, *et al.*, 2017; RAJABI, *et al.*, 2016).

1.4.1. Nanopartículas magnéticas (MNPs)

O termo nanopartícula abrange os materiais na escala de 1 a 100 nm que se apresentam como aglomerados de átomos ou moléculas (Figura 11). Em decorrência do tamanho reduzido, esses nanomateriais possuem uma grande área superficial devido à elevada razão área superficial/volume e acarretando em um comportamento distinto quando comparado aos sólidos macroscópicos (BARRETO, 2016). Os nanomateriais exibem propriedades atraentes no campo da nanociência, tais como catalíticas, magnéticas, ópticas e eletrônicas. Assim a sua aplicação é realizada em diferentes áreas como, farmacêuticas, bioquímicas, química e médicas, que vem crescendo cada vez mais. Dentro desse campo, as nanopartículas magnéticas (MNPs) vêm apresentando grande destaque (BARRETO, 2016).

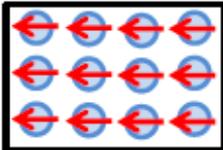
Figura 11 – Comparação do tamanho dos nanomateriais com outros materiais comuns.



Fonte: Adaptado de Barreto (2016)

Uma das classificações que os materiais recebem é de acordo com sua resposta a aplicação de um campo magnético externo. Estes podem ser nominados de paramagnéticos quando o campo magnético induzido apresenta uma elevada magnitude e com o mesmo sentido do campo externo empregado, diamagnéticos quando campo magnético induzido apresenta uma baixa magnitude e sentido oposto ao do campo externo, ferromagnéticos quando mesmo sem a utilização de um campo externo exibe um momento magnético acentuado e contínuo, antiferromagnéticos quando o momento magnético é praticamente nulo por causa do alinhamento dos spins serem antiparalelamente, e ferrimagnetismo quando o momento magnético é inferior quando comparado ao ferromagnético (apresentam spins antiparalelos, mas não se anulam totalmente, resultando em um momento magnético mais fraco) (MOURA, 2017). Esses comportamentos magnéticos são ilustrados na figura 12.

Figura 12 - Ilustração do comportamento dos materiais magnéticos.

Formação de domínios espontâneos	Ferromagnetismo	 <p>Momento de átomos individuais alinhados</p>
	Antiferromagnetismo	 <p>Momentos alternados de átomo a átomo</p>
	Ferrimagnetismo	 <p>Momentos alternados desiguais</p>
Sem domínios	Paramagnetismo	 <p>Alinhamento com campo aplicado</p>
	Diamagnetismo	 <p>Alinhamento oposto ao campo</p>

Fonte: Adaptado de Moura (2017)

Há ainda a classe dos chamados superparamagnéticos que tem comportamento similar aos paramagnéticos, porém com a utilização de um campo magnético externo, ao invés dos átomos serem afetados de forma individual, o material como um todo é alinhado. Além disso, apresenta uma elevada susceptibilidade magnética (como em materiais ferromagnéticos) (MOURA, 2017). Deste modo, os momentos magnéticos não se anulam e ordenam-se de forma conjunta e como consequência mostra um momento magnético permanente que se torna maior quando um campo magnético externo é aplicado. No superparamagnéticos, com a aplicação de um campo magnético externo, ocorre um instantâneo alinhamento magnético do material, inclusive em campos fracos. Contudo, na ausência de campo magnético não se tem magnetização (MOURA, 2017).

Dentro da área de nanomaterias, as MNPs caracterizam-se como a classe de partículas que possuem propriedades superparamagnética, em que, se torna viável a aplicação de um campo magnético e sem resquícios de magnetismo após a remoção do mesmo. As MNPs, em geral, com a aplicação de um campo magnético externo são fortemente atraídas. Comumente as nanopartículas magnéticas apresentam em sua composição núcleo rígido (elementos como ferro, níquel, cobalto e seus óxidos) com propriedade magnética e é recoberto por um polímero que proporciona a seletividade adequada para a determinação dos compostos a serem estudados. As nanopartículas de óxido de ferro (magnetita e maghemita) receberam maior destaque em razão à facilidade de síntese, biocompatibilidade e baixo custo. (AHMADI, *et al.*, 2017; SILVA, *et al.*, 2016).

Na síntese das MNPs, diversos métodos foram elaborados, sendo eles: biológicos, físicos e químicos para a obtenção de tamanhos e propriedades específicas. Dentre as metodologias propostas, destacam-se a microemulsão, deposição eletroquímica, deposição em fase sólida, coprecipitação, entre outras. A coprecipitação é uma das estratégias mais usuais para se obter nanopartículas de magnetita através da mistura de soluções aquosas de sais de ferro(II) e ferro (III), e logo após a precipitação por hidrólise alcalina (BARRETO, 2016). A representação da Equação (4) da obtenção da magnetita pode ser descrita como:

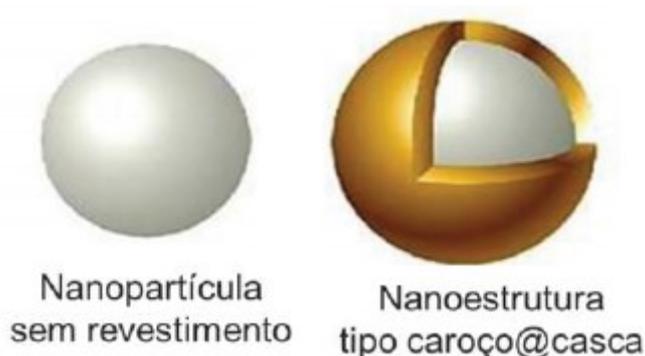


O método da coprecipitação permite a síntese de nanopartículas com uma satisfatória uniformidade e reatividade. Aliado a isso, a estratégia apresenta uma baixa aglomeração, um tempo de reação relativamente rápido e uma boa relação custo/benefício. As características químicas e morfológicas da magnetita dependem das condições do meio reacional. Alguns

fatores que podem afetar são: pH, base utilizada, velocidade de agitação e adição, e a estequiometria dos íons Fe^{3+} e Fe^{2+} . Assim, diversos métodos de coprecipitação vêm sendo apresentados na literatura (BARRETO, 2016).

A magnetita exibe em sua superfície átomos de ferro que não estão ligados aos átomos de oxigênio, desta forma, ela pode se comportar como um ácido de Lewis e coordenar-se com diversos tipos de moléculas. Assim, é possível obter variados modelos de recobrimento, originando as estruturas core@shell (caroço@casca ou núcleo magnético@recobrimento) como representado na Figura 13 (BARRETO, 2016; SILVA, *et al.*, 2016).

Figura 13 – Ilustração de tipos de nanoestrutura. Núcleo (caroço) sem revestimento e núcleo com revestimento (casca).



Fonte: Adaptado de Silva, *et al.* (2018)

O núcleo magnético pode alterar a carga superficial e conseqüentemente afetar a estabilidade coloidal e a dispersibilidade. O recobrimento permite a incorporação de ligantes com diferentes tipos de grupos funcionais fornecendo uma melhor seletividade para as nanopartículas, e com isso adaptar as mesmas para as mais distintas aplicações. Na área da química, as nanopartículas magnéticas vêm sendo largamente utilizadas no preparo de amostra (BARRETO, 2016).

No ano de 1996 o emprego de nanopartículas magnéticas obteve grande notoriedade com uma publicação de Towler *et al.* sobre um estudo para a determinação de metais em água do mar no qual adotaram $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{MnO}_2$ como sorvente. Em 1999, Safarikova e Safarik inseriram a chamada extração em fase sólida magnética (*magnetic solid phase extraction*, m-SPE ou MSPE). Nesse trabalho, MNPs ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ -ftalocianina de cobre) foram usadas para a extração de compostos orgânicos, alcançando um fator de enriquecimento de

aproximadamente 460 vezes (SILVA, *et al.*, 2016). Desde então, as MNPs vem sendo amplamente utilizadas em diversas técnicas de preparo de amostra como fase extratora.

As propriedades magnéticas das MNPs fazem com que sejam mais atraentes em técnicas de extração em fase sólida (AHMADI, *et al.*, 2017). Entre as principais vantagens das nanopartículas magnéticas, pode-se destacar o fato dos compostos serem facilmente extraídos e removidos seletivamente da matriz a partir de um ímã externo. Após a extração, os analitos podem ser eluídos e posteriormente levados para análise. Como resultado, tem-se um preparo de amostra rápido, eficiente e fácil dos compostos alvo (RAJABI, *et al.*, 2016). As MNPs vem sendo adotadas como fase extratora na determinação de vários analitos e em diferentes tipos de matriz (Tabela 1).

Tabela 1 – Diferentes tipos de nanopartículas utilizadas no preparo de amostras.

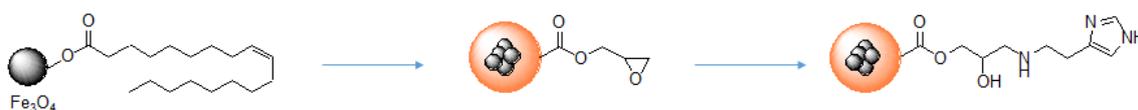
Analitos	Técnica	Amostra	Nanopartícula	Deteção	Referência
Estrogênios (Hormônios)	d- μ -SPE	Carne de porco	CTAB-recoberto Fe_3O_4 @ácido caprílico	HPLC-DAD	WANG, <i>et al.</i> , 2016
Agrotóxicos organofosforados	MSPE	Amostras aquáticas	Carbono recoberto Fe_3O_4 ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{C}$)	HPLC-UV	HEIDARI, <i>et al.</i> , 2012
Desreguladores endócrinos	DLLME	Água	Fe_3O_4 @ SiO_2 @MIM- PF_6	HPLC-MS/MS	CASADO-CARMONA, <i>et al.</i> , 2016
HPAs	MSPE	Café	Fe_3O_4 @MPS@IL	HPLC-FLD	SHI, <i>et al.</i> , 2016
Sabores e fragrâncias	MSPE	Alimentos	Fe_3O_4 @GO	HPLC-DAD	XIAO, <i>et al.</i> , 2017
4-nonilfenol	DLLME– d- μ SPE	Água	C_8 MNPs	HPLC-FLD	TAY, <i>et al.</i> , 2013

Fonte: Autoria própria (2019)

Tendo em vista essas características, essa pesquisa busca empregar nanopartículas funcionalizadas com histamina como fase extratora em técnicas de microextração. No primeiro trabalho foi utilizado pela primeira vez nanopartículas funcionalizadas com histamina (MNP-HIS) (Figura 14) associada à TFME para determinação de desreguladores endócrinos em amostra aquosa. No segundo estudo, essa mesma nanopartícula magnética foi

empregada pela primeira vez articulada a técnica de Ba μ E para determinação de parabenos em água. Em testes preliminares a adição de histamina na estrutura da nanopartículas apresentou um acréscimo satisfatório na resposta analítica proporcionando uma melhor sensibilidade do método para os analitos propostos. Juntamente a isso, a nanopartículas foi explorada aderindo as mesmas os diferentes suportes. A síntese das nanopartículas foi realizada pelo grupo do laboratório de catálise e fenômenos interfaciais (LACFI) orientados pelo professor Dr. Bruno Silveira de Souza e cedida ao nosso laboratório para a realização desse trabalho.

Figura 14 - Nanopartículas funcionalizadas com histamina (MNP-HIS).



Fonte: Adaptado de Campedelli (2017)

Capítulo III. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

- O presente trabalho tem como objetivo explorar o uso de nanopartículas funcionalizadas com histamina como fase extratora em técnicas de microextração para determinar desreguladores endócrinos e parabenos em amostras .

3.2. Objetivos Específicos

- Sintetizar as nanopartículas magnéticas funcionalizadas com histamina (MNP-HIS);
- Caracterizar as nanopartículas magnéticas funcionalizadas com histamina (MNP-HIS) através das técnicas de infravermelho e microscopia de transmissão eletrônica;
- Avaliar a utilização das nanopartículas funcionalizadas como fase extratora para as técnicas de extração: TFME e BA μ E;
- Utilizar otimização multivariada, a fim de obter superfícies de resposta que indiquem as melhores condições de trabalho;
- Determinar dos parâmetros analíticos de mérito, e aplicação para as metodologias propostas nestes trabalhos;
- Desenvolver e otimizar uma metodologia para determinação de hormônios e alquilfenóis (estrona, 17- β -estradiol, estriol, 17- α -etinilestradiol, 4-octilfenol e 4-nonilfenol) em amostras aquosas, usando a técnica de microextração em filme fino (TFME) utilizando nanopartículas funcionalizadas com histamina (MNP-HIS) como fase extratora associada ao sistema de *96-well plate*;
- Produzir pentes para a TFME com nanopartículas funcionalizadas com histamina (MNP-HIS) empregando filme adesivo;
- Otimizar as condições de extração por BA μ E para determinação de parabenos (metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno e butilparabeno) em amostras de água por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos;
- Produzir barras adsortivas de BA μ E com nanopartículas funcionalizadas com histamina (MNP-HIS) utilizando filmes adesivos e suportes cilíndricos de polipropileno.

CAPÍTULO IV

NANOPARTÍCULAS FUNCIONALIZADAS COM HISTAMINA (MNP-HIS) COMO NOVO SORVENTE PARA MICROEXTRAÇÃO EM FILME FINO DE COMPOSTOS DESREGULADORES ENDÓCRINOS EM AMOSTRAS AQUOSAS E DETERMINAÇÃO POR HPLC-FLD.

4.1. Introdução

Nos últimos anos, tem aumentado significativamente o número de publicações relatando a numerosa presença de compostos orgânicos nos diversos tipos de água (residuais, superficiais, subterrânea e de fontes) (KOUMAKI, *et al.*, 2018). Dentre esses compostos orgânicos podemos citar os desreguladores endócrinos (do inglês *endocrine disrupting compounds*, EDCs), que podem ser definidos como substâncias exógenas que afetam o sistema endócrino ou hormonal, produzindo efeitos adversos ao ser humano e a vida selvagem (KRANTZBERG; HARTLEY, 2018; ZHANG, *et al.*, 2018). As substâncias que são classificadas como desreguladoras endócrinas podem ser tanto de origem natural (*fitoestrogênios*) quanto sintética (*xenoestrogênios*). Os EDCs podem ser encontrados em diversos materiais, tais como, produtos de higiene pessoal, agrotóxicos, metais, entre outros. A exposição a esses compostos pode causar inúmeros prejuízos à saúde do homem e sua descendência. Atrasos no desenvolvimento neurológico, problemas nas funções reprodutivas e imunológicas são algumas das possíveis alterações causadas. Meios de contaminação podem ocorrer através de inalação de gases, pele, alimentos, água e etc. Em água, os EDCs são geralmente encontrados em baixas concentrações e comumente se faz necessário uma etapa de preparo de amostra para separação e pré-concentração dos analitos da matriz (MONNERET, 2017).

As técnicas tradicionais de preparo de amostra como a extração em fase sólida (SPE) e a extração líquido-líquido (LLE), ainda que sejam muito empregadas, requerem de uma demanda muito grande de tempo, utilizam altos volumes de solventes, geralmente envolvem várias etapas deixando o analista mais exposto além de normalmente adotar solventes tóxicos. Com o intuito de minimizar essas limitações e tornar os métodos ambientalmente mais amigáveis, surgiram as técnicas de miniaturização (CARASEK; MERIB, 2015; BERTON, *et al.*, 2016; XU, *et al.*, 2016).

Muitas técnicas de microextração vêm sendo empregadas para a determinação de desreguladores endócrinos. Dentre essas, pode ser destacado a SPME (MEHDINIA; MOUSAVI, 2008; YU, *et al.*, 2002), a extração sortiva em barra de agitação (SBSE) (HUANG, *et al.*, 2018; KAWAGUCHI *et al.*, 2004; NAKAMURA; DAISHIMA, 2004), e a microextração em filme fino (TFME) (CAI, *et al.*, 2015; JAHNKE, *et al.*, 2009).

A microextração em filme fino tornou-se uma técnica atrativa de preparo de amostras como uma alternativa para superar as limitações da microextração em fase sólida. Enquanto na SPME o volume da fase de extração é limitado pelo tamanho da fibra externa, na TFME um filme fino com uma alta relação área superficial/volume é usada como fase de extratora. Com essa configuração, o volume da fase extratora aumenta, mas a espessura do revestimento permanece constante ou ainda mais fina, permitindo melhor sensibilidade sem aumentar o tempo de equilíbrio (JIANG; PAWLISZYN, 2012; BOYACI, *et al.*, 2016).

Além disso, a TFME pode ser associada ao sistema *96-well plate* que aumenta significativamente a frequência analítica do método. Juntamente a isso, o método apresenta uma precisão e exatidão satisfatória e baixo custo (MIRNAGHI; PAWLISZYN, 2012).

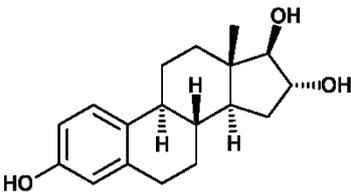
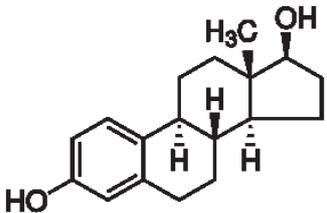
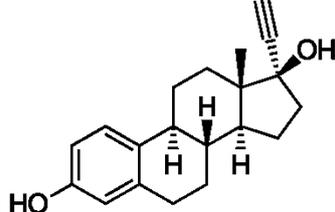
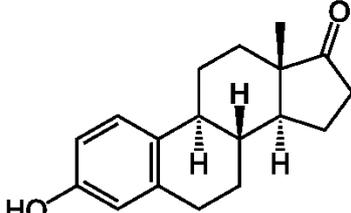
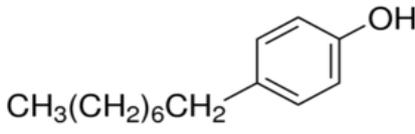
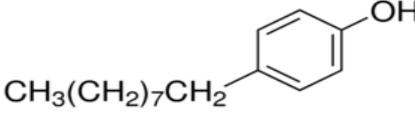
Diferentes tipos de fases extradoras podem ser aliados a métodos de extração em fase sólida, desde as fases comerciais até as alternativas (AZZOUZ, *et al.*, 2019). O desenvolvimento de novas fases sorventes é uma abordagem importante para aumentar a eficiência da extração, uma vez que alguns materiais podem melhorar significativamente as interações específicas com os analitos e reduzir os custos de análise (KIRSCHNER, *et al.*, 2017).

Entre os materiais alternativos, as nanopartículas (NPs) têm atraído grande atenção como uma nova e poderosa ferramenta para as técnicas de extração, devido à sua biocompatibilidade, propriedade magnética, baixa toxicidade e fácil preparação. Além disso, é possível realizar modificações na estrutura das NPs, permitindo uma maior seletividade para os analitos alvo (AHMADI, *et al.*, 2017). Usada como filme fino, as nanopartículas podem melhorar a área superficial e a cinética de sorção, melhorando a eficiência da extração. Assim, recentemente, os trabalhos têm relatado o uso de NPs juntamente com TFME como fase extratora e acoplados a métodos cromatográficos (LI, *et al.*, 2016; AYZIA, *et al.*, 2018).

Com base nisso, o objetivo deste estudo foi o uso de nanopartículas funcionalizadas com histamina (MNP-HIS) como fase extratora para a técnica de TFME e sistema de *96-well plate* para a determinação de EDCs (estrona, 17- β -estradiol, estriol, 17- α -etinilestradiol, 4-octilfenol e 4-nonilfenol) em amostras de água por HPLC-FLD. A estrutura dos analitos e

algumas propriedades físico-químicas estão apresentadas na Tabela 2. As nanopartículas funcionalizadas com histamina acopladas a este dispositivo de microextração não foram relatadas anteriormente.

Tabela 2 - Estrutura e algumas propriedades físico-químicas dos analitos.

Analito	Estrutura química	pKa	Log P
Estriol		10,25	2,53
17-β-estradiol		10,27	4,15
17-α-etinilestradiol		10,24	4,11
Estrona		10,25	3,64
4-Octilfenol		10,31	5,30
4-Nonilfenol		10,30	5,74

Fonte: Chemicalize.org (2019)

4.2. Materiais e métodos

4.2.1. Materiais e reagentes

Os desreguladores endócrinos estriol ($\geq 97\%$), 17- β -estradiol ($\geq 98\%$), estrona ($\geq 99\%$), 17 α -etinilestradiol, 4-octilfenol (99,0%) e 4-nonilfenol (99,8%) foram obtidos da Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, USA). Acetonitrila (ACN) e metanol (MeOH) ambos de grau cromatográfico foram adquiridos da JT Baker (Mallinckrodt, NJ, EUA). A água foi purificada através do sistema de água ultra-pura (Mega Purity, Billerica, EUA). Soluções estoque (1000 mg L^{-1}) foram preparadas dissolvendo uma quantidade apropriada de cada analito em MeOH e a solução trabalho contendo todos os analitos (25 mg L^{-1} de estrona e 5 mg L^{-1} de estriol, 17- β -estradiol, 17- α -etinilestradiol, 4-octilfenol e 4-nonilfenol) foi preparada pela diluição das soluções estoques em MeOH e estocadas a 4°C . Para o preparo do tampão foi utilizado ácido cítrico e hidrogenofosfato dissódico (VETEC, Rio de Janeiro, Brasil). Cloreto de sódio para o ensaio da força iônica foi adquirido da VETEC (Rio de Janeiro, Brasil).

4.2.2. Instrumentação e condições cromatográficas

As amostras foram analisadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (Prominence Shimadzu LC-20AT) com injetor manual (Rheodyne 7725i), sendo utilizado um detector de fluorescência (FLD). A separação foi realizada em uma coluna em fase reversa da Phenomenex Kinetex C18 (4.6 mm d.i. x 25cm c x $5 \mu\text{m}$ d.p.). Foram utilizados volume de injeção de $20 \mu\text{L}$ e a vazão de $1,0 \text{ ml min}^{-1}$. O gradiente de eluição selecionado e a fase móvel constituíram de: ACN (A) 40% e água (B) 60% de 0-3,5 min; a concentração de A aumentou até 90% de 3,5-4,0 min e manteve-se constante até 10,0 min; de 10,0-15,0 min a concentração de A diminui para 35%; por fim de 15,0-20,0 min a concentração de A manteve-se em 35%. O comprimento de onda de excitação e emissão foi de 280 nm e 310 nm (FLD), respectivamente.

4.3. Preparação das nanopartículas magnéticas (MNPs)

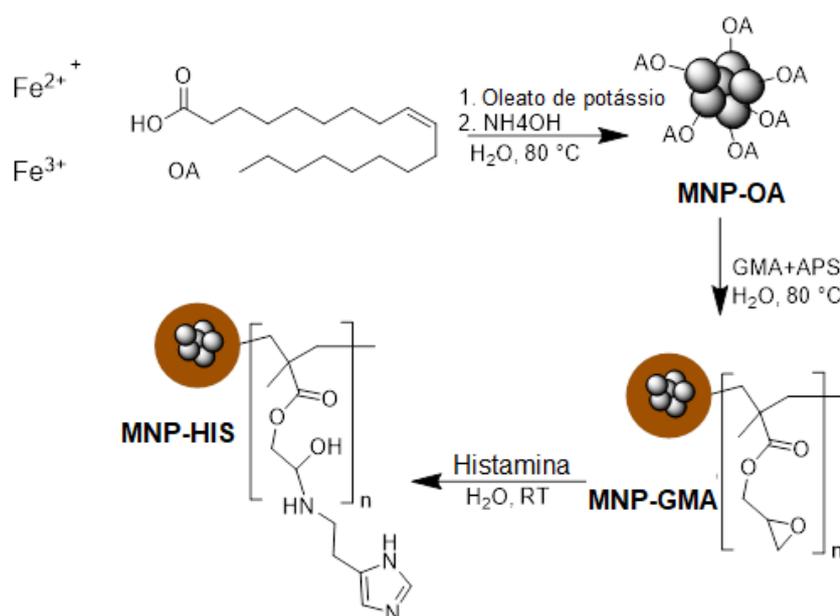
As MNP-OA (nanopartículas magnéticas estabilizadas com ácido oleico) foram preparadas como descrito na literatura (Wang, *et al.*, 2009b). Em um balão de fundo redondo

com três bocas, 5 mmol de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e 10 mmol de FeCl_3 foram dissolvidos em 100 mL de água deionizada. A solução foi agitada mecanicamente a 80 °C com borbulhamento de argônio. Após 30 min, foram adicionados 10 mmol de oleato de potássio e a mistura foi agitada durante mais 30 min. Em seguida, 35 mL de $\text{NH}_4\text{OH}_{\text{aq}}$ (4%) foram rapidamente adicionados, resultando na formação instantânea de uma dispersão preta. A reação continuou durante 30 min a 80 °C. A dispersão preta contendo MNP-OA monodispersa a 54 mg mL⁻¹ foi armazenada sob atmosfera de argônio.

A copolimerização do glidicilmetacrilato (GMA) com OA-MNP foi realizada em um tubo schlenck. 360 mg de persulfato de amônio e 4,6 mL de GMA foram adicionados a 100 mL da dispersão aquosa de MNP-OA. A mistura foi purgada com argônio e o frasco foi imerso num banho de silício pré-aquecido a 80 °C. A reação continuou por 1 h sob fluxo de argônio e agitação magnética. Após o resfriamento, as partículas de MNP-GMA foram coletadas usando um imã e lavadas com grandes quantidades de água e etanol.

A funcionalização do MNP-GMA foi realizada via abertura de anel epóxi com histamina. Dispersou-se 1 g de MNP-GMA em 10 mL de uma solução aquosa contendo 20 mmol de histamina. A mistura foi agitada magneticamente à temperatura ambiente durante 3 dias. Finalmente, as partículas de MNP-HIS foram coletadas usando um imã, lavadas com água e etanol por várias vezes. A representação esquemática da preparação de partículas é representada na Figura 15.

Figura 15 - Representação da preparação de nanopartículas magnéticas funcionalizadas com histamina.

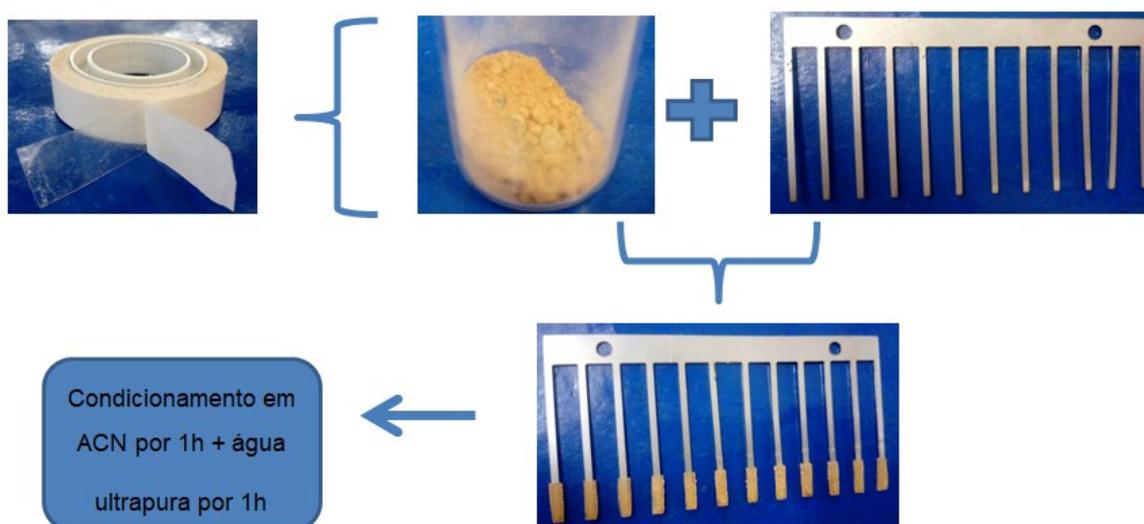


Fonte: Adaptado de Campedelli (2017)

4.4. Fabricação dos filmes finos compostos pelas MNP-HIS

Para a confecção dos pentes da TFME, foi utilizada uma fita dupla face (Adelbras, Ind. e Com. de Adesivos) de 1 cm de comprimento para fixar a fase extratora (MNP-HIS) nos pinos. Em seguida, eles foram condicionados com 300 μL (usando poços com capacidade de 500 μl) de acetonitrila e água por 1 hora em cada solvente, empregando o sistema de 96-*well plate*. O condicionamento foi realizado para limpar e remover o excesso de fase de extração (Figura 16).

Figura 16 - Preparo dos pentes para a TFME.



Fonte: Autoria própria (2019)

4.5. Etapas de otimização

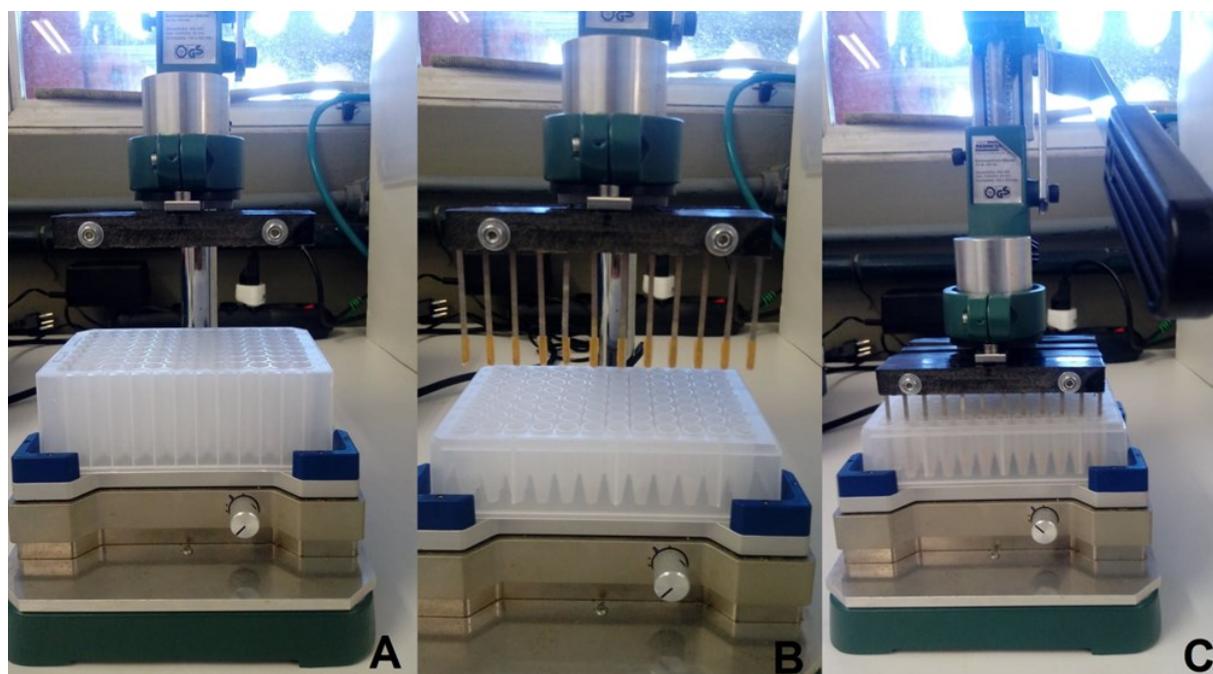
As extrações foram realizadas em poços com capacidade de 2,0 mL e a etapa de dessorção foi feita em poços de 500 μL (Figura 17). Os ensaios foram realizados com 1,5 mL de água ultrapura fortificada com 250 $\mu\text{g L}^{-1}$ de estrona e 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ de estriol, 17- β -estradiol, 17 α -etinilestradiol, 4-octilfenol e 4-nonilfenol. Além disso, o pH da amostra foi ajustado para 5 e o tempo de extração foi de 50 min. A etapa de dessorção foi realizada com 300 μL de acetonitrila:metanol (50:50 v/v) por 30 min. Agitação constante foi empregada em todos os experimentos e após a extração/dessorção os pentes da TFME foram condicionados em acetonitrila e água por 30 min em cada solvente.

A variação de pH da amostra não foi estudada pois em água os analitos não estão ionizados e esta é a forma desejada para que ocorra a extração, mas para garantir que eles estejam 100% neutros, foi adicionado um tampão pH 5, que é bem abaixo do pKa dos analitos (Tabela 2). Além disso, o pH das amostras analisadas também é próximo de 5, favorecendo a análise.

As variáveis que podem influenciar a eficiência de extração da metodologia TFME/MNP-HIS foram otimizados antes da determinação dos parâmetros analíticos de mérito, incluindo o tempo de extração e o efeito de *salting-out*. Além disso, as condições de dessorção, como tempo de dessorção e o tipo de solvente orgânico, também foram otimizadas.

A otimização da etapa de tempo de dessorção foi estudada univariadamente e em triplicata em 10, 20 e 30 min. O solvente de dessorção (acetonitrila, água e metanol) foi selecionado através do simplex centroide (tabela 3). Na extração, o tempo de extração (10-50 min) e a porcentagem de sal (0-30%) foram analisados pelo planejamento multivariado Doehlert (tabela 4). Para as otimizações univariadas as áreas dos analitos foram normalizadas individualmente e para as otimizações multivariadas utilizou-se a média geométrica. Os dados foram processados utilizando os programas computacionais Statsoft Statistica 8.0, Origin 8.0 e Microsoft Excel.

Figura 17 – Dispositivo de 96 poços (A), TFME com os pentes revestidos com HIS-MNP (B) e processo de extração com TFME (C).



Fonte: Autoria própria (2019)

Tabela 3 - Experimentos do simplex centroide para escolha do(s) solvente(s) na etapa de dessorção líquida.

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

Fonte: Autoria própria (2019)

Tabela 4 - Experimentos do planejamento Doehlert para escolha do tempo de extração e porcentagem de sal.

Experimento	Tempo de extração (min)	NaCl (%)
1	10	15
2	20	0
3	20	30
4	30	15
5	30	15
6	30	15
7	40	0
8	40	30
9	50	15

Fonte: Autoria própria (2019)

4.6. Figuras analíticas de mérito

As figuras analíticas de mérito foram determinadas e avaliadas a partir do documento de orientação da Comissão Europeia (EUROPEAN COMMISSION, 2015). As curvas de calibração foram construídas empregando amostras de água ultrapura fortificadas com os analitos nas concentrações de 20 a 250 µg L⁻¹ de estrona, 4 a 50 µg L⁻¹ de estriol e 4-

nonilfenol, e 0,5 a 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ de 17- β -estradiol, 17- α -etinilestradiol e 4-octilfenol. As extrações foram feitas em triplicatas usando as MNP-HIS. Os coeficientes de determinação foram obtidos a partir das curvas de calibração. O limite de quantificação (LOQ) foi selecionado como sendo o primeiro nível de concentração da curva de calibração e o limite de detecção (LOD) foi calculado dividindo o LOQ por 3,3, tendo-se como referência estudos anteriores (DIAS, 2015; MERIB, *et al.*, 2016).

A precisão e a exatidão foram estudadas realizando-se extrações em amostras de água de rio fortificadas com dois níveis de concentração dos analitos (20 e 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ de estrona e, 4 e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ de estriol, 17- β -estradiol, 17- α -etinilestradiol, 4-octilfenol e 4-nonilfenol), em triplicata. A precisão foi obtida através do desvio padrão relativo (RSD) e sendo o valor de 20% o máximo, como aceitável. A exatidão foi avaliada como sendo a porcentagem da recuperação relativa considerando o valor de 70-120% como aceitável (EUROPEAN COMMISSION, 2015).

O método desenvolvido foi aplicado em amostras de água de rio coletadas em seis pontos do rio Balneário Camboriú de Santa Catarina, Brasil (Figura 18). As amostras foram estocadas em frascos de vidro devidamente limpos e selados e conservadas sob refrigeração a 4 °C até a análise.

Figura 18 - Fotos dos seis pontos de coleta das amostras de água.



Ponto 1: Sítio Salto dos Pilões



Ponto 2: Ponte da Bicheira



Ponto 3: Ponte do Loteamento



Ponto 4: Ponte do Britador



Ponto 5: Ponte da Vila da Conceição



Ponto 6: Ponte da Vila da Pedra

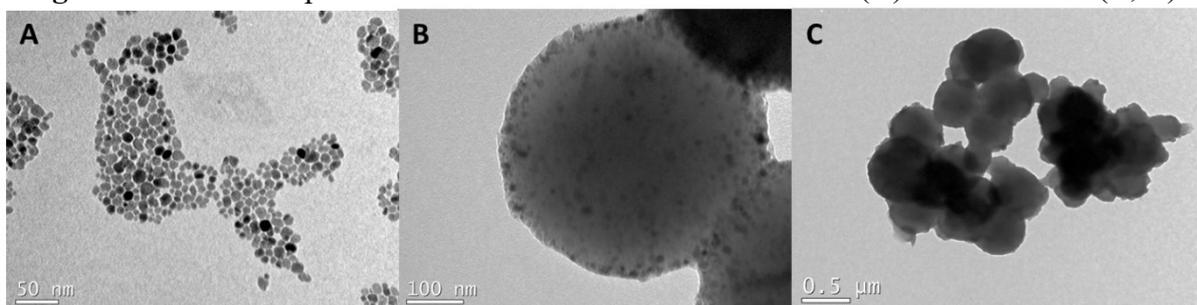
Fonte: Autoria própria (2019)

4.7. Resultados e discussões

4.7.1. Caracterização da fase extratora MNP-HIS

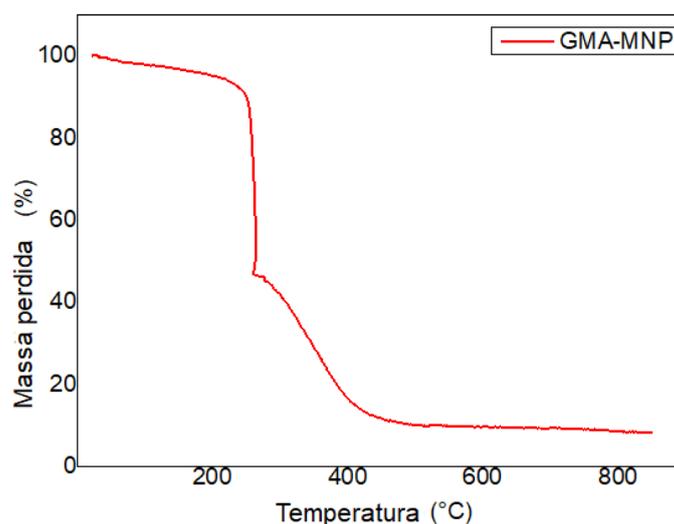
As nanopartículas MNP-OA e MNP-GMA foram analisadas por TEM (Microscopia eletrônica de transmissão) como apresentado na Figura 19. As MNP-OA são aproximadamente esféricas e apresentam um diâmetro de 9,0 nm. As MNP-GMA também são esféricas e o diâmetro médio das partículas é muito maior do que as MNP-OA, em torno de 400 nm, que é resultado do teor de polímero. A análise de TGA (Figura 20) confirma a presença de aproximadamente 93% de material orgânico na MNP-GMA. Como pode ser visto na Figura 19B, os domínios de magnetita são distribuídos homogeneamente por toda a partícula, e é possível confirmar que as nanopartículas magnéticas estão incorporadas na estrutura do polímero.

Figura 19 - Microscopia eletrônica de transmissão de MNP-OA (A) e MNP-GMA (B, C).



Fonte: Adaptado de Campedelli (2017)

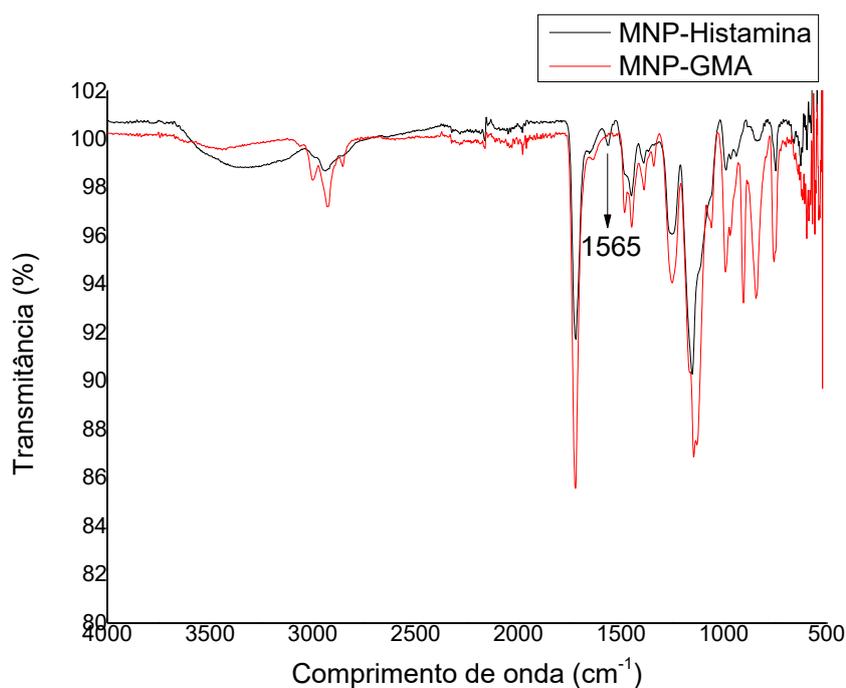
Figura 20 - Análise TGA da MNP-GMA.



Fonte: Adaptado de Campedelli (2017)

As partículas preparadas em cada etapa da síntese também foram analisadas por FT-IR (Infravermelho com Transformada de Fourier) (Figura 21). Para as MNP-OA, os principais picos observados são o estiramento alquílico CH em $2850-2950\text{ cm}^{-1}$, as bandas em 1523 e 1420 cm^{-1} , atribuídas ao grupo carboxilato coordenado aos íons ferro, e as ligações Fe-O do óxido de ferro a 600 cm^{-1} (ROTH, *et al.*, 2016; BRONSTEIN, *et al.*, 2007). A banda que confirma a polimerização da GMA na partícula é o estiramento da carbonila do éster em 1722 cm^{-1} e duas bandas vibracionais em 905 e 842 cm^{-1} associadas à curvatura do anel epóxi assimétrica e simétrica, respectivamente (SHEN, *et al.*, 2013; TARDUCCI, *et al.*, 2000). Além disso, a ausência do sinal C=C em torno de 1640 cm^{-1} confirma ainda mais a polimerização completa da GMA. A funcionalização com histamina é suportada pelo desaparecimento dos sinais do anel epóxi para MNP-HIS, o aparecimento de uma banda a 1565 cm^{-1} , atribuída à deformação N-H do imidazol (LIU, *et al.*, 2017). Outra evidência indicando a abertura do anel e a inserção de histamina é o aparecimento de uma banda larga na faixa de $3600-3200\text{ cm}^{-1}$ atribuída aos estiramentos N-H e O-H. Finalmente, a análise elementar confirmou que o MNP-HIS contém $1,46\text{ mmol}$ de histamina por grama de material.

Figura 21 - Espectro de infravermelho da NPM funcionalizada com histamina (MNP-HIS).



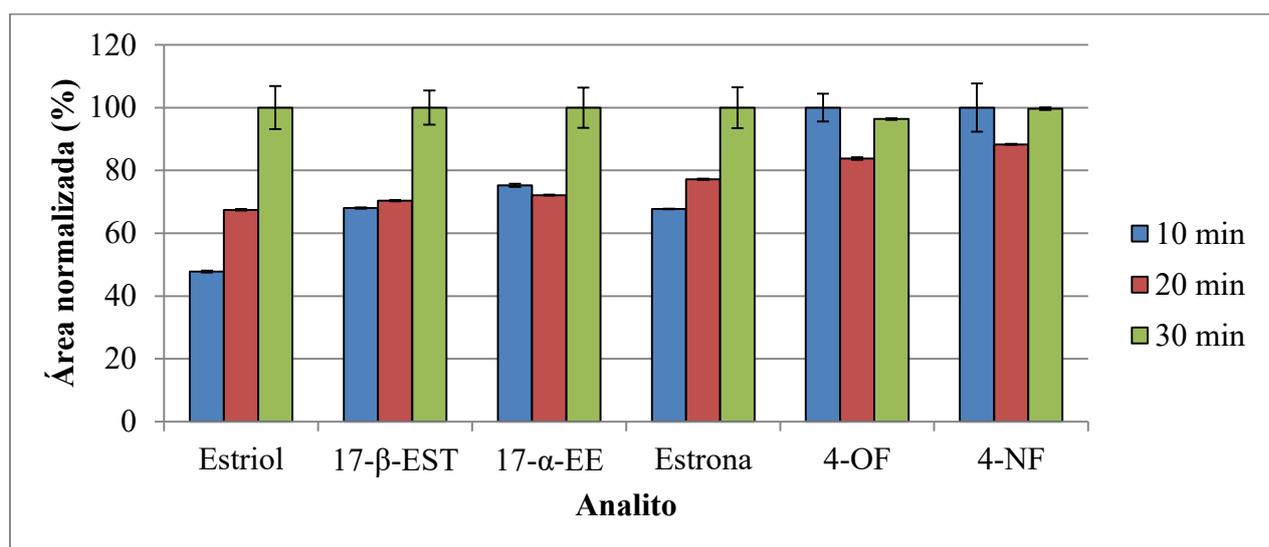
Fonte: Adaptado de Campedelli (2017)

4.7.2. Otimização das etapas de dessorção

4.7.2.1. Tipo de solvente e tempo de dessorção

O tempo de dessorção é um parâmetro importante para avaliar a interação entre o solvente de dessorção e a fase extratora. Neste trabalho, foram avaliados os tempos de dessorção de 10, 20 e 30 min. A Figura 22 mostra os resultados obtidos indicando que a melhor resposta analítica foi obtida utilizando 30 min. O uso de 10 e 20 min não forneceu tempo suficiente para que os analitos fossem dessorvidos satisfatoriamente. Testes preliminares foram realizados empregando mais de 30 min, no entanto uma diminuição nas áreas de pico foi observada, possivelmente devido ao processo de re-extração que ocorre nos sítios ativos de MNP-HIS. Além disso, adotando 30 min não houve efeito de memória entre os experimentos.

Figura 22 - Escolha do tempo de dessorção.

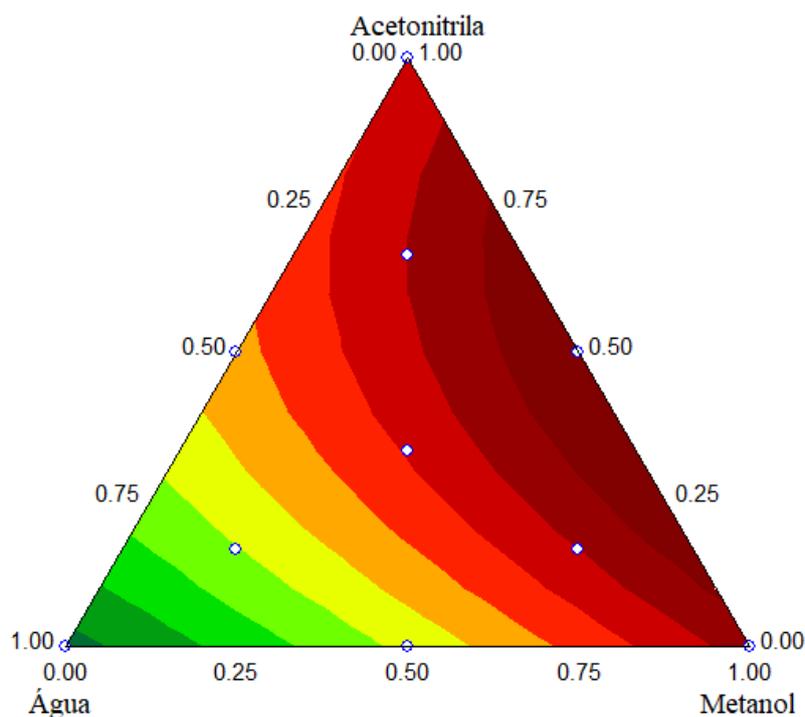


*Gráfico de barras para a otimização do tempo de dessorção, utilizando 300 μL de ACN como solvente de dessorção. Condições experimentais: 1,5 mL de amostra de água ultrapura fortificada com 250 $\mu\text{g L}^{-1}$ de estrona e 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ dos demais analitos, pH da amostra de 5,0, sem adição de sal, tempo de extração de 30 min. Analitos: Estriol; 17-β-EST; 17-α-EE: 17- α -etinilestradiol; Estrona; 4-OP: 4-octilfenol; e 4-NP: 4-nonilfenol.

Fonte: Autoria própria (2019)

O solvente de dessorção foi escolhido através de um planejamento simplex centroide (modelo quadrático), utilizando como resposta as médias geométricas das áreas de pico dos compostos estudados. A acetonitrila, a água e o metanol foram avaliados quanto à dessorção com base na sua total compatibilidade com o equipamento e a fase móvel. Os resultados são apresentados na Figura 23, em que é possível verificar que a melhor condição foi alcançada quando se utilizou uma mistura de acetonitrila e metanol (50:50 v/v). Uma possível explicação para os resultados obtidos deve-se à polaridade dos solventes e às interações dos analitos, como ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals.

Figura 23 - Escolha do solvente de dessorção ($r^2 = 0,7937$).



*Superfície triangular obtida a partir do planejamento simplex centroide para a otimização do tipo de solvente de dessorção usando 300 μL e tempo de dessorção de 30 min. Condições experimentais: 1,5 mL de amostra de água ultrapura fortificada com 250 $\mu\text{g L}^{-1}$ de estrona e 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ dos demais analitos, pH da amostra de 5,0, sem adição de sal, tempo de extração de 30 min.

Fonte: Autoria própria (2019)

4.7.3. Otimização das condições de extrações

4.7.3.1. Otimização do tempo de extração e força iônica

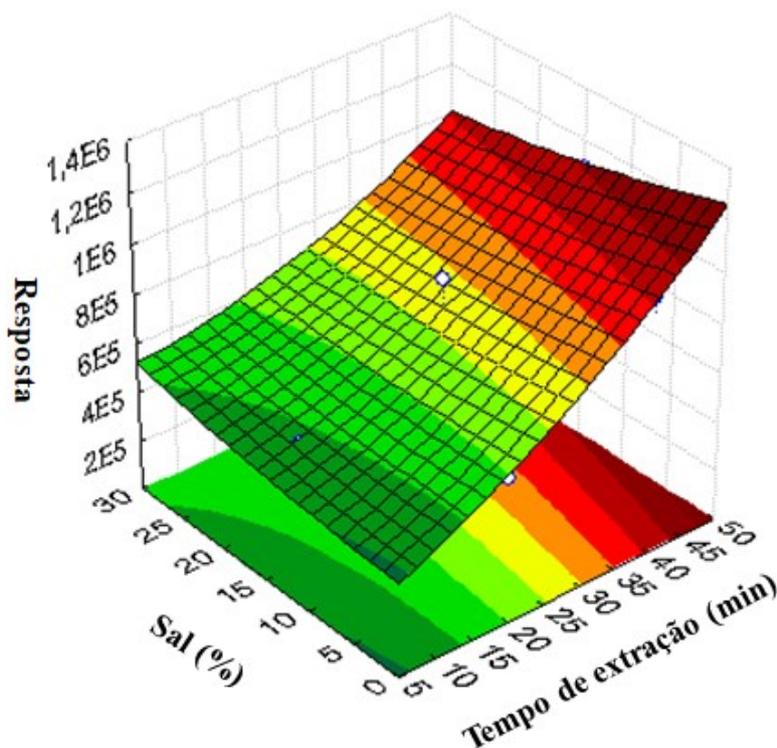
A eficiência de extração é diretamente influenciada pela transferência de massa entre fases, que é uma variável dependente do tempo. Sendo a transferência de massa um processo de equilíbrio, essa será menor quanto mais próximo o sistema estiver destas condições e se torna constante quando o equilíbrio é atingido. Além disso, a adição de sal pode aumentar a eficiência da extração por meio do efeito *salting out*, em que a solubilidade dos analitos na amostra é diminuída devido às moléculas de água solvatarem os íons. Dessa forma, por meio

de um mecanismo de competição, os analitos ficam mais livres para serem extraídos. Mas nem sempre a adição de sal favorece a extração dos compostos, às vezes ela pode ser insignificativa ou até mesmo desfavorecer (CARASEK; MERIB, 2015; PSILLAKIS; KALOGERAKIS, 2003). Com base nessas informações, o tempo de extração e o ajuste da força iônica foram otimizados usando um planejamento Doehlert. O tempo de extração variou de 10 a 50 min e a porcentagem de sal variou de 0 a 30%.

De acordo com a superfície de resposta obtida (Figura 24), é possível observar que a melhor condição foi alcançada quando nenhum sal foi adicionado à amostra. Os resultados obtidos estão de acordo com outros estudos publicados para os mesmos analitos (MERIB, *et al.*, 2018; VILLAR-NAVARRO, *et al.*, 2013). Além disso, como a fase extratora possui grupos polares, a adição de sal pode estar interferindo negativamente na extração dos analitos alvo, bloqueando ou interagindo com os sítios ativos da histamina.

O tempo de extração tendeu a um máximo, então 50 min foi a condição selecionada. Longos tempos são comuns nessa técnica, porém optou-se por colocar um tempo limite que neste trabalho foi de 50 min. Neste tempo uma satisfatória resposta analítica foi obtida.

Figura 24 - Superfície de resposta obtida tempo de extração versus % de sal ($r^2 = 0,9922$) na extração dos hormônios e alquilfenóis por TFME/MNP-HIS associado ao sistema 96-well plate.



Fonte: Autoria própria (2019)

4.7.4. Parâmetros analíticos de mérito e análise das amostras

Aplicando as condições ótimas de extração e dessorção, os parâmetros analíticos de mérito foram avaliados e os resultados estão apresentados na Tabela 5. A linearidade foi avaliada através dos coeficientes de determinação (r^2) obtidos pelas curvas de calibração realizadas em água ultrapura para cada analito. Os resultados foram $\geq 0,99$ para todos os compostos avaliados. O limite de quantificação (LOQ) foi obtido como a menor concentração fortificada que apresentou recuperação relativa entre 70 e 120%, com desvios padrão relativos (RSD) $\leq 20\%$. O limite de detecção (LOD) foi obtido dividindo o LOQ por 3,33. LOQ e LOD variaram entre 0,5 a 20 e 0,2 a 6,1 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. A Diretiva 2013/39/UE do Parlamento Europeu e do Conselho estabelece as concentrações máximas permitidas (MAC) e a média anual (AA) de octilfenol (OP) e nonilfenol (PN) em águas superficiais. Para OPs o AA é de 0,1 mg L^{-1} e o MAC não é aplicável, enquanto para NPs o AA é de 0,3 mg L^{-1} e o MAC é de 2,0 mg L^{-1} (Directive 2013/39/EU). Não há legislação

vigente para os demais compostos estudados em amostras de água. A precisão do método foi assegurada com ensaios intradia ($n = 3$) interdia ($n = 9$) avaliando os resultados de RSD nas concentrações de $4,0 \mu\text{g L}^{-1}$ e $10,0 \mu\text{g L}^{-1}$ (estriol, 17- β -estradiol, 17 α -etinilestradiol, 4-octilfenol e 4-nonilfenol) e $20,0 \mu\text{g L}^{-1}$ e $50,0 \mu\text{g L}^{-1}$ (estrona). Como mostrado na Tabela 5, os RSD variaram entre 1,6 a 10,6% e 1,0 a 9,7%.

Tabela 5 - Faixa linear de trabalho, coeficientes de determinação, limites de detecção e limites de quantificação obtidos para o método proposto para determinação de estriol, 17- β -estradiol, 17- α -etinilestradiol, estrona, 4-octilfenol e 4-nonilfenol em amostras de água usando TFME/MNP-HIS.

Analitos	Faixa linear de Trabalho ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	r^2	Precisão (intradia) ^a ($n=3$)		Precisão (interdia) ^a ($n=9$)	
					$\mu\text{g L}^{-1}$	%	$\mu\text{g L}^{-1}$	%
Estriol	4,0-50,0	1,2	4,0	0,9998	4,0	1,6	4,0	4,9
					10,0	5,7	10,0	9,7
17- β -Estradiol	0,5-50,0	0,2	0,5	0,9987	4,0	4,1	4,0	6,8
					10,0	6,4	10,0	7,3
17- α -Etinilestradiol	0,5-50,0	0,2	0,5	0,9991	4,0	10,8	4,0	6,1
					1,0	2,0	10,0	2,4
Estrona	20,0-250,0	6,1	20,0	0,9955	20,0	7,9	20,0	9,7
					50,0	1,0	50,0	9,2
4-Octilfenol	0,5-50,0	0,2	0,5	0,9976	4,0	7,1	4,0	10,6
					10,0	3,1	10,0	4,6
4-Nonilfenol	4,0-50,0	1,2	4,0	0,9994	4,0	5,9	4,0	9,8
					10,0	8,4	10,0	9,1

^a Precisões intradia e interdia foram calculadas baseadas no desvio padrão relativo (RSD)

Fonte: Autoria própria (2019)

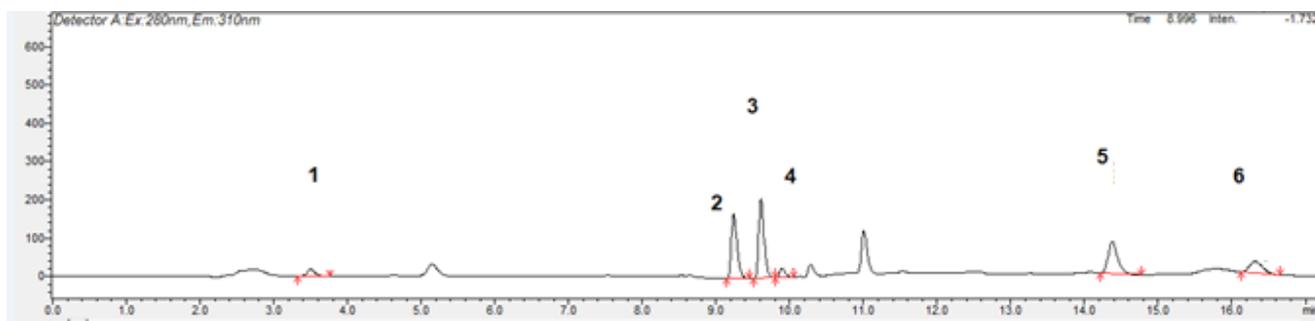
A recuperação relativa e a aplicabilidade foram avaliadas utilizando amostras de águas subterrâneas coletadas na cidade de Balneário Camboriú (Santa Catarina, Brasil). As amostras foram adicionadas nos níveis de concentração de $20,0$ e $50 \mu\text{g L}^{-1}$ (estrona) e $4,0$ e $10 \mu\text{g L}^{-1}$ (estriol, 17- β -estradiol, 17- α -etinilestradiol, 4-octilfenol e 4-nonilfenol), e as extrações foram realizadas em repetições ($n = 3$). De acordo com a Tabela 6, as recuperações relativas variaram de 82% a 120% e o RSD variou de 0,1% a 13,6%. Além disso, amostras de água não fortificadas foram extraídas e os hormônios e alquilfenóis encontrados estavam nas concentrações abaixo de LOD. A Figura 25 representa um dos cromatogramas obtidos com a amostra no ponto 1 com os analitos na concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$.

Tabela 6 - Recuperação (R%) e precisão (RSD%) usando o método proposto (n = 3).

Analito	Nível fortificado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Ponto 1		Ponto 2		Ponto 3		Ponto 4		Ponto 5		Ponto 6	
		R (%)	RSD (%)										
Estriol	4,0	97	12,3	94	0,2	105	5,4	96	9,5	120	4,4	100	4,7
	10,0	108	7,6	87	10,8	83	3,9	85	2,7	101	6,1	82	0,2
17- β -Estradiol	4,0	113	6,9	102	4,4	95	5,8	86	8,8	85	9,7	107	1,1
	10,0	98	10,9	97	3,4	89	9,3	85	11,4	83	7,5	96	7,1
17 α -Ethinilestradiol	4,0	116	8,7	96	13,6	96	5,2	84	5,0	88	5,0	106	7,0
	10,0	97	10,4	100	8,9	100	3,8	97	3,7	96	1,6	92	2,9
Estrona	20,0	102	7,1	101	14,9	101	11,5	111	2,5	93	3,7	91	9,7
	50,0	93	0,1	114	6,1	87	0,4	92	12,5	89	1,6	101	2,3
4-Octilfenol	4,0	113	6,0	95	7,0	92	6,6	104	0,7	101	3,0	104	6,1
	10,0	99	2,6	101	5,0	106	4,2	104	1,4	99	1,3	102	6,6
4-Nonilfenol	4,0	102	4,6	102	2,0	99	3,4	98	0,3	117	10,6	119	3,4
	10,0	108	2,5	104	13,2	110	10,0	115	8,2	102	9,5	110	2,3

Fonte: Autoria própria (2019)

Figura 25 – Cromatograma obtido após a extração por MNP-HIS/TFME e determinação por HPLC-FLD para a amostra de água de rio no ponto 1 com $10 \mu\text{g L}^{-1}$ dos analitos monitorados no comprimento de absorção 280 nm e comprimento de emissão 310 nm. Ordem de eluição: 1, estriol; 2, 17- β -estradiol; 3, 17- α -etinilestradiol; 4, estrona; 5, 4-octilfenol e 6, 4-nonilfenol.



Fonte: Autoria própria (2019)

Ao comparar os resultados obtidos com os já relatados na literatura (Tabela 7), nota-se que o método proposto apresenta LOD e faixa linear satisfatória para os analitos alvo. A técnica mostrou-se ambientalmente amigável e nenhuma quantidade adicional de solvente orgânico foi utilizado durante o procedimento de extração e a fase sorvente foi reutilizada 18 vezes sem interferência de efeitos de memória. Além disso, a combinação do sistema de 96-*well plate* com TFME/MNP-HIS permite a extração de até 96 amostras em 50 min e a dessorção em 30 min, o que proporciona uma média de 50 segundos por amostra.

Tabela 7 - Comparação do método proposto com estudos previamente relatados na literatura.

Referência	Analitos	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Técnica de extração	Volume de solvente extrator	Tempo de extração	Técnica analítica
Este Trabalho	Estriol 17- β -EST 17- α -EE Estrona 4-OP 4-NP	1,2 0,2 0,2 6,1 0,2 1,2	4,0-50,0 0,5-50,0 0,5-50,0 20,0-250,0 0,5-50,0 4,0-50,0	TFME/ MNP-HIS	Sem uso de solvente extrator	\approx 31 s por amostra	HPLC-FLD
Nakamura; Daishima, 2004	4-OP 4-NP	0,54 0,52	- -	HF-LPME (sistema em 3 fases)	30 μL de fase receptora aquosa (pH 9)	30 min	HPLC-FLD
Zhou, <i>et al.</i> , 2011	4-NP	0,48	3.0–300.0	IL-DLLME	65 μL de líquido iônico	20 min	HPLC-FLD
Pessoa, <i>et al.</i> , 2014	17- β -EST 17- α -EE Estrona	0,011 0,060 0,035	- - -	SPE	Sem uso de solvente extrator	10 min	GC-MS
Lu, <i>et al.</i> , 2015	Estriol 17- α -EE Estrona	0,43 0,40 0,086	0,5–100,0 0,5–100,0 0,1–100,0	MM-MIPS (Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ @mSiO ₂)	Sem uso de solvente extrator	20 min	HPLC-DAD

Fonte: Autoria própria (2019)

4.8. Conclusões

A TFME/MNP-HIS foi aplicada com sucesso na extração e pré-concentração de hormônios e alquilfenóis em amostras de água. O procedimento proposto exibiu valores satisfatórios de LOD, LOQ, recuperação e RSD. O procedimento de preparo da amostra envolve 50 min de extração e 30 min de dessorção, e 96 extrações podem ser realizadas simultaneamente, fornecendo uma alta frequência analítica de cerca de 50 segundos por amostra. O método desenvolvido é de baixo custo, fácil aplicação e baixo consumo de amostras. Além disso, o uso da nanopartícula funcionalizadas com histamina favoreceu a extração, aumentando a seletividade do método.

CAPÍTULO V

NANOPARTÍCULAS FUNCIONALIZADAS COM HISTAMINA (MNP-HIS) COMO SORVENTE PARA MICROEXTRAÇÃO EM BARRA ADSORTIVA DE PARABENOS EM AMOSTRAS AQUOSAS E DETERMINAÇÃO POR HPLC-DAD.

5.1. Introdução

Os parabenos são ésteres derivados do ácido p-hidroxibenzóico, que são empregados como conservantes químicos devido à sua atividade antimicrobiana. Portanto, esses compostos são amplamente encontrados em produtos como cosméticos, alimentos, produtos farmacêuticos e de higiene pessoal. Entre os ésteres do ácido para-hidroxibenzóico, o metilparabeno, o etilparabeno, o propilparabeno e o butilparabeno são geralmente os mais usados. A atividade antimicrobiana desses compostos é maior à medida que a cadeia alquílica aumenta. Porém, esse fato limita sua aplicação devido à baixa solubilidade em meio aquoso. Estudos recentes expuseram a preocupação com os danos causados aos humanos pela exposição a esses compostos (SANCHIS, *et al.*, 2019; ARIFFIN, *et al.*, 2019; RAZAVI; ES'HAGH, 2019; NÚÑEZ, *et al.*, 2010; PIAO, *et al.*, 2014; BELTRAN, *et al.*, 2010). Alguns dos problemas associados a essa exposição são infertilidade, dermatite alérgica e câncer de mama (NÚÑEZ, *et al.*, 2010). Com base nisso, os parabenos são classificados como compostos desreguladores endócrinos (EDCs) (ARIFFIN, *et al.*, 2019; NÚÑEZ, *et al.*, 2010; PIAO, *et al.*, 2014; BELTRAN, *et al.*, 2010). Esses ésteres alquílicos geralmente são rapidamente metabolizados e excretados na urina (SANCHIS, *et al.*, 2019). Como consequência, os parabenos podem ser encontrados no meio ambiente e, em muitos casos, afetando a qualidade da água. Portanto, o estudo desses compostos em água é necessário.

Cromatografia gasosa (GC) e cromatografia líquida (LC) são as técnicas mais frequentemente empregadas para determinar parabenos. No entanto, devido ao baixo nível de concentração em que esses compostos são encontrados, uma etapa de preparo de amostra é necessária (PASTOR-BELDA, *et al.*, 2018; ALCUDIA-LEÓN, *et al.*, 2013; FARAJZADEH, *et al.*, 2010; YAN, *et al.*, 2019).

Muitas técnicas de microextração foram usadas para determinar parabenos em diferentes tipos de amostras, incluindo microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) (FARAJZADEH, *et al.*, 2010), microextração líquido-líquido assistida por ar (AALLME) (FARAJZADEH, *et al.*, 2013), microextração em fase líquida suportada por fibra oca (HF-

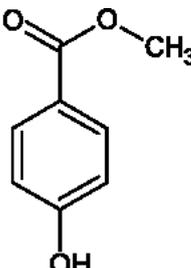
LPME) (DÍAZ-ÁLVAREZ, *et al.*, 2013), microextração em sorvente empacotado (MEPS) (FUMES; LANÇAS, *et al.*, 2017), extração sortiva em disco rotativo (RDSE) (BECERRA-HERRERA, *et al.*, 2018), micro extração em fase sólida dispersiva (D μ SPE) (JALILIAN, *et al.*, 2019) e microextração adsortiva em barra (BA μ E) (DIAS, *et al.*, 2015; MAFRA, *et al.*, 2018).

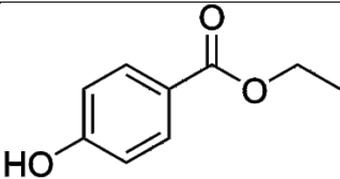
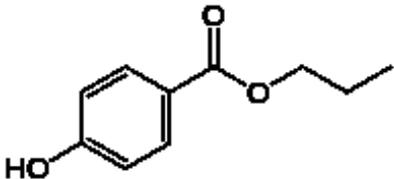
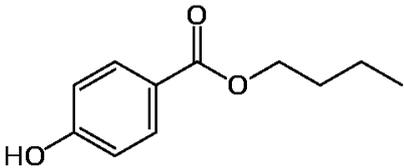
Nos últimos anos, a microextração adsortiva em barra tem atraído muita atenção devido às suas diversas vantagens, como rapidez e facilidade de preparo e possibilidade de escolha da fase sorvente para a extração dos compostos alvo (YAN, *et al.*, 2019; ABUJABER, *et al.*, 2019). O dispositivo BA μ E é composto por um suporte polimérico revestido com a fase de extração com o auxílio de um filme adesivo dupla-face. A extração ocorre por tecnologia de flutuação, em que o dispositivo é menos denso que a amostra aquosa e a dessorção emprega apenas alguns microlitros de solvente. Uma das principais vantagens desta técnica é a possibilidade de escolher a fase de extração mais adequada com base nos compostos a serem determinados. Muitos tipos de fase sorvente têm sido utilizados nos BA μ E, entre eles cortiça, carvão ativado (AC) e nanotubos de carbono (CNTs) (YAN, *et al.*, 2019; ABUJABER, *et al.*, 2019; OENNING, *et al.*, 2017, Ide, *et al.*, 2018).

Nanopartículas (NPs) utilizadas como fase sorvente têm sido amplamente aplicadas, devido a propriedades como boa dispersibilidade e área superficial relativamente elevada. Uma característica muito interessante dos NPs é a possibilidade de funcionalização, o que permite que a superfície do NP seja modificada para aumentar a seletividade do método (AMIRI, *et al.*, 2015; CHISVERT, *et al.*, 2018; BENEDÉ, *et al.*, 2014).

A partir disso, o objetivo deste trabalho foi empregar nanopartículas funcionalizadas com histamina (MNP-HIS) pela primeira vez como fase extratora para a técnica de Ba μ E para a determinação de parabenos (metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno e etilparabeno) em amostras de água por HPLC-DAD. Algumas propriedades físico-químicas e a estrutura dos parabenos são mostradas na Tabela 8.

Tabela 8 - Estrutura e algumas propriedades físico-químicas dos analitos.

Analito	Estrutura química	pKa	Log P
Metilparabeno		8,17	1,66

Etilparabeno		8,22	2,19
Propilparabeno		8,35	2,71
Butilparabeno		8,37	3,24

Fonte: Chemicalize.org (2019)

5.2. Materiais e métodos

5.2.1. Materiais e reagentes

Os parabenos metilparabeno (99%), etilparabeno (99%), propilparabeno (99%) e butilparabeno (99,0%) foram obtidos da Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, USA). Acetonitrila (ACN) e metanol (MeOH) ambos de grau cromatográfico foram adquiridos da JT Baker (Mallinckrodt, NJ, EUA). A água foi purificada através do sistema de água ultra-pura (Mega Purity, Billerica, EUA). Soluções estoque (1000 mg L^{-1}) foram preparadas dissolvendo uma quantidade apropriada de cada analito em MeOH e a solução trabalho contendo todos os analitos (50 mg L^{-1}) foi preparada pela diluição das soluções estoques em MeOH e estocadas a 4°C . Para o preparo do tampão foi utilizado ácido cítrico e hidrogenofosfato dissódico (VETEC, Rio de Janeiro, Brasil). Cloreto de sódio para o ensaio da força iônica foi adquirido da VETEC (Rio de Janeiro, Brasil).

5.2.2. Instrumentação e condições cromatográficas

As amostras foram analisadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (Prominence Shimadzu LC-20AT) com injetor manual (Rheodyne 7725i), sendo utilizado um detector de arranjo de diodos (DAD). A separação foi realizada em uma coluna em fase

reversa da Phenomenex Kinetex C18 (4.6 mm d.i x 25cm c x 5 μ m d.p.). Foram utilizados volume de injeção de 20 μ L e a vazão de 1,0 ml min^{-1} . O gradiente de eluição selecionado e a fase móvel foram: ACN (A) 55% e água (B) 45% de 0-2,5 min; a concentração de A aumentou até 80% de 2,5-4,0 min e manteve-se constante até 7,5 min; e de 7,5-10,0 min a concentração de A diminuiu para 55%. O comprimento de onda máximo selecionado para as análises foi de 257 nm.

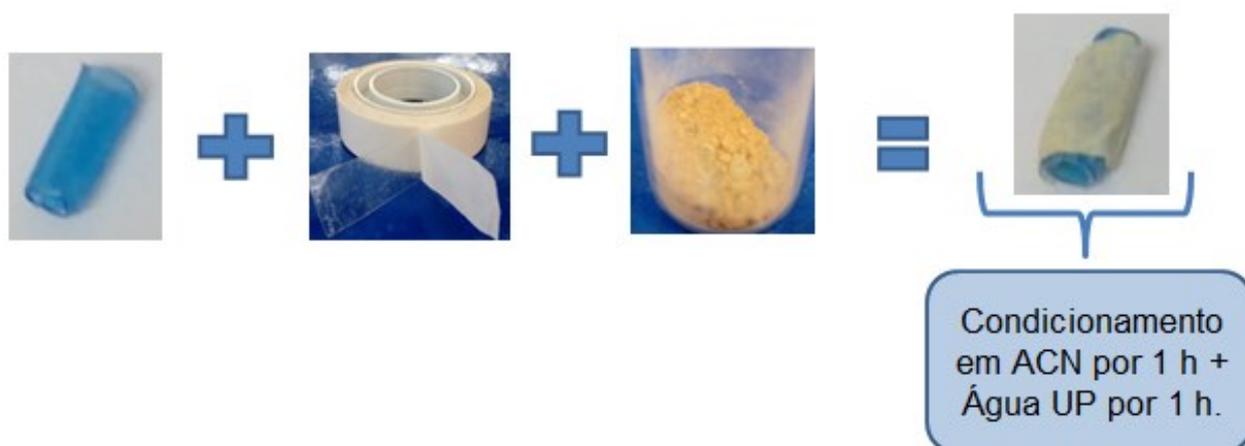
5.3. Preparação das nanopartículas magnéticas (MNPs)

A preparação das nanopartículas magnéticas funcionalizadas com histamina (MNP-HIS) está descrita no item 4.3.

5.4. Fabricação das barras adsortivas compostas pelas MNP-HIS

Para a confecção das barras adsortivas para a BA μ E, foi empregado um suporte de polipropileno de 7,5 mm e para fixar a fase extratora (MNP-HIS) usou-se uma fita dupla face (Adelbras, Ind. e Com. de Adesivos) de 5 mm de comprimento. Logo após, elas foram condicionadas com 300 μ L de acetonitrila e água por 1 h em cada solvente, usando um agitador orbital. O condicionamento foi realizado para limpar e remover o excesso de fase de extração (Figura 26). A quantidade de material foi limitada ao tamanho da barra, com a fita dupla-face revestida de forma homogênea no final.

Figura 26 - Preparo das barras adsortivas com recobrimento de MNP-HIS.



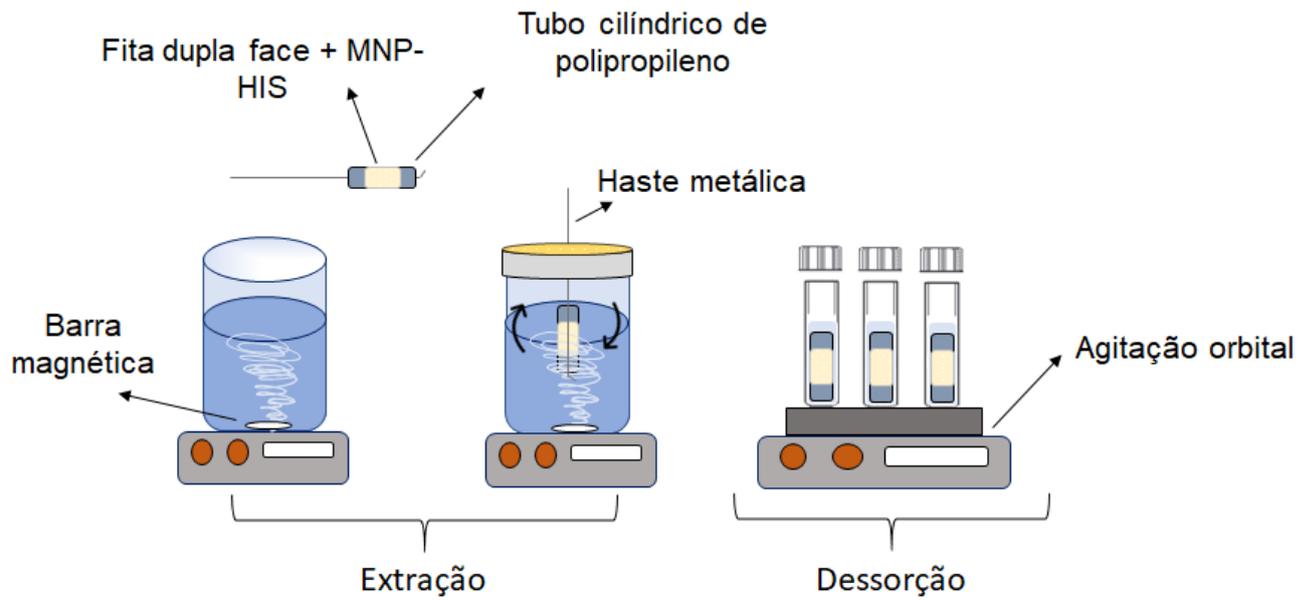
Fonte: Autoria própria (2019)

5.5. Etapas de otimização

As extrações foram feitas empregando frascos de 22 mL com 15 mL de água ultrapura fortificada com $500 \mu\text{g L}^{-1}$ dos analitos (Figura 27). Para a dessorção foram usados 250 μL de solvente orgânico em frascos de 1,5 mL com *inserts* com capacidade para até 500 μL . Nas etapas de extração e dessorção foram utilizadas agitação magnética e orbital, respectivamente. Depois do procedimento de extração/dessorção as barras adsorptivas foram condicionadas em acetonitrila e água por 30 min em cada solvente. O pH da amostra foi ajustado para 5, a variação do mesmo não foi otimizada devido aos compostos já se apresentarem na forma não ionizada em água. O tempo de extração foi de 90 min e a porcentagem de sal foi de 30% de NaCl. A etapa de dessorção foi realizada com 250 μL de acetonitrila:metanol (25:75 v/v) por 30 min.

Neste trabalho foram otimizadas as condições de extração e dessorção da técnica. Para tal, adotou-se planejamentos univariados e multivariados. Na etapa de dessorção foram avaliadas em triplicata e univariadamente tempos de 10 a 30 min. Para a escolha do solvente de dessorção (acetonitrila, água e metanol) foi feito um planejamento simplex lattice (Tabela 9). Na etapa de extração, o tempo de extração (30-90 min.), e o efeito *salting out* através da adição de sal (0-30%) foram avaliados pelo planejamento multivariado *Doehlert* (Tabela 10). Foram adotados para as análises dos dados os programas computacionais Statsoft Statistica 8.0, Origin 8.0 e Microsoft Excel.

Figura 27 – Esquema do procedimento de extração MNP-HIS/BaμE.



Fonte: Autoria própria (2019)

Tabela 9 - Experimentos do *simplex lattice* para escolha do(s) solvente(s) na etapa de dessorção líquida.

Experimentos	Água		Acetonitrila		Metanol	
	Proporção (%)	Proporção (v/v)	Proporção (%)	Proporção (v/v)	Proporção (%)	Proporção (v/v)
1	1,000	300 μL	0,000	0 μL	0,000	0 μL
2	0,000	0 μL	1,000	300 μL	0,000	0 μL
3	0,000	0 μL	0,000	0 μL	1,000	300 μL
4	0,500	150 μL	0,500	150 μL	0,000	0 μL
5	0,500	150 μL	0,000	0 μL	0,500	150 μL
6	0,000	0 μL	0,500	150 μL	0,500	150 μL
7 (ponto central)	0,333	100 μL	0,333	100 μL	0,333	100 μL
8 (ponto central)	0,333	100 μL	0,333	100 μL	0,333	100 μL
9 (ponto central)	0,333	100 μL	0,333	100 μL	0,333	100 μL

Fonte: Autoria própria (2019)

Tabela 10 - Experimentos do planejamento *Doehlert* para escolha do tempo de extração e porcentagem de sal.

Experimento	Tempo de extração (min)	NaCl (%)
1	30	15
2	45	0
3	45	30
4	60	15
5	60	15
6	60	15
7	75	0
8	75	30
9	90	15

Fonte: Autoria própria (2019)

5.6. Figuras analíticas de mérito

Os parâmetros analíticos de mérito foram determinados e avaliados com base nas orientações da Comissão Europeia (EUROPEAN COMMISSION, 2015). Foram feitas curvas de calibração para cada analito utilizando amostras de água ultrapura fortificadas com parabenos (metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno e butilparabeno) nas concentrações de 5 a 500 $\mu\text{g L}^{-1}$. Foram realizadas replicatas ($n=3$) das extrações utilizando as MNP-HIS. Os coeficientes de determinação foram obtidos a partir das curvas de calibração. O limite de quantificação (LOQ) foi estabelecido como sendo o primeiro nível de concentração da curva de calibração e o limite de detecção (LOD) foi calculado dividindo o LOQ por 3,3, tendo-se como referência estudos anteriores (DIAS, 2015; MERIB, *et al.*, 2016).

A exatidão e a precisão foram avaliadas realizando-se extrações em triplicatas em amostras de água de rio fortificadas com três níveis de concentração dos parabenos (5, 50 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$). A precisão foi obtida através do desvio padrão relativo (RSD) e considerou-se como aceitável o valor máximo de 20%. Para a exatidão o valor considerado como aceitável foi de 70-120% e a avaliação foi através da porcentagem da recuperação relativa (EUROPEAN COMMISSION, 2015).

O método proposto foi aplicado em amostras de água de lago universitário nas dependências do Hospital Universitario da UFSC (HU/UFSC), água de córrego (córrego universitário (CU)/UFSC) e água de mangue do Itacorubi em Florianópolis, Santa Catarina, Brasil (Figura 28). As amostras foram estocadas em frascos de âmbar devidamente esterilizados e conservadas sob refrigeração a 4 °C até a análise.

Figura 28 – Córrego universitário (CU/UFSC) (A), lago (HU/UFSC) (B), e mangue do Itacorubi (C).



Fonte: Adaptado de Mafra (2021)

5.7. Resultados e discussões

5.7.1. Caracterização da fase extratora MNP-HIS

A caracterização das nanopartículas magnéticas funcionalizadas com histamina (MNP-HIS) está descrita no item 4.7.1.

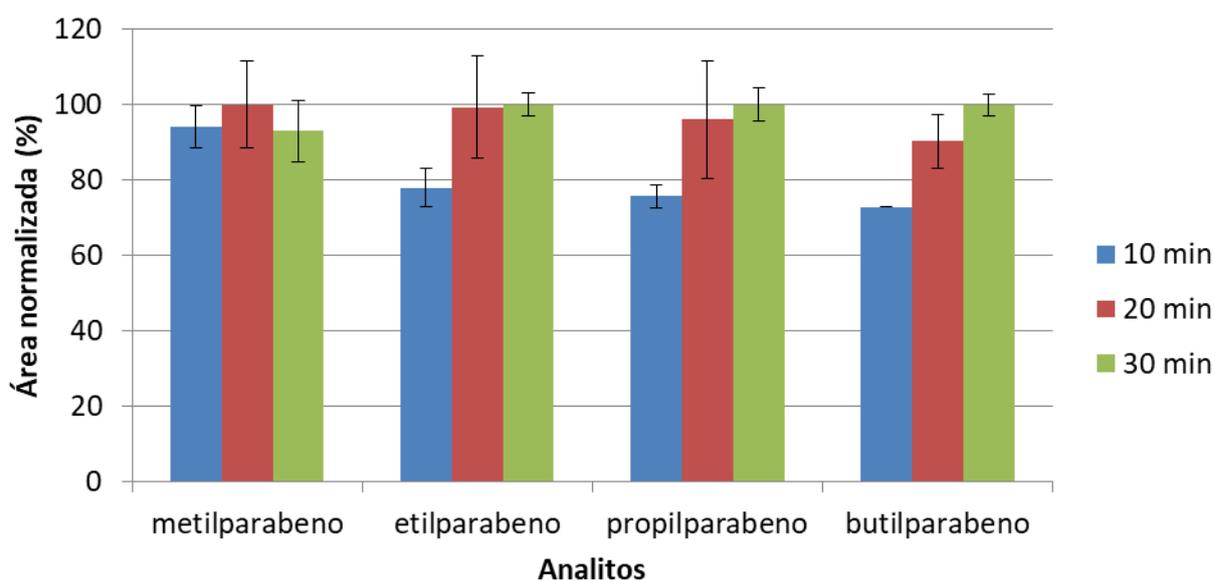
5.7.2. Otimização das etapas de dessorção

5.7.2.1. Tipo de solvente e tempo de dessorção

A dessorção é uma etapa importante no preparo da amostra e, para obter a resposta analítica máxima, o tempo de dessorção e o tipo de solvente de dessorção foram estudados. O tempo de dessorção foi avaliado de forma univariada para 10, 20 e 30 min de dessorção e os resultados são apresentados na Figura 29. De acordo com a Figura 29, a condição ótima foi

obtida quando 30 min foi utilizado. Percebe-se que com 30 min já ocorre uma estabilização na área normalizada do pico. Quando foram usados 10 min, uma menor eficiência de dessorção foi obtida. Uma possível explicação é que esse tempo não foi suficiente para uma boa interação entre o solvente e os compostos. Para o tempo de dessorção de 20 min, as respostas foram muito próximas às de 30 min. Porém, este tempo apresentou RSD maior, e para garantir a dessorção máxima dos analitos foi escolhido 30 min.

Figura 29 - Escolha do tempo de dessorção.



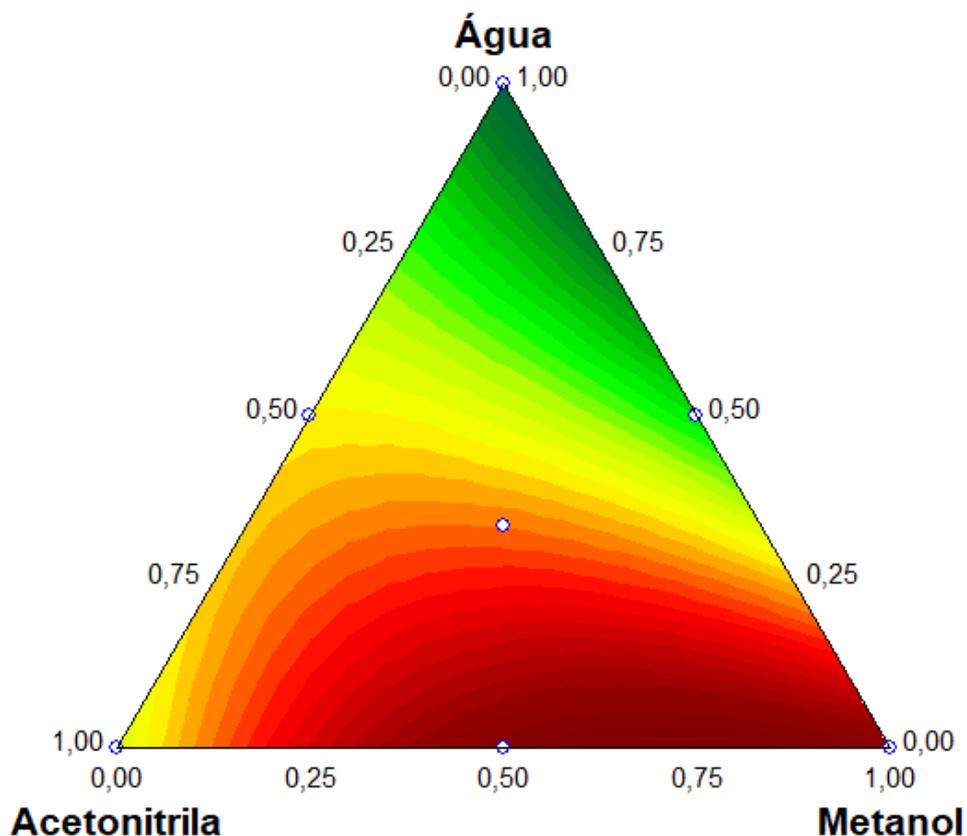
*Gráfico de barras para a otimização do tempo de dessorção, utilizando 250 μL de ACN como solvente de dessorção. Condições experimentais: 15 mL de amostra de água ultrapura fortificada com 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ de parabenos, pH da amostra 5,0, sem adição de sal e tempo de extração de 60 min. Analitos: metilparabeno (MP), etilparabeno (EP), propilparabeno (PP) e butilparabeno (BP).

Fonte: Autoria própria (2021)

Para selecionar o tipo de solvente de dessorção, ACN, MeOH e água ultrapura foram avaliados usando planejamento *simplex-lattice* e a média geométrica das áreas dos picos como resposta (Figura 30). De acordo com a Figura 30, a água ultrapura não se mostrou viável, pois não apresenta uma boa interação para remoção dos analitos da fase extratora. A mistura de ACN e MeOH apresentou melhores resultados. A partir do uso de 50% de MeOH houve aumento na resposta analítica. A tendência indica respostas mais próximas do metanol, porém, com a mistura de ACN em pequena proporção foi possível obter uma melhor

resposta, pois a interação analito e fase extratora foi superada, assim, foi escolhida uma combinação de 25% ACN e 75% MeOH.

Figura 30 - Escolha do solvente de dessorção ($r^2 = 0,9799$).



*Superfície triangular obtida a partir do planejamento *simplex lattice* para a otimização do tipo de solvente de dessorção usando 250 μL e tempo de dessorção de 30 min. Condições experimentais: 15 mL de amostra de água ultrapura fortificada com 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ de parabenos, pH da amostra 5,0, sem adição de sal e tempo de extração de 60 min. Analitos: metilparabeno (MP), etilparabeno (EP), propilparabeno (PP) e butilparabeno (BP).

Fonte: Autoria própria (2021)

5.7.3. Otimização das condições de extração

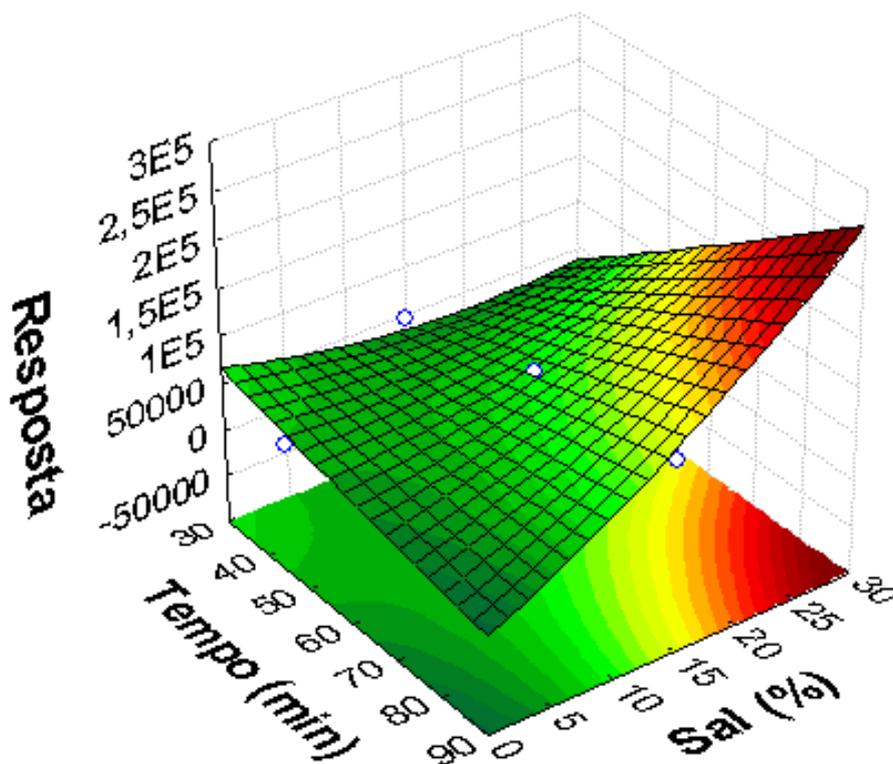
5.7.3.1. Otimização do tempo de extração e força iônica

O BA μ E é uma técnica de extração não exaustiva, portanto, é necessário atingir a condição de equilíbrio ou pré-equilíbrio para uma extração quantitativa dos analitos alvo.

Assim, o tempo de extração é uma variável importante a ser estudada, uma vez que depende da cinética de transferência de massa dos compostos na fase sorvente e na fase aquosa (NENG, *et al.*, 2015; AHMAD, *et al.*, 2016; IDE, *et al.*, 2016; AHMAD, *et al.*, 2014). A concentração de sal também pode influenciar na eficiência de extração devido ao efeito *salting out*. Isso ocorre quando a água solvata preferencialmente os íons salinos, diminuindo a solubilidade dos analitos na amostra e favorecendo sua migração para a fase sorvente (AHMAD, *et al.*, 2016; AHMAD, *et al.*, 2014). Portanto, a porcentagem de NaCl (0-30%) e o tempo de extração (30-90 min.) foram otimizados, empregando um planejamento Doehlert e usando as médias geométricas das áreas dos picos dos analitos como resposta (Figura 31).

De acordo com a Figura 31, quanto maior o tempo de extração maior será a resposta obtida. O mesmo comportamento foi observado para a porcentagem de sal, visto que a eficiência de extração aumentou com a utilização da quantidade máxima de sal. Assim, foram selecionados os tempos de extração de 90 min e 30% de NaCl.

Figura 31- Superfície de resposta obtida tempo de extração versus % de sal ($r^2 = 0,9464$) na extração dos parabenos por BA μ E /MNP-HIS.



Fonte: Autoria própria (2021)

5.7.4. Parâmetros analíticos de mérito e análise das amostras

Para cada composto, uma curva de calibração foi construída aplicando condições otimizadas de extração e dessorção em amostras de água, e os parâmetros analíticos de mérito foram obtidos. Foram determinados os coeficientes de determinação (r^2), faixa linear de trabalho, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ) e precisão (RSD). Os dados são exibidos na Tabela 2. Para todos os analitos, o r^2 foi maior que 0,99 e a faixa linear variou de 5 a 500 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os LOD e LOQ foram de 1,5 e 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, para todos os compostos. A precisão intra-dia variou de 1 para EP, PP e BP a 3% para MP, EP, PP e BP, e a precisão inter-dia variou de 3 para EP a 18% para BP.

Tabela 11 – Faixa linear, limites de detecção (LOD), limites de quantificação (LOQ), coeficientes de determinação e precisão intradia e interdia obtidos para o método proposto para extração de parabenos em amostras de água usando HIS-MNP/BA μ E.

Analitos	Faixa linear de trabalho ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	r^2	Precisão (intradia) ^a (n=3)		Precisão (interdia) ^a (n=9)	
					$\mu\text{g L}^{-1}$	%	$\mu\text{g L}^{-1}$	%
MP	5,0-500,0	1,5	5,0	0,9971	5,0	3	5,0	11
					50,0	2	50,0	12
					500,0	2	500,0	10
EP	5,0-500,0	1,5	5,0	0,9963	5,0	1	5,0	3
					50,0	1	50,0	12
					500,0	3	500,0	12
PP	5,0-500,0	1,5	5,0	0,9961	5,0	1	5,0	12
					50,0	1	50,0	9
					500,0	3	500,0	10
BP	5,0-500,0	1,5	5,0	0,9961	5,0	3	5,0	18
					50,0	3	50,0	5
					500,0	1	500,0	8

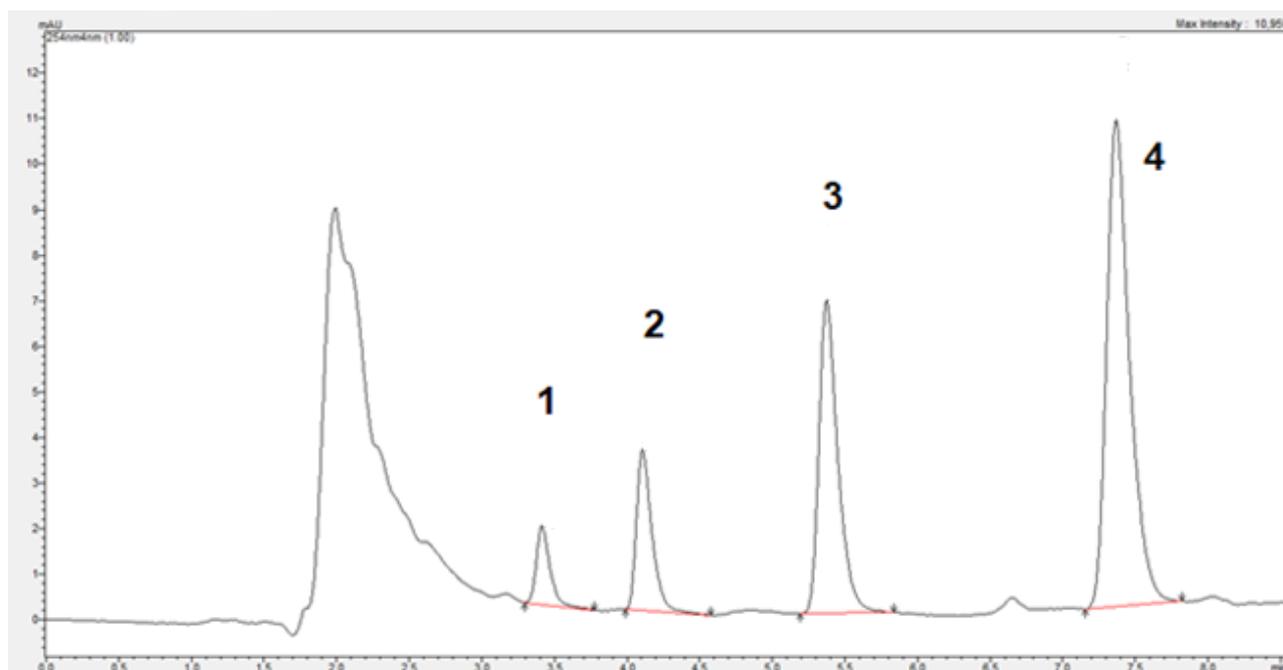
^a Precisões intradia e interdia foram calculadas baseadas no desvio padrão relativo (RSD)

Fonte: Autoria própria (2021)

As recuperações relativas dos analitos em amostras de água de lago (HU/UFSC), água de córrego (CU/UFSC) e água de mangue foram usadas para avaliar a precisão do método. As amostras de água foram fortificadas nas concentrações 5, 50 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ dos analitos em triplicatas (n = 3). Os resultados são apresentados na Tabela 13. De acordo com a Tabela 13, as recuperações relativas (R) variaram de 81% a 125%, e os desvios padrão

relativos (RSD) variaram de 1 a 16%. Na análise de amostras não fortificadas, as concentrações dos parabenos ficaram abaixo do LOD do método proposto. A Figura 32 representa um dos cromatogramas obtidos com a amostra do córrego universitário com parabenos na concentração de $50 \mu\text{g L}^{-1}$.

Figura 32 – Cromatograma obtido após a extração por MNP-HIS/BaμE e determinação por HPLC-DAD para a amostra de água do córrego universitário (CU/UFSC) fortificada com $50 \mu\text{g L}^{-1}$ dos parabenos monitorados em 254 nm. Ordem de eluição: 1, metilparabeno; 2, etilparabeno; 3, propilparabeno e 4, butilparabeno.



Fonte: Autoria própria (2021)

Tabela 12 – Recuperação (R%) e precisão (RSD%) usando o método proposto (n = 3).

Analito	Nível fortificado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Água de lago (HU/UFSC)		Água de córrego (CU/UFSC)		Água de mangue	
		R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)
MP	5,0	89	10	84	1	93	3
	50,0	119	5	100	6	104	8
	500,00	125	2	111	1	118	2
EP	5,0	99	4	117	2	114	6
	50,0	110	9	97	6	93	1
	500,00	116	8	96	4	111	16
PP	5,0	95	6	101	3	95	8
	50,0	84	1	82	7	81	9
	500,00	111	8	96	6	111	3
BP	5,0	89	3	82	4	105	9
	50,0	94	2	99	7	99	1
	500,00	103	8	90	9	102	4

Fonte: Autoria própria (2021)

A comparação do método proposto com outros trabalhos anteriormente relatados na literatura é apresentada na Tabela 14. Os LODs obtidos foram inferiores (ARIFFIN, *et al.*, 2019; BLANCO, *et al.*, 2009; DIAS, *et al.*, 2015, 35, RAMOS-PAYAN, *et al.*, 2017) ou semelhantes (MAFRA, *et al.*, 2019) sendo apenas superiores ao trabalho de Almeida e Nogueira (2014), proporcionando assim um resultado satisfatório, e as faixas lineares de trabalho foram consideravelmente maiores, variando de 5 a 500 $\mu\text{g L}^{-1}$. Pois o tempo de extração é de 90 min, sendo semelhante a alguns trabalhos (DIAS, *et al.*, 2015; MAFRA, *et al.*, 2019), porém é possível realizar mais de uma extração ao mesmo tempo, sendo seis realizadas simultaneamente, proporcionando um tempo de 15 min por extração sendo ligeiramente mais próximo de outros métodos feitos um de cada vez (ARIFFIN, *et al.*, 2019; RAMOS-PAYAN, *et al.*, 2017) ou mesmo muito inferior a 16 h (ALMEIDA; NOGUEIRA, 2014). O método também avalia os 4 parabenos simultaneamente, enquanto alguns trabalhos fazem apenas dois ou três deles (ARIFFIN, *et al.*, 2019; DIAS, *et al.*, 2015; RAMOS-PAYAN, *et al.*, 2017).

Além disso, o HIS-MNP apresentou alta área superficial e boa porosidade, colaborando com a seletividade do método para alguns analitos com valores LOD inferiores aos já relatados. A proposta de utilizar BA μ E com esse nanomaterial é uma metodologia inédita, e se mostrou um método bem sucedido e promissor nessa aplicação.

Tabela 13 – Comparação do método proposto com estudos previamente relatados na literatura.

Referência	Analitos	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Faixa Linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Técnica de extração	Tempo de extração	Técnica analítica
Este Trabalho	MP	1,5	5,0-500,0	HIS-MNP/BA μ E	90 min	HPLC-DAD
	EP	1,5	5,0-500,0			
	PP	1,5	5,0-500,0			
	BP	1,5	5,0-500,0			
Blanco, <i>et al.</i> , 2009	MP	2,2	5,0-1000,0	SPE-LVSS ^a	60 s	CE-DAD
	EP	2,3	5,0-1000,0			
	PP	1,9	5,0-1000,0			
	BP	1,8	5,0-1000,0			
Dias, <i>et al.</i> , 2015	MP	2,5	8,0-400,0	Cortiça/BA μ E	90 min	HPLC-DAD
	EP	1,0	3,2-400,0			
Ramos-Payan, <i>et al.</i> , 2017	EP	3,5	-	DF- μ LPME ^b	5 min	HPLC-DAD
	PP	1,8	-			
	BP	2,6	-			
Mafra, <i>et al.</i> , 2019	MP	1,5	5,0-500,0	Pa-SDME ^c	90 min	HPLC-DAD
	EP	1,5	5,0-500,0			
	PP	1,5	5,0-500,0			
	BP	1,5	5,0-500,0			
Ariffin, <i>et al.</i> , 2019	MP	3,5	10,0-1000,0	MSPE-MNP@DC19 3C	10 min	HPLC-UV
	EP	5,0	10,0-1000,0			
	PP	6,3	10,0-1000,0			
Almeida; Nogueira, 2014	MP	0,1	0,5-28,0	BA μ E	16 h	HPLC-DAD
	EP	0,1	0,5-28,0			
	PP	0,1	0,5-28,0			
	BP	0,1	0,5-28,0			

^aStacking com injeção de grande volume.

^bMicroextração em fase líquida baseada em microfluídico de fluxo duplo.

^cMicroextração em gota única paralela.

5.7.5. Reprodutibilidade e estabilidade das HIS-MNP como uma fase de extração para BA μ E.

A reprodutibilidade das HIS-MNP combinada com a BA μ E foi verificada usando seis barras diferentes para extrações simultâneas e os analitos na concentração de 500 $\mu\text{g L}^{-1}$. O desvio padrão relativo (RSD) entre as barras variou de 5% para o metilparabeno a 13% para o butilparabeno. Esses resultados são apresentados na Tabela 11. Todos os RSDs foram inferiores a 20% e a técnica proposta foi considerada reprodutível. Além disso, a estabilidade das HIS-MNP apresentada na Figura 33 foi encontrada em dezoito ciclos de extração/dessorção apresentando até 80% de eficiência. Todos os RSDs obtidos estão abaixo

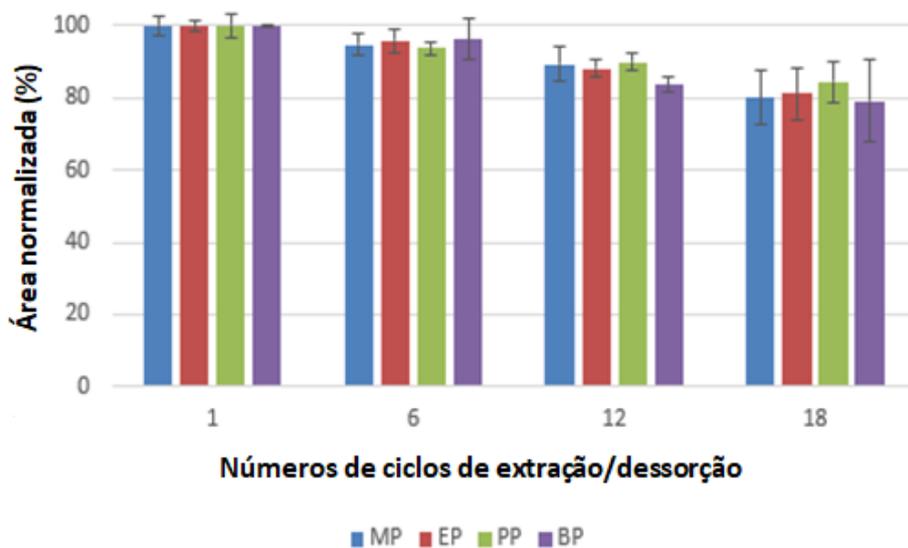
de 7,5% para os 4 analitos em 500 $\mu\text{g L}^{-1}$, assim, extrações e dessorção podem ser realizadas 18 vezes usando a mesma barra.

Tabela 14 – Reprodutibilidade da produção das barras com HIS-MNP.

Analito	RSD (%)
MP	5
EP	11
PP	12
BP	13

Fonte: Autoria própria (2021)

Figura 33 - Gráfico de barras da estabilidade de HIS-MNP/BA μ E para os 4 analitos.



Fonte: Autoria própria (2021)

5.8. Conclusões

A HIS-MNP usada como sorvente para BA μ E foi aplicada satisfatoriamente na determinação de MP, EP, PP e BP em amostras de água. A abordagem desenvolvida apresentou resultados satisfatórios de LOD, LOQ, coeficientes de determinação, exatidão e precisão. O método é ambientalmente amigável e não requer nenhum solvente adicional. Além disso, o HIS-MNP/BA μ E é de baixo custo e pode ser reutilizado por até 18 ciclos de extração/dessorção. Além da facilidade de aplicação, o procedimento pode ser utilizado para análises de outras amostras e para diversos tipos de compostos. Além disso, o HIS-MNP forneceu uma boa extração dos analitos alvo e ensaios livres de efeitos de memória.

CAPÍTULO VI – CONCLUSÃO FINAL E PERSPECTIVAS

Neste trabalho foram apresentadas novas metodologias empregando nanopartículas magnéticas funcionalizadas com histamina (MNP-HIS) como fase sorvente alternativa associada com técnicas de microextração. A combinação das MNP-HIS com diferentes abordagens de extração proporcionou a união das vantagens de se utilizar uma nanopartícula com um recobrimento que permite uma melhor extração dos analitos além da sua elevada área superficial, e o uso da microextração em filme fino (TFME) junto ao sistema de 96 poços e a microextração adsortiva em barra (BaμE) contribuíram para a rapidez, facilidade de aplicação, baixo custo e da possibilidade de realizar extrações em simultâneo.

No primeiro estudo, as MNP-HIS foram aliadas a TFME/96-*well plate* para analisar desreguladores endócrinos (estrona, 17-β-estradiol, estriol, 17-α-etinilestradiol, 4-octilfenol e 4-nonilfenol) em matrizes aquosas por HPLC-FLD. Posteriormente, adotou-se a técnica de BaμE juntamente com as MNP-HIS para a determinação de parabenos (metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno e butilparabeno) em amostras de água por HPLC-DAD. Ambas as metodologias se mostraram eficientes e foram aplicadas com sucesso. As condições de extração e dessorção dos métodos foram otimizadas e os parâmetros analitos de mérito obtidos foram satisfatórios além de exibir benefícios quando comparado com outras abordagens da literatura, tais como, o aumento da frequência analítica, fácil manuseio e aplicação, sem a necessidade de solventes adicionais e a reutilização da fase extratora.

As MNP-HIS empregadas como fase sorvente na TFME/96-*well plate* e na BaμE mostraram-se promissoras para a aplicação na determinação de diversos grupos de analitos e na combinação com diferentes técnicas de microextração. Os trabalhos também exploraram a viabilidade de aderir as nanopartículas a uma superfície e assim evitar possíveis problemas como a aglomeração das mesmas.

Inúmeras vantagens podem ser destacadas na combinação de MNP-HIS com técnicas de microextração. A TFME/96-*well plate* com MNP-HIS como sorvente mostrou-se uma ferramenta eficiente para a análise de até 96 extrações simultâneas e conseqüentemente elevando a frequência analítica do método. Aliado a isso, o baixo consumo de amostra e a facilidade de manuseio. Quando as NMP-HIS são empregadas como fase extratora para a BaμE, evidencia-se benefícios como o fácil preparo das barras e o baixo custo para a obtenção das mesmas além da possibilidade da utilização da meia barra e, conseqüentemente, melhorando o fator de enriquecimento. Ademais, as barras apresentam uma durabilidade satisfatória e oportuniza extrações simultâneas. Em ambas as abordagens, ressalta-se que não

é necessária a adição de nenhum solvente extra e proporciona a reutilização da fase sorvente, sendo as mesmas ambientalmente amigáveis. Além disso, uma simples etapa de limpeza pode ser usada fazendo com que as metodologias não apresentem efeito de memória.

Como perspectivas, podemos citar a possibilidade de automatização das técnicas que colaborariam na diminuição dos erros ocasionados pelo laboratorista. As MNP-HIS também podem ser associadas a outras técnicas de preparo de amostra. Alguns exemplos seriam a aplicação das nanos como fase receptora em microextrações em fase líquida suportadas com membranas juntamente com o sistema de 96 poços, a combinação com solventes supramoleculares (SUPRAS), o uso de barras magnéticas como suporte para explorar ainda mais as propriedades de dispersão, entre muitas outras. As propriedades catalíticas das MNP-HIS podem ser averiguadas e combinadas com os procedimentos de microextração. Ainda podem-se realizar modificações nas MNP-HIS para aperfeiçoar a seletividade das mesmas e aplicar para diferentes grupos de compostos. Desta forma, busca-se obter ainda mais precisão e exatidão nas metodologias além diminuir o tempo de análise.

REFERÊNCIAS

Abujaber, F.; Ahmad, S. M.; Neng, N. R.; Martín-Doimeadios, R. C. R.; Bernardo, F. J. G.; Nogueira, J. M. F. Bar adsorptive microextraction coated with multi-walled carbon nanotube phases - Application for trace analysis of pharmaceuticals in environmental waters. *Journal of Chromatography A*. v. 1600, p. 17–22, 2019.

Ahmad, S. M.; Almeida, C.; Neng, N. R.; Nogueira, J. M. F. Application of bar adsorptive microextraction (BA μ E) for anti-doping control screening of anabolic steroids in urine matrices. *Journal of Chromatography B*. v. 969, p. 35–41, 2014.

Ahmad, S. M.; Almeida, C.; Neng, N. R.; Nogueira, J. M. F. Bar adsorptive microextraction (BA μ E) coated with mixed sorbent phases—Enhanced selectivity for the determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in real matrices in combination with capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B*. v. 1008, p.115–124, 2016.

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.

Alcudia-León, M. C.; Lucena, R.; Cárdenas, S.; Valcárcel, M.; Determination of parabens in waters by magnetically confined hydrophobic nanoparticle microextraction coupled to gas chromatography/mass spectrometry. *Microchemical Journal*. v. 110, p. 643–648, 2013.

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

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

Alves, S. I. C. Validação de um método analítico para a identificação de ácidos gordos voláteis em águas intersticiais de sedimentos marinhos por SPME-GC-MS. Dissertação de Mestrado, Universidade de Lisboa, 88p, 2014.

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

Amiri, A.; Baghayeri, M.; Nori, S. Magnetic solid-phase extraction using poly(paraphenylenediamine) modified with magnetic nanoparticles as adsorbent for analysis of monocyclic aromatic amines in water and urine samples. *Journal of Chromatography A*. v. 1415, p. 20–26, 2015.

Ariffin, M. M.; Azmi, H. M.; Saleh, A. N. M.; Mohamad, S.; Rozi, S. K. M. Surfactant functionalisation of magnetic nanoparticles: A greener method for parabens determination in water samples by using magnetic solid phase extraction. *Microchemical Journal*. v. 147, p. 930–940, 2019.

Augusto, F.; Carasek, E.; Silva, R. G. C.; Rivellino, S. R.; Batista, A. D.; Martendal, E. New sorbents for extraction and microextraction techniques. *J. Chromatogr. A*. v. 1217, p. 2533–2542, 2010.

Ayazia, Z.; Esfahlana, F. S.; Khoshhesab, Z. M. 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. *Anal. Methods*. v. 10, p. 3043–3051, 2018.

Azmir, J.; Zaidul, I.S.M.; Rahman, M. M.; Sharif, K. M.; Mohamed, A.; Sahena, F.; Jahurul, M. H. A.; Ghafoor, K.; Norulaini, N. A. N.; Omar, A.K.M. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*. v. 117 p. 426–436, 2013.

Azzouz, A.; Kailasa, S. K.; Lee, S. S.; Rascón, A. J.; Ballesteros, E.; Zhang, M.; Kim, K. Review of nanomaterials as sorbents in solid-phase extraction for environmental samples, *Trends in Analytical Chemistry*. v. 108, p. 347-369, 2018.

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

Barreto, I. S. Um método automático para em fase sólida magnética de Cd e Pb em águas e Cd em óleo comestível e detecção por GF AAS. Tese de Doutorado, Universidade Federal da Paraíba, 114p, 2016.

Becerra-Herrera, M.; Miranda, V.; Arismendi, D.; Richter, P. Chemometric optimization of the extraction and derivatization of parabens for their determination in water samples by rotating-disk sorptive extraction and gas chromatography mass spectrometry. *Talanta*. v. 176, p. 551–557, 2018.

Beltran, A.; Marcé, R. M.; Cormack, P. A. G.; Borrull, F. Synthetic approaches to parabens molecularly imprinted polymers and their applications to the solid-phase extraction of river water samples. *Analytica Chimica Acta*. v. 677, p. 72–78, 2010.

Benedé, J. L.; Chisvert, A.; Giokas, D. L.; Salvador, A. Development of stir bar sorptive-dispersive microextraction mediated by magnetic nanoparticles and its analytical application to the determination of hydrophobic organic compounds in aqueous media. *Journal of Chromatography A*. v. 1362, p. 25–33, 2014.

Berton, P.; Lana, N. B.; Ríos, J. M.; García-reyes, J. F.; Altamirano, J. C. State of the art of environmentally friendly sample preparation approaches for determination of PBDEs and metabolites in environmental and biological samples: A critical review. *Analytica Chimica Acta*. v. 905, p. 24– 41, 2016.

Blanco, E.; Casais, M. C.; Mejuto, M. C.; Cela, R. Combination of off-line solid-phase extraction and on-column sample stacking for sensitive determination of parabens and p-

hydroxybenzoic acid in waters by non-aqueous capillary electrophoresis. *Analytica Chimica Acta*. v. 647, p. 104–111, 2009.

Boyacı, E.; Gorynski, K.; Rodriguez-Lafuente, A.; Bojko, B.; Pawliszyn, J. Introduction of solid-phase microextraction as a high-throughput sample preparation tool in laboratory analysis of prohibited substances. *Analytica Chimica Acta*. v. 809 p. 69– 81, 2014.

Boyacı, E.; Gorynski, K.; Viteri, C. R.; Pawliszyn, J. 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.

Borges, K. B.; Figueiredo, E. C.; Queiroz, M. E. C. **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos**, 1 ed., LTC, Rio de Janeiro, 2015.

Bronstein, L. M.; Huang, X.; Retrum, J.; Schmucker, A.; Pink, M.; Stein, B. D.; Dragnea, B. Influence of Iron Oleate Complex Structure on Iron Oxide Nanoparticle Formation. *Chem. Mater.* v. 19, p. 3624–3632, 2007.

Cai, P.; Li, D.; Chen, J.; Xiong, C.; Ruan, J. Comparison of two thin-film microextractions for the analysis of estrogens in aqueous tea extract and environmental water samples by high performance liquid chromatography-ultraviolet detection. *Food Chemistry*. v. 173, p. 1158–1166, 2015.

Campedelli, R. R. Nanopartículas Magnéticas Funcionalizadas com Bases Orgânicas para Aplicação em Reações de Degradação de Organofosforados. Qualificação de doutorado, Universidade Federal de Santa Catarina, 53 p, 2017.

Carasek, E.; Merib, J. Membrane-based microextraction techniques in analytical chemistry: a review. *Anal. Chim. Acta*. v. 880, p. 8–25, 2015.

Casado-Carmona, F. A.; Alcudia-León, M. C.; Lucena, R.; Cárdenas, S.; Valcárcel M. Magnetic nanoparticles coated with ionic liquid for the extraction of endocrine disrupting compounds from waters. *Microchemical Journal*. v. 128, p. 347–353, 2016.

Castro, M. D. L.; Priego-Capote, F. Soxhlet Extraction Versus Accelerated Solvent Extraction. *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*. v. 2, p. 83-103, 2012.

Chisvert, A.; Cárdenas, S.; Lucena, R. Dispersive micro-solid phase extraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. v. 112, p. 226-233, 2018.

Dias, A. N.; Silva, A. C.; Simão, V.; Merib, J.; Carasek, E. A novel approach to bar adsorptive microextraction: Cork as extractor phase for determination of benzophenone, triclocarban and parabens in aqueous samples. *Analytica Chimica Acta*. v. 888, p. 59–66, 2015.

Dias, A. N. Cortiça: uma nova abordagem como fase extratora para microextração em fase sólida e microextração em barra adsortiva. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina, 151p, 2015.

Díaz-Álvarez, M.; Turiel, E.; Martín-Esteban, A. Hollow fibre liquid-phase microextraction of parabens from environmental waters. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. v. 93, p. 727–738, 2013.

Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the Council of 12 August 2013 Amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as Regards Priority Substances in the Field of Water Policy.

Farajzadeh, M. A.; Djozan, D.; Bakhtiyari, R. F. Use of a capillary tube for collecting an extraction solvent lighter than water after dispersive liquid–liquid microextraction and its application in the determination of parabens in different samples by gas chromatography—Flame ionization detection. *Talanta*. v. 81, p. 1360–1367, 2010.

Farajzadeh, M. A.; Khosrowshahi, E. M.; Khorram, P. Simultaneous derivatization and air-assisted liquid-liquid microextraction of some parabens in personal care products and their determination by GC with flame ionization detection. *Journal of Separation Science*. v. 36, p. 3571–3578, 2013.

Feng, J.; He, X.; Liu, X.; Sun, X.; Li, Y. Preparation of magnetic graphene/mesoporous silica composites with phenyl-functionalized pore-walls as the restricted access matrix solid phase extraction adsorbent for the rapid extraction of parabens from water-based skin toners, *Journal of Chromatography A*. 1465 (2016) 20–29.

Fumes, B. H.; Lanças, F. M. Use of graphene supported on aminopropyl silica for microextraction of parabens from water samples, *Journal of Chromatography A*. 1487 (2017) 64–71.

Heidari, H.; Razmi, H. Multi-response optimization of magnetic solid phase extraction based on carbon coated Fe₃O₄ nanoparticles using desirability function approach for the determination of the organophosphorus pesticides in aquatic samples by HPLC–UV. *Talanta*. v. 99, p. 13–21, 2012.

Huang, Y.; Lee, H. K.; Shih, H.; Jen, J. A sublimate sorbent for stir-bar sorptive extraction of aqueous endocrine disruptor pesticides for gas chromatography-electron capture detection. *Journal of Chromatography A*. v. 1564 p. 51–58, 2018.

Ide, A. H.; Ahmad, S. M.; Neng, N. R.; Nogueira, J. M. F. Enhancement for trace analysis of sulfonamide antibiotics in water matrices using bar adsorptive microextraction (BA μ E). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. v. 129, p. 593–599, 2016.

Ide, A. H.; Nogueira, J. M. F. New-generation bar adsorptive microextraction (BA μ E) devices for a better eco-user-friendly analytical approach – Application for the determination of antidepressant pharmaceuticals in biological fluids. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. v. 153, p. 126–134, 2018.

Jagirani, M. S.; Soyloka, M. A review: Recent advances in solid phase microextraction of toxic pollutants using nanotechnology scenario. *Microchemical Journal*, v. 159, 105436, p. 1–17, 2020.

Jahnke, A.; Mayer, P.; Broman, D.; McLachlan, M. S. Possibilities and limitations of equilibrium sampling using polydimethylsiloxane in fish tissue. *Chemosphere* v. 77, p. 764–770, 2009.

Jalilian, N.; Ebrahimzadeh, H.; Asgharinezhad, A. A. Preparation of magnetite/multiwalled carbon nanotubes/metal-organic framework composite for dispersive magnetic micro solid phase extraction of parabens and phthalate esters from water samples and various types of cream for their determination with liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. v. 1608, 460426, 2019.

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

Jele'n, H. H. et al. Microextraction techniques in the analysis of food flavor compounds: A review. *Analytica Chimica Acta*. v. 738, p. 13-26, 2012.

Jiang, R.; Pawliszyn, J. Thin-film microextraction offers another geometry for solid-phase microextraction. *Trends in Analytical Chemistry*. v. 32, p. 245-253, 2012.

Kawaguchi, M.; Takahashi, S.; Seshimo, F.; Sakui, N.; Okanouchi, N.; Ito, R.; Inoue, K.; Yoshimura, Y.; Izumi, S.; Makino, T.; Nakazawa, H. Determination of 4-*tert*-octylphenol and 4-nonylphenol in laboratory animal feed sample by stir bar sorptive extraction followed by liquid desorption and column-switching liquid chromatography–mass spectrometry with solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A*. v. 1046, p. 83–88, 2004.

Kirschner, N.; Dias, A. N.; Budziak, D.; Silveira, C. B.; Merib, J.; Carasek, E. 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.

Koumaki, E.; Mamais, D.; Noutsopoulos, C. Assessment of the environmental fate of endocrine disrupting chemicals in rivers. *Science of the Total Environment*. v. 628–629, p. 947–958, 2018.

Krantzberg, G.; Hartley, P. Feasible policy development and implementation for the destruction of endocrine disruptors in wastewater. *Science of the Total Environment*. v. 631–632, p. 246–251, 2018.

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

Li, N. et al. A novel dispersive solid-phase extraction method using metal-organic framework MIL-101 as the adsorbent for the analysis of benzophenones in toner. *Talanta*. v. 132, p. 713–718, 2015.

Li, D.; Zou, J.; Cai, P.; Xiong, C.; Ruan, J. 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.

Liu, Y.; Guerrouache, M.; Kebe, S. I.; Carbonnier B.; Le Droumaguet, B. Gold nanoparticles-supported histamine-grafted monolithic capillaries as efficient microreactors for flow-through reduction of nitro-containing compounds. *J. Mater. Chem. A*. v. 5, 1 p. 11805–11814, 2017.

Lu, H.; Xu, S. Mesoporous structured estrone imprinted Fe₃O₄@SiO₂@mSiO₂ for highly sensitive and selective detection of estrogens from water samples by HPLC. *Talanta*. v. 144 p. 303–311, 2015.

Mafra, G.; Oenning, A. L.; Dias, A. N.; Merib, J.; Budziak, D.; Silveira, C. B.; Carasek, E. 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.; Vieira, A. A.; Merib, J.; Anderson, J. L.; Carasek, E. Single drop microextraction in a 96-well plate format: a step toward automated and high-throughput analysis. *Analytica Chimica Acta*. v. 1063, p. 159-166, 2019.

Mehdinia, A.; Mousavi, M. F. Enhancing extraction rate in solid-phase microextraction by using nano-structured polyaniline coating. *J. Sep. Sci.* v. 31, p. 3565 – 3572, 2008.

Merib, J.; Spudeit, D. A.; Corazza, G.; Carasek, E.; Anderson, J. L. 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*. 2018.

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

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

Monneret, C. What is an endocrine disruptor?. *C. R. Biologies*. v. 340, p. 403–405, 2017.

Morés, L.; Dias, A. N.; 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, 2018.

Moura, C. L. Nanopartículas lipídicas sólidas magnéticas multifuncionais à base de cera de carnaúba com potencial aplicação terapêutica. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Ceará, 112p, 2017.

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

Nakamura, S.; Daishima, S. Simultaneous determination of alkylphenols and bisphenol A in river water by stir bar sorptive extraction with in situ acetylation and thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. v. 1038, p. 291–294, 2004.

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

Neng, N. R.; Ahmad, S. M.; Gaspar, H.; Nogueira, J. M. F. Determination of mitragynine in urine matrices by bar adsorptive microextraction and HPLC analysis. *Talanta*, 144 (2015) 105–109.

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

Nogueira, J. M. F. Microextração adsortiva em barra (BA μ E): Um conceito analítico inovador para microextração estática. *Scientia Chromatographica*. v. 5, p. 275-283, 2013.

Núñez, L.; Turiel, E.; Martín-Esteban, A.; Tadeo, J. L. Molecularly imprinted polymer for the extraction of parabens from environmental solid samples prior to their determination by high performance liquid chromatography–ultraviolet detection, *Talanta*. 80 (2010) 1782–1788.

Oenning, A. L.; Morés, L.; Dias, A. N.; Carasek, E. 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.

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

Pastor-Belda, M.; Marín-Soler, L.; Campillo, N.; Viñas, P.; Hernández-Córdoba, M. Magnetic carbon nanotube composite for the preconcentration of parabens from water and urine samples using dispersive solid phase extraction. *Journal of Chromatography A*. v. 1564, p. 102–109, 2018.

Pawliszyn, J. **Handbook of Solid Phase Microextraction**. Chemical Industry Press, Ontario, 2009, 410 p.

Pessoa, G. P.; Souza, N. C.; Vidal, C. B.; Alves, J. A. C.; Firmino, P. I. M.; Nascimento, R. F.; Santos, A. B. Occurrence and removal of estrogens in Brazilian wastewater treatment plants. *Science of the Total Environment*. v. 490, p. 288–295, 2014.

Piao, C.; Chen, L.; Wang, Y. A review of the extraction and chromatographic determination methods for the analysis of parabens, *Journal of Chromatography B*. 969 (2014) 139–148.

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.

Płotka-Wasyłka, J.; Szczepanska, N.; Guardia, M.; Namiesnik J. Miniaturized solid-phase extraction techniques. *Trends in Analytical Chemistry*. v. 73 p. 19–38, 2015.

Psillakis, E.; Kalogerakis, N. Developments in liquid-phase microextraction. *TrAC-Trends Anal. Chem.* v. 22. p. 565–574, 2003.

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.

Rajabi, M.; Moghadam, A. G.; Barfi, B.; Asghari, A. Air-assisted dispersive micro-solid phase extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons using a magnetic graphitic carbon nitride nanocomposite. *Microchim Acta*. v. 183 p. 1449–1458, 2016.

Ramos-Payan, M.; Maspocho, S.; Llobera, A. A simple and fast Double-Flow microfluidic device based liquid-phase microextraction (DF- μ LPME) for the determination of parabens in water samples. *Talanta*. v. 165 p. 496–501, 2017.

Razavi, N.; Es'haghi, Z. Curcumin loaded magnetic graphene oxide solid-phase extraction for the determination of parabens in toothpaste and mouthwash coupled with high performance liquid chromatography. *Microchemical Journal*. v. 148, p. 616–625, 2019.

Roth, H. C.; Schwaminger, S.; Fraga García, P.; Ritscher, J.; Berensmeier, S. Oleate coating of iron oxide nanoparticles in aqueous systems: the role of temperature and surfactant concentration. *J. Nanoparticle Res.* v. 99, p. 1-12, 2016.

Šafaříková, M.; Šafařík, I. Magnetic solid-phase extraction. *J Magn Magn Mater.* v. 194 p. 108–112, 1999.

Sanchis, Y.; Coscollà, C.; Yusà, V. Analysis of four parabens and bisphenols A, F, S in urine, using dilute and shoot and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Talanta.* 202, p. 42–50, 2019.

Seidi, S.; Karimi, E. S.; Rouhollahi, A.; Baharfar, M.; Shanehsaz, M.; Tajik, M. Synthesis and characterization of Polyamide-Graphene oxide-Polypyrrole electrospun nanofibers for spin-column micro solid phase extraction of parabens in milk samples. *Journal of Chromatography A.* v. 1599, p. 25–34, 2019.

Shahvar, A.; Soltani, R.; Saraji, M.; Dinari, M.; Alijani, S. Covalent triazine-based framework for micro solid-phase extraction of parabens. *Journal of Chromatography A.* v. 1565, p. 48–56, 2018.

Shen, Y.; Guo, W.; Qi, L.; Qiao, J.; Wang, F.; Mao, L. Immobilization of trypsin via reactive polymer grafting from magnetic nanoparticles for microwave-assisted digestion. *J. Mater. Chem. B.* v. 1, p. 2260-2267, 2013.

Shi, Y.; Wu, H.; Wang, C.; Guo, X.; Du, J.; Du, L. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in coffee and tea samples by magnetic solid-phase extraction coupled with HPLC–FLD. *Food Chemistry.* v. 199, p. 75–80, 2016.

Silva, E. A. S.; Risticovic, S.; Pawliszyn, J. Recent trends in SPME concerning sorbent materials, configurations and in vivo applications. *Trends in Analytical Chemistry.* v. 43, p. 24-36, 2013.

Silva, A. K.; Sobieski, E.; Viana, L. H.; Lanças, F. M.; Nazario, C. E. D. Extração em Fase Sólida Magnética (MSPE): Fundamentos e Aplicações. *Scientia Chromatographica*. v. 8, p. 239-256, 2016.

Silva, R. N.; Pocrifka, L. A.; Passos, R. R. Nanomateriais com estrutura coreshell: uma alternativa para a reação de redução de oxigênio em células a combustível?. *Revista de educação, ciência e tecnologia do IFAM*. v. 12, nº 2, p. 55-69, 2018.

Tay, K. S.; Rahman N. A.; Abas, M. R. B. Magnetic nanoparticle assisted dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of 4-n-nonylphenol in water. *Anal. Methods*. v. 5, p. 2933–2938, 2013.

Towler. P. H.; Smith, J. D.; Dixon, D. R. Magnetic recovery of radium, lead and polonium from seawater samples after preconcentration on a magnetic adsorbent of manganese dioxide coated magnetite. *Anal Chim Acta*. v. 328 p. 53–59, 1996.

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

Villar-Navarro, M.; Ramos-Payán, M.; Fernández-Torres, R.; Callejón Mochón, M.; Bello-López, M. A. A novel application of three phase hollow fiber based liquid phase microextraction (HF-LPME) for the HPLC determination of two endocrine disrupting compounds (EDCs), n-octylphenol and n-nonylphenol, in environmental waters. *Sci. Total Environ*. v. 443, p. 1–6, 2013.

Xiao, R.; Zhang, X.; Zhang, X.; Niu, J.; Lu, M.; Liu, X.; Cai, Z. Analysis of flavors and fragrances by HPLC with Fe₃O₄@GO magnetic nanocomposite as the adsorbent. *Talanta*. v. 166, p. 262–267, 2017.

Xu, L.; Qi, X.; Li, X.; Bai, Y.; Liu, H. Recent advances in applications of nanomaterials for sample preparation. *Talanta*. v. 146, p. 714–726, 2016.

Wang, W.; Xu, Y.; Wang, D. I. C.; Li, Z. *J. Am. Chem. Soc.* v. 131, p. 12892–12893, 2009.

Wang, J.; Chen, Z.; Li, Z.; Yang, Y. Magnetic nanoparticles based dispersive micro-solid-phase extraction as a novel technique for the determination of estrogens in pork samples. *Food Chemistry*. v. 204 p. 135–140, 2016.

Winefordner, J. D. **Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry**. v. 162, 2003.

Yan, X.; Zhong, D.; Zhan, Y.; Li, Y.; Wu, D. Porous polyimide particle-coated adsorptive microextraction bar combined with thermal desorption-gas chromatography for rapid determination of parabens in condiments. *Journal of Chromatography A*. v. 1601, p. 71–78, 2019.

Yang, H.; Dutkiewicz, E. P.; Urban, P. L. Kinetic study of continuous liquid-liquid extraction of wine with realtime detection. *Analytica Chimica Acta*. v. 1034, p. 85-91, 2018.

Yu, J.; Dong, L.; Wu, C.; Wu, L.; Xing, J. Hydroxyfullerene as a novel coating for solid-phase microextraction fiber with sol e gel technology. *Journal of Chromatography A*. v. 978, p. 37–48, 2002.

Zhang, S.; Lu, F.; Ma, X.; Yue, M.; Li, Y.; Liu, J.; You, J. Quaternary ammonium-functionalized MCM-48 mesoporous silica asa sorbent for the dispersive solid-phase extraction of endocrinedisrupting compounds in water. *Journal of Chromatography A*. v. 1557 p.1–8, 2018.

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