



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

Rafael Scur Ortiz

**Fase sortiva baseada em papel aplicada na microextração em filme fino em sistema de
alta frequência analítica para determinação de desreguladores endócrinos por
cromatografia**

Florianópolis
2022

Rafael Scur Ortiz

Fase sortiva baseada em papel aplicada na microextração em filme fino em sistema de alta frequência analítica para determinação de desreguladores endócrinos por cromatografia

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

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra

Ortiz, Rafael Scur

Fase sortiva baseada em papel aplicada na microextração em filme fino em sistema de alta frequência analítica para determinação de desreguladores endócrinos por cromatografia / Rafael Scur Ortiz ; orientador, Eduardo Carasek da Rocha, 2022.

92 p.

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

Inclui referências.

1. Química. 2. Química Analítica. 3. Cromatografia. 4. Preparo de amostra. 5. Microextração. I. Rocha, Eduardo Carasek da. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

Rafael Scur Ortiz

Fase sortiva baseada em papel aplicada na microextração em filme fino em sistema de alta frequência analítica para determinação de desreguladores endócrinos por cromatografia

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

Prof. Dr. Josias de Oliveira Merib

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA)

Prof. Dr. Luiz Augusto dos Santos Madureira

Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Prof. Dr. Gustavo Amadeu Micke

Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Química Analítica.

Prof. Dr. Giovanni Finoto Caramori

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Química

Prof. Dr. Eduardo Carasek da Rocha

Orientador

Florianópolis, 2022

AGRADECIMENTOS

Ao professor Eduardo Carasek, pelo apoio e pela oportunidade cedida.

Aos meus colegas do Laboratório de Cromatografia e Espectrometria Atômica (CROMAAS), pelo compartilhamento das nossas vivências e dos nossos conhecimentos. Em especial, ao Ricardo Huelsmann pela proximidade e pelo suporte durante o desenvolvimento desse projeto.

À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), por colaborar com o desenvolvimento intelectual, pessoal e profissional dos seus alunos e demais membros, pela contribuição à comunidade catarinense em termos de desenvolvimento socioeconômico, e, pela contribuição científica nacional e internacional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro.

À Gabriela Mafra, pela inspiração quanto ao tema e ao problema de pesquisa. Nessa mesma linha, agradeço ao professor Rafael Lucena (Universidade de Córdoba, Espanha) pelas relevantes contribuições no campo da microextração.

Às pessoas que estiveram presentes na minha vida durante esse período, que me deram apoio, que me ouviram, e, que colaboraram com o meu desenvolvimento pessoal.

Aos membros da banca, por terem aceitado contribuir para esta pesquisa e pelo *feedback*. Ainda, ao professor Alexandre Parize por ter fornecido o nylon.

RESUMO

Nesse estudo desenvolveu-se um método para a determinação de dez desreguladores endócrinos (ftalatos, bisfenóis e alquilfenóis) em amostras de água utilizando-se no preparo de amostra a técnica de microextração em filme fino (TFME) em sistema de alta frequência analítica. A separação e detecção foi realizada por meio de um cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD). Uma fase sortiva de poliamida baseada em papel (PSP) foi preparada mergulhando-se um papel filtro (2,5 cm por 0,5 cm) em uma solução de nylon 66 em ácido fórmico, seguido da evaporação do solvente da superfície do papel a temperatura ambiente. O dispositivo de extração confeccionado foi empregado na TFME em um sistema semiautomatizado, o qual permitiu que as etapas de extração e dessorção fossem realizadas em até 24 amostras simultaneamente. Esse sistema semiautomatizado foi desenvolvido por meio da impressão 3D para a fixação dos PSPs e utilização de 15 mL de amostra e 400 μL de solvente de dessorção. O método desenvolvido foi otimizado pelo planejamento de experimentos de forma multivariada e univariada. A melhor condição de preparo do PSP é alcançada com dois mergulhos do papel na solução de nylon 66, sendo cada mergulho intercalado pela evaporação do solvente da superfície do papel para permitir a impregnação da poliamida. Verificou-se a existência de efeito sinérgico pois tanto a poliamida quanto a celulose atuaram para a extração dos analitos. As condições otimizadas para a extração foram de 30% de NaCl (m/v) adicionados à amostra em pH 2 por 180 minutos. Para a dessorção, obtiveram-se os melhores resultados com acetonitrila por 20 minutos. As curvas de calibração obtidas apresentaram coeficientes de determinação entre 0,9837 para DNOP e 0,9997 para BPF. Os limites de detecção foram de 1,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a maioria dos analitos com as exceções de DEHP e DNOP que obtiveram 3 $\mu\text{g L}^{-1}$ e de DMP que obteve 7,6 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os limites de quantificação foram de 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a maioria dos analitos com as exceções de DEHP e DNOP que obtiveram 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ e de DMP que obteve 25 $\mu\text{g L}^{-1}$. A repetitividade e a precisão intermediária foram avaliadas por meio do desvio padrão relativo (RSD) e obtiveram bons resultados para a maioria dos analitos, sendo igual ou inferior a 24%. Apesar disso, os três últimos analitos da separação cromatográfica (4-NP, DEHP e DNOP) apresentaram RSDs na faixa de 10 a 40%. A exatidão foi avaliada a partir de recuperação relativa em três amostras aquosas. A amostra de água mineral obteve recuperações satisfatórias para a maioria dos analitos, variando de 69 a 145%. A amostra de água de coco apresentou efeito de matriz superior a 20% para os últimos quatro analitos da separação cromatográfica, sendo satisfatório para os seis demais analitos na faixa de 55 a 112%. A amostra de água de córrego apresentou pronunciado efeito de matriz. O método obteve boa frequência analítica com cerca de 8,3 minutos para cada amostra.

Palavras-chave: Fase sortiva baseada em papel. Poliamida 66. Microextração em filme fino. Alta frequência analítica. Desreguladores endócrinos.

ABSTRACT

In this study, an analytical method was developed for the determination of ten endocrine disrupting compounds (phthalates, bisphenols and alkylphenols) in water samples by using thin film microextraction technique (TFME) in a high-throughput system in the sample preparation. The separation and detection was performed with a high-performance liquid chromatograph with diode-array detection (HPLC-DAD). A polyamide paper-based sorptive phase (PSP) was prepared by dipping a filter paper (2.5 cm by 0.5 cm) into a nylon 66 solution in formic acid, followed by the evaporation of the solvent from the paper surface at room temperature. The extraction device produced was employed in TFME in a semi-automated system, which allowed the extraction and desorption steps to be carried out in up to 24 samples simultaneously. This semi-automated system was built with the aid of a 3D printer to hold the PSPs and to use 15 mL of sample and 400 μL of desorption solvent. The developed method was optimized by multivariate design of experiments and univariate approach. The best condition for the PSP preparation is achieved with two dips of the paper into the nylon 66 solution, each one being intercalated by the solvent evaporation from the paper surface to allow the polyamide impregnation. It was noted the existence of a synergic effect because both the polyamide and the cellulose contributed for the analytes extraction. The optimized conditions for the extraction were NaCl 30% (w/v) added to the sample at pH 2 for 180 minutes. For the desorption, the best results were obtained with acetonitrile for 20 minutes. The calibration curves showed coefficients of determination between 0.9837 for DNOP and 0.9997 for BPF. The limits of detection were 1.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ for most the analytes with the exceptions of DEHP and DNOP which resulted in 3 $\mu\text{g L}^{-1}$ and DMP which resulted in 7.6 $\mu\text{g L}^{-1}$. The limits of quantification were 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ for most the analytes with the exceptions of DEHP and DNOP which resulted in 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ and DMP which resulted in 25 $\mu\text{g L}^{-1}$. The repeatability and the intermediate precision were evaluated using the RSD and they reached good results for most the analytes, being equal or less than 24%. In spite of this, the last three analytes of the chromatographic separation (4-NP, DEHP and DNOP) showed RSDs in the range of 10 to 40%. The accuracy was assessed using relative recovery of three aqueous samples. The mineral bottled water sample obtained satisfactory recoveries for most the analytes in the range of 69 to 145%. The coconut water sample showed matrix effect greater than 20% for the last four analytes of the chromatographic separation, being satisfactory for the other six analytes in the range of 55 to 112%. The stream water sample showed pronounced matrix effect. The time consumed for each sample was about 8.3 minutes, which came up as a good high-throughput method.

Keywords: Paper-based sorptive phase. Polyamide 66. Thin film microextraction. High-throughput. Endocrine disrupting compounds.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Frações das espécies neutras de BPA, BPF, 4-OP e 4-NP em água em função do pH	22
Figura 2 – Técnicas clássicas de extração empregadas em preparo de amostra. Legenda: (a) funil de separação utilizado em LLE; (b) cartucho de SPE; e (c) aparato de extração por soxhlet.	25
Figura 3 – Geometrias de SPME (a-c) e esquema cinético de extração em fibra de SPME com PDMS formando uma camada limite.	29
Figura 4 – Estrutura química da celulose contendo três monômeros de glicose.	30
Figura 5 – Reações de condensação para formação do Nylon 6 a partir da caprolactama e do Nylon 66 a partir do ácido adípico e da 1,6-hexanodiamina.	34
Figura 6 – Estação robótica de preparo de amostra automatizado Concept 96 (PAS Technology) com capacidade de processamento de até 96 amostras simultaneamente. Em detalhe, escova contendo 8 pentes com 12 pinos cada. Cada pino possui sua extremidade inferior revestida com fase sortiva.	35
Figura 7 – Sistema semiautomatizado de extrações paralelas – isto é, simultâneas – em placa de 96 poços. Legenda: (a) pinos contendo fase sortiva presos ao equipamento; e (b) posição de extração/dessorção.	36
Figura 8 – Esboço da Equação (3) representando o número de mols extraídos em SPME em função do volume de amostra.	37
Figura 9 – Princípio de funcionamento da impressora 3D de modelagem por deposição fundida.	38
Figura 10 – Sequência de etapas para a impressão 3D de um objeto.	39
Figura 11 – Dispositivos impressos em 3D para a TFME. Legenda: 1) tubo impresso em LAY-FOMM 60, (a) antes do condicionamento, (b) depois do condicionamento, e (c) no interior de um tubo Eppendorf; 2) LAY-FOMM 60 como fase sortiva nos pentes da TFME; e 3) dispositivo de poliamida não revestida para microextração baseada em adsorção.	40
Figura 12 – Poços selecionados aleatoriamente para a realização dos ensaios de precisão intermediária.	50
Figura 13 – Cromatograma da separação otimizada dos analitos em solução padrão em metanol na concentração de $500 \mu\text{g L}^{-1}$	51

Figura 14 – Cromatogramas do branco do PSP de acordo com os ciclos de limpeza realizados em metanol: primeiro (em preto), segundo (em azul), terceiro (em verde) e quarto (em rosa) ciclos.....	52
Figura 15 – Gráfico de barras das áreas cromatográficas comparando o desempenho do PSP e do papel não revestido no procedimento otimizado de TFME em 50 µg L ⁻¹	53
Figura 16 – Espectros de radiação infravermelha do papel filtro e do PSP em ambas as faces por meio de ATR-IR.....	54
Figura 17 – Espectro de radiação infravermelha do recobrimento de poliamida 66 por FTIR	54
Figura 18 – Cromatogramas do branco dos poços de polipropileno quando exposto à 600 µL de metanol (em preto) e acetonitrila (em azul) por 30 min sob agitação e branco da coluna do HPLC (em rosa).....	56
Figura 19 – Sistema semiautomatizado de 24 poços desenvolvido por impressão 3D. Legenda: (a-b) posição de extração vista de cima e de frente; (c-d) posição de dessorção vista de cima e de frente.	58
Figura 20 – Gráfico de barras das áreas cromatográficas normalizadas (%) comparando o desempenho de PSPs preparados com quantidades diferentes de mergulhos na solução de poliamida 66.	60
Figura 21 – Gráfico de barras das áreas cromatográficas em diferentes ciclos de uso dos PSPs.	60
Figura 22 – Gráficos de Pareto dos efeitos padronizados ao nível de 5% de significância	63
Figura 23 – Gráfico de barras da resposta normalizada para otimização do tempo de extração	65
Figura 24 – Gráfico de contorno obtido por meio do planejamento simplex-centroide para otimização do solvente de dessorção	67
Figura 25 – Gráfico de barras da resposta normalizada para otimização do tempo de dessorção	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estruturas químicas e propriedades físico-químicas dos analitos selecionados	20
Tabela 2 – Técnicas empregadas em preparo de amostra de matrizes alimentícias.....	24
Tabela 3 – Aplicações de fases sortivas baseadas em papel por deposição física no contexto de microextração previamente à análise por cromatografia e espectrometria de massas	31
Tabela 4 – Condições cromatográficas em modo gradiente otimizadas para a separação por HPLC-DAD em fase reversa C18 com vazão de 1 mL/min.....	43
Tabela 5 – Descrição das peças produzidas via impressão 3D para o sistema semiautomatizado com placa de 24 poços.....	45
Tabela 6 – Condições empregadas no planejamento fatorial completo 2 ⁴ no estudo dos fatores envolvidos na etapa de extração do método de TFME (concentração de 100 µg L ⁻¹)	48
Tabela 7 – Proporções (v/v) empregadas no planejamento simplex-centroide para otimização de solvente de dessorção.....	49
Tabela 8 – Tempo de retenção dos analitos.....	51
Tabela 9 – Limites de detecção e quantificação, faixas lineares de trabalho, equações analíticas, coeficientes de determinação, fatores de enriquecimento e precisões intermediárias do método desenvolvido.....	69
Tabela 10 – Recuperações relativas e desvios padrões relativos dos analitos em três amostras aquosas	70
Tabela 11 – Comparação do método desenvolvido com métodos similares reportados na literatura durante o período de 2016 a 2022	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3D – Tridimensional

4-NP – 4-nonilfenol

4-OP – 4-octilfenol

ACN – Acetonitrila

ATR – Reflectância total atenuada, do inglês *Attenuated Total Reflectance*

BBP – Benzilbutil ftalato

BET – Brunauer-Emmett-Teller (isoterma)

BPA – Bisfenol A

BPF – Bisfenol F

C18 – Octadecil

CAD – Desenho assistido por computador, do inglês *Computer Aided Design*

CF – Fibra de carbono

DAD – Detector de arranjo de diodos, do inglês *Diode Array Detector*

DBP – Dibutil ftalato

DEHP – Bis-(2-etilhexil) ftalato

DEP – Dietil ftalato

DI – Imersão direta, do inglês *Direct Immersion* (modo de SPME)

DI – Infusão direta, do inglês *Direct Infusion* (em espectrometria de massas)

DiBP – Di-isobutil ftalato

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

DMP – Dimetil ftalato

DNOP – Di-n-octil ftalato

dSPE – Extração em fase sólida dispersiva, do inglês *Dispersive Solid Phase Extraction*

EDC – Desregulador endócrino, do inglês *Endocrine Disrupting Compound*

EF – Fator de enriquecimento, do inglês *Enrichment Factor*

EFSA – Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar, do inglês *European Food Safety Agency*

ESI – Ionização por eletronebulização, do inglês *Electrospray Ionization*

FID – Detector por ionização em chama, do inglês *Flame Ionization Detector*

FTIR – Infravermelho com transformada de Fourier, do inglês *Fourier-transform Infrared*

GC – Cromatografia gasosa, do inglês *Gas Chromatography*

HF – Fibra oca, do inglês *Hollow Fiber*

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

HS – *Headspace*

IR – Infravermelho, do inglês *Infrared*

K_a – Constante de dissociação ácida

K_{OW} – Coeficiente de partição octanol-água

LC – Cromatografia líquida, do inglês *Liquid Chromatography*

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

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

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

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

m/v – Relação massa-volume (referente a concentração)

m-dSPE – Extração em fase sólida magnética-dispersiva, do inglês *Magnetic-Dispersive Solid Phase Extraction*

MeOH – Metanol

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

MIP – Polímero impresso molecularmente, do inglês *Molecularly Imprinted Polymer*

MISPE – Extração em fase sólida com polímero molecularmente impresso, do inglês *Molecularly Imprinted Solid Phase Extraction*

MS – Espectrometria de massas, do inglês *Mass Spectrometry*

MS/MS – Espectrometria de massas em tandem, do inglês *Tandem Mass Spectrometry*

NaCl – Cloreto de sódio

PA – Poliamida

PDMS – Polidimetilsiloxano

PETG – Polietileno tereftalato glicol

pH – Potencial hidrogeniônico

PLA – Ácido polilático

PP – Polipropileno

PS – Poliestireno

PSP – Fase sortiva baseada em papel, do inglês *Paper Based Sorptive Phase*

PVA – Álcool polivinílico

QuEChERS – Rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e seguro; do inglês *quick, easy, cheap, effective, rugged and safe* (método)

R² – Coeficiente de determinação

RSD – Desvio padrão relativo, do inglês *Relative Standard Deviation*

SBSE – Extração sortiva em barra de agitação, do inglês *Stir Bar Sorptive Extraction*

SDME – Microextração em gota única, do inglês *Single Drop Microextraction*

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

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

TFME – Microextração em filme fino, do inglês *Thin Film Microextraction*

TNPP – Trisnôniofenil fosfônio

UAE – Extração assistida por ultrassom, do inglês *Ultrasonic Assisted Extraction*

UP – Ultrapura

UPLC – Cromatografia líquida de ultra eficiência, do inglês *Ultra Performance Liquid Chromatography*

UV – Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1	DESREGULADORES ENDÓCRINOS.....	17
2.2	PREPARO DE AMOSTRA	23
2.3	MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA	27
2.3.1	Fases sortivas baseadas em papel.....	30
2.3.2	Automação da microextração em filme fino	34
2.3.2.1	<i>Impressão 3D.....</i>	38
3	OBJETIVOS	41
3.1	OBJETIVO GERAL.....	41
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
4	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	42
4.1	REAGENTES E SOLUÇÕES.....	42
4.2	INSTRUMENTAÇÃO	42
4.3	PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DO PSP	43
4.4	DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA SEMIAUTOMATIZADO DE 24 POÇOS	44
4.5	OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO	44
4.6	PARÂMETROS ANALÍTICOS DE MÉRITO.....	49
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
5.1	SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA	51
5.2	CONDICIONAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO PSP	52
5.3	SISTEMA SEMIAUTOMATIZADO DE 24 POÇOS.....	55
5.4	OTIMIZAÇÕES DO MÉTODO	59
5.4.1	Otimização do PSP	59
5.4.2	Otimização dos fatores de extração.....	61
5.4.3	Otimização dos fatores de dessorção	66

5.5	PARÂMETROS ANALÍTICOS DE MÉRITO.....	68
5.6	COMPARAÇÃO COM OUTROS MÉTODOS DA LITERATURA.....	72
6	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	75
	REFERÊNCIAS.....	76
	APÊNDICE A – Esquema de preparo do PSP.....	87
	APÊNDICE B – Cromatogramas do branco dos poços de PLA e PETG	88
	APÊNDICE C – Imagens das peças impressas em 3D	89
	ANEXO A – Limites para algumas substâncias em contato com alimentos..	91
	ANEXO B – Documentos encontrados pela base Scopus a nível global no período de 1953 a 2021 buscando por “determination AND (phthalates OR alkylphenols OR bisphenols)” no título do artigo, resumo e palavras-chaves	92

1 INTRODUÇÃO

O progresso científico nas Ciências Analíticas contribuiu para o desenvolvimento de sofisticadas instrumentações, as quais possuem elevada seletividade e capacidade de detecção a nível traço. Apesar disso, o preparo de amostra ainda é uma etapa compulsória em muitas aplicações a fim de compatibilizar a amostra ao instrumento, remover interferentes e/ou pré-concentrar analitos. A partir da década de 1990, pesquisas científicas em preparo de amostras se preocuparam em tornar os métodos analíticos ambientalmente amigáveis, reduzindo o impacto ambiental e a exposição ocupacional a solventes tóxicos. Essa perspectiva se alinhou com uma tendência global de interesse no desenvolvimento sustentável e no meio ambiente. Além disso, buscaram-se métodos cujos preparos de amostra fossem simplificados, miniaturizados e automatizados.

Nesse contexto, a microextração em fase sólida (SPME) ganhou destaque por seu baixo consumo de solventes e sua capacidade de integrar diferentes operações, como a amostragem, a extração e a pré-concentração. A SPME em sua concepção constitui-se de uma fibra de sílica fundida revestida que permite a dessorção dos analitos diretamente no injetor do cromatógrafo gasoso. Entretanto, esse design apresentou baixa capacidade de extração e outras geometrias foram elaboradas para aumentar o volume de fase sortiva. A impregnação da fase sortiva em uma superfície planar de modo a formar um filme fino logrou êxito em elevar a capacidade de extração e facilitar a cinética de extração. Essa variante da SPME, denominada de microextração em filme fino (TFME), foi automatizada em um sistema que permite o processamento de até 96 amostras simultaneamente, o que permitiu a obtenção de alta frequência analítica. Apesar disso, duas limitações restringem a aplicabilidade dessa técnica. A primeira é a baixa razão dos volumes de amostra e de solvente de dessorção que implicam em baixos fatores de enriquecimento. A segunda é a limitação de fases sortivas que necessitam estar aderidas aos pentes de alumínio. Pensando nisso, a impressão 3D pode fornecer um meio para a solução deste problema através da confecção de novos poços com volumes adequados e de novos pentes capazes de fixar diferentes fases sortivas.

Uma estratégia de preparo de fases sortivas que tem sido utilizada em TFME é a impregnação de um revestimento na superfície do papel filtro. O papel filtro é constituído majoritariamente de celulose e possui vários atrativos como a portabilidade, a sua estrutura planar e porosa, a facilidade de uso, o baixo custo e a resistência química frente a diversos solventes e faixas de pH. Este dispositivo, chamado de fase sortiva baseada em papel (PSP),

apresenta-se como uma promissora alternativa para aplicações analíticas. A proposta deste estudo é, portanto, compatibilizar os PSPs à TFME em sistema semiautomatizado de extrações paralelas por meio da adaptação da técnica de microextração com maiores volumes de amostra. Para isso, foi preparada uma fase sortiva de poliamida baseada em papel e empregada no sistema desenvolvido por meio de impressão 3D, o que permitiu a extração e a dessorção de desreguladores endócrinos em até vinte e quatro amostras de água mineral simultaneamente.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 DESREGULADORES ENDÓCRINOS

A exposição de compostos desreguladores endócrinos (EDCs, do inglês *Endocrine Disrupting Compounds*) aos seres vivos e, em particular, aos seres humanos, suscitou o debate desse tema em razão de inúmeras pesquisas apontarem seus efeitos nocivos (ONG; SAMSUDIN; SOTO-VALDEZ, 2022). De acordo com definição da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US EPA, 1997, p. 13),

um desregulador endócrino é definido como um agente exógeno que interfere na síntese, secreção, transporte, interação, ação ou eliminação de hormônios naturais no corpo que são responsáveis pela manutenção da homeostase, reprodução, desenvolvimento e/ou comportamento.

Estudos de monitoramento biológico humano confirmaram a presença de EDCs em matrizes como urina e sangue (FANIBAND; LINDH; JÖNSSON, 2014). Embora tais estudos englobem todas as fontes de exposição às quais os indivíduos se mostraram suscetíveis, a ingestão de alimento contaminado tem sido relacionada como uma fonte significativa (MUNCKE, 2009). Em muitos casos, os EDCs estão presentes em produtos industrializados, que, por não se encontrarem quimicamente ligados, acabam por serem liberados do material e atingem a água, o solo, a comida, a atmosfera e o ser humano (PÉREZ-OUTEIRAL; MILLÁN; GARCIA-ARRONA, 2016). Apesar de não ser possível estabelecer uma relação direta entre causa e efeito, a literatura científica tem reportado diversos problemas de saúde humana e animal associados com a exposição aos EDCs, os quais podem ser encontrados em amostras de água e alimentos na faixa de concentração de ng a $\mu\text{g L}^{-1}$ (VIEIRA et al., 2021).

A contaminação de alimentos e bebidas por plastificantes a partir de embalagens é mais relevante do que a ocasionada durante o processo de produção (SALAZAR-BELTRÁN et al., 2018). As primeiras observações científicas de que compostos prejudiciais à saúde estavam se difundindo a partir de embalagens em direção aos alimentos são datadas do início dos anos de 1980 (SZCZEPAŃSKA; KUDŁAK; NAMIEŚNIK, 2018). A maioria das embalagens produzidas são constituídas de materiais plásticos que necessitam de aditivos para a obtenção de propriedades e funcionalidades desejadas. Exemplos de aditivos comuns incluem plastificantes, lubrificantes, antioxidantes, estabilizantes, antiestáticos, retardantes de chama, e pigmentos (HAHLADAKIS et al., 2018).

A preocupação com o uso de materiais plásticos, e, em particular, os materiais destinados ao contato com alimentos, tem motivado restrições no uso desses aditivos (ver

ANEXO A). Assim, o surgimento de indícios de malefícios e a cautela com grupos de risco, como crianças e gestantes, tem motivado as agências regulatórias a banir ou estabelecer limites mais rigorosos (BAUGHAN, 2015). A seguir são discutidos alguns destes compostos, os quais foram classificados como EDCs pela Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA, do inglês *European Food Safety Agency*) (SZCZEPAŃSKA; KUDŁAK; NAMIEŚNIK, 2018).

O bisfenol A (BPA) foi descrito pela primeira vez em 1891 (BERNARDO et al., 2015). Seu uso principal é como monômero na fabricação de policarbonato e resina epóxi, os quais representam 65 e 30% da produção total de BPA, respectivamente (XING et al., 2022). Além disso, BPA é empregado como estabilizante e antioxidante na produção de policloreto de vinila. A exposição humana ao BPA pode-se dar pelas vias ocupacional, ambiental e alimentar. Estudos indicam que a principal fonte de exposição ao BPA, e, que causa maior preocupação, é a via alimentícia, cerca de mil vezes maior que outras fontes. Isto se dá pela utilização de policarbonato em recipientes e resinas epóxi como revestimento em enlatados. De acordo com um estudo realizado na Espanha em 2017, a ingestão desse composto a partir da alimentação foi estimada em 0,715 µg por kg de massa corpórea por dia (MARTÍNEZ et al., 2017).

As pesquisas científicas têm indicado que o BPA é capaz de interferir em diferentes órgãos humanos e que pode se ligar à receptores hormonais causando efeitos biológicos. Há também a possibilidade de interferência em função enzimática, indução de estresse oxidativo, resposta inflamatória, mutações e alterações epigenéticas. Ainda, o BPA pode afetar o desenvolvimento da gravidez e se relacionar com o desenvolvimento de cânceres. Entretanto, há uma lacuna sobre a toxicidade e o metabolismo, bem como sua interação com outros poluentes ambientais (MA et al., 2019).

O bisfenol F (BPF) foi sintetizado para substituir o BPA, e, embora sua compreensão a respeito seja menor, há possibilidade de efeitos similares do BPA devido sua semelhança estrutural. Estudos têm sugerido que o BPF não é uma alternativa segura (VILELA; BASSIN; PEIXOTO, 2018).

Os ftalatos compreendem um conjunto de compostos na forma esterificada do ácido ftálico que se dividem em dois tipos: i) os de alta massa molar, cuja cadeia lateral possui de 7 a 13 átomos de carbono, utilizados como plastificantes para aumentar a flexibilidade e a durabilidade dos produtos; e, ii) os de baixa massa molar, cuja cadeia lateral possui de 3 a 6 átomos de carbono, utilizados para fixação de cor e fragrância (HUANG et al., 2021). Portanto, são compostos presentes em uma enorme variedade de aplicações, tais como produtos de higiene pessoal, embalagens, brinquedos, dispositivos médicos, revestimentos, equipamentos

esportivos, cabos elétricos, e entre outros (LUÍS et al., 2021). Um estudo realizado entre 2012 e 2013 com crianças brasileiras estimou a exposição diária ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$) como sendo 0,3 para DMP; 1,7 para DBP; 1,8 para DiBP; 2,1 para DEP; e 7,2 para DEHP (ROCHA et al., 2017).

Assim como o BPA e seus similares, os ftalatos apresentam uma ampla janela de efeitos adversos. Entretanto, os que mais se destacam são aqueles relacionados ao sistema reprodutivo (tanto masculino quanto feminino) e ao desenvolvimento humano, da gravidez até a infância e juventude. Além disso, estudos epidemiológicos humanos indicam associação entre a exposição de ftalatos e efeitos adversos, como, por exemplo, diabetes tipo II e resistência à insulina, obesidade, alergia e asma (WANG; QIAN, 2021).

Nas últimas cinco décadas observou-se o aumento de desordens associadas ao sistema reprodutor masculino. Algumas dessas desordens foram agrupadas e receberam a terminologia de síndrome de disgenesia testicular, um conjunto de sintomas que inclui má formação do órgão genital masculino no feto e efeitos reprodutivos adversos em jovens. Embora a genética e o estilo de vida adotado durante a gravidez contribuam para este quadro clínico na população, a exposição aos ftalatos e outros EDCs durante o desenvolvimento fetal tem sido apontada como uma possível causadora da síndrome (FREDERIKSEN; SKAKKEBÆK; ANDERSSON, 2007; XING; BAI, 2018). Os efeitos da exposição de ftalatos ao sistema reprodutor feminino têm sido relacionados com puberdade precoce, nascimento prematuro e problemas de fertilidade (MESQUITA; LORIGO; CAIRRAO, 2021).

Alquilfenóis, tais como octilfenol e nonilfenol, possuem atividade estrogênica e interferem no sistema reprodutivo. Além disso, são compostos persistentes no meio ambiente, o que agrava a preocupação (JING et al., 2021). Os efluentes domésticos e industriais são fontes significativas desses compostos no meio ambiente e não são removidos eficientemente nas estações de tratamento (CRINI et al., 2022). Os alquilfenóis possuem aplicações na produção de tecido, papel, detergente e embalagens de alimentos; podendo também serem gerados a partir da degradação química de surfactantes alquilfenóis etoxilados (AMIRIDOU; VOUTSA, 2011) e do antioxidante trisnonilfenil fosfito (TNPP) (FASANO et al., 2012).

Devido ao potencial nocivo e às dúvidas com relação ao efeito em função da concentração dos desreguladores endócrinos mencionados, faz-se necessário o desenvolvimento de métodos analíticos para monitorar sua presença em alimentos. Considerando a importância da água para a vida humana e animal e o risco de contaminação passível, esta matriz foi selecionada para ser alvo do presente estudo (SALAZAR-BELTRÁN et al., 2018). A Tabela 1 compila dados relevantes a respeito dos analitos selecionados neste

estudo, enquanto o ANEXO B traz um panorama geral da quantidade de artigos publicados sobre a determinação desses compostos.

É imprescindível conhecer a amostra e os analitos que serão determinados, pois suas propriedades físico-químicas influenciam o comportamento e a execução da análise pretendida (BORGES; JUNIOR, 2015). Um parâmetro importante a ser levado em consideração é a hidrofobicidade do composto, isto é, uma medida do quão apolar é, indicando tendência de migração de uma fase aquosa para uma orgânica. Este parâmetro pode ser representado pelo logaritmo da constante de distribuição do composto entre octanol e água ($\log K_{OW}$). A partir dos dados da Tabela 1, observa-se uma faixa ampla que parte de baixa até alta hidrofobicidade, variando de 1,60 para DMP e indo até 8,10 para DNOP. O $\log K_{OW}$ está intimamente relacionado com a solubilidade relativa do composto nas fases em questão. Assim, uma outra forma de compreender o comportamento do composto é verificar sua solubilidade em água, que estabelece relação inversa ao $\log K_{OW}$ (MOLDOVEANU; DAVID, 2017). Esta grande variação representa um desafio ao analista, visto que exige uma condição capaz de estabelecer compromisso entre estas tendências distintas.

Tabela 1 – Estruturas químicas e propriedades físico-químicas dos analitos selecionados (continua)

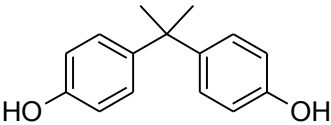
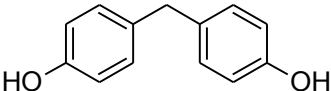
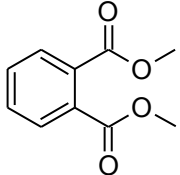
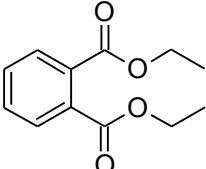
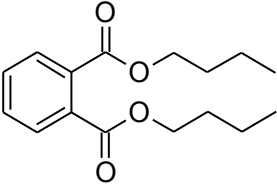
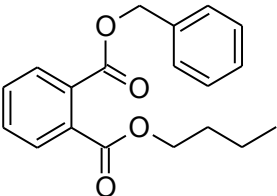
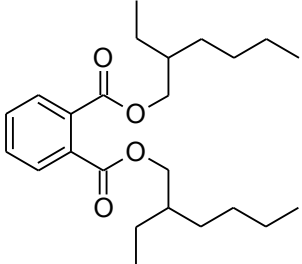
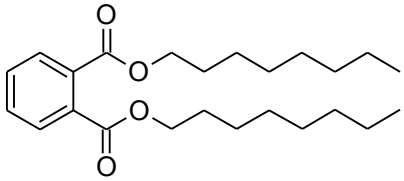
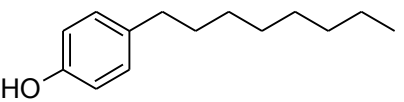
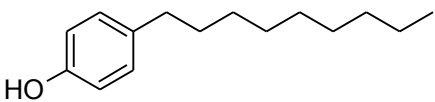
Analito	Estrutura	$\log K_{OW}$	pK_a	Solubilidade em água (mg L^{-1} , 20 a 25 °C)
Bisfenol A (BPA)		3,32	9,60 (pK_{a1}) 10,20 (pK_{a2})	300 ^a
Bisfenol F (BPF)		2,91	7,55 (pK_{a1}) 10,80 (pK_{a2})	360 ^b
Dimetil ftalato (DMP)		1,60	–	5220 ^c
Dietil ftalato (DEP)		2,47	–	600 ^c

Tabela 1 – Estruturas químicas e propriedades físico-químicas dos analitos selecionados (conclusão)

Analito	Estrutura	$\log K_{OW}$	pK_a	Solubilidade (mg/L) em água a 25 °C
Dibutil ftalato (DBP)		4,50	–	10 ^d
Benzilbutil ftalato (BBP)		4,73	–	2,8 ^e
Bis-(2-etilhexil) ftalato (DEHP)		7,60	–	0,003 ^f
Di-n-octil ftalato (DNOP)		8,10	–	0,003 ^c
4-octilfenol (4-OP)		5,30	10,31	12 ^g
4-nonilfenol (4-NP)		5,76	10,31	7 ^h

Fonte: National Institutes of Health (2022)

^a JRC Institute for Health and Consumer Protection (2010a)

^b Fromme et al. (2002)

^c Salazar-Beltrán et al. (2018)

^d JRC Institute for Health and Consumer Protection (2009)

^e JRC Institute for Health and Consumer Protection (2008a)

^f JRC Institute for Health and Consumer Protection (2008b)

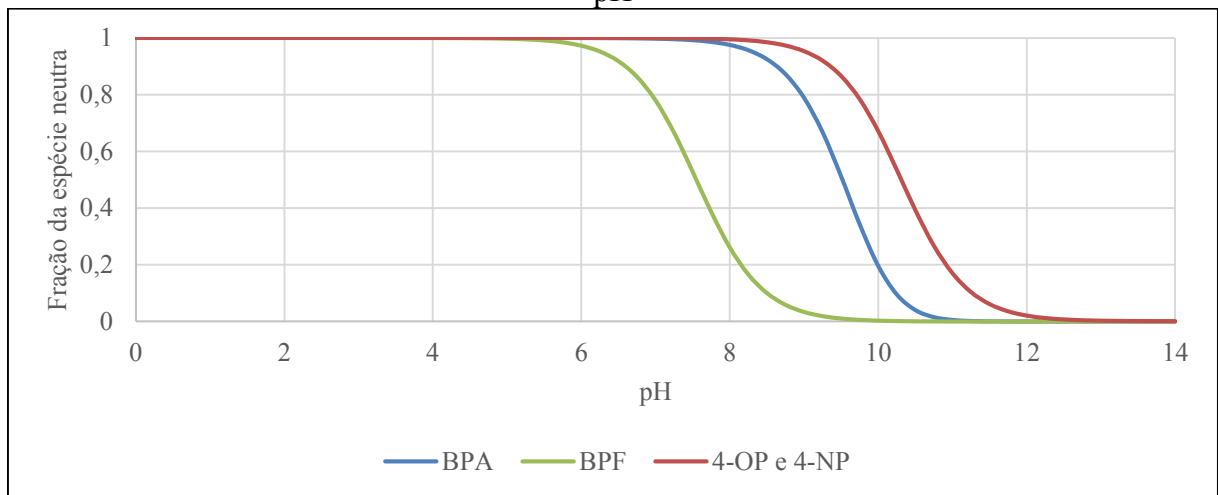
^g Giger e Ahel (1993)

^h JRC Institute for Health and Consumer Protection (2010b)

Observação: Os dados de solubilidade aqui dispostos desconsideram fenômenos de formação de soluções coloidais, as quais podem aumentá-la.

Outro parâmetro importante é a constante de dissociação ácida (representada pelo pK_a). As propriedades ácido-base intrínsecas dos compostos permitem a existência de diferentes espécies em água dependendo do pH. BPA, BPF, 4-OP e 4-NP possuem o grupo funcional fenólico cujo hidrogênio pode ser transferido para uma molécula de solvente, resultando em uma base conjugada com estrutura ionizada e a carga sendo estabilizada pela ressonância do anel benzênico (BRUICE, 2006). A partir do pK_a é possível definir qual a espécie predominante. A forma neutra dos fenóis predomina em pH menor do que pK_a , em pH igual ao pK_a coexistem as formas neutra e ionizada, e, em pH maior do que o pK_a , a forma ionizada predomina. Com base na Figura 1 é possível observar que em pH inferior ou igual a 5,5 todas as referidas espécies se encontram em sua forma neutra (protonada); coexistem formas neutras e ionizadas no intervalo de 5,5 a 12; e, estão predominantemente desprotonadas em pH superior a 12. Os ftalatos não possuem propriedade ácido-base na faixa de pH de trabalho. Essas diferentes formas de um determinado analito podem influenciar sua solubilidade e migração entre fases.

Figura 1 – Frações das espécies neutras de BPA, BPF, 4-OP e 4-NP em água em função do pH



Fonte: Elaborado pelo Autor (2022)

Equações das frações de espécies neutras (α_0) (SKOOG et al., 2014):

Para ácidos monopróticos $\alpha_0 = \frac{[HX]}{c_i} = \frac{[H^+]}{[H^+] + K_a}$, onde $[HX]$ é a concentração da espécie neutra, C_i é a concentração analítica, $[H^+]$ é a concentração de íons hidrônio e K_a é a constante de dissociação ácida.

Para ácidos dipróticos $\alpha_0 = \frac{[H_2X]}{c_i} = \frac{[H^+]^2}{[H^+]^2 + [H^+]K_{a1} + K_{a1}K_{a2}}$, onde $[H_2X]$ é a concentração da espécie neutra, C_i é a concentração analítica, $[H^+]$ é a concentração de íons hidrônio e K_{a1} e K_{a2} são as constantes de dissociação ácida do primeiro e do segundo hidrogênio ionizável, respectivamente.

As constantes de dissociação ácida estão dispostas na Tabela 1. A função p é definida como $pX = -\log_{10}X$.

2.2 PREPARO DE AMOSTRA

Métodos analíticos capazes de monitorar contaminantes em água e alimentos são necessários como forma de controle de qualidade e de avaliação de risco à saúde e ao meio ambiente (SALAZAR-BELTRÁN et al., 2018). A cromatografia gasosa (GC, do inglês *Gas Chromatography*) e líquida (LC, do inglês *Liquid Chromatography*) são as técnicas instrumentais mais utilizadas para essa finalidade. A espectrometria de massas (MS, do inglês *Mass Spectrometry*) é usualmente empregada para o sistema de detecção por permitir alta sensibilidade e seletividade, e, ainda, oferecer informação que permite a identificação inequívoca do analito (SANCHIS; YUSÀ; COSCOLLÀ, 2017).

A escolha do instrumento analítico depende das propriedades físico-químicas dos analitos e do nível de concentração desses. A cromatografia gasosa é limitada pela volatilidade, termoestabilidade, polaridade e massa molar dos analitos. A análise por GC-MS exige, portanto, estabilidade térmica a cerca de 300 a 350 °C e compostos voláteis ou volatilizáveis, o que usualmente recai sobre moléculas não polares ou moderadamente polares com massa molar na faixa de até 400 a 450 g mol⁻¹ (SANCHIS; YUSÀ; COSCOLLÀ, 2017; STASHENKO; MARTÍNEZ, 2011). A separação de compostos fenólicos em GC-MS usualmente requer uma etapa de derivatização para aumentar a resolução e a detectabilidade e obter picos simétricos e de boa precisão, o que faz com que o uso da cromatografia líquida seja vantajosa (SALGUEIRO-GONZÁLEZ et al., 2017). Embora um cromatógrafo líquido com detector de arranjo de diodos (DAD, do inglês *Diode Array Detector*) tenha menos vantagens frente a um instrumento com MS, a sua maior facilidade de uso e o seu menor custo o tornam atrativo (LACORTE; CAZES, 2010; MIRAGHAEI et al., 2017); motivo pelo qual ainda é frequentemente usado no desenvolvimento de métodos na pesquisa científica (LÓPEZ; CAMPOS; CASSELLA, 2022; WANG et al., 2021; WERNER; GRZEŚKOWIAK; ZGOŁA-GRZEŚKOWIAK, 2022).

Apesar do avanço tecnológico alcançado nas últimas décadas no campo das Ciências Analíticas, geralmente a introdução direta da amostra no instrumento não é possível de ser realizada. Portanto, uma etapa prévia à análise, denominada de preparo de amostra, é necessária. O preparo de amostra possui três finalidades: i) a compatibilização da amostra com o instrumento, garantindo que a amostra tenha propriedades físicas e químicas que estejam de acordo com a capacidade de processamento do instrumento; ii) a remoção de interferentes, compostos que possam afetar o sinal analítico que pretende-se mensurar; e iii) adequar a

concentração do analito, que em análises a nível traço é feita por meio de enriquecimento, de forma que a concentração final seja maior e permita a obtenção de limites de detecção mais baixos (STASHENKO; MARTÍNEZ, 2011).

O preparo de amostra é conhecido por ser usualmente a etapa crítica do procedimento analítico, motivo pelo qual alguns autores a chamam de “calcanhar de Aquiles”. Nesta etapa pode ocorrer a perda do analito e a contaminação da amostra; alto consumo de solventes orgânicos e/ou reagentes tóxicos; elevado consumo de tempo e recursos; e execução de procedimentos árduos (CARASEK; TONJES; SCHARF, 2002). Assim, o preparo de amostra vem sendo continuamente estudado e aprimorado. A Tabela 2 organiza as diferentes técnicas utilizadas, convencionais ou não, no preparo de amostra de matrizes alimentícias para determinação de EDCs.

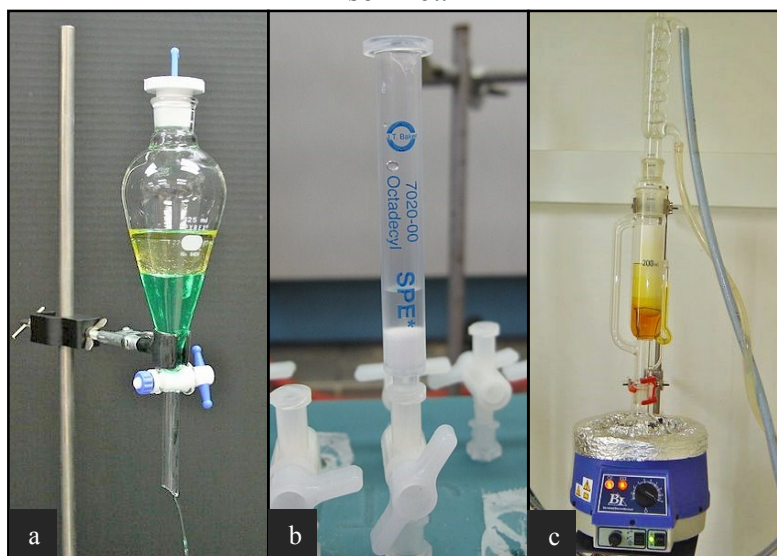
A estratégia mais utilizada em análise de compostos orgânicos é o isolamento do analito de sua matriz e de seus interferentes, sendo simultaneamente ou posteriormente pré-concentrado. As técnicas convencionais utilizadas para esse fim são a extração líquido-líquido (LLE, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*), a extração em fase sólida (SPE, do inglês *Solid Phase Extraction*) e a extração por soxhlet (SANCHIS; YUSÀ; COSCOLLÀ, 2017). A Figura 2 apresenta configurações típicas dessas técnicas.

Tabela 2 – Técnicas empregadas em preparo de amostra de matrizes alimentícias

Técnicas baseadas em solvente	Técnicas baseadas em sorventes	Outras técnicas
Extração líquido-líquido (LLE)	Extração em fase sólida (SPE)	Extração assistida por ultrassom (UAE)
Microextração em fase líquida (LPME)	Microextração em fase sólida (SPME) nos modos imersão direta (DI) e headspace (HS)	Técnicas de extração-dessorção térmica
Microextração em gota única (SDME)	SPE magnética-dispersiva (m-dSPE)	
LPME com fibra oca (HF-LPME)	SPE com polímero molecularmente impresso (MISPE)	
Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME)	Extração sortiva em barra de agitação (SBSE)	
QuEChERS		

Fonte: Ong, Samsudin e Soto-Valdez (2020)

Figura 2 – Técnicas clássicas de extração empregadas em preparo de amostra. Legenda: (a) funil de separação utilizado em LLE; (b) cartucho de SPE; e (c) aparato de extração por soxhlet.



Fonte: Adaptado de Wikimedia Commons

A LLE é realizada por meio do contato entre dois líquidos imiscíveis, geralmente uma fase aquosa e outra orgânica. Os compostos migram de uma fase para a outra conforme a sua afinidade e solubilidade. A LLE se destaca pela sua simplicidade e pelos aparatos e vidrarias de baixo custo. No entanto, o grande volume de solventes tóxicos utilizados e tempos longos necessários para se alcançar a total transferência do analito tornaram-na menos atrativa. A SPE se estabeleceu a partir da década de 1970 e se assemelha à cromatografia líquida clássica, sendo constituída de uma coluna aberta contendo um sólido sortivo. Esse dispositivo, chamado de cartucho, recebe a amostra líquida que percola através do sólido e retém os analitos. Posteriormente os analitos são eluídos com um solvente apropriado, usualmente orgânico. O desenvolvimento da SPE representou um avanço importante na história do preparo de amostra, pois contornava as principais limitações da LLE (LANÇAS, 2009).

A extração por soxhlet é uma técnica muito utilizada em Química Orgânica e Analítica quando a matriz se encontra no estado sólido. Nela, um solvente volátil é aquecido e segue em direção a um condensador. Em seguida, o solvente vai para uma câmara onde se encontra a amostra sólida em um cartucho de papel. Por fim, este mesmo solvente retorna ao frasco de origem por meio de um sifão. Este processo é continuamente repetido. A simplicidade de operação e o fato de as extrações poderem ser desassistidas são características de destaque. Esse sistema, entretanto, requer longos tempos e elevado consumo de solventes orgânicos (CASTRO; PRIEGO-CAPOTE, 2010; NET et al., 2015).

O método QuEChERS (acrônimo do inglês *quick, easy, cheap, effective, rugged and safe*, em português: rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e seguro) foi desenvolvido em 2003 e ganhou notoriedade na análise a nível traço em matrizes alimentícias, tendo sido empregado para análise de EDCs. O QuEChERS é composto de duas etapas, uma de extração dos compostos para uma fase líquida e outra de limpeza por extração em fase sólida dispersiva (d-SPE). Nesta, o sólido sorvente é agitado com o extrato e retém coextrativos da matriz (VERMA et al., 2021). Há a expectativa de que o QuEChERS seja automatizado e miniaturizado, permitindo assim reduzir a operação manual, aumentar sua reprodutibilidade e reduzir reagentes e resíduos (PERESTRELO et al., 2019).

Embora as técnicas convencionais empregadas em preparo de amostra apresentem resultados satisfatórios, as tendências desse campo científico são o desenvolvimento de métodos miniaturizados e automatizados que respeitem os princípios de Química Verde, notoriamente a simplicidade e a redução de solventes tóxicos e de resíduos. Nesse sentido, também se busca integrar as etapas do preparo de amostra, como, por exemplo, extração, limpeza e pré-concentração (GONZÁLEZ-SÁLAMO; SOCAS-RODRÍGUEZ; HERNÁNDEZ-BORGES, 2018; ONG; SAMSUDIN; SOTO-VALDEZ, 2022).

O ano de 1990 é considerado um marco importante devido ao advento da microextração em fase sólida (SPME, do inglês *Solid Phase Microextraction*) por Arthur e Pawliszyn (1990). A SPME é constituída de um suporte revestido com uma fase sortiva e, em alguns casos, uma camada de proteção. A dessorção dos compostos pode ser realizada por eluição em alguns microlitros de solvente ou por via térmica em um injetor de um cromatógrafo gasoso. Do ponto de vista da Química Verde, a SPME surgiu com a promessa de ser livre de solventes orgânicos ou de uso insignificante destes. Ao longo do seu desenvolvimento, que permanece até os dias atuais, diferentes geometrias foram concebidas para prover melhorias específicas para cada problema analítico (PIRI-MOGHADAM; ALAM; PAWLISZYN, 2017).

Alguns anos depois, uma nova nomenclatura surgiu para se referir às técnicas miniaturizadas que utilizavam uma fase líquida para a extração dos compostos: a microextração em fase líquida (LPME, do inglês *Liquid Phase Microextraction*). A primeira a surgir foi a microextração em gota única (SDME, do inglês *Single Drop Microextraction*) que utilizava uma gota suspensa em uma microseringa exposta diretamente à amostra ou no espaço vazio acima desta (*headspace*). Devido a problemas com a estabilidade da gota, esta técnica evoluiu para um modo em que o solvente fosse aderido a uma membrana porosa, denominado de fibra oca (HF, do inglês *Hollow Fiber*). Uma outra possibilidade é a adição da gota (solvente extrator)

juntamente com um terceiro solvente (chamado de dispersor) diretamente na matriz aquosa. Assim, ocorre um sistema ternário em que, pelo fato de o solvente dispersor ser miscível tanto na amostra quanto na gota orgânica, formam-se microgotas dispersas na amostra. A coleta da gota é realizada por centrifugação. Esta é denominada de microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME, do inglês *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*) (YILMAZ; SOYLAK, 2020).

Tanto a SPME e a LPME têm sido aplicadas no preparo de amostras alimentícias com boa sensibilidade e pré-concentração. Porém, a SPME tem sido preferida devido a sua facilidade de operação e sua versatilidade para amostras tanto líquidas quanto gasosas (GONZÁLEZ-SÁLAMO; SOCAS-RODRÍGUEZ; HERNÁNDEZ-BORGES, 2018).

2.3 MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

O dispositivo clássico e mais usual de SPME é constituído de uma fibra de sílica fundida contendo em sua superfície uma camada fina de revestimento que possui de 5 a 100 μm de espessura. Este revestimento pode ser um sólido polimérico ou um líquido imobilizado. A fibra revestida é armazenada em um aparato que se assemelha a uma seringa, permitindo a exposição ou a retração da fibra. A SPME pode ser empregada em dois modos de operação: i) imersão direta (DI, do inglês *Direct Immersion*) via exposição diretamente na amostra líquida ou gasosa; e ii) *headspace* (HS) via exposição à fase gasosa acima da amostra líquida ou sólida em sistema fechado (SPIETELUN et al., 2010).

A SPME possui caráter não exaustivo, isto é, nem todo o analito presente na amostra é extraído; ao invés disso, se estabelece uma distribuição do analito entre a amostra e a fibra que é definida pela sua respectiva constante de distribuição (K_{fa}), conforme as Equações (1) e (2). C_f e C_a representam as concentrações do analito na fibra e na amostra, respectivamente, em estado de equilíbrio. No caso do revestimento ser sólido, C_f deve ser entendido como a concentração do analito na superfície desse sólido. Devido a sua recuperação absoluta ser quase sempre inferior a 100%, calcula-se a exatidão em técnicas de microextração por meio de recuperação relativa (PAWLISZYN, 2012).

$$[A]_{amostra} \rightleftharpoons [A]_{fibra} \quad (1)$$

$$K_{fa} = \frac{C_f}{C_a} \quad (2)$$

A partir da Equação (2), do balanço de massas e de alguns rearranjos algébricos, chega-se à Equação (3) que indica o número de mols (n) extraídos pela fibra. É interessante observar a sua dependência com a concentração original da amostra (C_0), o que permite estabelecer uma curva de calibração, mas também a sua influência com outros fatores, como a constante de distribuição e volumes de amostra (V_a) e de fase sortiva (V_f).

$$n = \frac{C_0 K_{fa} V_a V_f}{K_{fa} V_f + V_a} \quad (3)$$

Em situações nas quais o volume de amostra é muito maior que a constante de fase sortiva ($V_a \gg K_{fa} V_f$), a Equação (3) pode ser simplificada para a Equação (4). A determinação do valor da constante de distribuição não é uma tarefa simples devido a vários fatores experimentais que podem influenciá-la.

$$n = C_0 K_{fa} V_f \quad (4)$$

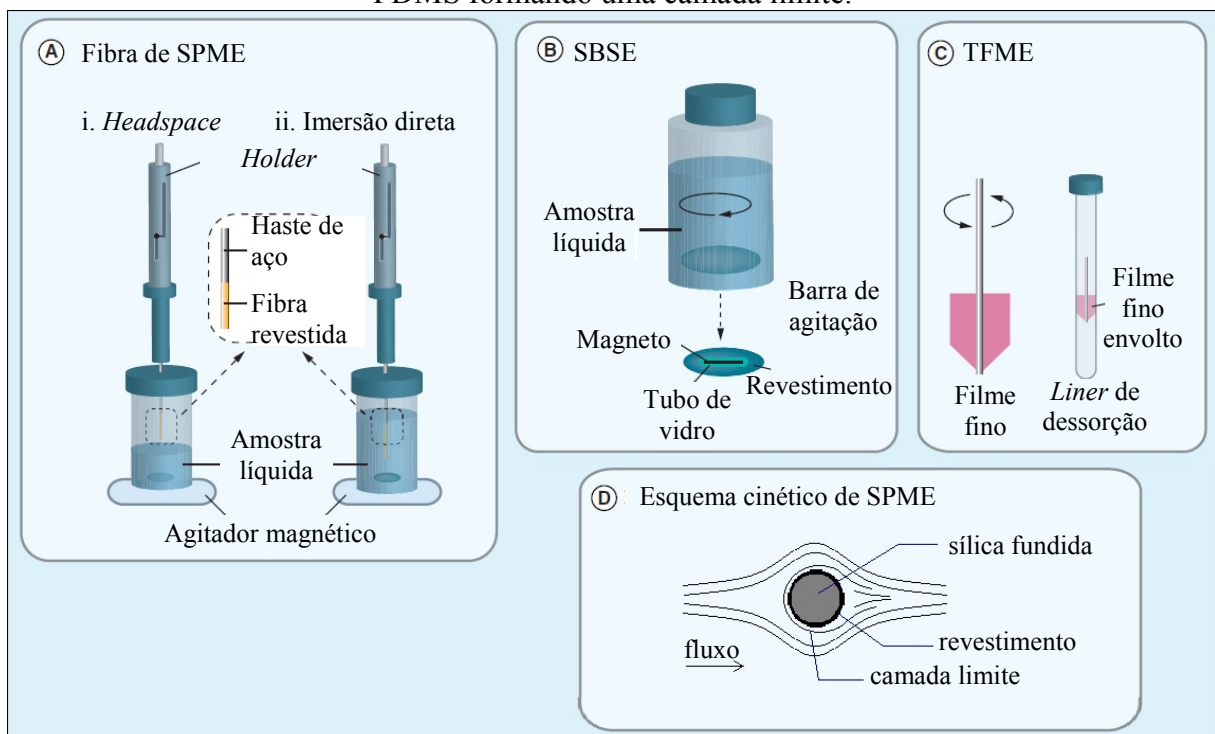
Em 1999, mantendo a mesma fase sortiva utilizada inicialmente em SPME – o líquido viscoso de polidimetilsiloxano (PDMS) –, foi possível aumentar a capacidade de extração pelo aumento do volume de fase sortiva (BALTUSSEN et al., 1999). Este novo dispositivo foi constituído de uma barra de agitação magnética inserida em um tubo de vidro revestido com uma camada de PDMS entre 0,3 e 1,0 mm. A extração sortiva com barra de agitação (SBSE, do inglês *Stir Bar Sorptive Extraction*), como foi denominada, pode ser desorvida em uma unidade térmica em GC ou via líquida para LC (KATAOKA, 2015).

Em busca de aumentar a sensibilidade e a eficiência de extração da SPME, desenvolveram-se novas fases com maiores valores de K_{fa} e revestimentos mais espessos. Também foram desenvolvidas fases sortivas com propriedades adsorptivas ou mistas, caracterizadas por alta porosidade. Todavia, observou-se que o aumento da espessura exigia tempos mais longos para se atingir o equilíbrio químico. Com o objetivo de equacionar capacidade e velocidade de extração, a geometria de filme fino (TF, do inglês *Thin Film*) foi proposta. Assim, a fase sortiva foi suportada em uma superfície planar que permitiu o aumento da área geométrica e do contato com a amostra; o que resultou em maior volume de fase sortiva, porém de forma a manter baixa a espessura do revestimento (BRUHEIM; LIU; PAWLISZYN, 2003). A Figura 3 apresenta geometrias comumente utilizadas em SPME e detalha o processo cinético de extração para a fibra, mas que pode ser estendido para os outros formatos.

A formação dos filmes finos pode ser realizada por diferentes abordagens. O *dip coating* é uma destas possibilidades, na qual o suporte é mergulhado em uma mistura

contendo a fase sortiva dissolvida ou dispersa em um solvente ou em uma cola. Revestimentos mais espessos podem ser obtidos pela repetição do processo de imersão. O *dip coating* pode ser feito via ligação covalente ou por deposição física. Fases sortivas quimicamente ligadas requerem a funcionalização do suporte por meio de um pré-tratamento para ativação química da superfície, e, de forma geral, são formadas por camadas mais finas uma vez que todos os grupos ativos na superfície são ocupados na primeira imersão. Assim, esse procedimento acaba sendo mais complexo e laborioso do que a deposição física (OLCER et al., 2019).

Figura 3 – Geometrias de SPME (a-c) e esquema cinético de extração em fibra de SPME com PDMS formando uma camada limite.

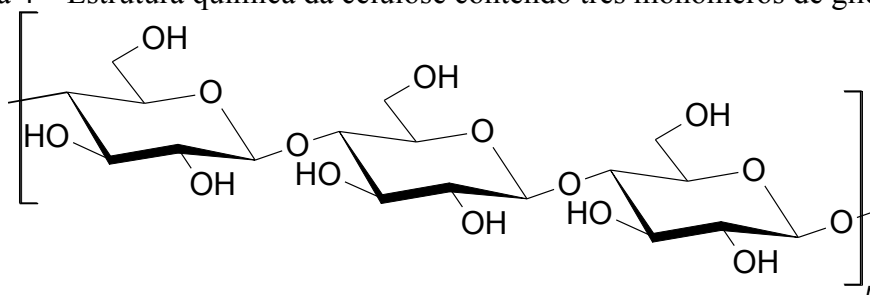


Fonte: Adaptado de Kataoka (2015)

Uma perspectiva que tem atraído atenção no preparo de fases sortivas em TFME é o uso de papel como suporte. Esse material é atrativo devido à alta disponibilidade, baixo custo e estrutura planar e porosa. O papel filtro comumente presente em laboratórios é adequado para essa finalidade e possui cerca de 95% de celulose, um polímero de origem natural e biodegradável (DÍAZ-LIÑÁN et al., 2020; MAFRA et al., 2020). A celulose é constituída a partir da união de moléculas de D-glicose por meio de ligações β -1,4-glicosídicas, formando cadeias não ramificadas que se mantêm unidas por ligações de hidrogênio e forças de van der Waals (KHAN; AHRING, 2019), conforme estrutura na Figura 4. A grande quantidade de hidroxilas na superfície da celulose confere caráter hidrofílico e limita a interação com

compostos menos polares, como os ftalatos, por exemplo. Ao mesmo tempo, esses grupos hidroxilas a tornam excepcionalmente interessante para modificações químicas e diferentes aplicações. Por esta razão, o uso do papel no preparo de amostra inclui a alteração da superfície por meio de imobilização – química ou física – de uma fase sortiva (WU; HE, 2019).

Figura 4 – Estrutura química da celulose contendo três monômeros de glicose.



Fonte: Elaborado pelo Autor com auxílio do software ACD/ChemSketch

2.3.1 Fases sortivas baseadas em papel

Uma das primeiras aplicações de fases sortivas baseadas em papel (PSP, do inglês *Paper-Based Sorptive Phase*) é atribuída a Chen e Hurtubise no final dos anos de 1990. Eles utilizaram papel impregnado com silicone – Whatman 1PS, disponível comercialmente como separador de fases em LLE – para isolar hidrocarbonetos policíclicos aromáticos de água e determiná-los diretamente por técnicas luminescentes (CHEN; HURTUBISE, 1998). Dentre as possibilidades de preparo de PSPs, a técnica de *dip coating* com a deposição física do sorvente possui destaque pela simplicidade e por não necessitar de equipamentos sofisticados, podendo ser realizada em praticamente qualquer laboratório. Nesse sentido, se faz oportuno o seu uso no preparo de amostra no contexto de microextração, conforme compilado na Tabela 3.

Tabela 3 – Aplicações de fases sortivas baseadas em papel por deposição física no contexto de microextração previamente à análise por cromatografia e espectrometria de massas

Revestimento	Analito(s)	Amostra	Técnica de extração	Técnica instrumental	Referência
Poliestireno	Metadona	Urina	Extração em ponteira	GC-MS	(RÍOS-GÓMEZ; LUCENA; CÁRDENAS, 2017)
Nanopartículas de ZnO e poliamida	Pesticidas organofosforados	Água de rio e de represa	TFME assistida por ultrassom	GC-FID	(AYAZI; ESFAHALAN; KHOSHESAB, 2018)
Óxido de grafeno e poliamida	Pesticidas organofosforados	Água de rio, de represa e encanada	MEPS	GC-FID	(AYAZI; ESFAHLAN; MATIN, 2018)
Nanochifres de carbono de parede simples	Antidepressivos	Urina	Extração em ponteira	UPLC-DAD DI-ESI-MS	(RÍOS-GÓMEZ et al., 2018)
MIP a base de poliamida	Cocaína e metanfetamina	Saliva	TFME	DI-ESI-MS/MS	(DÍAZ-LIÑÁN et al., 2021a)
Nanopartículas magnéticas de Fe ₃ O ₄ revestidas com SiO ₂ em poliamida	Parabenos e triclosan	Água de piscina	Imersão direta com agitação	LC-MS/MS	(CASADO-CARMONA; LUCENA; CÁRDENAS, 2021)
Poliamida	Antibióticos	Saliva	TFME	LC-MS/MS	(BENEDÉ et al., 2021a)
Poliestireno e poliamida	Filtros UV	Água de mar e de piscina	TFME	LC-MS/MS	(BENEDÉ et al., 2021b)

Fonte: Elaborado pelo Autor (2022)

Legenda: MIP, polímero molecularmente impresso; TFME, microextração em filme fino; MEPS, microextração em sorvente empacotado; GC, cromatógrafo gasoso; MS, espectrômetro de massas; FID, detector por ionização em chama; UPLC, cromatógrafo líquido de ultra eficiência; DAD, detector de arranjo de diodos; DI, infusão direta; ESI, ionização por eletronebulização; LC, cromatógrafo líquido.

Materiais poliméricos são frequentemente empregados em SPME devido à sua capacidade de extração e estabilidade físico-química. Por esse motivo, poliestireno (PS) foi proposto como fase sortiva. Obtido a partir de embalagem de iogurte, PS foi dissolvido em clorofórmio na concentração de 3% (m/v) com subsequente imersão do papel filtro nessa solução. Após a evaporação do solvente, observou-se a formação de um filme fino de poliestireno na superfície. Este dispositivo foi inserido em uma ponteira de micropipeta e utilizado na determinação de metadona em urina por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (RÍOS-GÓMEZ; LUCENA; CÁRDENAS, 2017).

O uso de nanopartículas como fase sortiva é vantajoso pelo aumento da área superficial e do número de sítios de adsorção. Assim sendo, nanopartículas de óxido de zinco (AYAZI; ESFAHALAN; KHOSHESAB, 2018) e de óxido de grafeno (AYAZI; ESFAHLAN; MATIN, 2018) foram imobilizadas em papel. Nestes casos, o papel foi imerso em solução contendo as nanopartículas e poliamida, sendo subsequentemente introduzido em água. Devido a troca do solvente ácido fórmico por água, a poliamida se solidificou formando o filme fino. Tais nanocompósitos foram utilizados para a determinação de pesticidas organofosforados em amostras aquosas por cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama.

Agregados de grafeno nanoparticulados também foram usados como revestimento em papel. O papel filtro foi imerso em uma mistura dessas nanopartículas em clorofórmio, formando o filme fino após a evaporação do solvente. O dispositivo confeccionado foi inserido em uma ponteira de micropipeta para a extração de antidepressivos em urina. A quantificação foi feita de modo comparativo com as técnicas de cromatografia líquida de ultra performance acoplada ao detector de arranjo de diodos e a infusão direta em espectrômetro de massas com ionização por eletronebulização (RÍOS-GÓMEZ et al., 2018).

Um polímero molecularmente impresso (MIP, do inglês *Molecularly Imprinted Polymer*) foi preparado a partir de uma solução em ácido fórmico contendo poliamida, moléculas modelo e um co-solvente porógeno. Após o papel filtro ser mergulhado nessa solução e evaporado o solvente, verificou-se que a fase sortiva possuía maior seletividade aos analitos frente ao mesmo polímero produzido na ausência das moléculas modelo. Diferentemente dos métodos usuais de produção de MIP que requerem uma reação química, essa se baseou apenas na forma como os compostos interagem durante o processo de formação do sorvente. Cocaína e metanfetamina foram extraídas utilizando esse material e determinados em saliva por infusão direta em espectrômetro de massas em tandem com ionização por eletronebulização (DÍAZ-LIÑÁN et al., 2021a).

Em SPME, quando o volume de amostra é grande o suficiente – ver Equação (4) –, a quantidade de mols extraída se torna independente do volume de amostra. Isso é bastante pertinente pois permite o desenvolvimento de amostradores para extração *on-site*, que integram a amostragem, extração e pré-concentração em uma única etapa, em consonância com os princípios da Química Analítica Verde. Pensando nisso, uma fase sortiva magnética de poliamida baseada em papel foi desenvolvida para ser acoplada a um magneto em um agitador elétrico, permitindo o fácil manuseio do equipamento. Este aparato foi inserido em água de piscina para a extração de parabenos e triclosan. A separação e quantificação foi realizada em laboratório por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem (CASADO-CARMONA; LUCENA; CÁRDENAS, 2021).

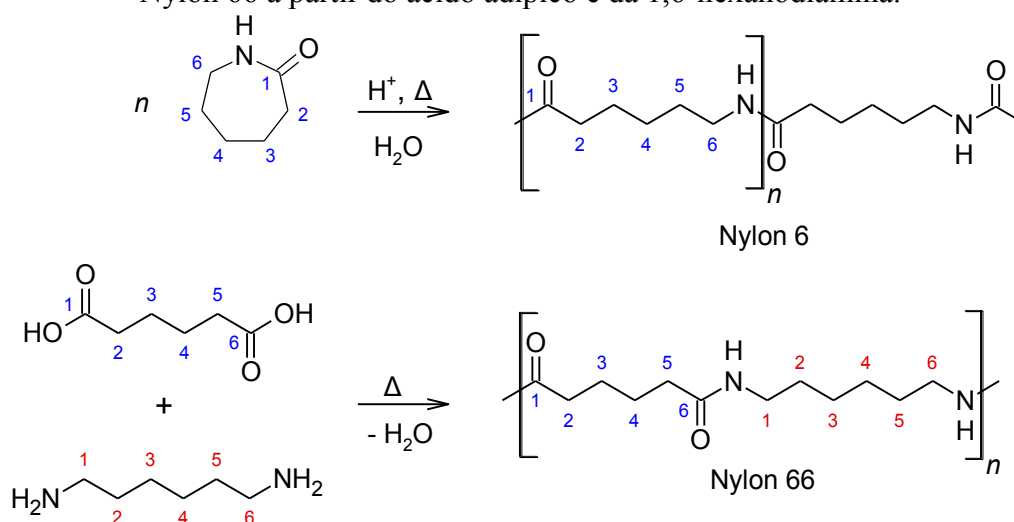
Embora o papel possa ser usado por si só para a extração de compostos de caráter hidrofílico (DÍAZ-LIÑÁN et al., 2021b), é possível a existência de um efeito sinérgico ou co-extrativo visando ampliar a faixa de compostos aptos a serem extraídos. Isso ficou evidenciado na análise de antibióticos derivados da penicilina compreendendo diferentes polaridades em amostras de saliva. Desta forma, os compostos mais polares foram extraídos pela celulose enquanto que os menos polares foram extraídos pela poliamida (BENEDÉ et al., 2021a). De modo similar, um PSP contendo metade recoberto de poliamida e outra metade de poliestireno mostrou-se melhor do que suas componentes individuais para a extração de quatorze filtros de radiação ultravioleta (BENEDÉ et al., 2021b). A instrumentação analítica utilizada nestes casos foi um cromatógrafo líquido acoplado à espectrometria de massas em tandem.

Dentre as aplicações constantes na Tabela 3, é possível verificar a preferência por revestimentos de poliamida. O termo nylon é usado para se referir às poliamidas de origem sintética e, mais recentemente, para se referir às poliamidas totalmente alifáticas. Disponível comercialmente a partir de 1938 com vistas a substituir a seda, o nylon se tornou hoje amplamente utilizado. Seu sucesso se deve por sua estabilidade térmica e mecânica e seu fácil processamento (RULKENS; KONING, 2012). As poliamidas são tipicamente produzidas a partir da reação de condensação de um diácido e uma diamina, conforme Figura 5. Sua nomenclatura é descrita na forma Nylon *XY* ou Poliamida *XY* (PA *XY*), onde X e Y são algarismos que se referem ao número de átomos de carbono presentes na estrutura da amina e do ácido, respectivamente. Alternativamente, um único algarismo pode ser utilizado quando os grupos ácido e amino se encontram na mesma molécula (MCKEEN, 2017).

No que concerne às aplicações de PSPs, a poliamida mais utilizada é o Nylon 6. Esse polímero tem apresentado boa capacidade sortiva e fácil impregnação no papel, além de ser

biocompatível (DMITRIENKO et al., 2013). O Nylon 6 também tem apresentado boa compatibilidade com nanopartículas, propiciando a formação de nanocompósitos que permitem aprimorar sua capacidade sortiva (DARVISHNEJAD; RAOOF; GHANI, 2021; REYES-GALLARDO; LUCENA; CÁRDENAS, 2017). Ainda, tem sido relatado o uso do nylon para a confecção de nanofibras por meio de eletrofiação para aplicação em SPME (BAGHERI et al., 2012; MEHRANI; EBRAHIMZADEH; MORADI, 2019). Outras aplicações incluem como membranas em SPE (PERALTA; FERNÁNDEZ; MASI, 2011) e fase sortiva impressa em 3D em TFME (KOŁODZIEJ; SOBCZAK; GORYŃSKI, 2022).

Figura 5 – Reações de condensação para formação do Nylon 6 a partir da caprolactama e do Nylon 66 a partir do ácido adípico e da 1,6-hexanodiamina.



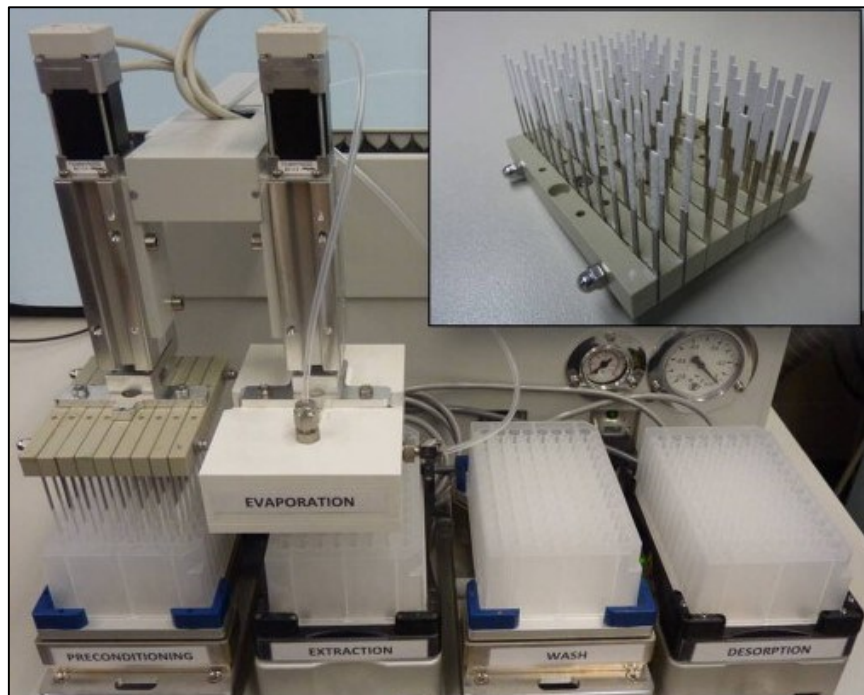
Fonte: Elaborado pelo Autor com auxílio do software ACD/ChemSketch

2.3.2 Automação da microextração em filme fino

Dentre as aplicações citadas na Tabela 3 e, no melhor do nosso conhecimento, não há uso de PSPs em sistemas automatizados ou semiautomatizados. A automação do preparo de amostra surge como necessidade frente aos instrumentos analíticos modernos que têm apresentado elevada capacidade de processamento e análise. As técnicas de preparo de amostra utilizadas em muitos laboratórios ainda exigem considerável trabalho manual, o que pode representar cerca de 60% do tempo gasto pelo analista durante o procedimento laboratorial (MAJORS, 2015). A TFME se encontra automatizada e comercialmente disponível sob o nome de Concept 96 da PAS Technology (Magdala, Alemanha), voltado para o uso com HPLC ou LC-MS. Esse aparato robótico, mostrado na Figura 6, é capaz de realizar as etapas de pré-condicionamento, extração, limpeza, dessorção e, opcionalmente, evaporação e reconstituição de até 96 amostras de forma simultânea (MIRNAGHI et al., 2011). Além do aumento da

frequência analítica e da produtividade, a automação reduz a exposição do analista aos solventes e amostras, o que diminui o risco de contaminação e eleva a segurança do ambiente de trabalho. A remoção do fator humano na execução do trabalho também contribui para o aumento da reprodutibilidade, uma vez que o equipamento realiza a operação nas mesmas condições em cada amostra (VUCKOVIC, 2013).

Figura 6 – Estação robótica de preparo de amostra automatizado Concept 96 (PAS Technology) com capacidade de processamento de até 96 amostras simultaneamente. Em detalhe, escova contendo 8 pentes com 12 pinos cada. Cada pino possui sua extremidade inferior revestida com fase sortiva.

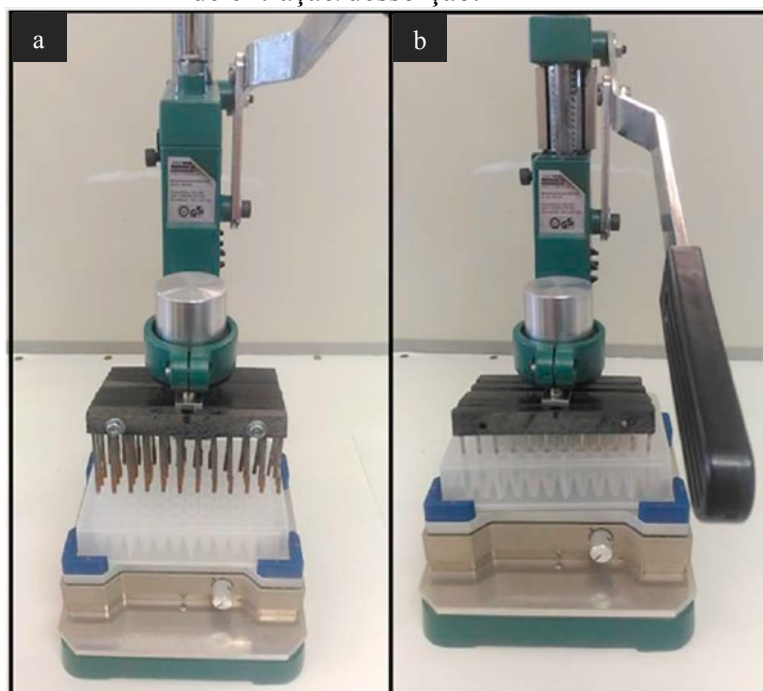


Fonte: Boyaci et al. (2014)

Apesar dos benefícios que equipamentos automatizados – como o Concept 96 – oferecem, o seu elevado custo de aquisição ainda é um empecilho para a expansão de seu uso em laboratórios. Entretanto, existem aparelhos mais simples disponíveis comercialmente e baseados em agitadores orbitais para a realização das etapas do preparo de amostra em placas multipoços. Os mais utilizados são os de 96 poços como o da Figura 7 – por vezes também referido pelo nome anglófono *96 well-plate*. Nesse sistema as etapas devem ser realizadas com o auxílio de um técnico e não é possível a integração ao instrumento cromatográfico, contudo, o seu uso eleva a frequência analítica e aumenta a reprodutibilidade das análises (MAFRA, 2021). O emprego de aparatos semiautomatizados, como o que foi usado no presente estudo, colabora para o desenvolvimento de metodologias com menor custo e mais acessíveis aos

laboratórios de menor orçamento, conforme preconizado numa perspectiva de uma Química Analítica Democrática (DE LA GUARDIA; GARRIGUES, 2020).

Figura 7 – Sistema semiautomatizado de extrações paralelas – isto é, simultâneas – em placa de 96 poços. Legenda: (a) pinos contendo fase sortiva presos ao equipamento; e (b) posição de extração/dessorção.



Fonte: Carmo, Merib e Carasek (2019)

Uma limitação importante do sistema de 96 poços é o volume utilizado. Volumes entre 0,8 e 1,8 mL são tipicamente empregados como exigência mínima para que a fase sortiva esteja completamente imersa. Por outro lado, o volume máximo que pode ser utilizado nos poços disponíveis comercialmente beira a 2 mL. Essa situação gera três consequências: i) restrição do uso de amostras muito pequenas; ii) baixos fatores de enriquecimento devido à baixa razão entre os volumes de amostra e de solvente de dessorção; e, iii) maior consumo de solvente orgânico do que o idealizado para as técnicas de microextração (VUCKOVIC, 2013).

Em um procedimento de extração (JAMIL, 2020), o número de mols do composto presente no extrato final é uma fração do número de mols originalmente presentes na amostra:

$$n_{extrato} = \alpha \cdot n_{amostra} \quad (5)$$

onde n pode ser substituído pela sua relação de concentração (C) e volume (V),

$$CV_{extrato} = \alpha \cdot CV_{amostra} \quad (6)$$

A Equação (6) pode ser rearranjada da seguinte forma:

$$\frac{C_{extrato}}{C_{amostra}} = \alpha \cdot \frac{V_{amostra}}{V_{extrato}} \quad (7)$$

O fator de enriquecimento (EF, do inglês *Enrichment Factor*) pode ser definido pela relação multiplicativa que geralmente expressa o quão mais concentrado é o extrato obtido do que a sua amostra:

$$C_{extrato} = EF \cdot C_{amostra} \quad (8)$$

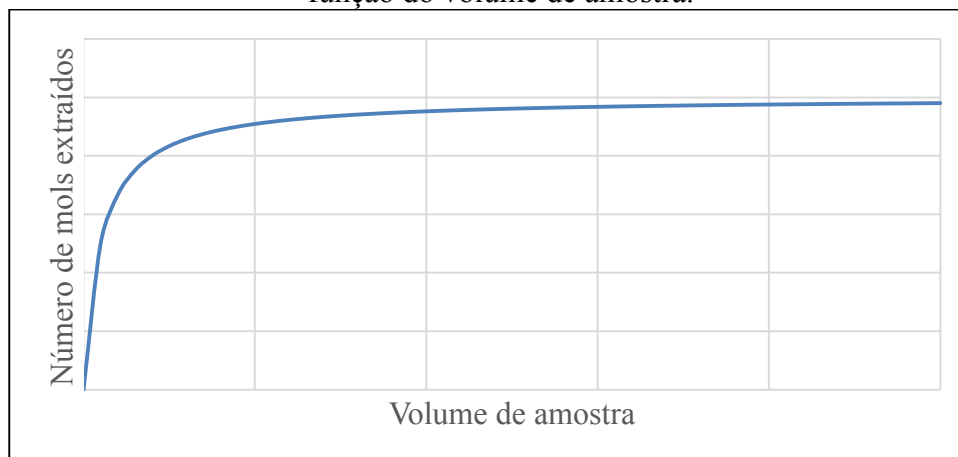
As Equações (7) e (8) podem ser combinadas para resultar em:

$$EF = \alpha \cdot \frac{V_{amostra}}{V_{extrato}} \quad (9)$$

A fração α é uma constante que depende das condições de extração e de dessorção. O fator de enriquecimento teórico e máximo de ser alcançado pode ser calculado a partir dos volumes de amostra e de extrato final considerando-se um processo exaustivo, no qual α assume a unidade.

A partir da Equação (9) pode-se inferir que fatores de enriquecimento maiores podem ser alcançados a partir da redução do volume de extrato e pelo aumento do volume de amostra. Nas técnicas de microextração, a quantidade máxima que se pode extrair também é limitada pela Equação (3) que estabelece um volume crítico de amostra, a partir do qual o fenômeno de extração se torna independente e cujo comportamento pode ser visto no esboço na Figura 8. Este último atributo é especialmente relevante para as aplicações *in vivo* e *on-site* (PIRIMOGHADAM; ALAM; PAWLISZYN, 2017).

Figura 8 – Esboço da Equação (3) representando o número de mols extraídos em SPME em função do volume de amostra.

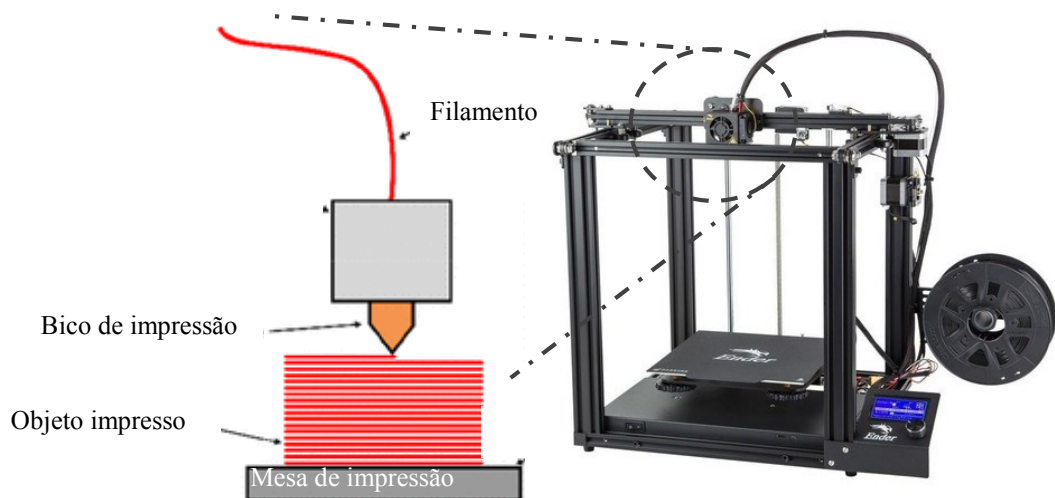


Fonte: Elaborado pelo Autor (2022)

2.3.2.1 Impressão 3D

Além das limitações de volume, um outro obstáculo encontrado na TFME com uso de placa multipiços é a compatibilização com os PSPs. Tradicionalmente, os pentes de alumínio servem como suporte para a fase sortiva. Entretanto, torna-se um entrave para o emprego de outros tipos de fases, como as que usam papel, tecido ou membrana como suporte. Uma solução elegante a este tipo de problema pode ser feita por intermédio da tecnologia de impressão tridimensional (3D). A impressão 3D – também conhecida como manufatura aditiva ou prototipagem rápida – é uma abordagem iterativa para a fabricação de objetos que permite o design e o teste de protótipos até que se obtenha o resultado desejado. As impressoras 3D mais utilizadas se baseiam na técnica de modelagem por deposição fundida (FDM, do inglês *Fused Deposition Modeling*), na qual o filamento termoplástico é fundido e extrusado a partir de um bico em direção a uma superfície de modo a formar camadas do material depositado, conforme representado pela Figura 9 (TULLY; MELONI, 2020).

Figura 9 – Princípio de funcionamento da impressora 3D de modelagem por deposição fundida.

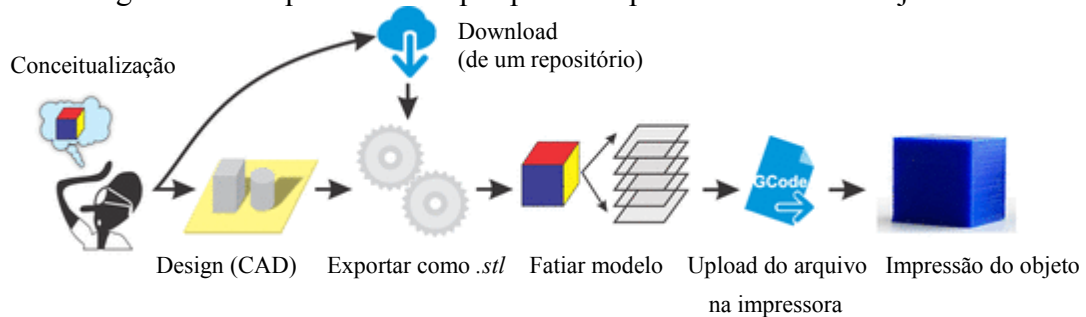


Fonte: Adaptado de Tully e Meloni (2020) e de divulgação da Creality Ender-5

O processo de impressão 3D é representado pela Figura 10. A primeira etapa é a conceitualização do objeto a ser impresso, na qual deve ser observado o formato, as propriedades desejadas, o material a ser utilizado e a finalidade prática de que se busca alcançar. A partir daí, o usuário pode optar por buscar um modelo pronto em repositórios ou desenvolver o seu próprio modelo por meio de um desenho assistido por computador (CAD, do inglês *Computer Aided Design*). Esse modelo deve ser então exportado para um arquivo de formato STL para descrevê-lo tridimensionalmente. Uma vez de posse dessa descrição 3D, é necessário o processamento por um software responsável por fatiar o modelo em camadas e inserir as

configurações de impressão. Isto gera um arquivo numa linguagem de programação denominada de GCode que pode ser lida pela impressora 3D (TULLY; MELONI, 2020).

Figura 10 – Sequência de etapas para a impressão 3D de um objeto.



Fonte: Tully e Meloni (2020)

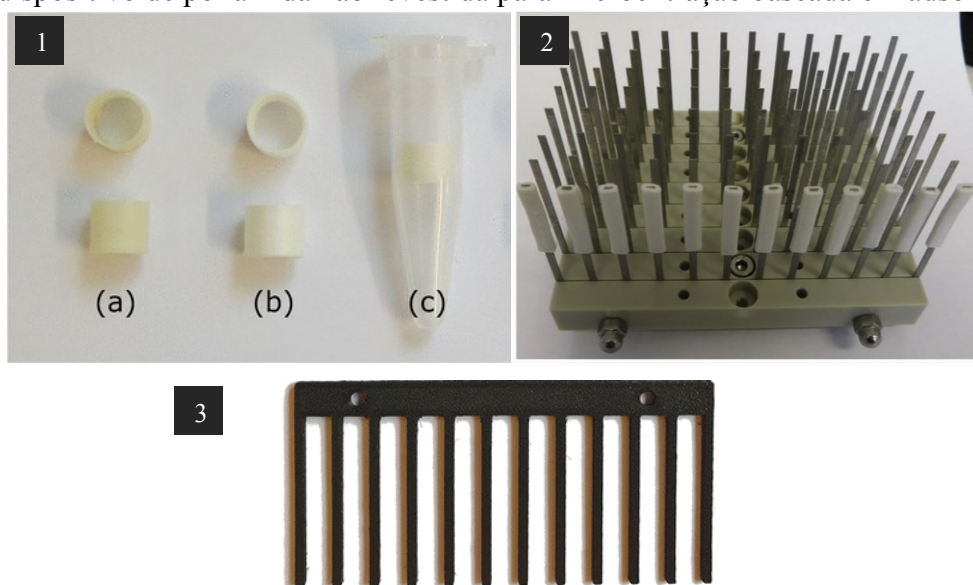
Embora a impressão 3D esteja consideravelmente difundida em diferentes campos científicos, ainda se trata de um recurso pouco explorado no preparo de amostra, especialmente em microextração. Objetos com funcionalidade de suporte têm sido desenvolvidos tanto em LLE quanto em SPE, porém os dispositivos impressos neste último também têm sido utilizados como fase sortiva. A impressão 3D também tem sido utilizada para desenvolver dispositivos de separação por membrana (LI et al., 2020; WANG; PUMERA, 2021). Alguns estudos foram selecionados a seguir com a finalidade de exemplificar a aplicação da impressão 3D. A Figura 11 apresenta dispositivos desenvolvidos por esses autores.

A primeira menção a uma fase sortiva preparada por modelagem por deposição fundida empregou o filamento LAY-FOMM 60, um compósito baseado em poliuretano contendo álcool polivinílico (PVA). Esse material foi impresso na forma de um anel com 5 mm de altura, diâmetro externo de 8,6 mm e espessura de 0,2 mm, dimensões adequadas para acomodar-se no interior de um tubo Eppendorf. Após uma limpeza com metanol e água, uma parte significativa do PVA foi solubilizado, fazendo com que o anel adquirisse propriedade porosa. Essa fase foi utilizada para a extração do fármaco glimepirida de amostras de água. Os autores propuseram que essa estratégia fosse aproveitada para a fabricação de fases sortivas com diferentes geometrias para SPME (BELKA; ULENBERG; BĄCZEK, 2017). A fim de demonstrar aplicabilidade, essa mesma metodologia foi aplicada para a determinação de hormônios esteroidais em plasma sanguíneo (KONIECZNA et al., 2018).

A partir das condições previamente otimizadas na determinação dos hormônios esteroidais, o mesmo grupo de pesquisa aplicou seus conhecimentos na TFME. Eles imprimiram peças de LAY-FOMM 60 em um formato capaz de se encaixar nos pinos do

sistema de extração de 96 poços. De forma similar, esse material passou por um condicionamento para remoção do PVA e de impurezas, fornecendo um material poroso. Apesar da baixa eficiência de extração e da capacidade nula de pré-concentração, os autores conseguiram bons resultados de exatidão e precisão nas amostras de plasma sanguíneo (BELKA et al., 2019).

Figura 11 – Dispositivos impressos em 3D para a TFME. Legenda: 1) tubo impresso em LAY-FOMM 60, (a) antes do condicionamento, (b) depois do condicionamento, e (c) no interior de um tubo Eppendorf; 2) LAY-FOMM 60 como fase sortiva nos pentes da TFME; e 3) dispositivo de poliamida não revestida para microextração baseada em adsorção.



Fonte: Adaptado de 1) Belka, Ulenberg e Baczek (2017); 2) Belka et al. (2019) e 3) Kołodziej, Sobczak e Goryński (2022)

De modo geral, a aplicabilidade dos protótipos impressos em 3D em microextração e em outras áreas do preparo de amostras é limitada pela falta de materiais que ofereçam boa resistência térmica e química, tendo-se em consideração os diferentes solventes orgânicos existentes. Nesse sentido, um novo material contendo poliamida e 15% de fibra de carbono (PA CF15) foi proposto para a confecção dos pentes da TFME em substituição aos pentes metálicos, os quais possuem um processo laborioso e custoso para serem revestidos. Observou-se que os pentes tradicionais podem ser substituídos por pentes confeccionados com poliamida 12 contendo 15% de fibra de carbono, exibindo desempenho analítico similar. Verificou-se também que o procedimento para revestir os novos pentes é mais simples, mais econômico e menos agressivo quimicamente. Entretanto, o que mais se destacou foi a confecção dos pentes com poliamida 6 e 15% de fibra de carbono, os quais não exigiram o recobrimento com a fase sortiva e permitiram a extração direta dos 38 compostos analisados em saliva (KOŁODZIEJ; SOBCZAK; GORYŃSKI, 2022).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um método analítico para a determinação de desreguladores endócrinos em água por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (HPLC-DAD) utilizando, no preparo de amostra, poliamida 66 baseada em papel como fase sortiva e empregando-a na técnica de microextração em filme fino com sistema multipoço elaborado por meio da impressão 3D.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar a separação cromatográfica dos analitos no HPLC-DAD;
- Preparar fase sortiva baseada em papel filtro (PSP) a partir da poliamida 66 por meio de *dip coating* e caracterizá-la por espectroscopia de infravermelho e área superficial específica (BET);
- Produzir sistema de extração simultânea com placa multipoço por meio da impressão 3D;
- Otimizar fatores que afetam o preparo do PSP, do procedimento de extração e de dessorção dos analitos;
- Determinar e avaliar os principais parâmetros analíticos de mérito: faixa linear de trabalho, limites de detecção e quantificação, coeficiente de determinação, fator de enriquecimento e precisão intermediária;
- Determinar e avaliar a exatidão por meio de recuperação relativa, aplicando-se o método em amostras aquosas.

4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Padrões analíticos de dimetil ftalato, dietil ftalato, dibutil ftalato, benzilbutil ftalato, bis-(2-etilhexil) ftalato, di-n-octil ftalato, bisfenol A (99%), bisfenol F (99%), 4-octilfenol (99%) e 4-nonilfenol (99,8%) foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Os padrões sólidos foram utilizados para preparar soluções estoque individuais em metanol na concentração de 1000 mg L⁻¹. Os ftalatos (EPA Phthalate Esters Mix – CRM48805) foram adquiridos na forma de mix na concentração de 2000 mg L⁻¹ em metanol e foram diluídos com o mesmo solvente para 500 mg L⁻¹. Uma solução de trabalho padrão contendo todos os analitos em metanol em 50 mg L⁻¹ foi preparada por diluição.

Água ultrapura foi obtida por meio do sistema Mega Purity (Billerica, MA, EUA). Solventes grau HPLC acetonitrila (ACN) e metanol (MeOH) foram obtidos da Merck (Kenilworth, NJ, EUA). Etanol grau PA foi obtido da Neon Química. Cloreto de sódio (Neon, Suzano, Brasil) foi utilizado para ajuste de força iônica. Soluções de hidróxido de sódio e ácido clorídrico (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), nas concentrações de 0,1 e 1,0 mol L⁻¹ foram utilizadas para ajuste de pH.

Nylon 66 na forma de *pellets* foram adquiridos da Sigma Aldrich (Milwaukee, WI, EUA). Ácido fórmico foi adquirido da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Papel filtro foi utilizado para a imobilização da fase sortiva. PETG branco foi adquirido da SunLu (Zhuhai, China) e PP natural (FL100PP) foi adquirido da Braskem (Philadelphia, PA, EUA).

4.2 INSTRUMENTAÇÃO

Este estudo foi desenvolvido utilizando um cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu Prominence LC-20AT (Shimadzu, Quioto, Japão) equipado com detector de arranjo de diodos SPD-M20A e injeção manual Rheodyne 7725i (Rohnert Park, CA, EUA) com alça de injeção de 20 µL. A separação cromatográfica foi realizada em fase reversa em coluna HyperClone C18 da Phenomenex (Torrance, CA, EUA) de dimensões de 250 mm de comprimento por 4,6 mm de diâmetro interno e 5 µm de diâmetro de partícula. O comprimento de onda monitorado foi 200 nm. O gradiente de fase móvel acetonitrila/água foi otimizado com vazão de 1 mL min⁻¹; inicialmente foi mantido 45% de acetonitrila até 2,5 min, aumentado paulatinamente até 80% em 7,0 min de eluição, mantido constante até 8,0 min, aumentado até 90% em 8,50 min, mantido constante até 11,5 min, aumentado até 100% em 12,0 min, mantido

constante até 25,0 min e retornado para a condição inicial de 45% de acetonitrila na faixa de 25,10 a 30,0 min, conforme a Tabela 4.

Tabela 4 – Condições cromatográficas em modo gradiente otimizadas para a separação por HPLC-DAD em fase reversa C18 com vazão de 1 mL/min.

Tempo (min)	Acetonitrila (%) – Canal A	Água (%) – Canal B
0,01 – 2,50	45	55
7,00 – 8,00	80	20
8,50 – 11,50	90	10
12,00 – 25,00	100	0
25,10 – 30,00	45	55

Fonte: Elaborado pelo Autor (2022)

Um sistema semiautomatizado produzido pela Brüder Mannesmann Werkzeuge (Remscheid, Alemanha) foi empregado para as extrações e dessorções. Uma impressora 3D de fabricação por filamento fundido Creality Ender-5 (Shenzen, China) foi utilizada juntamente com os softwares de CAD Autodesk Fusion 360 (San Rafael, EUA) e de fatiamento Ultimaker Cura (Utrecht, Holanda).

4.3 PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DO PSP

O papel filtro foi cortado em formato retangular com dimensões de 2,5 cm por 0,5 cm. Uma solução de 20% (m/v) de nylon 66 foi preparada em ácido fórmico e o papel filtro foi mergulhado nessa solução com o auxílio de uma pinça. O papel filtro foi retirado da solução e repousado sobre uma placa de vidro à temperatura ambiente. Após a evaporação do solvente, é possível observar a formação de uma camada sortiva impregnada nos poros do papel. Esse processo de mergulhar e secar foi realizado novamente – totalizando dois mergulhos – e deu origem à fase sortiva baseada em papel (PSP) de poliamida 66 (ver APÊNDICE A). A fim de remover as impurezas presentes após a síntese, cada PSP foi condicionado com o equivalente à 300 μ L de metanol por 4 ciclos de 30 minutos cada. Ainda, foi realizada a extração dos analitos (50 μ g L⁻¹) de forma comparativa entre o PSP e o suporte de papel sem revestimento.

A massa média do papel cortado (n=3) foi de 10,1 \pm 0,3 mg e a massa média do PSP (n=12) foi de 21,3 \pm 1,4 mg, cuja diferença de 11,2 \pm 1,4 mg está associada com a quantidade de poliamida impregnada nos poros do papel. O papel filtro utilizado na confecção e o PSP foram caracterizados por espectroscopia de infravermelho de reflectância total atenuada (ATR-IR) e a poliamida removida da superfície do PSP foi caracterizada por espectroscopia de

infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). As análises de infravermelho foram realizadas pela Central de Análises do Departamento de Química da UFSC utilizando o equipamento da marca Bruker (modelo Alpha).

A área superficial específica do PSP foi determinada pela isoterma Brunauer-Emmett-Teller (BET) de adsorção e dessorção de nitrogênio (N₂) utilizando o instrumento modelo NOVA2200E da Quantachrome Instruments (Boynton Beach, FL, EUA). A análise de BET foi realizada pelo Laboratório de Catálise e Fenômenos Interfaciais (LACFI) do Departamento de Química da UFSC.

4.4 DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA SEMIAUTOMATIZADO DE 24 POÇOS

A impressão de peças em 3D requer que algumas configurações sejam definidas de acordo com o material e a finalidade da peça. Em todos os casos, a altura de camada foi 0,2 mm e a sobreposição de preenchimento foi 30%, bem como, as opções “permitir retração”, “evitar impressão de partes durante deslocamento” e adesão pelo tipo “*brim*” com cinco camadas, foram empregadas. Impressões utilizando PETG foram configuradas para temperatura do bico em 240 °C e da mesa em 68 °C; velocidade de impressão de 40 mm/s, sendo a primeira camada 20 mm/s; e velocidade do ventilador em 40%. Impressões utilizando PP (com auxílio de cola adesiva para PP/PE) foram configuradas para temperatura do bico em 230 °C e da mesa em 40 °C; velocidade de impressão de 45 mm/s, sendo a primeira camada 35 mm/s; e velocidade do ventilador em 80%. Outras configurações como porcentagem de preenchimento, número de camadas de parede, número de camadas superiores e inferiores, bem como a necessidade de gerar suporte foram avaliadas para cada peça constante na Tabela 5.

4.5 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO

A fim de encontrar as melhores condições de operação em termos de capacidade de extração e precisão do método de TFME, foram realizadas otimizações por abordagens multivariadas e univariadas. Em um primeiro momento foram otimizadas as condições relativas ao preparo do PSP, seguido das condições de extração e dessorção. Em todos os casos se utilizou o sistema de 24 poços desenvolvido com 15 mL de amostra e 400 µL de solvente de dessorção.

A quantidade de vezes que o papel filtro foi mergulhado na solução de nylon 66 em ácido fórmico, sendo feita a evaporação do solvente entre cada mergulho, foi estudada univariadamente em 2, 4 e 6 vezes. Após isso, avaliou-se a reusabilidade do dispositivo confeccionado no seu segundo e terceiro ciclo de vida.

Tabela 5 – Descrição das peças produzidas via impressão 3D para o sistema semiautomatizado com placa de 24 poços

(continua)

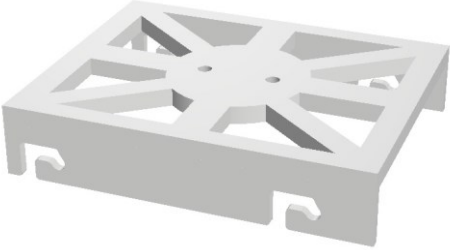
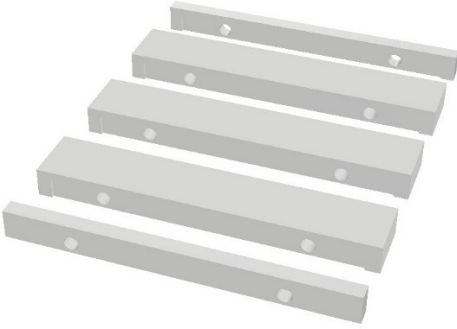
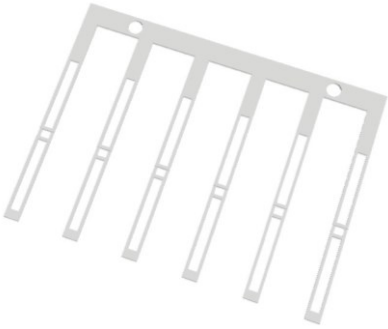
Descrição	Desenho assistido por computador	Material	Quantidade (un.)	Massa por unidade (g)	Tempo por unidade	Configurações
Peças para fixação dos PSPs						
Suporte para prender o conjunto dos pentes		PETG	1	27	4 h 29 min	Preenchimento: 10% (gradual) Núm. paredes: 3 Núm. sup/inf: 4 Requer suporte
Separadores dos pentes		PETG	1 na frente	5	46 min	Preenchimento: 8% Núm. paredes: 3 Núm. sup/inf: 4
			3 entre os pentes	Total: 36	1 h 55 min Total: 5 h 45 min	
			1 no fundo	5	47 min	
Pentes		PP	4	3 Total: 12	28 min Total: 1 h 52 min	Preenchimento: 100%

Tabela 5 – Descrição das peças produzidas via impressão 3D para o sistema semiautomatizado com placa de 24 poços

(continua)


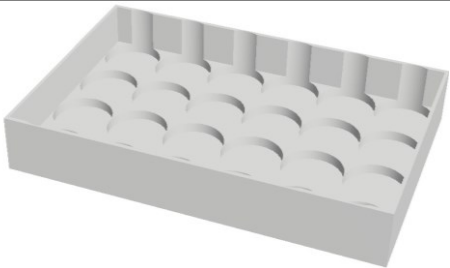
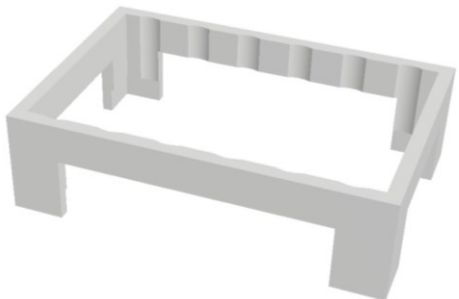

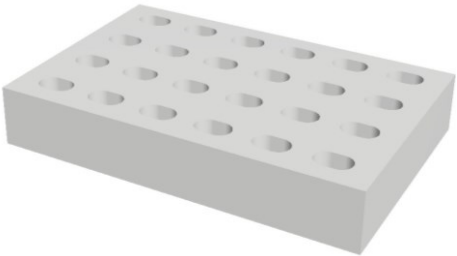
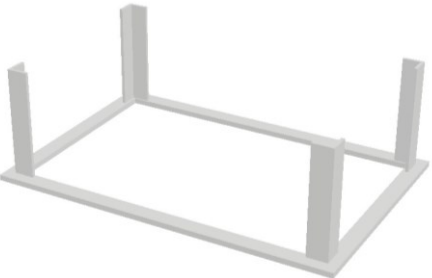
Descrição	Desenho assistido por computador	Material	Quantidade (un.)	Massa por unidade (g)	Tempo por unidade	Configurações
Peças para fixação dos PSPs						
Presilhas		PP	24	0,25 Total: 6	2 min Total: 48 min	Preenchimento: 100%
Peças para a etapa de extração						
Placa para encaixe dos frascos		PETG	1	39	7 h 27 min	Preenchimento: 25% Núm. paredes: 2 Núm. sup/inf: 2
Suporte para prender os frascos		PETG	1	36	5 h 45 min	Preenchimento: 8% Núm. paredes: 3 Núm. sup/inf: 4
Peças para a etapa de dessorção						
Poços		PP	24	2 Total: 48	24 min Total: 9 h 36 min	Preenchimento: 100%

Tabela 5 – Descrição das peças produzidas via impressão 3D para o sistema semiautomatizado com placa de 24 poços

(conclusão)						
Descrição	Desenho assistido por computador	Material	Quantidade (un.)	Massa por unidade (g)	Tempo por unidade	Configurações
Peças para a etapa de dessorção						
Placa para encaixe dos poços		PETG	1	56	8 h 50 min	Preenchimento: 5% Núm. paredes: 2 Núm. sup/inf: 4
Pernas para a placa dos poços		PETG	1	10	2 h	Preenchimento: 100%
<i>Total</i>			<i>62</i>	<i>280</i>	<i>48 h 05 min</i>	

Fonte: Elaborado pelo Autor (2022)

Legenda: PETG, polietileno tereftalato glicol; PP, polipropileno; Núm. paredes, número de camadas nas paredes da peça; Núm. sup/inf, número de camadas na parte superior e na parte inferior da peça

Um planejamento fatorial completo 2^4 foi selecionado para identificar os fatores que exercem influência na etapa de extração, bem como as interações existentes entre esses. No total foram 19 experimentos, tendo sido realizado 3 pontos centrais para estimar o erro puro. Os fatores analisados foram tempo de extração, pH da amostra, a porcentagem (m/v) de NaCl adicionado à amostra e o efeito da presença de etanol (v/v) na amostra. A Tabela 6 indica os experimentos e as condições empregadas nos níveis inferior (-1), intermediário (0) e superior (+1).

Tabela 6 – Condições empregadas no planejamento fatorial completo 2^4 no estudo dos fatores envolvidos na etapa de extração do método de TFME (concentração de $100 \mu\text{g L}^{-1}$)

Fatores (variáveis independentes)	Níveis		
	-1	0	1
Var1 – Tempo de extração (min)	30	110	190
Var2 – pH da amostra	2	6	10
Var3 – Porcentagem de NaCl (m/v)	0	15	30
Var4 – Porcentagem de etanol (v/v)	0	10	20

Experimento	Var1	Var2	Var3	Var4
1	30	2	0	0
2	190	2	0	0
3	30	10	0	0
4	190	10	0	0
5	30	2	30	0
6	190	2	30	0
7	30	10	30	0
8	190	10	30	0
9	30	2	0	20
10	190	2	0	20
11	30	10	0	20
12	190	10	0	20
13	30	2	30	20
14	190	2	30	20
15	30	10	30	20
16	190	10	30	20
17	110	6	15	10
18	110	6	15	10
19	110	6	15	10

Fonte: Elaborado pelo Autor (2022)

A variável tempo de extração foi estudada univariadamente em quadruplicata nos níveis 60, 100, 180 e 240 minutos. O melhor solvente para a dessorção dos analitos foi otimizado por meio de um planejamento simplex-centroide com acetona, acetonitrila e metanol,

conforme a Tabela 7. O tempo necessário para a dessorção dos analitos do PSP em acetonitrila foi estudado univariadamente em triplicata em 10, 20 e 30 minutos.

Tabela 7 – Proporções (v/v) empregadas no planejamento simplex-centroide para otimização de solvente de dessorção

Experimento	Acetona	Acetonitrila	Metanol
1	1	0	0
2	0	1	0
3	0	0	1
4	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	0
5	$\frac{1}{2}$	0	$\frac{1}{2}$
6	0	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$
10	$\frac{1}{3}$	$\frac{1}{3}$	$\frac{1}{3}$
11	$\frac{1}{3}$	$\frac{1}{3}$	$\frac{1}{3}$
12	$\frac{1}{3}$	$\frac{1}{3}$	$\frac{1}{3}$

Fonte: Elaborado pelo Autor (2022)

4.6 PARÂMETROS ANALÍTICOS DE MÉRITO

Após a otimização das condições de operação, o método desenvolvido foi validado com base nas diretrizes de notórias instituições regulatórias (AOAC INTERNATIONAL, 2016; ICH, 2005; US FDA, 2018). As curvas de calibração externa foram construídas em água ultrapura (UP) fortificadas em seis níveis de concentração em triplicata, com as exceções do DMP (quatro níveis), DEHP e DNOP (cinco níveis). As respostas obtidas foram aplicadas ao modelo de regressão linear simples a partir do qual obtiveram-se os coeficientes de determinação (R^2). O limite de quantificação (LOQ, do inglês *Limit of Quantification*) de cada analito foi estipulado a partir do primeiro ponto de sua faixa linear de trabalho considerando o critério de desvio padrão relativo (RSD, do inglês *Relative Standard Deviation*) inferior ou igual a 20%. O limite de detecção (LOD, do inglês *Limit of Detection*) foi calculado dividindo-se o LOQ por um fator estatístico de 3,3.

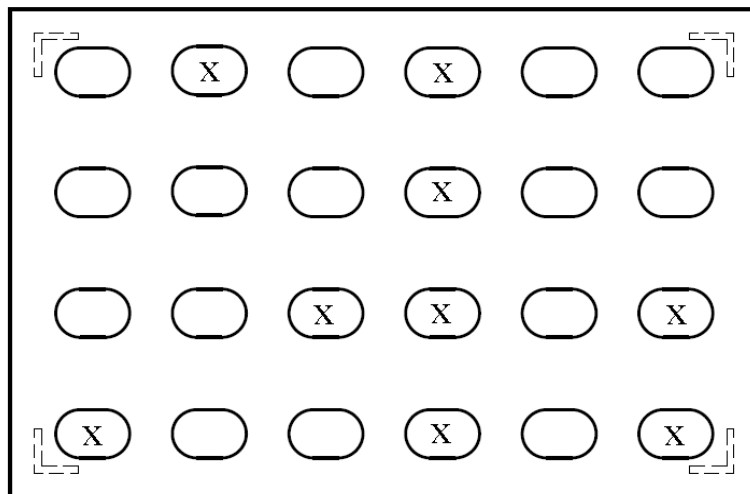
A precisão intradia foi calculada pelo RSD com respeito aos níveis inferior (LOQ), intermediário ($50 \mu\text{g L}^{-1}$) e superior ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) da curva de calibração. A precisão intermediária foi calculada pelo RSD de ensaios de fortificação de água UP em $50 \mu\text{g L}^{-1}$ realizadas em três dias consecutivos, cada dia em triplicata, totalizando nove experimentos ($n=9$). A precisão intermediária foi realizada utilizando poços distribuídos aleatoriamente entre os ensaios, de acordo com o identificado na Figura 12. O fator de enriquecimento (EF, do inglês *Enrichment Factor*) foi calculado pela Equação (10), onde $A_{extrato}$ refere-se à área do analito após passar pelo preparo de amostra enquanto que A_{matriz} refere-se à área do mesmo analito a

partir de solução padrão injetada diretamente no instrumento cromatográfico, ambos na concentração de $100 \mu\text{g L}^{-1}$.

$$EF = \frac{A_{extrato}}{A_{matriz}} \quad (10)$$

A avaliação da exatidão foi realizada por recuperação relativa em três amostras fortificadas nas concentrações de 10, 50 e $100 \mu\text{g L}^{-1}$. As amostras analisadas obtidas do comércio local foram: uma amostra de água mineral em garrafa PET e uma outra amostra de água de coco em embalagem cartonada. Também foi analisada uma amostra de água de córrego, coletada em frasco âmbar em frente ao Departamento de Química (UFSC) em Florianópolis e submetida ao procedimento analítico instantaneamente. As amostras comerciais foram armazenadas conforme instrução do rótulo da embalagem e analisadas dentro do prazo de validade.

Figura 12 – Poços selecionados aleatoriamente para a realização dos ensaios de precisão intermediária.



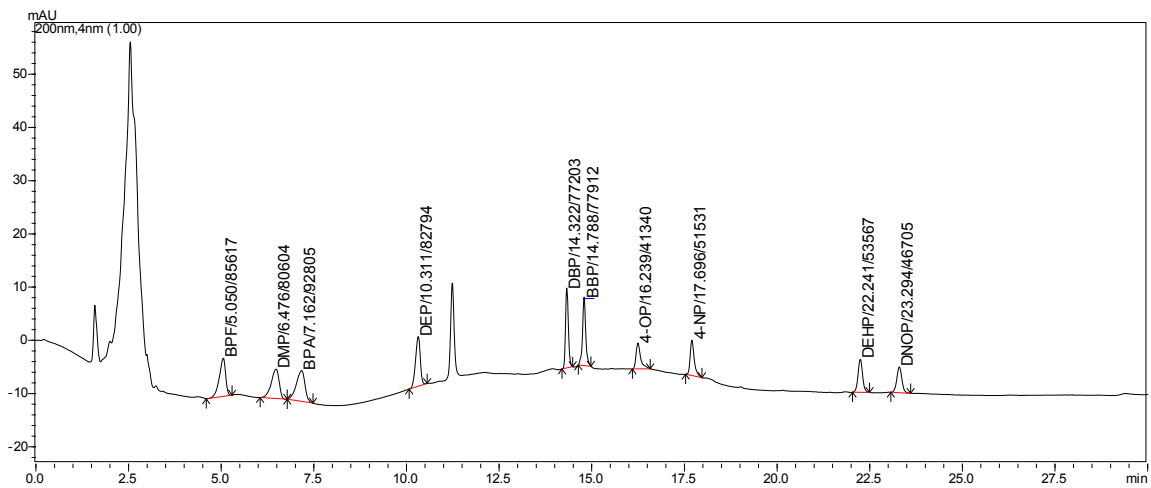
Fonte: Elaborado pelo Autor (2022)

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA

A primeira etapa da pesquisa foi o preparo de soluções e injeção individual dos padrões analíticos no cromatógrafo líquido de alta eficiência com o objetivo de otimizar a separação cromatográfica. Desta forma, a melhor condição de separação utilizando gradiente de solvente entre acetonitrila e água ultrapura pôde ser encontrada e está descrita na seção 4.2. A Figura 13 contém o cromatograma obtido para a separação dos analitos em $500 \mu\text{g L}^{-1}$ e a Tabela 8 apresenta os tempos de retenção de cada composto.

Figura 13 – Cromatograma da separação otimizada dos analitos em solução padrão em metanol na concentração de $500 \mu\text{g L}^{-1}$



Fonte: Obtido pelo Autor (2021) por meio do software LC Solutions (Shimadzu)

Tabela 8 – Tempo de retenção dos analitos

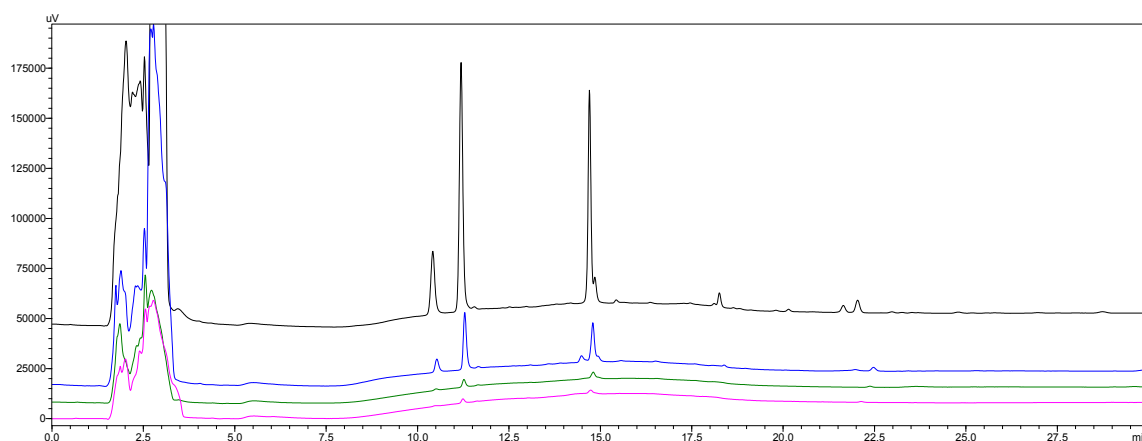
Tempo de retenção (min)	Analito
5,1	Bisfenol F
6,5	Dimetil ftalato
7,2	Bisfenol A
10,3	Dietil ftalato
14,3	Dibutil ftalato
14,8	Benzilbutil ftalato
16,2	4-octilfenol
17,7	4-nonilfenol
22,2	Bis-(2-etilhexil) ftalato
23,3	Di-n-octil ftalato

Fonte: Elaborado pelo Autor (2021)

5.2 CONDICIONAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO PSP

Um condicionamento da fase sortiva se mostrou necessário a fim de remover eventuais resquícios de poliamida que não tenham aderido ao papel e, principalmente, remover impurezas oriundas da síntese. Os PSPs foram inseridos em um frasco contendo o equivalente à 300 μL de metanol para cada dispositivo analítico e colocados sob agitação orbital durante 30 minutos. Este procedimento foi repetido até que as áreas dos picos se tornassem desprezíveis, o que foi possível observar a partir do quarto ciclo. A Figura 14 apresenta o cromatograma de cada ciclo de condicionamento.

Figura 14 – Cromatogramas do branco do PSP de acordo com os ciclos de limpeza realizados em metanol: primeiro (em preto), segundo (em azul), terceiro (em verde) e quarto (em rosa) ciclos.



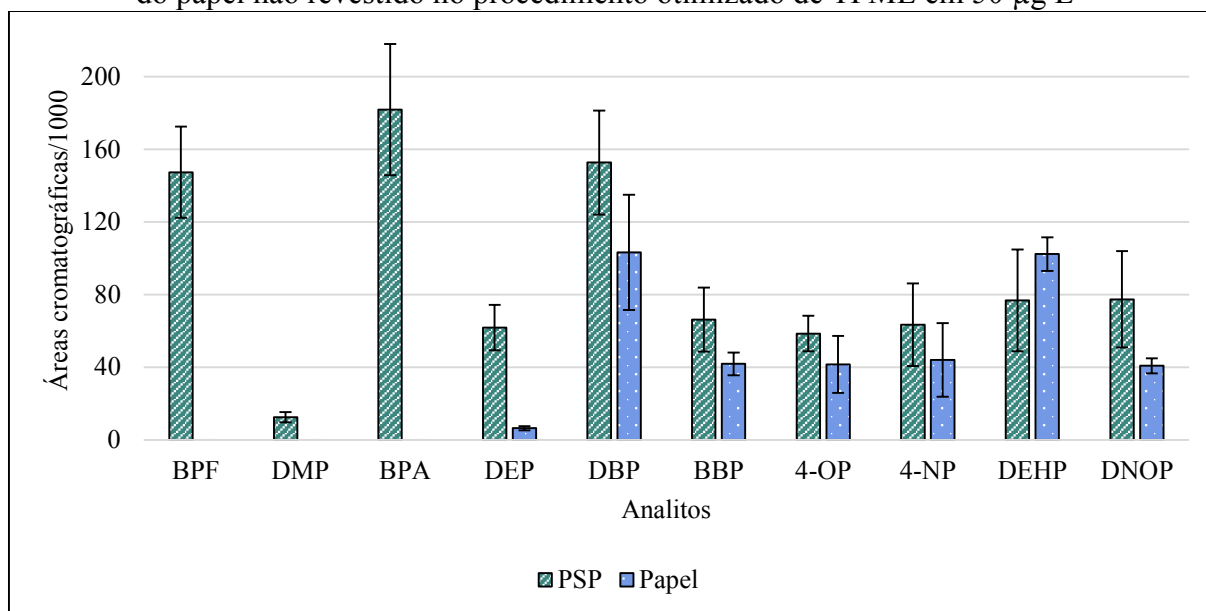
Fonte: Obtido pelo Autor (2021) por meio do software LC Solutions (Shimadzu)

A viabilidade do PSP e do papel não revestido para a extração dos analitos de amostras aquosas foi estudada nas condições otimizadas e é apresentada na Figura 15. Pode-se observar de forma geral que o revestimento de poliamida 66 oferece resultados melhores do que apenas o substrato de papel para os compostos de alta hidrofobicidade – $\log K_{OW}$ entre 4,5 e 8,1. Para os compostos de baixa e média hidrofobicidade, isto é, os que possuem $\log K_{OW}$ entre 1,6 e 3,32, o papel filtro se mostrou ineficiente. Assim, o PSP confeccionado com a poliamida 66 apresentou resultado satisfatório para a extração de todos os analitos, exceto o DMP.

O mecanismo pelo qual o processo sortivo ocorre ainda não é bem definido. Há relatos na literatura indicando condições de ótimo em situações nas quais os compostos se apresentam ionizados, o que tem sugerido a presença de interações eletrostáticas como um elemento importante (BENEDÉ et al., 2016, 2021b). De fato, os resultados obtidos durante a otimização mostram que quase todos os compostos em estudo podem ser extraídos sem diferença estatística

significativa no intervalo de pH de 2 até 10, mesmo quando os fenóis se encontram desprotonados e carregados negativamente. Apesar disso, o mais provável é a existência de múltiplos mecanismos sortivos, como ligação de hidrogênio e interações π - π .

Figura 15 – Gráfico de barras das áreas cromatográficas comparando o desempenho do PSP e do papel não revestido no procedimento otimizado de TFME em $50 \mu\text{g L}^{-1}$



Fonte: Elaborado pelo Autor (2022) com auxílio do software Microsoft Excel 2013.

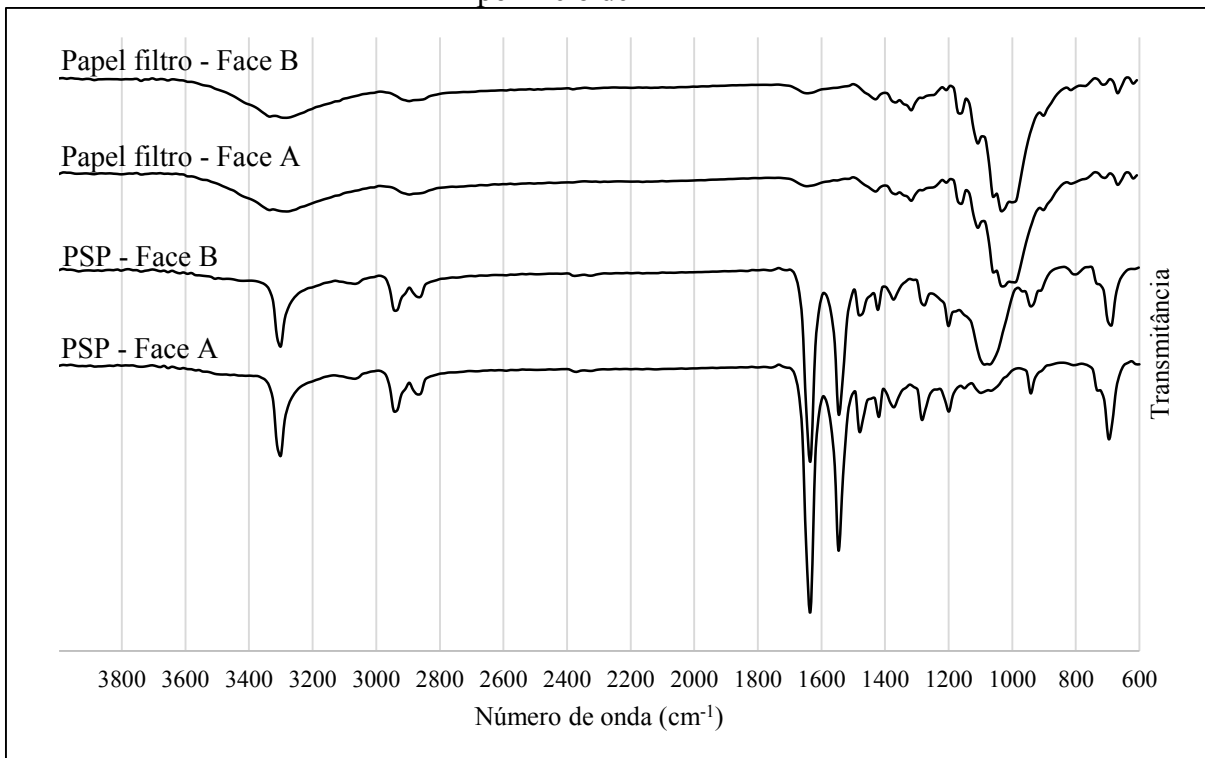
A espectroscopia de radiação infravermelha (IV) fornece informações a respeito dos grupos funcionais e do ambiente químico do exemplar. O espectro de IV por reflectância total atenuada do papel filtro e do PSP, em ambas as faces, é mostrado na Figura 16. O espectro de IV por transformada de Fourier do recobrimento de poliamida 66 é apresentado na Figura 17.

As seguintes bandas características da celulose do papel foram observadas: o estiramento da ligação O–H na forma de banda alargada em 3330 cm^{-1} ; o estiramento da ligação C–O referente ao oxigênio da hidroxila na forma de uma banda intensa em 1026 cm^{-1} e ao estiramento C–H em 2895 cm^{-1} (HOSPODAROVA; SINGOVSKA; STEVULOVA, 2018; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005).

É possível identificar as bandas características da poliamida 66 no espectro de IV do PSP, o que indica o recobrimento da superfície do papel. As referidas bandas são: estiramento assimétrico C–H₂ em 2938 cm^{-1} ; estiramento simétrico C–H₂ em 2870 cm^{-1} ; estiramento da ligação N–H com influência de interações por ligação de hidrogênio em 3300 cm^{-1} ; deformação angular no plano da ligação N–H em 3080 cm^{-1} ; estiramento da ligação C=O em 1630 cm^{-1} (banda I) e a chamada banda II resultante do estiramento C–N e da deformação angular N–H

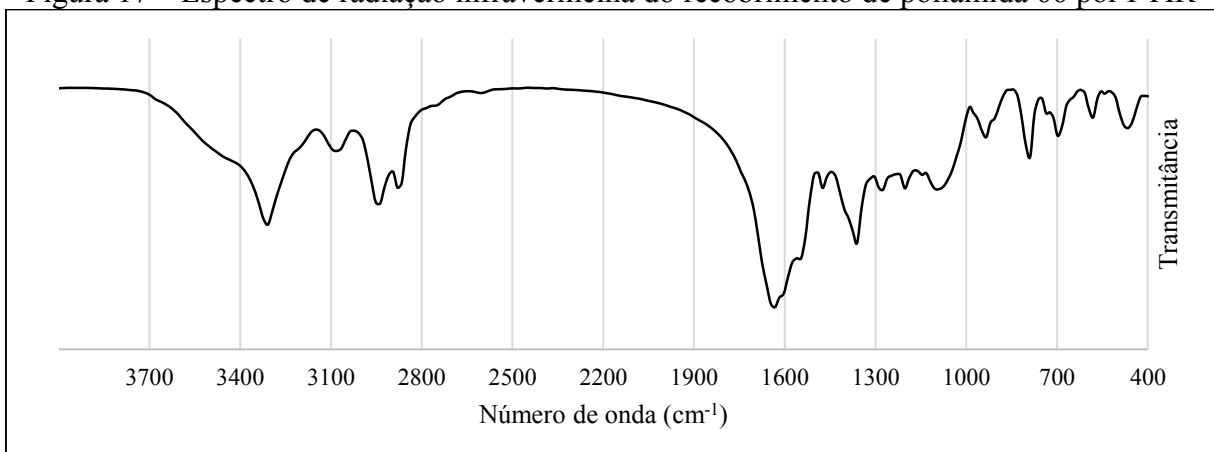
em 1538 cm^{-1} (ENLOW et al., 2005; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005). Na Figura 17, o espectro da poliamida 66, removida da superfície do papel, apresenta essas mesmas bandas. Algumas diferenças de intensidade e localização dos picos podem ser vistos entre os dois modos (ATR e transmissão). No modo ATR, essas variações estão associadas ao comprimento de penetração do feixe em função do número de onda e à variação do índice de refração da amostra (ENLOW et al., 2005).

Figura 16 – Espectros de radiação infravermelha do papel filtro e do PSP em ambas as faces por meio de ATR-IR



Fonte: Elaborado pelo Autor (2022) com auxílio do software Microsoft Excel 2013.

Figura 17 – Espectro de radiação infravermelha do recobrimento de poliamida 66 por FTIR



Fonte: Elaborado pelo Autor (2022) com auxílio do software Microsoft Excel 2013.

A área superficial específica do PSP foi determinada pela isoterma BET como sendo $3,410 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$. Esse dado pode ser comparado com nanocompósitos de poliamida 6 reportados na literatura, que apresentaram áreas superficiais específicas variando de 10,490 a $25,958 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, preparados tanto a partir de polimerização oxidativa (PALSANIYA; NEMADE; DASMAHAPATRA, 2020) quanto por eletrofiação (MEHRANI; EBRAHIMZADEH; MORADI, 2019). Como esperado, a área superficial para esses nanomateriais foi maior do que a do PSP preparado, porém este último conta com a vantagem de ser obtido por um procedimento mais simples.

5.3 SISTEMA SEMIAUTOMATIZADO DE 24 POÇOS

Diversos materiais termoplásticos para uso como filamento em impressão 3D por FDM estão disponíveis comercialmente. Dentre esses, três materiais foram selecionados e testados: ácido polilático (PLA), polietileno tereftalato glicol (PETG) e polipropileno (PP). A escolha desses três se deu por aspectos como a disponibilidade, a praticidade de uso e as propriedades desejadas nas peças finais (GORDEEV; DEGTYAREVA; ANANIKOV, 2016).

Embora o PLA seja biodegradável e ambientalmente amigável, seu uso foi logo descartado devido à baixa resistência química e física. O PETG apresentou problemas similares, como inchamento e deformação, quando exposto aos solventes. Apesar disso, o PETG apresentou boa resistência mecânica para a finalidade desejada e se mostrou de fácil impressão, tendo sido escolhido para fabricar as peças que não necessitam de contato com solventes.

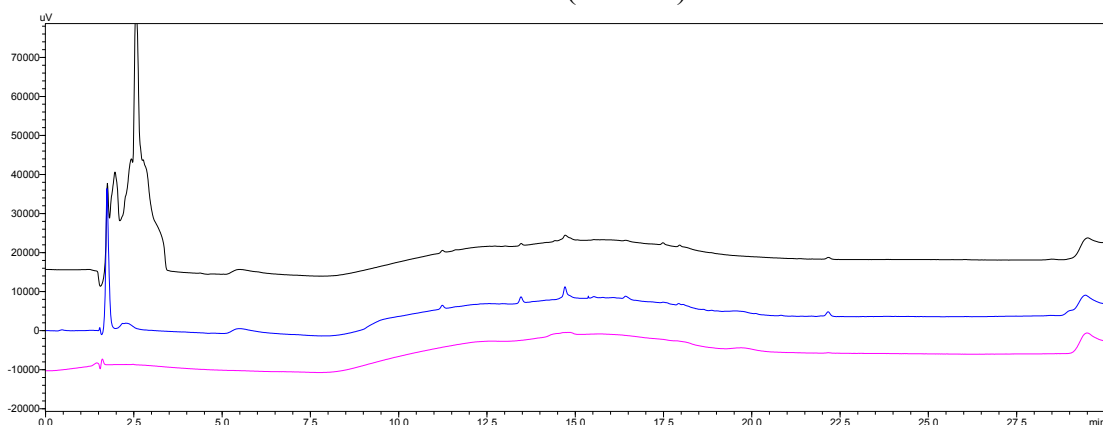
O PP foi o único que não apresentou deformações quando exposto por tempo prolongado – superior a 6 horas – aos solventes acetonitrila, metanol, acetona e água. Além disso, o PP apresentou boa resistência mecânica e flexibilidade. Entretanto, por ser um material mais difícil de ser impresso devido a sua tendência de empenar e de não fixar-se na base da impressora, seu uso foi restrito para peças que entram em contato com solventes e/ou substâncias químicas.

Uma outra característica importante para o uso de peças produzidas pela impressão 3D no preparo de amostra é que o material não apresente propriedades sortivas e não libere compostos de sua estrutura que possam causar interferência no sinal analítico. Nesse sentido, o PP cumpriu satisfatoriamente todos os requisitos. A Figura 18 apresenta cromatogramas dos brancos dos poços de PP nos dois solventes mais utilizados em cromatografia líquida, acetonitrila e metanol. Percebe-se a presença de alguns picos, porém seus sinais ficam em tempos de retenção distintos dos analitos. A única exceção é o DEHP, sinal que aparece no

branco em mesmo tempo de retenção que o padrão. Nesse caso, teve-se o cuidado de garantir que o sinal para o DEHP no LOD fosse superior ao sinal do branco acrescido de 3,3 vezes o desvio padrão do branco. Para fins de comparação, os cromatogramas dos brancos dos poços de PLA e PETG em metanol são apresentados no APÊNDICE B.

A impressão 3D tem emergido como uma importante tecnologia para a produção de peças com os mais variados formatos, customizadas e projetadas para a solução de um problema específico. O aprimoramento dessa ferramenta e sua comercialização a custos acessíveis resultou em sua popularização, alcançando engenheiros e pesquisadores capazes de projetar dispositivos integrando diferentes materiais. O uso da impressão 3D se tornou, portanto, especialmente frutífero nas áreas médicas e técnicas nas quais produtos personalizados com características específicas são necessários (AGRAWAAL; THOMPSON, 2021; HAJARE; GAJBHIYE, 2022). Esta ferramenta permitiu explorar uma nova abordagem em TFME com a construção de peças de PETG e PP permitindo a integração de fases sortivas baseadas em papel e outros substratos, conforme a Figura 19. Além disso, os poços de extração e dessorção foram desenvolvidos sob medida permitindo que o analista opte por volumes maiores de amostra e, ao mesmo tempo, minimizando o volume de solvente de dessorção. Ainda, o modelo desenvolvido por CAD pode servir como base para que outros pesquisadores possam aprimorar e desenvolver seus próprios projetos. Para mais detalhes, consultar APÊNDICE C.

Figura 18 – Cromatogramas do branco dos poços de polipropileno quando exposto à 600 μ L de metanol (em preto) e acetonitrila (em azul) por 30 min sob agitação e branco da coluna do HPLC (em rosa)

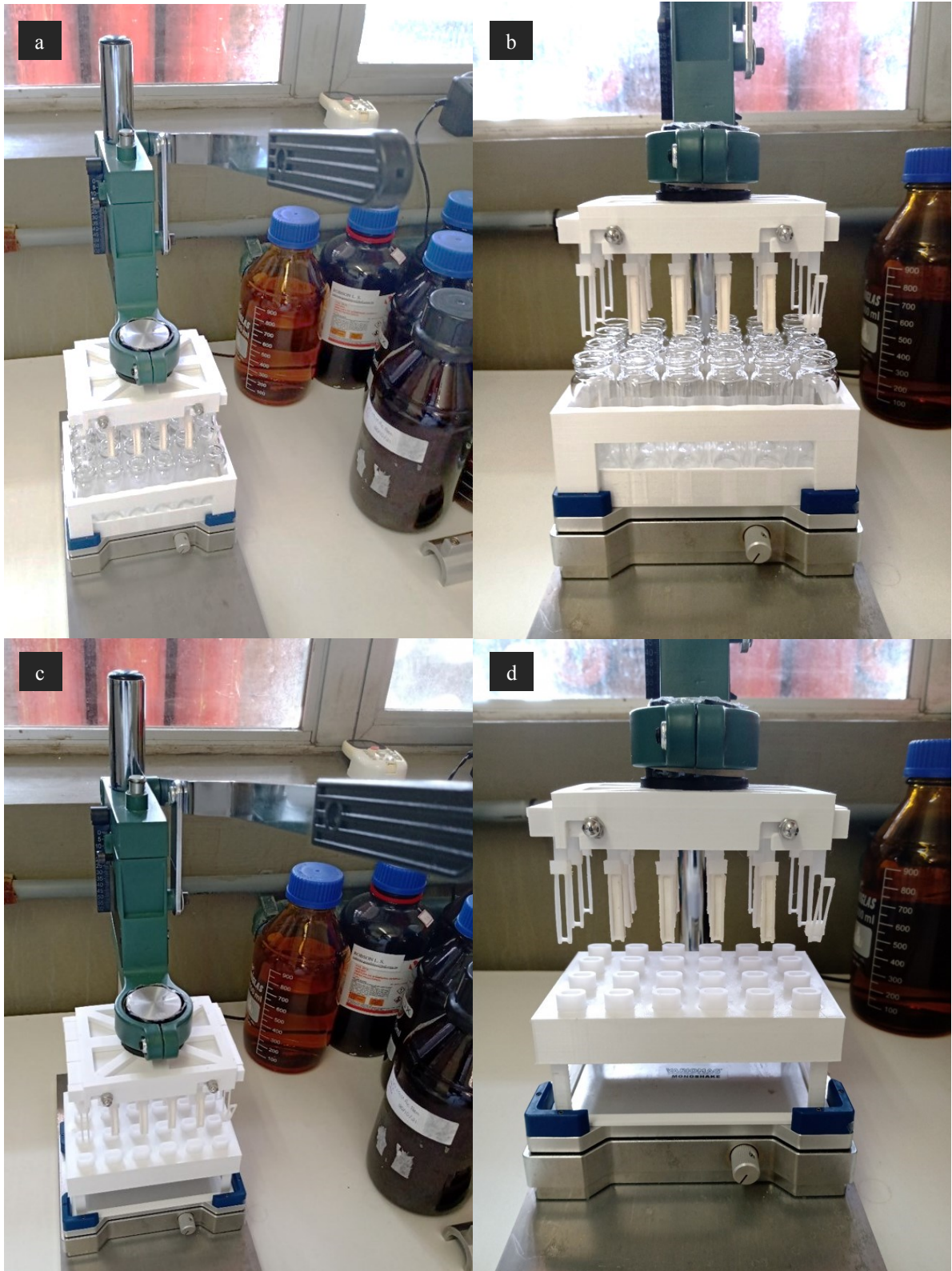


Fonte: Obtido pelo Autor (2021) por meio do software LC Solutions (Shimadzu)

O sistema semiautomatizado de 24 poços pode ser dividido nas seguintes partes:

- I. Agitador orbital acoplado à uma alavanca metálica que realiza movimento vertical para imersão e emersão da fase sortiva.
- II. Escova, caracterizada como o conjunto de suportes e os quatro pentes. Cada pente possui seis aberturas para a fixação dos PSPs. Na parte inferior de cada pente, há um mecanismo flexível que pode ser aberto e fechado com uma presilha, segurando o PSP por meio de pressão.
- III. Placa de extração contendo 24 poços. Constituído de uma placa que permite o encaixe de frascos de vidro de 15 mL, os quais são preenchidos com a amostra e servem como poços de extração.
- IV. Placa de dessorção contendo 24 poços. Constituído de uma placa que permite o encaixe de poços de polipropileno, cada poço com volume de até 700 μ L.

Figura 19 – Sistema semiautomatizado de 24 poços desenvolvido por impressão 3D. Legenda: (a-b) posição de extração vista de cima e de frente; (c-d) posição de dessorção vista de cima e de frente.



Fonte: Elaborado pelo Autor (2022)

5.4 OTIMIZAÇÕES DO MÉTODO

O preparo do PSP com dois mergulhos do papel filtro na solução de poliamida 66, sendo cada mergulho intercalado pela evaporação à temperatura ambiente do solvente, foi escolhida como a condição que melhor proporcionou a extração dos analitos e minimizou o tempo e a quantidade de materiais gastos. Os PSPs foram desenvolvidos para serem descartados após o uso. Após a realização dos ensaios de otimização, as melhores condições obtidas para a extração foram de 3 horas em pH 2 com adição de NaCl à amostra. Para a dessorção, os melhores resultados foram obtidos com acetonitrila pelo tempo de 20 minutos.

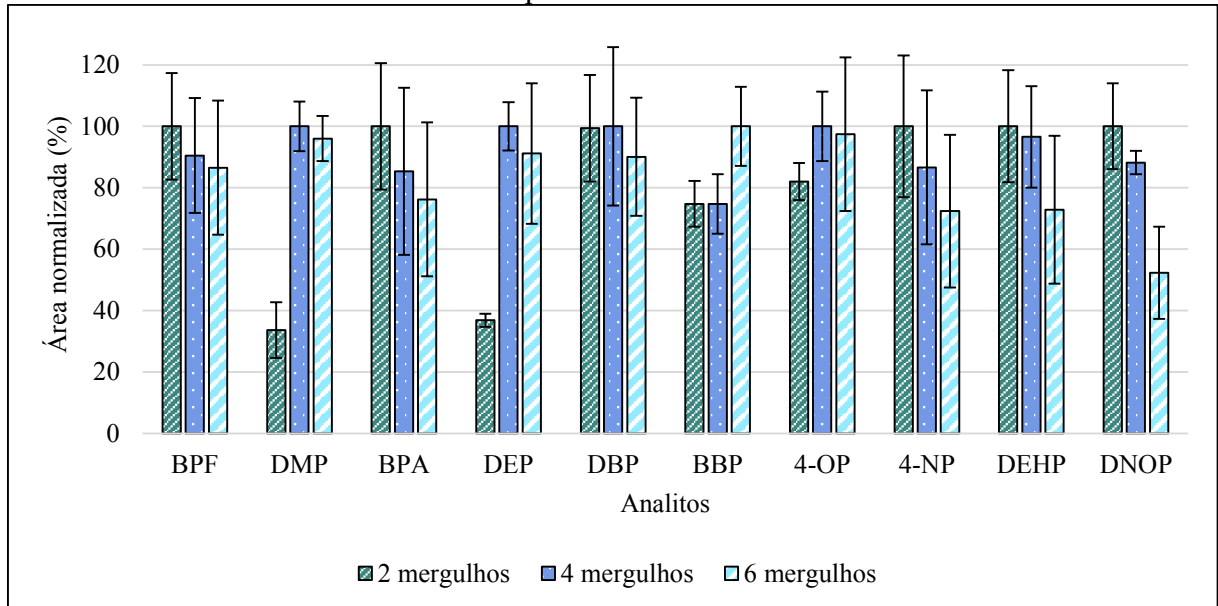
5.4.1 Otimização do PSP

Durante o preparo dos dispositivos de sorção, é possível mergulhar o papel filtro em diferentes quantidades de vezes na solução de poliamida 66 em ácido fórmico, sendo realizada a evaporação do solvente entre cada mergulho. Esse procedimento aumenta a quantidade de poliamida que pode ser impregnada na superfície do papel. Foram testados 2, 4 e 6 vezes de mergulho do papel filtro, cujo resultado pode ser visto na Figura 20. Para a maioria dos analitos, a capacidade de extração é levemente reduzida com o aumento da camada de PA 66. Isso pode ser explicado devido à redução de porosidade e contato com as fibras de papel, as quais atuam de forma sinérgica no procedimento de extração. Com a exceção do DMP e DEP, não há diferença significativa entre 2 e 4 mergulhos. Assim, o preparo do PSP foi estabelecido com 2 mergulhos pois gera resultado satisfatório e diminui o tempo e a quantidade de matéria-prima necessários.

A reusabilidade das fases sortivas utilizadas em SPME é um aspecto importante a se levar consideração. Essa característica usualmente reduz a quantidade de fase sortiva necessária de ser produzida, bem como reduz a quantidade de resíduos gerados. Em alguns casos, há uma redução significativa do custo de operação do procedimento analítico, pois alguns dispositivos analíticos podem ter custo elevado de substituição. Entretanto, a reusabilidade também pode ser uma característica indesejada devido ao efeito residual (também chamado de *carryover*), no qual ocorre a contaminação das análises subsequentes por compostos adsorvidos que não foram eficientemente removidos. É comum o emprego de um ou mais ciclos de limpeza com metanol após o uso de dispositivos analíticos quando se pretende reutilizá-los. Como pode ser visto na Figura 21, para quatro analitos (BPF, BPA, DEHP e DNOP) ocorre perda de eficiência após o primeiro uso do PSP. Tendo em consideração o baixo custo de produção dos PSPs e o risco de

efeito residual, a reusabilidade dessa fase sortiva não é recomendável. Portanto, adotou-se o princípio de uso único com o posterior descarte do material.

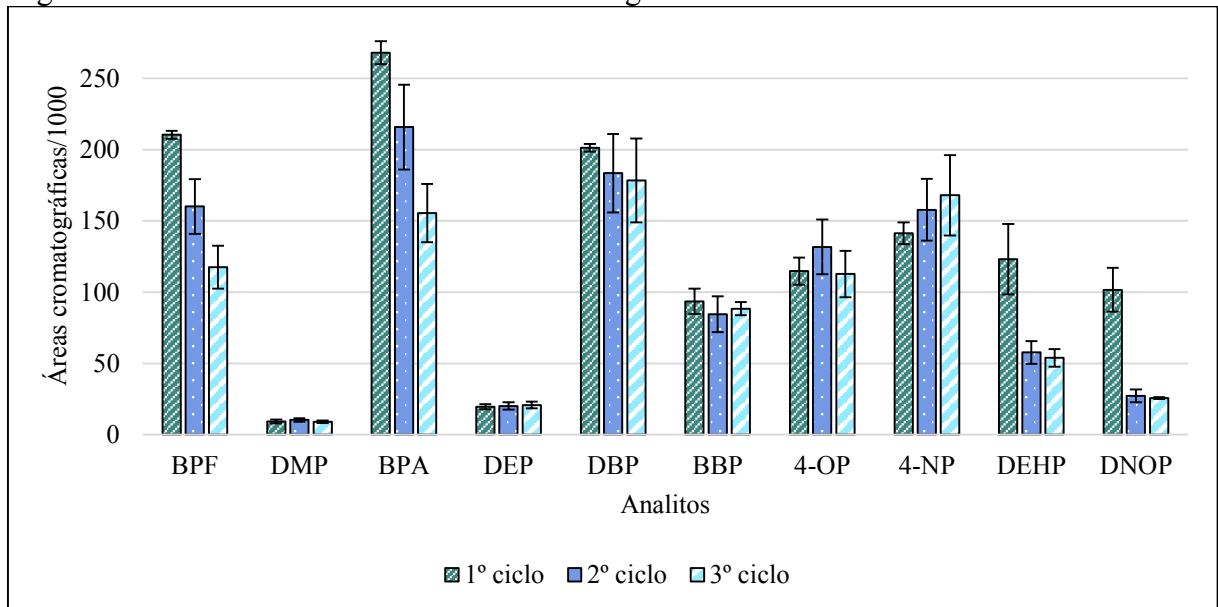
Figura 20 – Gráfico de barras das áreas cromatográficas normalizadas (%) comparando o desempenho de PSPs preparados com quantidades diferentes de mergulhos na solução de poliamida 66.



Fonte: Elaborado pelo Autor (2022) com auxílio do software Microsoft Excel 2013.

Demais condições empregadas – 200 $\mu\text{g L}^{-1}$; extração: 1,5 mL, 1 h, sem NaCl, pH 6; dessorção: 1,5 mL de MeOH por 30 min.

Figura 21 – Gráfico de barras das áreas cromatográficas em diferentes ciclos de uso dos PSPs.



Fonte: Elaborado pelo Autor (2022) com auxílio do software Microsoft Excel 2013.

Demais condições empregadas – 75 $\mu\text{g L}^{-1}$; extração: 15 mL, 3 h, sem NaCl, pH 10; dessorção: 400 μL de ACN por 30 min.

5.4.2 Otimização dos fatores de extração

Antes da otimização de vários fatores, se faz interessante um estudo de varredura com o objetivo de identificar quais são os fatores que exercem influência sobre a resposta analítica e como que esses fatores interagem entre si. Esse estudo também auxilia na escolha do domínio experimental em etapas subsequentes de otimização. Ainda, a aplicação de planejamento fatorial colabora para a economia na experimentação à medida que reduz a quantidade de fatores a serem avaliados. Uma explicação mais aprofundada sobre o tratamento matemático e os princípios que regem o planejamento experimental podem ser encontradas em bibliografias especializadas (FILHO, 2018; MONTGOMERY, 2017; NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

Dessa forma, foi realizado um planejamento fatorial completo de 2 níveis e 4 fatores (2^4), conforme disposto na Tabela 6. Esses fatores são, no modelo matemático, variáveis independentes das quais se tem controle sobre. Os fatores selecionados para estudo foram o tempo de extração (rotulado como variável 1), pH da amostra (rotulado como variável 2), porcentagem de NaCl adicionado à amostra (rotulado como variável 3) e porcentagem de etanol na amostra (rotulado como variável 4). A quantidade de etanol foi adicionada como um fator no planejamento com o objetivo principal de se avaliar a existência de efeito matriz ocasionado em possíveis amostras com teor alcoólico. Uma vez que os analitos apresentaram comportamentos distintos e obtiveram-se diferenças entre os erros experimentais, observou-se que a junção das diferentes respostas em uma única causaria um mascaramento do sistema em estudo, optando-se pela avaliação individual. As áreas cromatográficas dos analitos foram adotadas como a variável resposta $y(x_1, x_2, x_3, x_4)$. A escolha de cada modelo matemático se deu através dos maiores valores de R^2 , indicando a melhor explicação da variabilidade dos dados experimentais, e, da análise de variância (ANOVA) para checagem de falta de ajuste.

Para cada analito, é possível estabelecer um modelo matemático de previsão da variável dependente y , do seguinte modo:

$$\begin{aligned} \hat{y}(x_1, x_2, x_3, x_4) = & b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_4x_4 + b_{12}x_1x_2 \\ & + b_{13}x_1x_3 + b_{14}x_1x_4 + b_{23}x_2x_3 + b_{24}x_2x_4 + b_{34}x_3x_4 \\ & + b_{123}x_1x_2x_3 + b_{124}x_1x_2x_4 + b_{134}x_1x_3x_4 + b_{234}x_2x_3x_4 \end{aligned} \quad (11)$$

onde b_0 é a média entre os níveis +1 e -1 e representa o intercepto, b_i representa os coeficientes das variáveis lineares x_i , b_{ij} representa os coeficientes de interação entre as variáveis x_i e x_j , e, por último, b_{ijk} representa os coeficientes de interação as variáveis x_i , x_j e x_k . Interações

entre três ou mais variáveis são geralmente pouco prováveis e acabam frequentemente sendo excluídas do modelo. Esses coeficientes da matriz codificada podem ser testados quanto à significância pelo teste de hipóteses:

$$H_0: b = 0$$

$$H_1: b \neq 0$$

Para cada coeficiente é possível calcular um valor de t_0 ,

$$t_0 = \frac{b}{SE_b} = \frac{b}{\sqrt{MSE/N}} \quad (12)$$

onde SE_b é o erro padrão do coeficiente, MSE é o erro quadrático médio e N é o número de experimentos do fatorial. Se o módulo de t_0 for maior que o t tabelado para um determinado nível de significância com $n_c - 1$ graus de liberdade (n_c é o número de experimentos no ponto central) ou se p -valor for menor do que o nível de significância, rejeita-se H_0 .

A adição de pontos centrais ao planejamento fatorial é um recurso que possibilita avaliar a existência de curvatura e de estimar o erro experimental. Se a resposta obtida pelos pontos centrais se aproxima da média entre os níveis superior e inferior, ou seja, fica entre os níveis +1 e -1, é possível confirmar a linearidade com um teste de hipóteses.

Os resultados dos testes de hipóteses podem ser representados na forma de um gráfico de Pareto dos efeitos padronizados, como mostrado na Figura 22. Nesse gráfico, as barras indicam o valor de t_0 dos coeficientes e da avaliação de curvatura, delimitados por uma linha do valor de t crítico. Os fatores que ultrapassam da linha são ditos de significativos a um determinado nível de significância – geralmente 5% –, enquanto que aqueles que se encontram abaixo da linha podem ser menosprezados. Para os fatores principais – relacionados aos coeficientes b_i –, os sinais positivos indicam que as maiores respostas caminham em direção ao nível superior, enquanto que sinais negativos indicam que as maiores respostas caminham em direção ao nível inferior. Para os termos de interação (b_{ij}), sinais positivos indicam aumento de resposta quando as duas variáveis se encontram no mesmo nível e sinais negativos indicam aumento de resposta quando as duas variáveis se encontram em níveis distintos.

Figura 22 – Gráficos de Pareto dos efeitos padronizados ao nível de 5% de significância (continua)

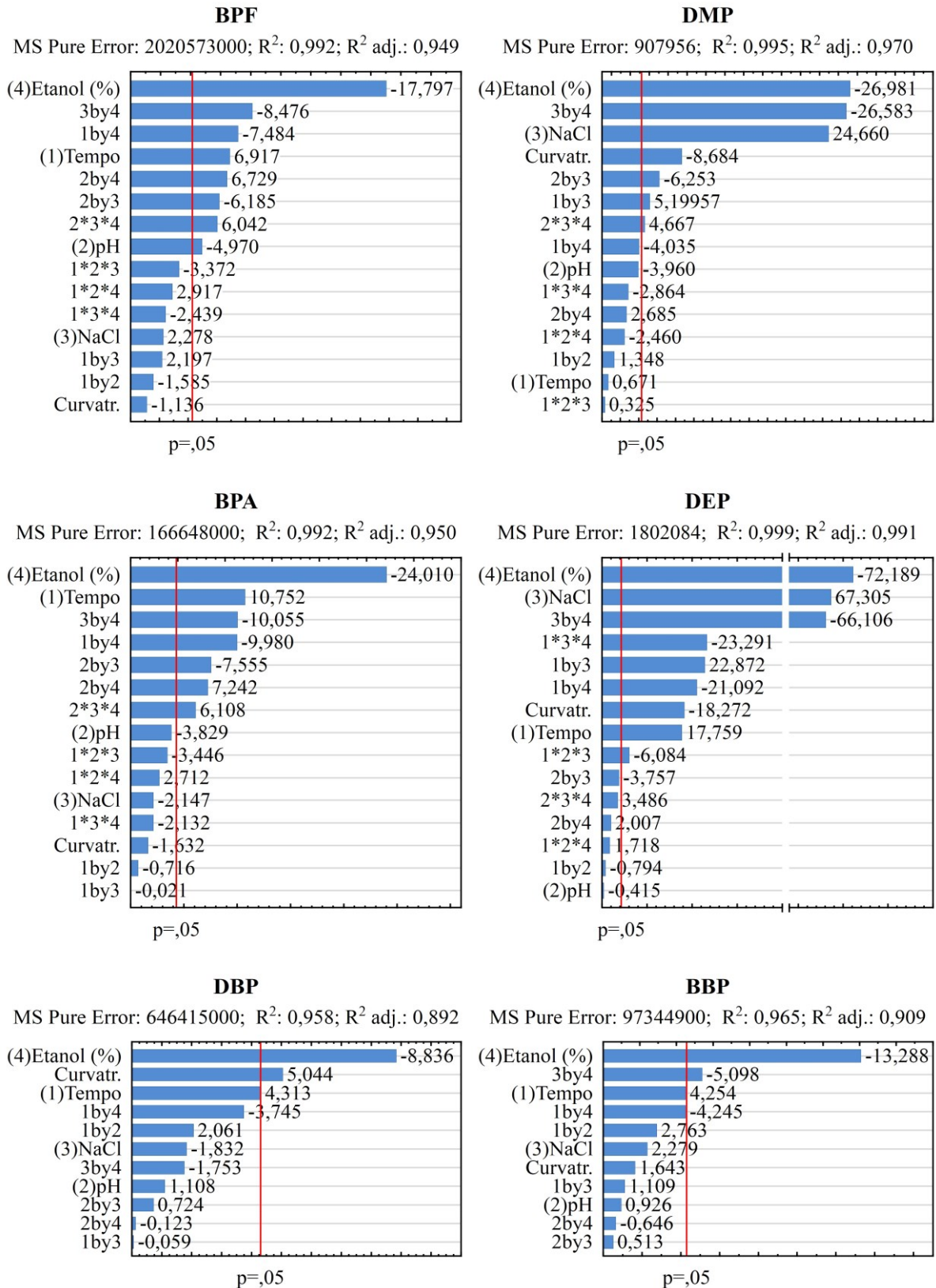
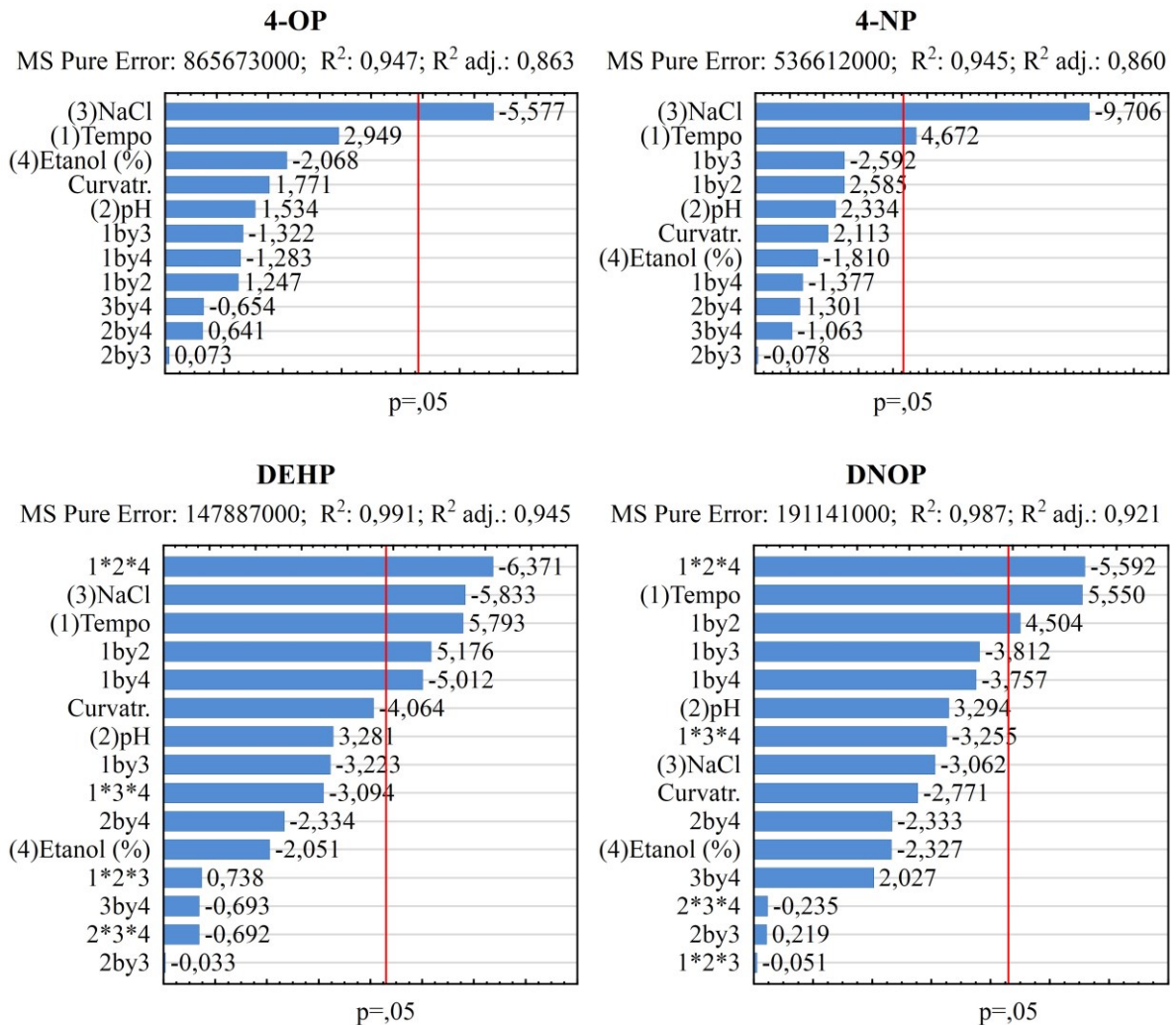


Figura 22 – Gráficos de Pareto dos efeitos padronizados ao nível de 5% de significância (conclusão)



Fonte: Elaborado pelo Autor (2022) com auxílio do software TIBCO Statistica 13.5.0

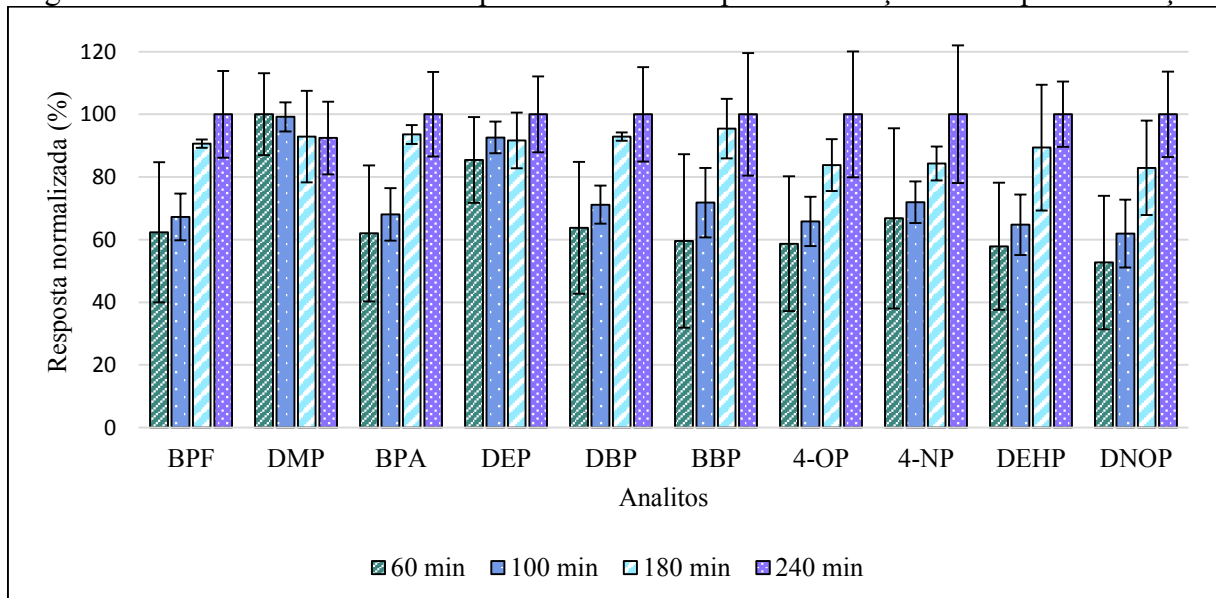
A primeira observação que pode ser tomada, com a exceção dos alquilfenóis, é a existência de um efeito bastante pronunciado da presença de etanol, tendo em consideração os níveis estudados. A presença de etanol aumentou consideravelmente a solubilidade desses analitos em água. Mais do que isso, as diversas interações com os outros fatores indicam mudança no comportamento físico-químico da solução. Esses resultados indicam que o processo de extração é desfavorável para amostras com teor alcoólico, que é o caso de algumas bebidas e simuladores alimentares. Para as aplicações em amostras de baixo teor alcoólico, seriam necessários experimentos extras para conferir se as extrações podem ser realizadas de forma a se obter baixos LOQs ou avaliar alguma estratégia de calibração pertinente.

A adição de um eletrólito, como o NaCl, à amostra é referida como um efeito de íon específico e por vezes também é relacionada à força iônica da solução. Dois comportamentos

distintos podem ocorrer. A redução da solubilidade de um não eletrólito quando aumenta-se a concentração de um eletrólito é chamada de efeito *salting-out*. Esse fenômeno é desejável pois desloca o equilíbrio no sentido de favorecer a extração. O *salting-out* tem sido explicado pela menor disponibilidade das moléculas do solvente de interagir com esses solutos, levando-os a um estado de agregação e/ou expulsão para uma fase orgânica. Entretanto, o oposto também é passível de ser observado. O efeito *salting-in* ocorre quando a transferência dos solutos da fase aquosa para a fase extratora é diminuída, seja pela formação de novas interações ou pela redução da difusibilidade desses compostos em direção à fase sortiva (HYDE et al., 2017; JIANG; OUYANG, 2015). A partir dos resultados obtidos do planejamento fatorial 2⁴, verificou-se que a única condição na qual o DEP pode ser extraído de forma satisfatória ocorre em 30% de cloreto de sódio. DMP e DEP apresentaram efeito *salting-out*, enquanto 4-OP, 4-NP e DEHP apresentaram efeito *salting-in*. Para os demais analitos, a adição de sal não apresentou efeito significativo. Como condição compromisso a fim de viabilizar baixo LOQ para o DEP, optou-se por utilizar 30% de NaCl.

O pH da amostra não foi significativo para a maioria dos analitos, com a exceção do BPF. O sinal negativo deste indica melhores condições em direção ao nível menor. Para BPF, DMP e BPA há também interação negativa entre pH e sal. Uma vez que o sal foi otimizado no nível máximo, espera-se obter melhores resultados quando o pH encontra-se no seu nível mínimo. Portanto, o pH 2 foi selecionado.

Figura 23 – Gráfico de barras da resposta normalizada para otimização do tempo de extração



Fonte: Elaborado pelo Autor (2022) com auxílio do software Microsoft Excel 2013.

Demais condições empregadas – 75 µg L⁻¹; extração: 15 mL, sem NaCl, pH 6; dessorção: 400 µL de ACN por 30 min.

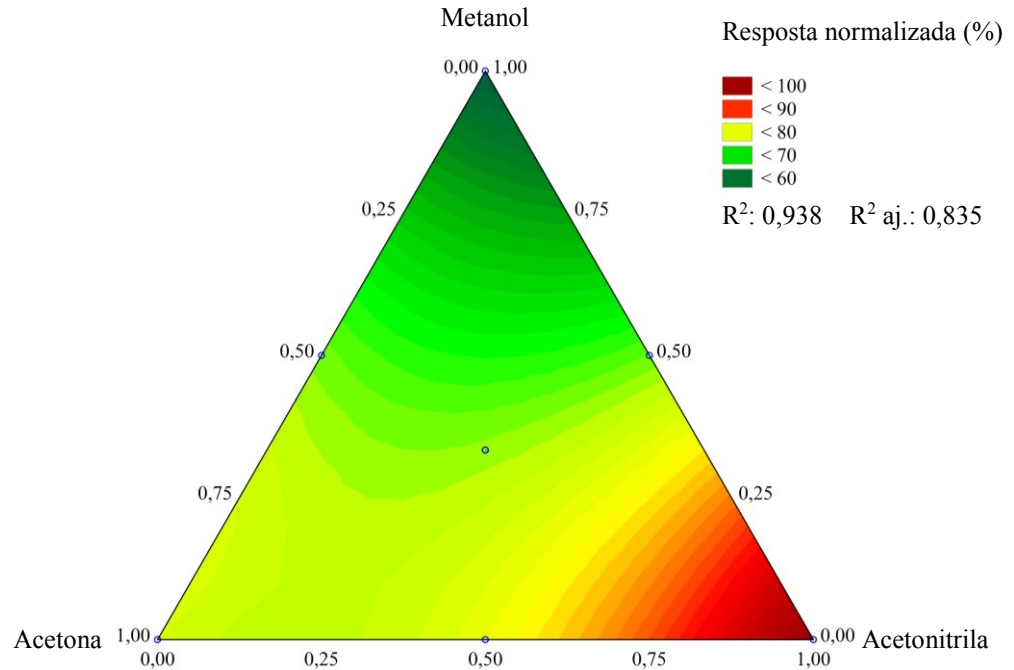
O tempo de extração foi selecionado para otimização univariada, conforme pode ser visto na Figura 23, em quatro níveis: 60, 100, 180 e 240 min. Como esperado, observou-se o aumento da resposta com o aumento do tempo de extração. O tempo de 180 minutos, isto é, 3 horas, foi escolhido por proporcionar resposta satisfatória e menor dispersão dos resultados.

5.4.3 Otimização dos fatores de dessorção

O melhor solvente para a etapa de dessorção é aquele que rompe com maior efetividade as interações dos analitos com os sítios adsorptivos da fase sortiva. Para esse estudo foram selecionados três solventes orgânicos polares comumente utilizados: metanol ($\log K_{OW} = -0,77$), que permite estabelecer ligações de hidrogênio; acetonitrila ($\log K_{OW} = -0,34$), que possui ligações de hidrogênio mais fracas; e, acetona ($\log K_{OW} = -0,24$), que estabelece interações π e dipolo-dipolo. Os resultados do planejamento simplex-centroide indicaram comportamento similar para todos os analitos, portanto as áreas cromatográficas obtidas para cada experimento foram agrupadas em uma única resposta, sem prejuízo na análise pretendida. Fez-se a média geométrica das áreas de cada experimento e a maior resposta foi rotulada como 100%, a partir da qual se normalizou as demais condições experimentais. Para o modelamento e geração do gráfico de contorno da Figura 24, escolheu-se o modelo quadrático de forma a gerar os termos das componentes puras ($b_i x_i$) e binárias ($b_{ij} x_i x_j$). Os resultados mostraram que a melhor ordem para o solvente de dessorção é: acetonitrila > acetona > metanol.

O tempo de dessorção foi otimizado univariadamente por meio dos níveis de 10, 20 e 30 minutos, conforme a Figura 25. É possível observar um leve aumento da resposta em 20 minutos seguido por um decaimento do sinal. Esse decaimento pode estar associado com a readSORÇÃO dos compostos pela fase sortiva. A condição de 20 minutos de dessorção foi escolhida como ótima, juntamente com 400 μL de acetonitrila previamente otimizada. Esse volume foi escolhido por ser o mínimo necessário para a completa imersão dos PSPs nos poços desenvolvidos, contemplando desse modo a Química Analítica Verde.

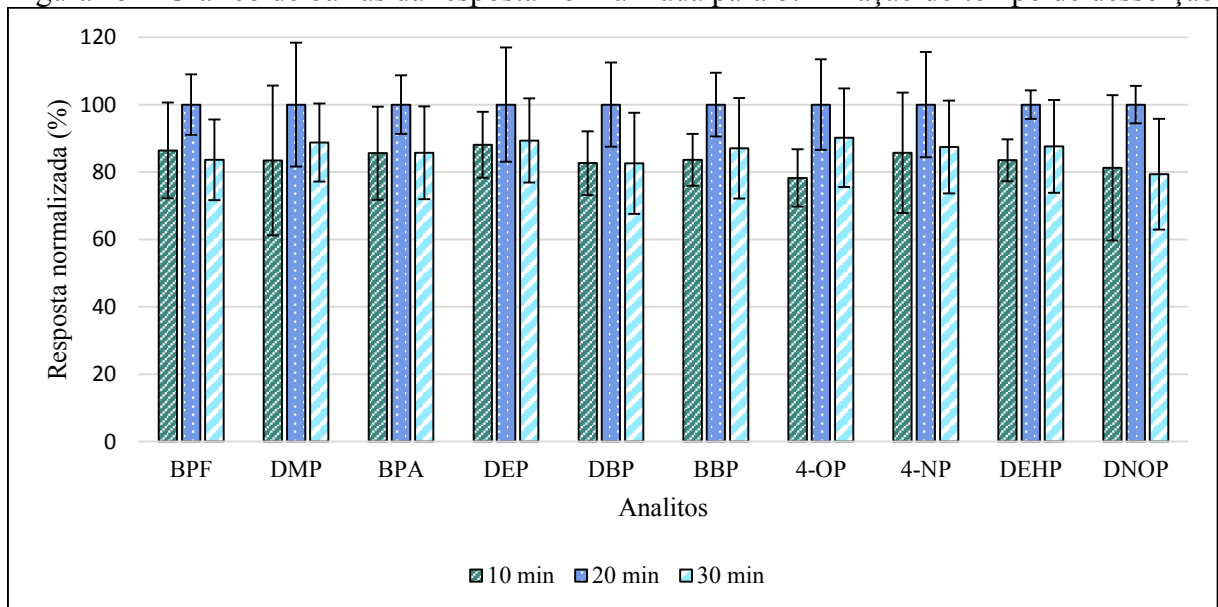
Figura 24 – Gráfico de contorno obtido por meio do planejamento simplex-centroide para otimização do solvente de dessorção



Fonte: Elaborado pelo Autor (2022) com auxílio do software TIBCO Statistica 13.5.0

Demais condições empregadas – $75 \mu\text{g L}^{-1}$; extração: 15 mL, sem NaCl, 3 h, pH 6; dessorção: $400 \mu\text{L}$ por 20 min.

Figura 25 – Gráfico de barras da resposta normalizada para otimização do tempo de dessorção



Fonte: Elaborado pelo Autor (2022) com auxílio do software Microsoft Excel 2013.

Demais condições empregadas – $75 \mu\text{g L}^{-1}$; extração: 15 mL, sem NaCl, 3 h, pH 6; dessorção: $400 \mu\text{L}$ de ACN.

5.5 PARÂMETROS ANALÍTICOS DE MÉRITO

Os parâmetros analíticos de mérito descritos na seção 4.6 foram determinados a partir de curvas de calibração em água UP nas condições otimizadas e se encontram na Tabela 9. Para a maioria dos compostos analisados obteve-se LOD de 1,5 e LOQ de 5 $\mu\text{g L}^{-1}$. Para DEHP e DNOP obteve-se LOD de 3 e LOQ de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$. O DMP foi o que apresentou menor eficiência de extração, com LOD de 7,6 e LOQ de 25 $\mu\text{g L}^{-1}$. Esses limites são adequados para análise a nível traço dos compostos selecionados em amostras de água, embora sejam passíveis de obtenção de limites mais baixos utilizando-se detectores mais sensíveis, como o MS, visando aplicação em uma larga escala de amostras. Por se tratarem de compostos encontrados em baixas concentrações, não se investigou a linearidade acima de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, reduzindo assim o gasto com padrões e focalizando na faixa de interesse. Os valores obtidos para o coeficiente de determinação indicam boa linearidade, sendo que ao menos 98% da variabilidade da área do pico cromatográfico pode ser explicada pela concentração.

As diretrizes estabelecidas por agências regulatórias usualmente definem critérios de aceitação, os quais estipulam valores de precisão e exatidão esperados para o método a ser aplicado. A AOAC International baseia-se na equação de Horwitz para definir o RSD esperado para a reprodutibilidade em função da concentração do analito. Essa é uma boa estimativa que pode ser utilizada para fins de comparação com os resultados obtidos. A repetitividade, isto é, a precisão intralaboratorial, é esperada como algo entre um meio a dois terços do RSD da reprodutibilidade. Assim, o RSD calculado e esperado é de 18 a 24% para 5 $\mu\text{g L}^{-1}$, de 13 a 17% para 50 $\mu\text{g L}^{-1}$, e, de 11 a 15% para 100 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os resultados de precisão obtidos se aproximam dos valores esperados com exceção dos últimos três analitos da separação cromatográfica.

A média dos fatores de enriquecimento obtidos foi de 15 vezes. Esse dado elucidava bem a importância dos volumes de amostra e solvente de dessorção, pois não seria possível a pré-concentração e obtenção dos LOQs desejados empregando o sistema convencional de 96 poços com a fase sortiva baseada em papel. Para exemplificar, baseado na experiência do grupo de pesquisa, o sistema convencional usualmente utiliza até 1,5 mL de volume de amostra e 300 μL de volume de solvente de dessorção. Nessas condições, pela Equação (9), o fator de enriquecimento máximo que pode ser obtido é de 5 vezes. O presente estudo, empregando 15 mL de amostra e 400 μL de solvente de dessorção possui fator de enriquecimento máximo calculado como sendo de 37,5 vezes. Tendo em consideração o caráter não-exaustivo das técnicas de microextração, esse dado representa um importante avanço de desempenho.

Tabela 9 – Limites de detecção e quantificação, faixas lineares de trabalho, equações analíticas, coeficientes de determinação, fatores de enriquecimento e precisões intermediárias do método desenvolvido

Analito	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Faixa linear de trabalho ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Equação analítica		R^2	EF	Precisão intradia (RSD, n=3)			Precisão interdia (RSD) em 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ (n=9)
				Inclinação	Intercepto			LOQ	50 $\mu\text{g L}^{-1}$	100 $\mu\text{g L}^{-1}$	
BPF	1,5	5	5 – 100	3008	-3812	0,9997	17	20	2	5	17
DMP	7,6	25	25 – 100	279	-1443	0,9955	2	9	8	7	23
BPA	1,5	5	5 – 100	3717	-5032	0,9948	22	13	4	6	20
DEP	1,5	5	5 – 100	1286	-45	0,9908	9	17	21	3	19
DBP	1,5	5	5 – 100	2587	8630	0,9900	17	14	21	13	19
BBP	1,5	5	5 – 100	1461	-1941	0,9980	15	22	11	10	24
4-OP	1,5	5	5 – 100	1087	-708	0,9935	17	7	21	14	17
4-NP	1,5	5	5 – 100	1276	-1035	0,9964	17	17	30	24	36
DEHP	3	10	10 – 100	1355	10499	0,9922	15	10	37	20	36
DNOP	3	10	10 – 100	1312	4976	0,9837	15	12	40	30	34

Fonte: Elaborado pelo Autor (2022)

Equação analítica $y=ax+b$, onde a é inclinação e b intercepto.

Tabela 10 – Recuperações relativas e desvios padrões relativos dos analitos em três amostras aquosas

Analito	Amostra 1			Amostra 2			Amostra 3		
	10 µg L ⁻¹	50 µg L ⁻¹	100 µg L ⁻¹	10 µg L ⁻¹	50 µg L ⁻¹	100 µg L ⁻¹	10 µg L ⁻¹	50 µg L ⁻¹	100 µg L ⁻¹
BPF	103 ± 10	114 ± 7	114 ± 8	79 ± 21	103 ± 11	93 ± 14	91 ± 25	123 ± 27	137 ± 27
DMP	*	98 ± 9	96 ± 7	*	96 ± 10	112 ± 22	*	127 ± 16	117 ± 25
BPA	106 ± 4	110 ± 9	107 ± 7	98 ± 19	102 ± 15	110 ± 9	105 ± 19	130 ± 26	135 ± 24
DEP	93 ± 11	117 ± 7	104 ± 16	75 ± 9	104 ± 7	109 ± 4	104 ± 3	129 ± 30	154 ± 22
DBP	82 ± 18	114 ± 3	108 ± 4	65 ± 19	75 ± 24	55 ± 21	40 ± 22	78 ± 27	91 ± 33
BBP	115 ± 24	115 ± 8	117 ± 13	99 ± 22	92 ± 25	83 ± 1	**	62 ± 31	106 ± 41
4-OP	120 ± 17	145 ± 11	109 ± 4	39 ± 27	44 ± 21	36 ± 40	**	61 ± 25	73 ± 30
4-NP	75 ± 27	139 ± 6	110 ± 18	34 ± 23	35 ± 21	27 ± 30	**	39 ± 16	61 ± 27
DEHP	140 ± 8	108 ± 5	88 ± 4	2 ± 18	26 ± 31	15 ± 29	**	32 ± 21	54 ± 25
DNOP	69 ± 5	104 ± 17	113 ± 2	25 ± 28	31 ± 26	19 ± 30	**	32 ± 22	54 ± 21

Fonte: Elaborado pelo Autor (2022)

* Nível de concentração inferior ao LOQ

** Não foi possível calcular a recuperação relativa neste ponto

Amostra 1 – Água mineral

Amostra 2 – Água de coco

Amostra 3 – Água de córrego

Com o objetivo de avaliar a exatidão do método, uma amostra de água mineral (amostra 1) em garrafa PET, obtida no comércio local, foi fortificada em três níveis de concentração em triplicata. A fim de verificar a ampliação do escopo do método, as amostras de água de coco (amostra 2) em embalagem cartonada e de água de córrego (amostra 3) foram submetidas ao mesmo procedimento. Os resultados da exatidão podem ser encontrados na Tabela 10.

As recuperações relativas para a amostra de água mineral variaram de 69% para di-n-octil ftalato a 145% para 4-octilfenol e os desvios padrões relativos variaram de 2% para di-n-octil ftalato a 27% para 4-nonilfenol. A maioria destes resultados se encontram de acordo com o esperado pela AOAC International e, portanto, são satisfatórios para a finalidade pretendida. Os analitos não foram detectados nas três amostras estudadas considerando os limites do método.

A análise da amostra de água de coco indicou efeito de matriz para os quatro últimos analitos da separação cromatográfica, 4-octilfenol, 4-nonilfenol, bis-(2-etilhexil) ftalato e di-n-octil ftalato, cujas recuperações relativas ficaram abaixo de 40%. Para os seis analitos restantes foram encontradas recuperações relativas satisfatórias, variando de 55% para dibutil ftalato a 112% para dimetil ftalato; bem como desvios padrões relativos satisfatórios na faixa de 1 a 25% para benzilbutil ftalato. Os resultados da amostra de água de córrego indicaram efeito de matriz predominante para todos os analitos.

Para superar o efeito de matriz gerado, uma vez que as amostras 2 e 3 diferem consideravelmente da amostra de água mineral, outra estratégia de calibração pode ser adotada. Uma variação da calibração externa é o uso de uma matriz isenta dos analitos ao invés do solvente – também chamada de calibração por compatibilização de matriz ou por semelhança de matriz, referida muitas vezes pelo nome em inglês *matrix-matched*. Assim, seria necessária a construção de curvas de calibração utilizando amostras cuja origem ateste a ausência dos compostos ou pela análise prévia de uma amostra nas condições otimizadas indicando a ausência relativa ao limite de detecção do método. No caso da água de coco, o fruto poderia ser obtido *in-natura*; para a água do córrego seria possível buscar fontes menos suscetíveis à contaminação e analisá-las. Uma outra opção é a calibração por adição de padrão, na qual a curva é construída na própria amostra. Essa estratégia é mais indicada para casos de poucas amostras ou em situações nas quais a alternativa anterior não seja promissora. Uma terceira possibilidade é o uso de calibração com padrões internos marcados isotopicamente que, entretanto, iria requerer um detector por espectrometria de massas, além do custo elevado.

5.6 COMPARAÇÃO COM OUTROS MÉTODOS DA LITERATURA

Métodos similares empregando pelo menos uma etapa de extração e outra de dessorção, publicados na literatura científica, foram selecionados para fins de comparação e se encontram descritos na Tabela 11.

O método desenvolvido apresentou boa frequência analítica, com cerca de 8,3 minutos para cada amostra. Kirschner et al. (2017) utilizaram um sistema de processamento de até 96 amostras simultâneas em TFME, obtendo 2,8 minutos para cada amostra. Entretanto, as limitações de volume desse sistema impediram a obtenção de melhores fatores de enriquecimento e, como consequência, de limites de detecção e quantificação mais baixos. Destaca-se o estudo de Huelsmann, Will e Carasek (2021) com capacidade de processar cada amostra em tempo inferior a 40 segundos, porém se trata de uma metodologia ainda não automatizada, o que exige trabalho intenso por parte do operador para aplicações de rotina. Nos demais estudos, os tempos para o processamento da amostra foram similares ou maiores do que o método proposto.

Tabela 11 – Comparação do método desenvolvido com métodos similares reportados na literatura durante o período de 2016 a 2022

(continua)

Analitos	Técnica de preparo de amostra Instrumento	Fase sorvente	Amostra (volume)	Solvente de dessorção (volume)	Tempo de preparo ^a por amostra ^b (total)	Faixas lineares ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Referência
DMP, DEP, DBP, BBP, DEHP e outros 8 ftalatos	μ -SPE GC-MS	Semente de <i>Moringa oleifera</i> em pó	Leite (5 mL)	Acetonitrila (100 μL)	15 min	1 – 100 5 – 100	(SAJID et al., 2016)
BPA	TFME HPLC-UV	Poliamida e C ₁₈	Água de rio (15 mL)	Metanol (150 μL)	62 min	0,15 – 50	(SARAJI; BEHBAHAN, 2016)
BPA e outros 4 desreguladores endócrinos	TFME HPLC-DAD	Terra diatomácea reciclada	Água de rio (1,5 mL)	Acetonitrila / Metanol (1:1, 300 μL)	2,8 min (4,5 h)	5 – 285 25 – 150	(KIRSCHNER et al., 2017)
DMP, DEP, DBP, BBP, DEHP e DNOP	MSPE GC-MS	MWCNT-Fe ₃ O ₄ /Ag	Refrigerante (10 mL)	Hexano (2 mL)	7 min	0,012 – 10 0,025 – 10	(MOAZZEN et al., 2018)
DMP, DEP, DBP e outros 2 ftalatos	m-dSPE GC-MS	MIL-101@Fe ₃ O ₄	Água e plasma sanguíneo (5 mL)	Hexano / Acetona (1:1 - 1 mL)	23 min	0,5 – 200	(DARGAHI et al., 2018)
BPA e outros 13 contaminantes	BA μ E UPLC-MS/MS	Oasis HLB	Água potável e superficial (25 mL)	Acetonitrila (700 μL)	33,3 min (8,3 h)	0,04 – 2 2 – 40	(SOUZA et al., 2018)
DMP, DEP, DBP, BBP, DEHP e DNOP	DPX GC-MS	Estireno-divinilbenzeno	Simulador de saliva (8 mL)	Acetato de etila (200 μL)	<40 s (3 min)	5 – 200	(HUELSMANN; WILL; CARASEK, 2021)

Tabela 11 – Comparação do método desenvolvido com métodos similares reportados na literatura durante o período de 2016 a 2022 (conclusão)

Analitos	Técnica de preparo de amostra Instrumento	Fase sorvente	Amostra (volume)	Solvente de dessorção (volume)	Tempo de preparo ^a por amostra ^b (total)	Faixas lineares ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Referência
DEP, DBP, BBP e outros 2 ftalatos	SBSE HPLC-DAD	Poli(4,4'-diamino-p-terfeniltriazina)	Água mineral e licor (10 mL)	Acetontirila (120 μL)	60 min	0,2 – 100 1 – 100	(WANG et al., 2021)
BPA, BPF, DMP, DEP, DBP, BBP, DEHP, DNOP, 4-OP e 4-NP	TFME HPLC-DAD	Poliamida e celulose	Água mineral (15 mL)	Acetonitrila (400 μL)	8,3 min (3,3 h)	5 – 100 25 – 100	Este estudo

Fonte: Elaborado pelo Autor (2022)

^a Tempo de preparo da amostra inclui o tempo de extração e de dessorção.

^b Calculado como tempo total dividido pela quantidade de amostras processadas nesse período.

Técnicas de preparo de amostra: SPE, extração em fase sólida – μ -SPE, micro-SPE – TFME, microextração em filme fino – MSPE, extração em fase sólida magnética – m-dSPE, extração em fase sólida magnética-dispersiva – Ba μ E, microextração adsortiva em barra – DPX, extração em ponteira descartável – SBSE, extração sortiva em barra de agitação. Fases sortivas: MWCNT, nanotubos de carbono de parede múltipla – MIL, materiais do Instituto Lavoisier – HLB, equilíbrio hidrofílico-lipofílico.

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Este estudo aplicou uma fase sortiva de poliamida baseada em papel (PSP) para a solução de um problema analítico: a determinação de desreguladores endócrinos em amostras de água. O preparo do PSP não exigiu materiais ou técnicas sofisticadas e/ou de alto custo, e, além disso, todos os reagentes e materiais empregados foram consumidos no processo. Por esses motivos, pode-se afirmar que o preparo desse dispositivo é simples e de baixo impacto ambiental.

Com base na literatura científica, esta é a primeira vez em que os PSPs são integrados à microextração em um sistema semiautomatizado, conferindo maior frequência analítica. O desenvolvimento desse método apenas foi possível devido ao uso de impressão 3D. Nesse sistema, foi possível aumentar o volume de amostra e otimizar o menor volume de solvente de dessorção a fim de ponderar os fatores de enriquecimento, o menor consumo, a menor geração de resíduos tóxicos e a frequência analítica. Ainda, a extração e dessorção dos analitos pôde ser realizada em até 24 amostras simultaneamente. A aplicação do método em amostra de água mineral indicou recuperações satisfatórias, boas precisões e alta sensibilidade.

A partir dos resultados alcançados com o presente estudo e com base no estado da arte das fases sortivas baseadas em papel em microextração, é possível delinear perspectivas futuras em quatro eixos principais. O primeiro é o desenvolvimento de novas fases sortivas baseadas em papel. Ainda há uma limitação de PSPs reportados na literatura, seja por deposição física ou química. Novos PSPs podem ser desenvolvidos e aplicados em técnicas de microextração, preferencialmente seletivos. Outro aspecto importante é a ampliação das aplicações de PSPs para outras matrizes, analitos e técnicas instrumentais. Em terceiro eixo está o desenvolvimento de métodos com o uso de PSPs para aplicações *on-site*. Uma das vantagens dos PSPs que pouco foi explorada é a sua portabilidade, o que abre espaço para aplicações *on-site*, permitindo integrar as etapas de amostragem e extração. Por último, este estudo contribui para o desenvolvimento de novos dispositivos por meio da impressão 3D que facilitem ou melhorem os parâmetros operacionais em técnicas de microextração.

REFERÊNCIAS

- AGRAWAAL, H.; THOMPSON, J. E. Additive manufacturing (3D printing) for analytical chemistry. **Talanta Open**, v. 3, n. article 100036 (17 pages), 2021.
- AMIRIDOU, D.; VOUTSA, D. Alkylphenols and phthalates in bottled waters. **Journal of Hazardous Materials**, v. 185, n. 1, p. 281–286, 2011.
- AOAC INTERNATIONAL. Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. **AOAC Official Methods of Analysis**, p. 1–17, 2016.
- ARTHUR, C. L.; PAWLISZYN, J. Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers. **Analytical Chemistry**, v. 62, n. 19, p. 2145–2148, 1990.
- AYAZI, Z.; ESFAHALAN, F. S.; KHOSHESAB, 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. **Analytical Methods**, v. 10, n. 25, p. 3043–3051, 2018.
- AYAZI, Z.; ESFAHLAN, F. S.; MATIN, P. Graphene oxide reinforced polyamide nanocomposite coated on paper as a novel layered sorbent for microextraction by packed sorbent. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 98, n. 12, p. 1118–1134, 2018.
- BAGHERI, H. et al. Novel polyamide-based nanofibers prepared by electrospinning technique for headspace solid-phase microextraction of phenol and chlorophenols from environmental samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 716, p. 34–39, 2012.
- 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, n. 10, p. 737–747, 1999.
- BAUGHAN, J. S. Chapter 3 Future trends in global food packaging regulation. In: **Global Legislation for Food Contact Materials**. Washington, DC: Elsevier, 2015. p. 65–76.
- BELKA, M. et al. Application of 3D-printed scabbard-like sorbent for sample preparation in bioanalysis expanded to 96-wellplate high-throughput format. **Analytica Chimica Acta**, v. 1081, p. 1–5, 2019.
- BELKA, M.; ULENBERG, S.; BĄCZEK, T. Fused Deposition Modeling Enables the Low-Cost Fabrication of Porous, Customized-Shape Sorbents for Small-Molecule Extraction. **Analytical Chemistry**, v. 89, n. 8, p. 4373–4376, 2017.
- BENEDÉ, J. L. et al. Stir bar sorptive-dispersive microextraction mediated by

magnetic nanoparticles-nylon 6 composite for the extraction of hydrophilic organic compounds in aqueous media. **Analytica Chimica Acta**, v. 926, p. 63–71, 2016.

BENEDÉ, J. L. et al. Synergistic combination of polyamide-coated paper-based sorptive phase for the extraction of antibiotics in saliva. **Analytica Chimica Acta**, v. 1164, n. article 338512 (9 pages), 2021a.

BENEDÉ, J. L. et al. A paper-based polystyrene/nylon Janus platform for the microextraction of UV filters in water samples as proof-of-concept. **Microchimica Acta**, v. 188, n. article 391 (12 pages), 2021b.

BERNARDO, P. E. M. et al. Bisfenol A: o uso em embalagens para alimentos, exposição e toxicidade - uma revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 74, n. 1, p. 1–11, 2015.

BORGES, K. B.; JUNIOR, C. S. N. Princípios básicos do preparo de amostras. In: BORGES, K. B.; FIGUEIREDO, E. C. DE; QUEIROZ, M. E. C. (Eds.). . **Preparo de Amostras para Análise de Compostos Orgânicos**. 1ª edição ed. [s.l.] LTC Editora GEN, 2015. p. 288.

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

BRUHEIM, I.; LIU, X.; PAWLISZYN, J. Thin-Film Microextraction. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 4, p. 1002–1010, 2003.

BRUICE, P. Y. Deslocalização eletrônica e ressonância. In: **Química Orgânica**. 4ª ed. São Paulo: Pearson Education Limited, 2006. p. 704.

CARASEK, E.; TONJES, J. W.; SCHARF, M. Pré-concentração de chumbo e cádmio em um sistema de micro extração líquido-líquido e determinação por espectrometria de absorção atômica com chama. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 748–752, 2002.

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

CASADO-CARMONA, F. A.; LUCENA, R.; CÁRDENAS, S. Magnetic paper-based sorptive phase for enhanced mass transference in stir membrane environmental samplers. **Talanta**, v. 228, n. article 122217 (8 pages), 2021.

CASTRO, M. D. L. DE; PRIEGO-CAPOTE, F. Soxhlet extraction: Past and present

panacea. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2383–2389, 2010.

CHEN, J.; HURTUBISE, R. J. Solid-phase microextraction with Whatman 1PS paper and direct room-temperature solid-matrix luminescence analysis. **Talanta**, v. 45, n. 6, p. 1081–1087, 1998.

CRINI, G. et al. Innovative technologies to remove alkylphenols from wastewater: a review. **Environmental Chemistry Letters**, 2022.

DARGAHI, R. et al. Dispersive magnetic solid-phase extraction of phthalate esters from water samples and human plasma based on a nanosorbent composed of MIL-101(Cr) metal–organic framework and magnetite nanoparticles before their determination by GC–MS. **Journal of Separation Science**, v. 41, n. 4, p. 948–957, 2018.

DARVISHNEJAD, F.; RAOOF, J. B.; GHANI, M. Thin film microextraction based on Co₃O₄@GO-Nylon-6 polymeric membrane to extract morin and quercetin and determining them through high performance liquid chromatography-ultraviolet detection. **Microchemical Journal**, v. 170, n. article 106684 (9 pages), 2021.

DE LA GUARDIA, M.; GARRIGUES, S. Past, present and future of green analytical chemistry. In: **Challenges in Green Analytical Chemistry**. [s.l: s.n.]. v. 2p. 1–18.

DÍAZ-LIÑÁN, M. C. et al. Paper-based sorptive phases for microextraction and sensing. **Analytical Methods**, v. 12, n. 24, p. 3074–3091, 2020.

DÍAZ-LIÑÁN, M. C. et al. Dual-template molecularly imprinted paper for the determination of drugs of abuse in saliva samples by direct infusion mass spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 160, n. article 105686 (7 pages), 2021a.

DÍAZ-LIÑÁN, M. C. et al. Unmodified cellulose filter paper, a sustainable and affordable sorbent for the isolation of biogenic amines from beer samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1651, n. article 462297 (7 pages), 2021b.

DMITRIENKO, E. V et al. A simple approach to prepare molecularly imprinted polymers from nylon-6. **Journal of Molecular Recognition**, v. 26, p. 368–375, 2013.

ENLOW, E. M. et al. Discrimination of Nylon Polymers Using Attenuated Total Reflection Mid-infrared Spectra and Multivariate Statistical Techniques. **Applied Spectroscopy**, v. 59, n. 8, p. 986–992, 2005.

FANIBAND, M.; LINDH, C. H.; JÖNSSON, B. A. G. Human biological monitoring of suspected endocrine-disrupting compounds. **Asian Journal of Andrology**, v. 16, n. 1, p. 5–16, 2014.

FASANO, E. et al. Migration of phthalates, alkylphenols, bisphenol A and di(2-

ethylhexyl)adipate from food packaging. **Food Control**, v. 27, n. 1, p. 132–138, 2012.

FILHO, E. R. P. **Planejamento Fatorial em Química: maximizando a obtenção de resultados**. São Carlos: EdUFSCar, 2018.

FREDERIKSEN, H.; SKAKKEBÆK, N. E.; ANDERSSON, A. M. Metabolism of phthalates in humans. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 51, n. 7, p. 899–911, 2007.

FROMME, H. et al. Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment. **Water Research**, v. 36, n. 6, p. 1429–1438, 2002.

GIGER, W.; AHEL, M. Aqueous solubility of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates. **Chemosphere**, v. 26, n. 8, p. 1461–1470, 1993.

GONZÁLEZ-SÁLAMO, J.; SOCAS-RODRÍGUEZ, B.; HERNÁNDEZ-BORGES, J. Analytical methods for the determination of phthalates in food. **Current Opinion in Food Science**, v. 22, p. 122–136, 2018.

GORDEEV, E. G.; DEGTYAREVA, E. S.; ANANIKOV, V. P. Analysis of 3D printing possibilities for the development of practical applications in synthetic organic chemistry. **Russian Chemical Bulletin**, v. 65, n. 6, p. 1637–1643, 2016.

HAHLADAKIS, J. N. et al. An overview of chemical additives present in plastics : Migration , release , fate and environmental impact during their use , disposal and recycling. **Journal of Hazardous Materials**, v. 344, p. 179–199, 2018.

HAJARE, D. M.; GAJBHIYE, T. S. Additive manufacturing (3D printing): Recent progress on advancement of materials and challenges. **Materials Today: Proceedings**, v. 58, p. 736–743, 2022.

HOSPODAROVA, V.; SINGOVSKA, E.; STEVULOVA, N. Characterization of Cellulosic Fibers by FTIR Spectroscopy for Their Further Implementation to Building Materials. **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 09, n. 06, p. 303–310, 2018.

HUANG, S. et al. A critical review on human internal exposure of phthalate metabolites and the associated health risks. **Environmental Pollution**, v. 279, n. article 116941 (14 pages), 2021.

HUELSMANN, R. D.; WILL, C.; CARASEK, E. Novel strategy for disposable pipette extraction (DPX): Low-cost Parallel-DPX for determination of phthalate migration from common plastic materials to saliva simulat with GC-MS. **Talanta**, v. 221, n. article 121443 (7 pages), 2021.

HYDE, A. M. et al. General Principles and Strategies for Salting-Out Informed by the Hofmeister Series. **Organic Process Research and Development**, v. 21, n. 9, p. 1355–1370,

2017.

ICH. **VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: TEXT AND METHODOLOGY Q2(R1)**. [s.l: s.n.].

JAMIL, L. A. Optimization of new sample preparation technique for the determination of methadone and codeine in plasma sample by GC-FID. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 31, n. 3, p. 580–588, 2020.

JIANG, R.; OUYANG, G. Fast Analytical Techniques on Microextraction. In: ZENG, E. Y. (Ed.). **Wilson and Wilson's Comprehensive Analytical Chemistry - Persistent Organic Pollutants (POPs): Analytical Techniques, Environmental Fate and Biological Effects**. [s.l.] Elsevier, 2015.

JING, X. et al. An Effervescence-assisted Centrifuge-less Dispersive Liquid-Phase Microextraction Based on Solidification of Switchable Hydrophilicity Solvents for Detection of Alkylphenols in Drinks. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 49, n. 5, p. e21065–e21071, 2021.

JRC INSTITUTE FOR HEALTH AND CONSUMER PROTECTION. **European Union risk assessment report: benzyl butyl phthalate**. VOL 76 ed. [s.l.] Publications Office, 2008a.

JRC INSTITUTE FOR HEALTH AND CONSUMER PROTECTION. **European Union risk assessment report: bis(2-ethylhexyl)phthalate**. VOL 80 ed. [s.l.] Publications Office, 2008b.

JRC INSTITUTE FOR HEALTH AND CONSUMER PROTECTION. **European Union risk assessment report: dibutyl phthalate**. VOL 29 ed. [s.l.] Publications Office, 2009.

JRC INSTITUTE FOR HEALTH AND CONSUMER PROTECTION. **Updated European Union risk assessment report: 4,4'-isopropylidenediphenol (bisphenol-A)**. [s.l.] Publications Office, 2010a.

JRC INSTITUTE FOR HEALTH AND CONSUMER PROTECTION. **European Union risk assessment report: 4-nonylphenol (branched) and nonylphenol**. VOL 10 ed. [s.l.] Publications Office, 2010b.

KATAOKA, H. SPME techniques for biomedical analysis. **Bioanalysis**, v. 7, n. 17, p. 2135–2144, 2015.

KHAN, M. U.; AHRING, B. K. Lignin degradation under anaerobic digestion: Influence of lignin modifications -A review. **Biomass and Bioenergy**, v. 128, n. article 105325 (10 pages), 2019.

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

KOŁODZIEJ, D.; SOBCZAK, Ł.; GORYŃSKI, K. Polyamide Noncoated Device for Adsorption-Based Microextraction and Novel 3D Printed Thin-Film Microextraction Supports. **Analytical Chemistry**, v. 94, p. 2764–2771, 2022.

KONIECZNA, L. et al. New 3D-printed sorbent for extraction of steroids from human plasma preceding LC–MS analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1545, p. 1–11, 2018.

LACORTE, S.; CAZES, J. Pollutants: HPLC Analysis in Water. **Encyclopedia of Chromatography**, 2010.

LANÇAS, F. M. Capítulo 12 – Preparo da Amostra. In: **Cromatografia líquida moderna**. Campinas: Editora Átomo, 2009. p. 251–313.

LI, F. et al. 3D Printing in analytical sample preparation. **Journal of Separation Science**, v. 43, n. 9–10, p. 1854–1866, 2020.

LÓPES, T.; CAMPOS, A. F.; CASSELLA, R. J. Determination of adulterants of cocaine in Real banknotes in Brazil by HPLC-DAD. **Microchemical Journal**, v. 178, n. article 107401 (8 pages), 2022.

LUÍS, C. et al. Comprehensive insight from phthalates occurrence: from health outcomes to emerging analytical approaches. **Toxics**, v. 9, n. 7, 157, p. 1–26, 2021.

MA, Y. et al. The adverse health effects of bisphenol A and related toxicity mechanisms. **Environmental Research**, v. 176, n. article 108575 (17 pages), 2019.

MAFRA, G. et al. Returning to nature for the design of sorptive phases in solid-phase microextraction. **Separations**, v. 7, n. 1, p. 1–22, 2020.

MAFRA, G. **Microextração em Gota Única Paralela: Uma Nova Estratégia para Sistemas de Alta Frequência Analítica Utilizando Líquidos Iônicos Magnéticos**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2021.

MAJORS, R. Overview of Sample Preparation. **LCGC Supplements**, v. 33, n. 11, p. 46–51, 2015.

MARTÍNEZ, M. A. et al. Prenatal exposure estimation of BPA and DEHP using integrated external and internal dosimetry: A case study. **Environmental Research**, v. 158, p. 566–575, 2017.

MCKEEN, L. Polyamides (Nylons). In: **Film Properties of Plastics and Elastomers**.

4. ed. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 187–227.

MEHRANI, Z.; EBRAHIMZADEH, H.; MORADI, E. Poly m-aminophenol / nylon 6 / graphene oxide electrospun nanofiber as an efficient sorbent for thin film microextraction of phthalate esters in water and milk solutions preserved in baby bottle. **Journal of Chromatography A**, v. 1600, p. 87–94, 2019.

MESQUITA, I.; LORIGO, M.; CAIRRAO, E. Update about the disrupting-effects of phthalates on the human reproductive system. **Molecular Reproduction and Development**, v. 88, n. 10, p. 650–672, 2021.

MIRAGHAEI, S. et al. Development and validation of a new HPLC-DAD method for quantification of sofosbuvir in human serum and its comparison with LC–MS/MS technique: Application to a bioequivalence study. **Journal of Chromatography B**, v. 1063, p. 118–122, 2017.

MIRNAGHI, F. S. et al. Optimization of the coating procedure for a high-throughput 96-blade solid phase microextraction system coupled with LC-MS/MS for analysis of complex samples. **Analytical Chemistry**, v. 83, n. 15, p. 6018–6025, 2011.

MOAZZEN, M. et al. Determination of phthalate acid esters (PAEs) in carbonated soft drinks with MSPE/GC–MS method. **Toxin Reviews**, v. 37, n. 4, p. 319–326, 2018.

MOLDOVEANU, S. C.; DAVID, V. Properties of Analytes and Matrices Determining HPLC Selection. In: **Selection of the HPLC Method in Chemical Analysis**. [s.l.: s.n.]. p. 189–230.

MONTGOMERY, D. C. **Design and Analysis of Experiments**. 9. ed. [s.l.] John Wiley & Sons, 2017.

MUNCKE, J. Exposure to endocrine disrupting compounds via the food chain: Is packaging a relevant source? **Science of the Total Environment**, v. 407, n. 16, p. 4549–4559, 2009.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. **Database**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>>.

NET, S. et al. Reliable quantification of phthalates in environmental matrices (air, water, sludge, sediment and soil): A review. **Science of the Total Environment**, v. 515–516, p. 162–180, 2015.

NETO, B. DE B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2010.

OLCER, Y. A. et al. Thin film microextraction: Towards faster and more sensitive

microextraction. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 113, p. 93–101, 2019.

ONG, H. T.; SAMSUDIN, H.; SOTO-VALDEZ, H. Migration of endocrine-disrupting chemicals into food from plastic packaging materials: an overview of chemical risk assessment, techniques to monitor migration, and international regulations. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 62, n. 4, p. 957–979, 2022.

PALSANIYA, S.; NEMADE, H. B.; DASMAHAPATRA, A. K. Hierarchical Nylon-6/reduced graphene oxide/polyaniline nanocomposites with enhanced dielectric properties for energy storage applications. **Journal of Energy Storage**, v. 32, n. article 101821 (13 pages), 2020.

PAWLISZYN, J. Chapter 2 Theory of Solid-Phase Microextraction. In: **Handbook of Solid Phase Microextraction**. [s.l.] Elsevier, 2012. p. 50–51.

PERALTA, C. M.; FERNÁNDEZ, L. P.; MASI, A. N. Solid phase extraction using nylon membranes with fluorescence detection as a fast and sensitive method for Amiloride and Furosemide determination in urine samples. **Microchemical Journal**, v. 98, p. 39–43, 2011.

PERESTRELO, R. et al. QuEChERS - Fundamentals, relevant improvements, applications and future trends. **Analytica Chimica Acta**, v. 1070, p. 1–28, 2019.

PÉREZ-OUTEIRAL, J.; MILLÁN, E.; GARCIA-ARRONA, R. Determination of phthalates in food simulants and liquid samples using ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction followed by solidification of floating organic drop. **Food Control**, v. 62, p. 171–177, 2016.

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

REYES-GALLARDO, E.; LUCENA, R.; CÁRDENAS, S. Silica nanoparticles–nylon 6 composites: synthesis, characterization and potential use as sorbent. **RSC Advances**, v. 7, p. 2308–2314, 2017.

RÍOS-GÓMEZ, J. et al. Carbon nanohorn suprastructures on a paper support as a sorptive phase. **Molecules**, v. 23, n. 6, 1252, 2018.

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

ROCHA, B. A. et al. Urinary concentrations of 25 phthalate metabolites in Brazilian children and their association with oxidative DNA damage. **Science of the Total Environment**, v. 586, p. 152–162, 2017.

RULKENS, R.; KONING, C. **Chemistry and Technology of Polyamides**. [s.l.] Elsevier B.V., 2012. v. 5

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

SALAZAR-BELTRÁN, D. et al. Phthalates in Beverages and Plastic Bottles: Sample Preparation and Determination. **Food Analytical Methods**, v. 11, n. 1, p. 48–61, 2018.

SALGUEIRO-GONZÁLEZ, N. et al. Trends in analytical methodologies for the determination of alkylphenols and bisphenol A in water samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 962, p. 1–14, 2017.

SANCHIS, Y.; YUSÀ, V.; COSCOLLÀ, C. Analytical strategies for organic food packaging contaminants. **Journal of Chromatography A**, v. 1490, p. 22–46, 2017.

SARAJI, M.; BEHBAHAN, A. K. Octadecylsilane/Nylon-6 composite as a thin-film microextraction sorbent for the determination of bisphenol A in water samples. **Journal of Separation Science**, v. 39, n. 18, p. 3616–3623, 2016.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. Chapter 2 Infrared Spectrometry. In: **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2005. p. 502.

SKOOG, D. A. et al. **Fundamentos de Química Analítica**. 9^a ed. São Paulo: Cengage Learning, 2014.

SOUZA, M. P. DE et al. Bar adsorptive microextraction (BA μ E) with a polymeric sorbent for the determination of emerging contaminants in water samples by ultra-high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Analytical Methods**, v. 10, n. 7, p. 697–705, 2018.

SPIETELUN, A. et al. Current trends in solid-phase microextraction (SPME) fibre coatings. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 11, p. 4524–4537, 2010.

STASHENKO, E. E.; MARTÍNEZ, J. R. Preparación de la muestra: un paso crucial para el análisis por GC-MS. **Scientia Chromatographica**, v. 3, n. 1, p. 25–49, 2011.

SZCZEPAŃSKA, N.; KUDŁAK, B.; NAMIEŚNIK, J. Recent advances in assessing xenobiotics migrating from packaging material – A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 1023, p. 1–21, 2018.

TULLY, J. J.; MELONI, G. N. A Scientist's Guide to Buying a 3D Printer: How to Choose the Right Printer for Your Laboratory. **Analytical Chemistry**, v. 92, n. 22, p. 14853–

14860, 2020.

US EPA. **SPECIAL REPORT ON ENVIRONMENTAL ENDOCRINE DISRUPTION: AN EFFECTS ASSESSMENT AND ANALYSIS**. Washington, DC: [s.n.].

US FDA. **Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry**. [s.l: s.n.].

VERMA, J. et al. QuEChERS based analysis of multiple pesticides and phthalates in packaged food products. **Microchemical Journal**, v. 171, n. article 106882 (10 pages), 2021.

VIEIRA, W. T. et al. Endocrine-disrupting compounds: Occurrence, detection methods, effects and promising treatment pathways - A critical review. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 9, n. article 104558 (18 pages), 2021.

VILELA, C. L. S.; BASSIN, J. P.; PEIXOTO, R. S. Water contamination by endocrine disruptors: Impacts, microbiological aspects and trends for environmental protection. **Environmental Pollution**, v. 235, p. 546–559, 2018.

VUCKOVIC, D. High-throughput solid-phase microextraction in multi-well-plate format. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 45, p. 136–153, 2013.

WANG, L.; PUMERA, M. Recent advances of 3D printing in analytical chemistry: Focus on microfluidic, separation, and extraction devices. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 135, 2021.

WANG, Y.; QIAN, H. Phthalates and their impacts on human health. **Healthcare (Switzerland)**, v. 9, n. 5, p. 1–9, 2021.

WANG, Z. et al. Triazine covalent organic polymer coated stir bar sorptive extraction coupled with high performance liquid chromatography for the analysis of trace phthalate esters in mineral water and liquor samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1660, n. article 462665 (7 pages), 2021.

WERNER, J.; GRZEŚKOWIAK, T.; ZGOŁA-GRZEŚKOWIAK, A. A polydimethylsiloxane/deep eutectic solvent sol-gel thin film sorbent and its application to solid-phase microextraction of parabens. **Analytica Chimica Acta**, v. 1202, n. article 339666 (11 pages), 2022.

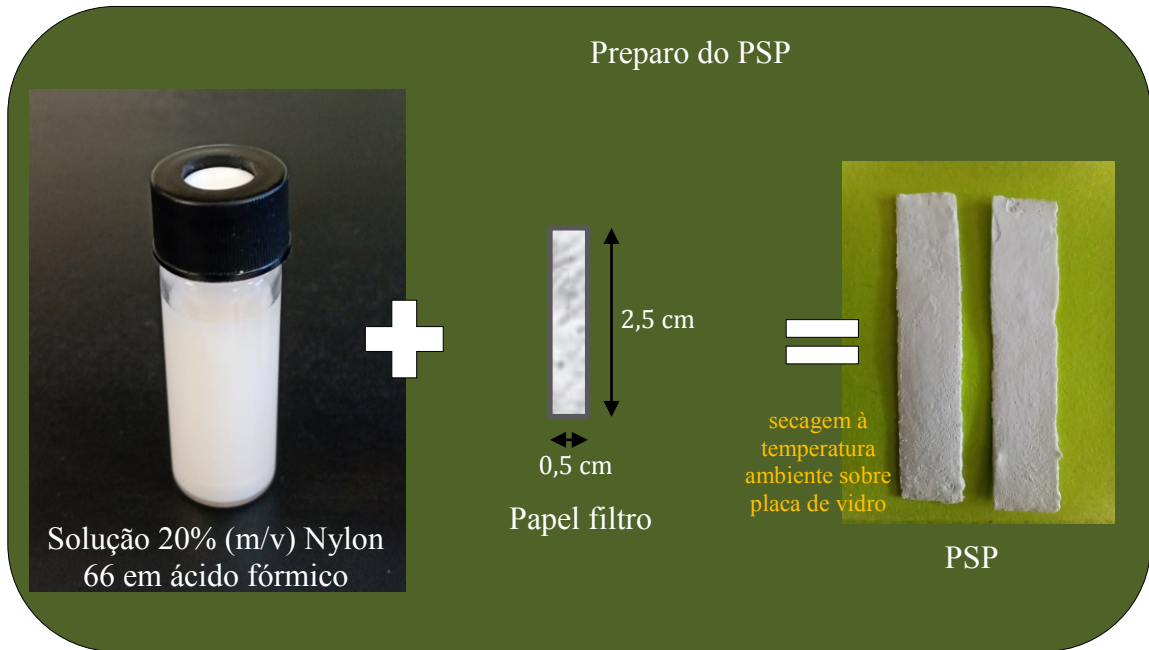
WU, J. H.; HE, C. Y. Advances in Cellulose-Based Sorbents for Extraction of Pollutants in Environmental Samples. **Chromatographia**, v. 82, n. 8, p. 1151–1169, 2019.

XING, J. et al. A critical review of presence, removal and potential impacts of endocrine disruptors bisphenol A. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - C**, v. 254, n. article 109275 (11 pages), 2022.

XING, J. S.; BAI, Z. M. Is testicular dysgenesis syndrome a genetic, endocrine, or

environmental disease, or an unexplained reproductive disorder? **Life Sciences**, v. 194, n. 43, p. 120–129, 2018.

YILMAZ, E.; SOYLAK, M. Historical backgrounds, milestones in the field of development of separation and preconcentration methods. In: **New Generation Green Solvents for Separation and Preconcentration of Organic and Inorganic Species**. [s.l.] Elsevier, 2020. p. 207–266.

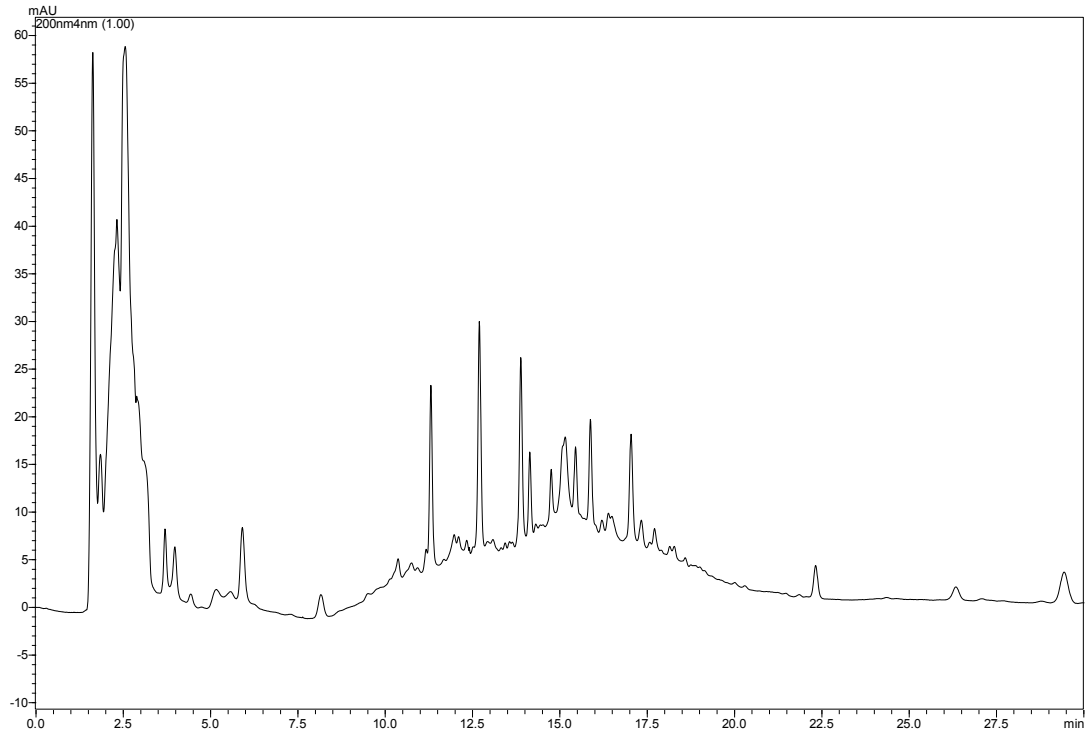
APÊNDICE A – Esquema de preparo do PSP

Fonte: Elaborado pelo Autor (2022)

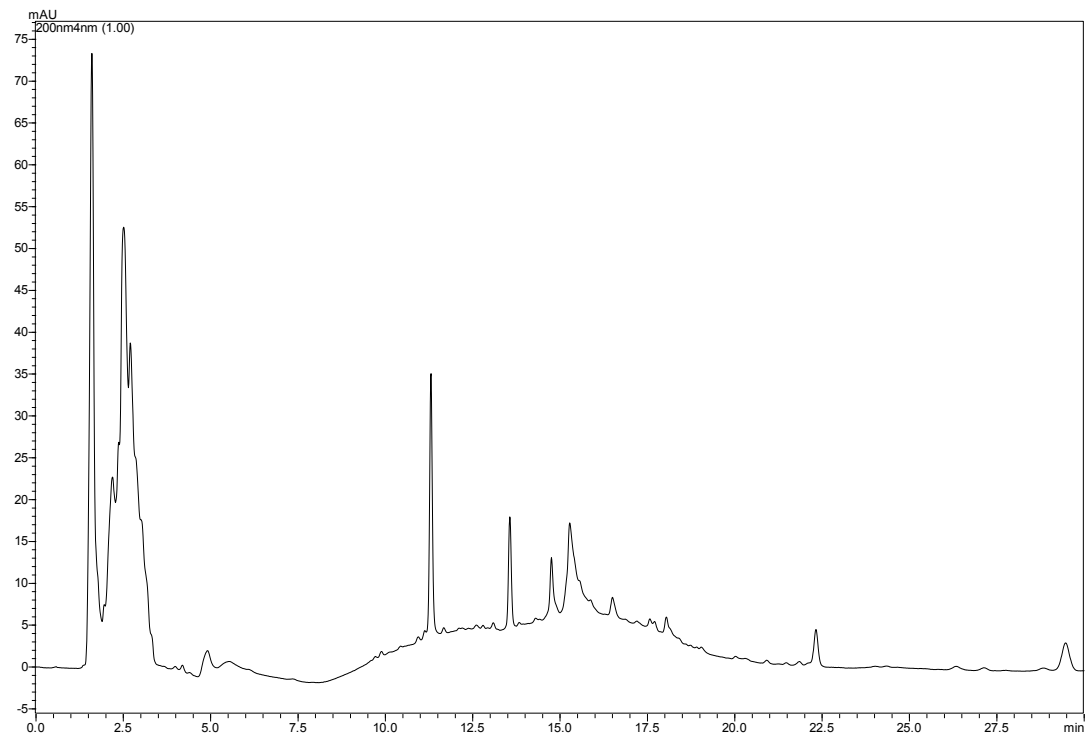
APÊNDICE B – Cromatogramas do branco dos poços de PLA e PETG

Exposição à 600 μ L de metanol por 30 min sob agitação.

PLA



PETG



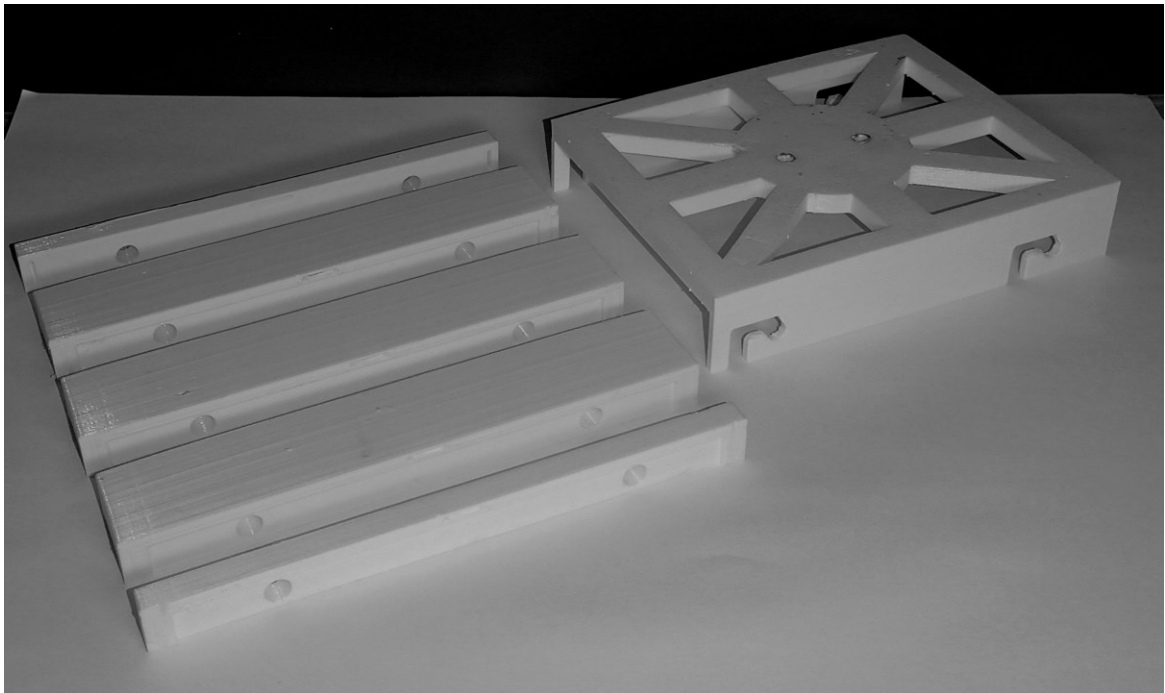
Fonte: Obtido pelo Autor (2021) por meio do software LC Solutions (Shimadzu)

APÊNDICE C – Imagens das peças impressas em 3D

Pentes aberto (acima) e fechado (abaixo)



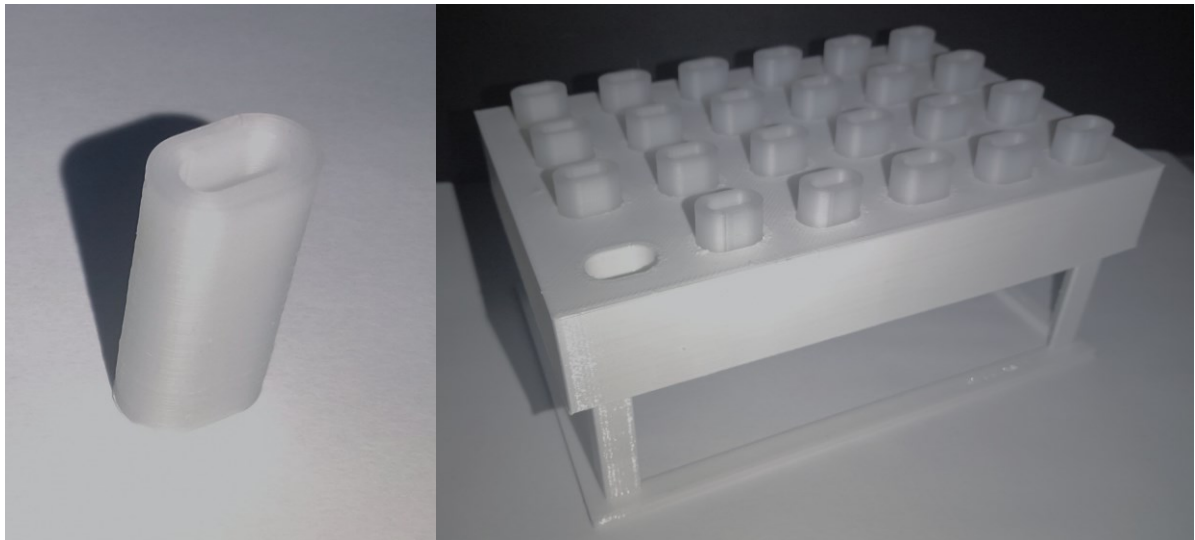
Suportes de fixação dos pentes



Poços de extração (capacidade: 15 mL)



Poços de dessorção em placa (capacidade: 700 μ L)



ANEXO A – Limites para algumas substâncias em contato com alimentos

Comparação de SML entre a União Europeia (EU 2011) e o Regulamento Chinês (NHFPC, 2016) sobre certas substâncias autorizadas em contato com alimentos que são prejudiciais à saúde humana.

Substância em contato com alimento	Número CAS	SML (mg/kg)	
		União Europeia	China
DBP	84-74-2	0,3	0,3
BBP	85-68-7	30,0	Não autorizado
DEHP	117-81-7	1,5	1,5
DAP	131-17-9	Não detectável	Não detectável
DMiP	1459-93-4	0,05	0,05
DEHA	103-23-1	18,0	18,0
Ácido fosforoso, tris-(nonil <i>e/ou</i> dinonil-fenil) ester	–	30	Não autorizado
TNPP	26523-78-4	Não autorizado	Não detectável
BPA	80-05-7	0,05	0,6
Estireno	100-42-5	Autorizado sem SML	Autorizado sem SML
Outras substâncias na lista positiva sem SMLs		Limite de detecção de 0,01 mg/kg	60 mg/kg
OML		10 mg/dm ²	10 mg/dm ²
OML (bebês e crianças pequenas)		60 mg/kg	60 mg/kg

Não detectável significa não detectado em 0,01 mg de substância por kg de alimento (mg/kg).

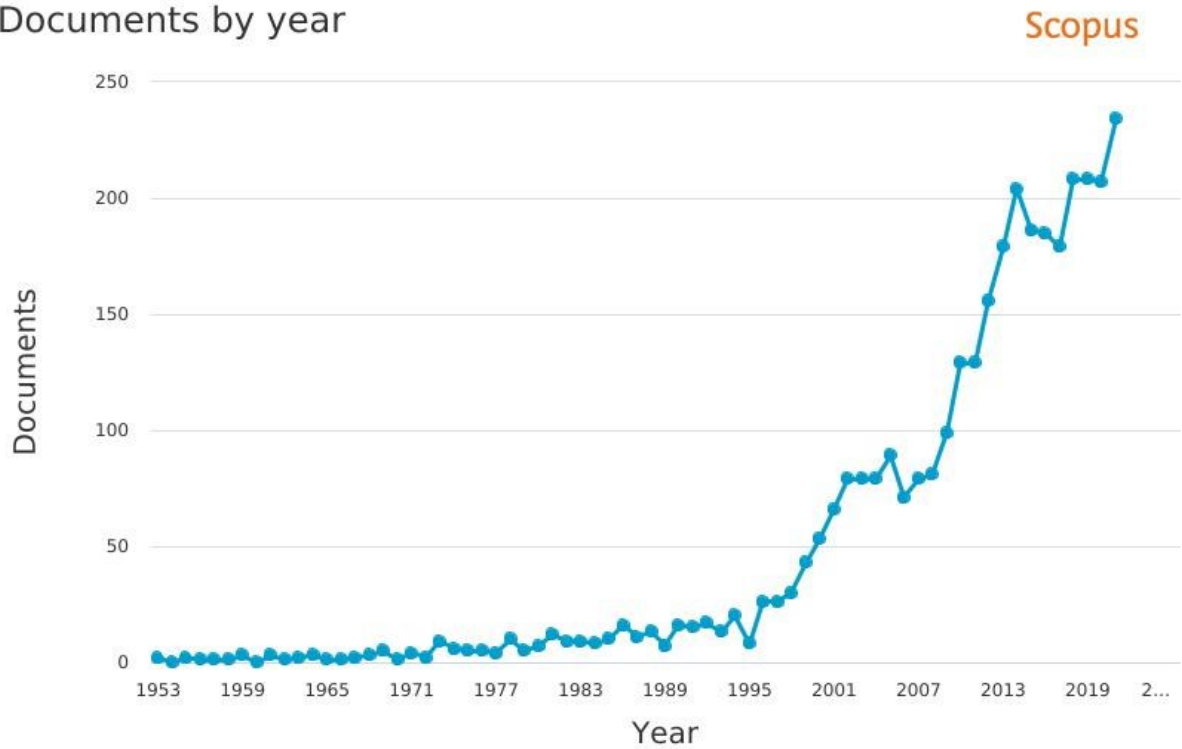
SML – Limite de migração específica

OML – Limite de migração global

Fonte: (ONG; SAMSUDIN; SOTO-VALDEZ, 2022)

ANEXO B – Documentos encontrados pela base Scopus a nível global no período de 1953 a 2021 buscando por “determination AND (phthalates OR alkylphenols OR bisphenols)” no título do artigo, resumo e palavras-chaves

Documents by year



Copyright © 2022 Elsevier B.V. All rights reserved. Scopus® is a registered trademark of Elsevier B.V.

Fonte: Scopus (2022)