



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO TECNOLÓGICO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DE  
MATERIAIS

Francielle Crocetta Turazzi

**EXPLORANDO O USO DE NOVAS FASES EXTRATORAS BASEADAS EM  
POLIANILINA NA MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA DE FILME FINO**

Florianópolis  
2024

Francielle Crocetta Turazzi

**EXPLORANDO O USO DE NOVAS FASES EXTRATORAS BASEADAS EM  
POLIANILINA NA MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA DE FILME FINO**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Polímeros.

Orientador(a): Prof. Dr. Guilherme Mariz de Oliveira Barra

Florianópolis

2024

Turazzi, Francielle Crocetta  
EXPLORANDO O USO DE NOVAS FASES EXTRATORAS BASEADAS EM  
POLIANILINA NA MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA DE FILME FINO  
/ Francielle Crocetta Turazzi ; orientador, Guilherme  
Mariz de Oliveira Barra, 2024.  
126 p.

Tese (doutorado) -Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em  
Ciência e Engenharia de Materiais, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Ciência e Engenharia de Materiais. 2. Polianilina.  
3. TF-SPME. 4. Sistema de placas de 96 poços de amostragem.  
5. Preparo de amostra. I. Barra, Guilherme Mariz de  
Oliveira. II. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de  
Materiais. III. Título.

Francielle Crocetta Turazzi

**EXPLORANDO O USO DE NOVAS FASES EXTRATORAS BASEADAS EM  
POLIANILINA NA MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA DE FILME FINO**

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado, em 15 de maio de 2024,  
pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.(a) Dr.(a) Andréa Rodrigues Chaves  
Universidade Federal de Goiás (UFG)

Prof.(a) Dr.(a) Bluma Guenther Soares  
Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

Prof. Dr. Josias de Oliveira Merib  
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA)

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

Insira neste espaço a  
assinatura digital

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Insira neste espaço a  
assinatura digital

Prof. Dr. Guilherme Mariz de Oliveira Barra  
Orientador(a)

Florianópolis, 2024.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Deila e Gilberto, que sempre me deram forças e me incentivaram a estudar. Se cheguei até aqui, foi porque eles estiveram ao meu lado me dando apoio para encarar todos os desafios ao longo da minha jornada acadêmica. Por mais que eu tivesse medo, vocês sempre me passaram confiança. Amo vocês.

A minha irmã Caroline, que eu acabo sempre ressaltando a sua importância na minha vinda para Florianópolis, pois foi ela quem fez a minha matrícula na graduação e me incentivou tanto a vir pra UFSC e hoje cá estou eu finalizando o doutorado.

Aos meus avós Zenir e Elias (*in memoriam*), que sempre me auxiliaram pois sabiam da importância do estudo na minha vida.

Ao meu orientador, professor Dr. Guilherme Mariz de Oliveira Barra, por todo o seu conhecimento a mim transmitido desde o mestrado. Gostaria de agradecer por ter aceitado me orientar ao longo destes anos, você sempre soube reconhecer os meus esforços e me deu total apoio para realização e conclusão deste trabalho.

Aos professores que tive ao longo da vida acadêmica, em especial ao professor Dr. Eduardo Carasek, que me deu a oportunidade de realizar parte deste trabalho em seu laboratório, seus ensinamentos contribuíram (e muito) para minha formação.

Aos professores Drs. que participaram do exame de qualificação, Pedro Henrique Hermes de Araújo e Josias Merib, agradeço a participação, pois suas sugestões e contribuições foram essenciais e de grande importância.

Aos professores Drs. Andréa Rodrigues Chaves, Bluma Guenther Soares, Josias de Oliveira Merib, agradeço por terem aceitado fazer parte da banca examinadora deste trabalho.

Aos meus colegas e amigos de ambos os laboratórios (GPMA e CroMaas) em que tive o prazer de trabalhar e conviver, obrigada pelas conversas, risadas e contribuições diárias que auxiliaram na realização deste trabalho.

Aos amigos que a UFSC me deu ao longo desses anos, cada um que me acrescentou em algo sabe o quanto eu considero, vocês são muito importantes para mim!

Gostaria de agradecer ao Rogério, secretário do PGMAT, por toda ajuda e disponibilidade sempre que necessário.

Ao CNPq pela bolsa de fornecida, porque sem isso, eu não conseguiria me finalizar a minha pós-graduação. E por fim, gostaria muito de agradecer a UFSC, foram alguns anos fazendo parte dessa Universidade maravilhosa.

## RESUMO

Neste trabalho, diferentes polianilinas (PANis) foram sintetizadas, caracterizadas e avaliadas como fases extratoras na técnica de microextração em fase sólida de filme fino (TF-SPME) acoplada ao sistema de placas de 96 poços de amostragem. Primeiramente, a polimerização foi feita através da síntese química por meio da oxidação da anilina, utilizando persulfato de amônio como oxidante. A partir de algumas mudanças no meio reacional, foram obtidas quatro PANis, denominadas PANi dopada com HCl, PANi dopada com ácido oxálico, PANi-sílica dopada com HCl e PANi-sílica dopada com ácido oxálico. As PANis foram caracterizadas por medidas de condutividade elétrica, microscopia eletrônica de varredura, espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier, espectrofotometria na região do ultravioleta-visível, área superficial específica e distribuição de poros. Através das caracterizações foi possível avaliar o efeito do meio reacional (ácido clorídrico, ácido oxálico e dispersão de sílica) na estrutura e propriedades das PANis produzidas neste trabalho. Na sequência, estas PANis foram separadamente avaliadas com a finalidade de verificar qual delas apresentaria o melhor desempenho/eficiência de extração para determinada aplicação, desta forma, duas metodologias distintas foram desenvolvidas. Na primeira metodologia, a PANi-sílica dopada com ácido oxálico foi utilizada, pela primeira vez, como fase extratora em TF-SPME para determinação de hormônios em urina por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência (HPLC-FLD). Na segunda metodologia, anti-inflamatórios não esteroidais foram determinados em amostras de água por cromatografia de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (HPLC-DAD) empregando PANi-sílica dopada com ácido clorídrico como fase extratora em TF-SPME. As condições ótimas para dessorção/extração de cada método foram investigadas e definidas, bem como a eficiência de extração foi comparada à de outros materiais comercialmente disponíveis. Ambas as metodologias apresentaram alta frequência analítica, uma vez que o tempo total de preparo foi aproximadamente menor ou igual a 2 minutos por amostra, considerando a capacidade máxima do sistema de placas de poços de amostragem (96 poços). As metodologias desenvolvidas foram validadas com sucesso através dos parâmetros analíticos de mérito, exibindo limites de quantificação (LOQs) aceitáveis ou até mesmo menores se comparados aos relatados por outros métodos reportados na literatura, além disso, foram feitas análises de amostras reais. De acordo com os resultados obtidos, a PANi pode ser considerada uma fase extratora promissora para determinação de diferentes classes de compostos, tanto em amostras biológicas, como ambientais.

**Palavras-chave:** Polianilina; cromatografia líquida; sistema de placas de 96 poços de amostragem, TF-SPME, preparo de amostra.

## ABSTRACT

In this work, different polyanilines (PANis) were synthesized, characterized, and evaluated as extractor phases in the thin-film solid phase microextraction (TF-SPME) technique coupled with a sampling 96-well plate sampling system. Initially, the polymerization was carried out through chemical synthesis by oxidizing aniline using ammonium persulfate as the oxidant. By making some changes in the reaction medium, four PANis were obtained, named PANi doped with HCl, oxalic acid-doped PANi doped with oxalic acid, PANi-silica doped with HCl, and oxalic PANi-silica doped with oxalic acid. The PANis were characterized by electrical conductivity measurements, scanning electron microscopy, Fourier-transform infrared spectroscopy, ultraviolet-visible spectroscopy, specific surface area, and pore size distribution. From the characterizations, it was possible to evaluate the effect of the reaction medium (hydrochloric acid, oxalic acid, and silica dispersion) on the structure and properties of the PANis produced in this work. Subsequently, these PANis were separately evaluated to determine which one would present the best extraction performance/efficiency for a specific application. Thus, two distinct methodologies were developed. In the first methodology, PANi-silica doped with oxalic acid was used, for the first time, as an extractor phase in TF-SPME for the determination of hormones in urine by high performance liquid chromatography with fluorescence detection (HPLC-FLD). In the second methodology, non-steroidal anti-inflammatory drugs were determined in water samples by high performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD) using PANi-silica doped with HCl as the extractor phase in TF-SPME. The optimal conditions for desorption/extraction for each method were investigated and defined, as well as the extraction efficiency was compared to that of other commercially available materials. Both methodologies showed high analytical throughput, as the total preparation time per sample was approximately equal to or less than 2 minutes per sample, considering the maximum capacity of the sampling well plate system (96 wells). The developed methodologies were successfully validated through analytical parameters of merit, exhibiting acceptable or even lower limits of quantification (LOQs) compared to those reported by other methods in the literature. Furthermore, analyses of real samples were conducted. According to the results obtained, PANi can be considered a promising extractor phase for the determination of different classes of compounds, both biological and environmental samples.

**Keywords:** Polyaniline; liquid chromatography; 96-well plate sampling system, TF-SPME, sample preparation.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Exemplos de PICs, onde x representa o número de unidades de repetição.....	18
Figura 2 – Ilustração do número total de publicações relacionadas a PANi nos últimos dez anos.....	19
Figura 3 – Mecanismo de síntese da PANi. Onde: x - representa o número de unidades de repetição. ....	20
Figura 4 – Estrutura química da PANi em diferentes estados de oxidação. Onde: x - representa o número de unidades de repetição; m - representa a proporção da estrutura constituída por anéis benzoídes e n - representa a proporção da estrutura constituída por quinóides. ....	21
Figura 5 – Representação da dopagem por protonação da PANi na forma base de esmeraldina resultando no sal de esmeraldina. Onde: HA - representa o dopante ácido.....	22
Figura 6 – Comparação da geometria cilíndrica da fibra de SPME com a geometria de filme fino da TF-SPME. ....	29
Figura 7 – Formas de extração na TF-SPME.....	30
Figura 8 – Representação do dispositivo que engloba a técnica de TF-SPME associada ao sistema de placas de 96 poços de amostragem. ....	31
Figura 9 – Estrutura química da PANi dopada com HCl. ....	35
Figura 10 – Estrutura química da PANi dopada com ácido oxálico.....	35
Figura 11 – Estrutura química da PANi-sílica dopada com HCl. ....	36
Figura 12 – Estrutura química da PANi-sílica dopada com ácido oxálico. ....	37
Figura 13 – Micrografias obtidas para PANi dopada com HCl, com ampliações de 1.000x até 20.000x.....	41
Figura 14 – Micrografias obtidas para PANi dopada com ácido oxálico, com ampliações de 1.000x até 20.000x.....	42
Figura 15 – Micrografias obtidas para PANi-sílica dopada com HCl, com ampliações de 1.000x até 20.000x.....	43
Figura 16 – Micrografias obtidas para PANi-sílica dopada com ácido oxálico, com ampliações de 1.000x até 20.000x.....	44
Figura 17 – Espectros de infravermelho das PANis.....	46
Figura 18 – Espectros na região do ultravioleta-visível das PANis. ....	48

Figura 19 – Esquema representativo do preparo dos filmes finos com o pó de PANi.....	53
Figura 20 – Cromatogramas do branco obtido para cada uma das PANis e injeção direta de 10 mg L <sup>-1</sup> . Condições TF-SPME: 1,5 mL de água ultrapura, 90 minutos de extração, sem mudança de pH e sem adição de sal, dessorção líquida com 300 µL de ACN e 20 minutos de dessorção. ....	58
Figura 21 – Cromatogramas do branco obtido para cada uma das PANis e injeção direta de 10 mg L <sup>-1</sup> . Condições TF-SPME: 1,5 mL de urina, 90 minutos de extração, sem mudança de pH e sem adição de sal, dessorção líquida com 300 µL de ACN e 20 minutos de dessorção.....	59
Figura 22 – Gráfico de barras obtido para avaliar a eficiência de extração de cada uma das PANis. Condições TF-SPME: 1,5 mL de urina fortificada com 500 µg L <sup>-1</sup> de cada analito, 90 minutos de extração, sem mudança de pH e sem adição de sal, dessorção líquida com 300 µL de ACN e 20 minutos de dessorção.....	60
Figura 23 – Gráfico de barras obtido para avaliar a eficiência de extração da PANi-sílica dopada com ácido oxálico, em comparação com materiais comerciais. Condições TF-SPME: 1,5 mL de urina fortificada com 500 µg L <sup>-1</sup> de cada analito, 90 minutos de extração, sem mudança de pH e sem adição de sal, dessorção líquida com 300 µL de ACN e 20 minutos de dessorção. ....	61
Figura 24 – Superfície de resposta obtida utilizando um planejamento <i>simplex-centróide</i> para otimização do solvente de dessorção (R <sup>2</sup> = 0,8942). Condições TF-SPME: 1,5 mL de urina fortificada com 500 µg L <sup>-1</sup> de cada analito, 90 minutos de extração, sem mudança de pH e sem adição de sal, dessorção líquida com 300 µL de diferentes solventes e 20 minutos de dessorção. ....	62
Figura 25 – Gráfico de barras obtido para otimização do tempo de dessorção. Condições TF-SPME: 1,5 mL de urina fortificada com 500 µg L <sup>-1</sup> de cada analito, 90 minutos de extração, sem mudança de pH e sem adição de sal, dessorção líquida com 300 µL de ACN e diferentes tempos de dessorção. ....	63
Figura 26 – Superfície de resposta obtida utilizando o planejamento <i>Doehlert</i> para otimização do tempo de extração e pH da urina (R <sup>2</sup> = 0,7949). Condições TF-SPME: 1,5 mL de urina fortificada com 500 µg L <sup>-1</sup> de cada analito, variando o tempo de extração e o pH da urina, sem adição de sal, dessorção líquida com 300 µL de ACN e 20 minutos de dessorção.....	65

Figura 27 – Gráfico de distribuição de espécies em função do pH da amostra, pH = 10. Sendo que a linha em azul representa a espécie ionizada e a linha vermelha representa a espécie neutra. ....66

Figura 28 – Cromatogramas do branco da urina (amarelo) e da urina fortificada (azul), obtidos no estudo da recuperação relativa. Condições TF-SPME: 1,5 mL de urina fortificada com 500  $\mu\text{g L}^{-1}$  de cada analito, 150 minutos de extração, pH da urina ajustado para 10 e sem adição de sal, dessorção líquida com 300  $\mu\text{L}$  de ACN e 20 minutos de dessorção. ....69

Figura 29 – Cromatogramas obtidos para análise de amostras de urina de seis voluntárias. Condições TF-SPME: 1,5 mL de urina, 150 minutos de extração, pH da urina ajustado para 10 e sem adição de sal, dessorção líquida com 300  $\mu\text{L}$  de ACN e 20 minutos de dessorção. ....70

Figura 30 – Cromatogramas do branco obtido para cada uma das PANis e injeção direta de 1  $\text{mg L}^{-1}$ . Condições TF-SPME: 1,5 mL de água ultrapura, 90 minutos de extração, sem mudança de pH e sem adição de sal, dessorção líquida com 300  $\mu\text{L}$  de ACN e 20 minutos de dessorção.  $\lambda = 200 \text{ nm}$ . ....83

Figura 31 – Gráfico de barras obtido para avaliar a eficiência de extração de cada uma das PANis. Condições TF-SPME: 1,5 mL de água ultrapura fortificada com 500  $\mu\text{g L}^{-1}$  de cada analito, 90 minutos de extração, pH = 3 e sem adição de sal, dessorção líquida com 300  $\mu\text{L}$  de ACN e 20 minutos de dessorção. ....84

Figura 32 – Gráfico de barras obtido para avaliar a eficiência de extração da PANi-sílica dopada com HCl, em comparação com materiais comerciais. Condições TF-SPME: 1,5 mL de água ultrapura fortificada com 500  $\mu\text{g L}^{-1}$  de cada analito, 90 minutos de extração, pH = 3 e sem adição de sal, dessorção líquida com 300  $\mu\text{L}$  de ACN e 20 minutos de dessorção. ....86

Figura 33 – Superfície de resposta obtida utilizando um planejamento *simplex-centróide* para otimização do solvente de dessorção ( $R^2 = 0,9538$ ). Condições TF-SPME: 1,5 mL de água ultrapura fortificada com 500  $\mu\text{g L}^{-1}$  de cada analito, 90 minutos de extração, pH da água ajustado para 3 e sem adição de sal, dessorção líquida com 300  $\mu\text{L}$  de diferentes solventes e 20 minutos de dessorção. 87

Figura 34 – Gráfico de barras obtido para otimização do tempo de dessorção. Condições TF-SPME: 1,5 mL de água ultrapura fortificada com 500  $\mu\text{g L}^{-1}$  de cada analito, 90 minutos de extração, pH da água ajustado para 3 e sem

adição de sal, dessorção líquida com 300 µL de ACN e diferentes tempos de dessorção.....88

Figura 35 – Gráfico de barras obtido para otimização do pH da amostra. Condições TF-SPME: 1,5 mL de água ultrapura fortificada com 500 µg L<sup>-1</sup> de cada analito, 90 minutos de extração, diferentes valores de pH e sem adição de sal, dessorção líquida com 300 µL de ACN e 20 minutos de dessorção. ....89

Figura 36 – Gráfico de distribuição de espécies em função do pH da amostra. \*Analitos: ASP, NAP e IBU, a linha em azul representa a espécie neutra e a linha vermelha representa a espécie ionizada. No caso do AME, existem quatro linhas, sendo uma delas representando a espécie neutra (verde) e as outras, as espécies ionizadas. ....90

Figura 37 – Superfície de resposta obtida utilizando o planejamento *Doehlert* para otimização do tempo de extração e % de NaCl ( $R^2 = 0,9010$ ). Condições TF-SPME: 1,5 mL de água ultrapura fortificada com 500 µg L<sup>-1</sup> de cada analito, pH da água ajustado para 3, variando o tempo de extração e o percentual de NaCl, dessorção líquida com 300 µL de ACN e 20 minutos de dessorção. ....92

Figura 38 – Cromatogramas do branco (azul) e da amostra de água fortificada (amarelo), obtidos no estudo da recuperação relativa. Condições TF-SPME: 1,5 mL de água com 500 µg L<sup>-1</sup> de cada analito, 100 minutos de extração, pH da água ajustado para 3 e sem adição de sal, dessorção líquida com 300 µL de ACN e 20 minutos de dessorção. ....95

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Informações referentes as amostras de urina analisadas.....	54
Quadro 2 – Pontos de coleta das amostras de água.....	80

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Trabalhos envolvendo fases extratoras baseadas em PANi em técnicas miniaturizadas de preparo de amostra. ....	26
Tabela 2 – Condutividade elétrica obtida para as PANis sintetizadas. ....	39
Tabela 3 – Área superficial específica, volume total de poros e diâmetro médio de poro das PANis sintetizadas. ....	49
Tabela 4 – Estrutura química e propriedades dos hormônios. ....	50
Tabela 5 – Experimentos realizados no planejamento <i>simplex-centróide</i> . ...	56
Tabela 6 – Experimentos realizados no planejamento <i>Doehlert</i> para otimização do tempo de extração e pH da urina. ....	57
Tabela 7 – Faixa linear de trabalho, equação linear, coeficiente de determinação ( $R^2$ ), LOD e LOQ dos analitos no método proposto. ....	67
Tabela 8 – Recuperação relativa e precisões intradia e interdia. ....	68
Tabela 9 – Comparação do método proposto com outros métodos relatados na literatura para a determinação de hormônios em urina. ....	72
Tabela 10 – Estrutura química e algumas propriedades dos analitos. ....	77
Tabela 11 – Experimentos realizados no planejamento <i>Doehlert</i> para otimização do tempo de extração e % de NaCl. ....	82
Tabela 12 – Faixa linear de trabalho, equação linear, coeficiente de determinação ( $R^2$ ), LOD e LOQ dos analitos no método proposto. ....	93
Tabela 13 – Recuperação relativa e precisões intradia e interdia. ....	94
Tabela 14 – Análise das amostras de água. ....	96
Tabela 15 – Comparação do método proposto com outros métodos relatados na literatura para a determinação de anti-inflamatórios não esteroidais em amostras de água. ....	97

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de etila
AOAC	Associação de Químicos Analíticos Oficiais, do inglês <i>Association of Official Analytical Chemists</i>
ASP	Aspirina
AME	Ácido Mefenâmico
BET	Brunauer, Emmet e Teller
BJH	Barett, Joyner e Halenda
BTEX	Benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno
C18-E	Sílica modificada com grupo C18
CPE	Extração em ponto nuvem, do inglês <i>Cloud point extraction</i>
DAD	Detector por arranjo de diodos, do inglês <i>Diode array detector</i>
DLLME	Microextração líquido-líquido dispersiva, do inglês <i>Dispersive liquid-liquid microextraction</i>
DPX	Extração em ponteira dispersiva, do inglês <i>Dispersive pipette extraction</i>
E1	Estrona
E2	17- $\beta$ -Estradiol
EE2	17- $\alpha$ -Etinilestradiol
FL-PR	Sílica modificada com íon magnésio
GC-FID	Cromatografia Gasosa com Detecção por Ionização de Chama, do inglês <i>Gas Chromatography with Flame Ionization Detection</i>
GC-MS	Cromatografia Gasosa com Detecção por Espectrometria de Massas, do inglês <i>Gas Chromatography with Mass Spectrometry Detection</i>
GC-MS/MS	Cromatografia Gasosa com Detecção por Espectrometria de Massas em Tandem, do inglês <i>Gas Chromatography with Mass Spectrometry Detection</i>
HCl	Ácido clorídrico
HF-MMLLE	Extração Líquido-Líquido em membrana microporosa de fibra oca, do inglês <i>Hollow Fiber Microporous Membrane Liquid-Liquid Extraction</i>

HPA	Hydrocarbonetos policíclicos aromáticos
HPLC-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção por Arranjo de Diodos, do inglês <i>High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection</i>
HPLC-EC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção eletroquímica, do inglês <i>High-Performance Liquid Chromatography and Electrochemical detection</i>
HPLC-FLD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção por Fluorescência, do inglês <i>High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection</i>
HPLC-MS	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção por Espectrometria de Massas, do inglês <i>High-Performance Liquid Chromatography with Mass Spectrometry Detection</i>
HPLC-Q-TOF	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção por Quadrupolo e Espectrometria de Massas por Tempo de Voo, do inglês <i>High-Performance Liquid Chromatography with Quadrupole and Time-of-Flight Mass Spectrometry Detection</i>
HPLC-UV	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção Ultravioleta, do inglês <i>High-Performance Liquid Chromatography with Ultravioleta Detection</i>
IBU	Ibuprofeno
IND	Indometacina
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LC	Cromatografia Líquida, do inglês <i>Liquid Chromatography</i>
LLE	Extração Líquido-Líquido, do inglês <i>Liquid-Liquid Extraction</i>
LOD	Limite de detecção, do inglês <i>Limit of Detection</i>
LOQ	Limite de quantificação, do inglês <i>Limit of Quantification</i>
LPME	Microextração em Fase Líquida, do inglês <i>Liquid Phase Microextraction</i>
MeOH	Metanol
MSPE	Extração em fase sólida magnética, do inglês <i>Magnetic Solid Phase Extraction</i>
NaCl	Cloreto de sódio

NAP	Naproxeno
PAni	Polianilina, do inglês <i>Polyaniline</i>
PIC	Polímero intrinsecamente condutor, do inglês <i>Intrinsically Conducting Polymer</i>
PTFE	Politetrafluoretileno
R <sup>2</sup>	Coefficiente de determinação
RDSE	Extração Sortiva em Disco Rotativo, do inglês <i>Rotating Disk Sorptive Extraction</i>
RSD	Desvio Padrão Relativo, do inglês <i>Relative Standard Deviation</i>
SBSE	Extração Sortiva em Barra de Agitação, do inglês <i>Stir Bar Sorptive Extraction</i>
SDME	Microextração em Gota Única, do inglês <i>Single Drop Microextraction</i>
SPE	Extração em Fase Sólida, do inglês <i>Solid Phase Extraction</i>
SPME	Microextração em Fase Sólida, do inglês <i>Solid Phase Microextraction</i>
TF-SPME	Microextração em Fase sólida de filme fino, do inglês <i>Thin-Film Solid Phase Microextraction</i>
TGA	Análise termogravimétrica, do inglês <i>Thermogravimetric analysis</i>
UHPLC-HRMS	Cromatografia Líquida de Ultra-Alta Eficiência com Detecção por Espectrometria de Massas de Alta Resolução, do inglês <i>Ultra-High-Performance Liquid Chromatography with High-Resolution Mass Spectrometry Detection</i>
UV	Ultravioleta
VOCs	Compostos orgânicos voláteis
XPS	Espectroscopia fotoeletrônica de raios-X, do inglês <i>X-ray photoelectron spectroscopy</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>18</b>
2.1	POLÍMEROS CONDUTORES .....	18
2.2	POLIANILINA.....	19
2.3	APLICAÇÃO DA POLIANILINA EM TÉCNICAS DE PREPARO DE AMOSTRA.....	22
<b>2.3.1</b>	<b>Microextração em fase sólida de filme fino .....</b>	<b>29</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>32</b>
3.1	OBJETIVO GERAL .....	32
3.2	OBJETIVO ESPECÍFICO.....	32
<b>4</b>	<b>SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS POLIANILINAS .....</b>	<b>34</b>
4.1	MATERIAIS E MÉTODOS .....	34
<b>4.1.1</b>	<b>REAGENTES E MATERIAIS.....</b>	<b>34</b>
4.2	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL .....	34
<b>4.2.1</b>	<b>Síntese da PANi dopada com HCl.....</b>	<b>34</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Síntese da PANi dopada com ácido oxálico .....</b>	<b>35</b>
<b>4.2.3</b>	<b>Síntese da PANi-sílica dopada com HCl.....</b>	<b>35</b>
<b>4.2.4</b>	<b>Síntese da PANi-sílica dopada com ácido oxálico .....</b>	<b>36</b>
4.3	CARACTERIZAÇÕES.....	37
<b>4.3.1</b>	<b>Condutividade elétrica.....</b>	<b>37</b>
<b>4.3.2</b>	<b>Microscopia eletrônica de varredura.....</b>	<b>38</b>
<b>4.3.3</b>	<b>Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier .....</b>	<b>38</b>
<b>4.3.4</b>	<b>Espectrofotometria na região do ultravioleta-visível.....</b>	<b>38</b>
<b>4.3.5</b>	<b>Área superficial específica e distribuição de poros.....</b>	<b>38</b>
4.4	RESULTADOS EXPERIMENTAIS.....	39
<b>4.4.1</b>	<b>Condutividade elétrica.....</b>	<b>39</b>
<b>4.4.2</b>	<b>Microscopia eletrônica de varredura.....</b>	<b>40</b>
<b>4.4.3</b>	<b>Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier .....</b>	<b>44</b>
<b>4.4.4</b>	<b>Espectrofotometria na região do ultravioleta-visível.....</b>	<b>46</b>
<b>4.4.5</b>	<b>Área superficial específica e distribuição de poros.....</b>	<b>48</b>

<b>5</b>	<b>POLIANILINA-SÍLICA DOPADA COM ÁCIDO OXÁLICO COMO FASE EXTRATORA EM TF-SPME PARA DETERMINAÇÃO DE HÔRMONIOS EM URINA E DETECÇÃO POR HPLC-FLD .....</b>	<b>50</b>
5.1	INTRODUÇÃO .....	50
5.2	MATERIAIS E MÉTODOS .....	52
<b>5.2.1</b>	<b>Reagentes e Materiais .....</b>	<b>52</b>
<b>5.2.2</b>	<b>Preparação dos filmes finos .....</b>	<b>52</b>
<b>5.2.3</b>	<b>Amostras de urina.....</b>	<b>54</b>
<b>5.2.4</b>	<b>Instrumentação e condições cromatográficas .....</b>	<b>55</b>
<b>5.2.5</b>	<b>Otimização da metodologia.....</b>	<b>55</b>
5.2.5.1	<i>Solvente de dessorção.....</i>	55
5.2.5.2	<i>Tempo de dessorção.....</i>	56
5.2.5.3	<i>Tempo de extração e pH.....</i>	56
<b>5.2.6</b>	<b>Parâmetros analíticos de mérito.....</b>	<b>57</b>
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	58
<b>5.3.1</b>	<b>Seleção da PAni para fase extratora .....</b>	<b>58</b>
<b>5.3.2</b>	<b>Otimização do solvente de dessorção .....</b>	<b>61</b>
<b>5.3.3</b>	<b>Otimização do tempo de dessorção .....</b>	<b>63</b>
<b>5.3.4</b>	<b>Otimização do tempo de extração e pH da amostra .....</b>	<b>64</b>
<b>5.3.5</b>	<b>Parâmetros analíticos de mérito.....</b>	<b>67</b>
5.4	CONCLUSÕES PARCIAIS .....	75
<b>6</b>	<b>POLIANILINA-SÍLICA DOPADA COM ÁCIDO CLORÍDRICO COMO FASE EXTRATORA EM TF-SPME PARA DETERMINAÇÃO DE ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROIDAIIS EM AMOSTRAS DE ÁGUA E DETECÇÃO POR HPLC-DAD</b>	<b>77</b>
6.1	INTRODUÇÃO .....	77
6.2	MATERIAIS E MÉTODOS .....	79
<b>6.2.1</b>	<b>Reagentes e Materiais .....</b>	<b>79</b>
<b>6.2.2</b>	<b>Preparação dos filmes finos .....</b>	<b>79</b>
<b>6.2.3</b>	<b>Amostras de água.....</b>	<b>80</b>
<b>6.2.4</b>	<b>Instrumentação e condições Cromatográficas .....</b>	<b>80</b>
<b>6.2.5</b>	<b>Otimização da metodologia.....</b>	<b>80</b>
6.2.5.1	<i>Solvente de dessorção.....</i>	81
6.2.5.2	<i>Tempo de dessorção.....</i>	81

6.2.5.3	<i>pH</i> .....	81
6.2.5.4	<i>Tempo de extração e % de NaCl</i> .....	81
<b>6.2.6</b>	<b>Parâmetros analíticos de mérito</b> .....	<b>82</b>
6.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	83
<b>6.3.1</b>	<b>Seleção da PANi para fase extratora</b> .....	<b>83</b>
<b>6.3.2</b>	<b>Otimização do solvente de dessorção</b> .....	<b>86</b>
<b>6.3.3</b>	<b>Otimização do tempo de dessorção</b> .....	<b>88</b>
<b>6.3.4</b>	<b>Otimização do pH da amostra</b> .....	<b>89</b>
<b>6.3.5</b>	<b>Otimização do tempo de extração e % de NaCl</b> .....	<b>91</b>
<b>6.3.6</b>	<b>Parâmetros analíticos de mérito</b> .....	<b>93</b>
6.4	CONCLUSÕES PARCIAIS .....	99
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO FINAL E PERSPECTIVAS</b> .....	<b>100</b>
<b>APÊNDICE A</b>	.....	<b>114</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A busca por materiais alternativos e funcionais despertou o interesse e atraiu a atenção de diversos grupos de pesquisa para sua aplicação como fase extratora em técnicas de preparo de amostra. Alguns materiais disponíveis comercialmente, como por exemplo, sílica modificada com íon magnésio (FL-PR) e sílica modificada com grupo C18 (C18-E), apresentam algumas limitações, como aplicabilidade limitada e baixa seletividade. Desta forma, grandes esforços vêm sendo feitos e impulsionaram o estudo e desenvolvimento de novos materiais que fossem eficientes na determinação de diferentes classes de analitos, além de proporcionar um aumento na capacidade de sorção desses analitos na presença de interferentes (Płotka-Wasyłka *et al.*, 2016; Torabi *et al.*, 2024).

A execução de técnicas de preparo de amostra antecedendo análises ambientais, alimentícias, farmacêuticas e biológicas pode ser uma ferramenta útil para obtenção de resultados precisos e confiáveis. Essas técnicas desempenham o papel de pré-concentrar os analitos, eliminar interferentes e adequar a matriz ao instrumento analítico. Atualmente, técnicas que envolvem a microextração têm sido amplamente desenvolvidas. Baseadas na miniaturização e simplificação dos procedimentos experimentais, essas técnicas envolvem a utilização de menores volumes de amostra, solventes e fase extratora, resultando em uma redução significativa na geração de resíduos (Fumes *et al.*, 2015; Jalili; Barkhordari; Ghiasvand, 2020).

Diversos estudos publicados na literatura evidenciam que a utilização de polianilina (PAni) se destaca nesta área devido as suas características únicas. Primeiramente, não apenas pela facilidade de síntese, a qual pode ser implementada tanto em laboratórios de pesquisa como em indústrias, mas também pelo custo relativamente baixo do monômero de anilina, sendo economicamente viável a sua produção em larga escala, se necessário. Outro aspecto importante que merece ser destacado é o menor impacto ambiental associado à síntese, considerando que solventes menos tóxicos são utilizados. Ademais, as propriedades da PAni podem ser aprimoradas por meio de modificações estruturais e superficiais, as quais, podem aumentar a sua seletividade para determinados analitos em aplicações específicas (Nasar; Mashkoor, 2019; Sowa *et al.*, 2014, 2022).

A PANi pertence a classe dos polímeros condutores, os quais também são conhecidos como polímeros intrinsecamente condutores (PICs). Esses materiais são considerados fases extratoras eficientes em técnicas de preparo de amostra devido à sua funcionalidade de superfície, que pode influenciar nos diferentes tipos de interações envolvendo ligações hidrofóbicas e  $\pi - \pi$  que podem ocorrer com os analitos, bem como capacidade de troca iônica, que possibilita a sua aplicação para analitos ionizados, ressaltando assim, a sua versatilidade frente à dos materiais comerciais (Canpolat *et al.*, 2022; Chaves *et al.*, 2015; Raza *et al.*, 2021).

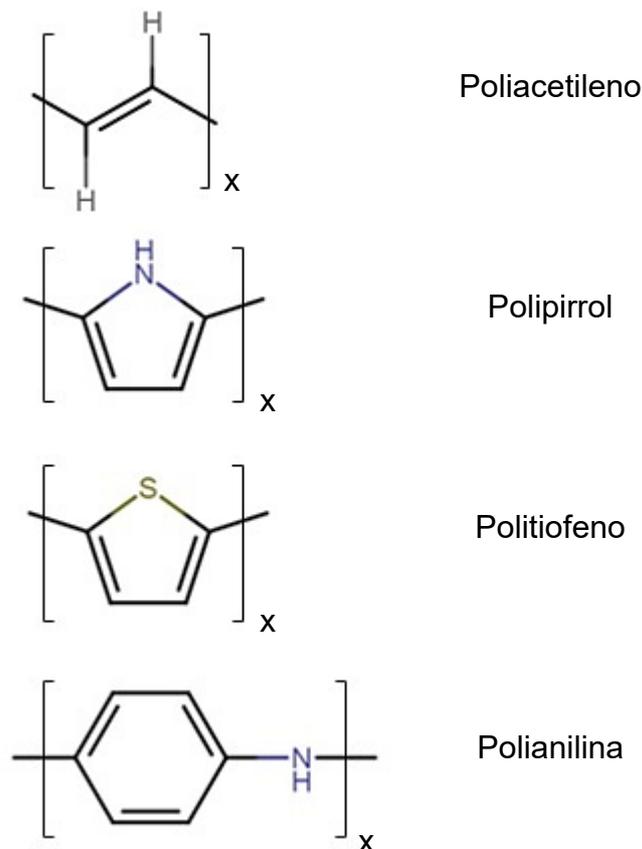
Diante deste contexto, este estudo tem como objetivo sintetizar e caracterizar diferentes PANis para serem utilizadas como fase extratora alternativa em uma técnica miniaturizada de preparo de amostra, a microextração em fase sólida de filme fino (TF-SPME). Para este propósito, a correlação entre a estrutura e propriedades das PANis sintetizadas será avaliada frente a eficiência de extração no desenvolvimento de duas metodologias analíticas inéditas e distintas. Dentre as quais, a primeira envolve a determinação de três estrogênios esteroides (17- $\beta$ -estradiol, 17- $\alpha$ -etinilestradiol e estrona) em matrizes biológicas (amostras de urina) e a segunda metodologia aborda a determinação de anti-inflamatórios não esteroidais (aspirina, naproxeno, indometacina, ibuprofeno e ácido mefenâmico) em matrizes ambientais (amostras de água coletadas de diferentes locais).

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 POLÍMEROS CONDUTORES

Segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), os polímeros condutores, ou mais precisamente polímeros intrinsecamente condutores (PICs) são polímeros constituídos de macromoléculas com sequências totalmente conjugadas de ligações duplas ao longo das cadeias (IUPAC, 2014). O Poliacetileno, polipirrol, politiofeno e a polianilina são alguns exemplos destes polímeros intrinsecamente condutores e as suas respectivas unidades de repetição estão representadas na Figura 1.

Figura 1 – Exemplos de PICs, onde x representa o número de unidades de repetição.



Fonte: Adaptado de K e Rout (2021).

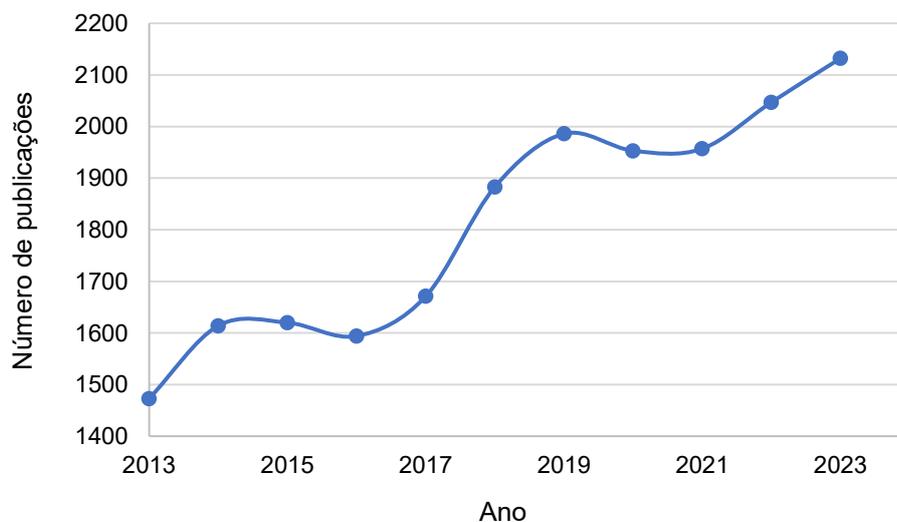
A partir da estrutura conjugada do polímero, que é de natureza isolante ou semicondutora, pode ocorrer a deslocalização eletrônica através de ressonância, ou

seja, os elétrons podem ser livremente deslocados ou transferidos ao longo da cadeia polimérica. Este fenômeno acaba atribuindo a estes materiais um certo valor de condutividade (tipicamente na faixa  $10^{-9}$  a  $10^{-6}$  S  $\text{cm}^{-1}$ ), que pode ser alterado pela dopagem, que consiste na adição ou remoção de elétrons por meio de modificações estruturais (Jadoun *et al.*, 2021; Taghizadeh *et al.*, 2020). Dentre os principais PICs existentes, uma atenção especial é dada à polianilina (PAni).

## 2.2 POLIANILINA

De acordo com a literatura, a polianilina (PAni) ou anilina preta como ficou conhecida, foi preparada pela primeira vez no ano de 1862, pelo professor de química do Hospital Universitário de Londres, Henry Letheby, sendo um dos primeiros PICs comercializados. Com o passar dos anos, inúmeras pesquisas relataram o seu uso em diferentes aplicações, que vão desde baterias recarregáveis até sensores químicos e biosensores, e esse número de dados só tem aumentado, conforme conclui-se a partir da Figura 2, que ilustra o número total de publicações relacionadas a PAni, no período dos últimos dez anos (Letheby, 1862; Scopus, 2023; Shoaie *et al.*, 2019).

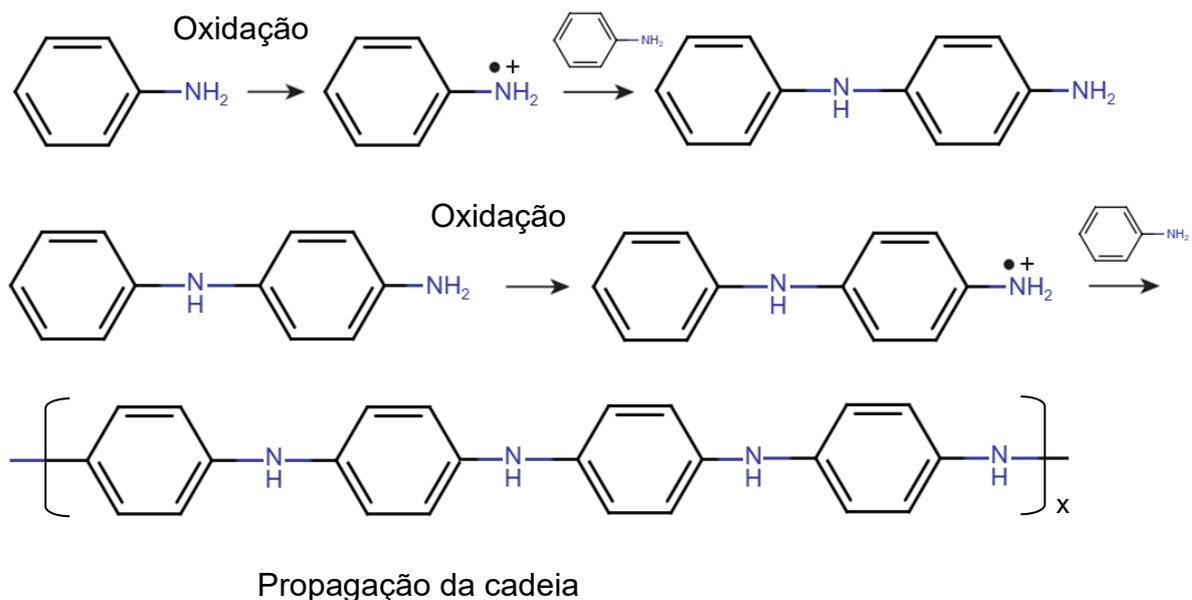
Figura 2 – Ilustração do número total de publicações relacionadas a PAni nos últimos dez anos.



Fonte: Base de dados Scopus (2023).

A PANi é comumente sintetizada via oxidação química ou eletroquímica em meio aquoso ácido. Em ambos os casos, a oxidação da anilina gera um radical cátion (anilínio) e este radical que dá início a polimerização pela propagação da cadeia, de acordo com o mecanismo de síntese mostrado na Figura 3. Na polimerização química, a oxidação do monômero ocorre através do uso de agentes oxidantes, como por exemplo, persulfato de amônio ou cloreto férrico. Enquanto na polimerização eletroquímica, o monômero é oxidado na superfície de um eletrodo de trabalho por meio de métodos potencioestáticos, galvanostáticos ou por meio de voltametria cíclica (Beygisangchin *et al.*, 2021; Idumah, 2021; Li, 2015; Qazi; Rai; Boccaccini, 2014).

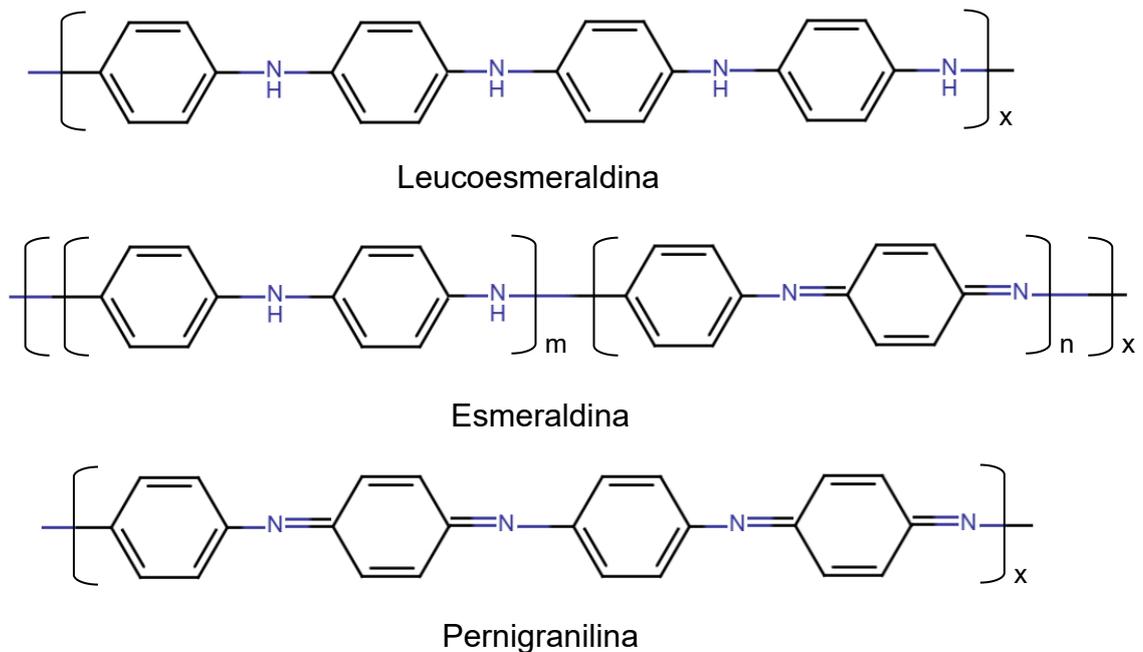
Figura 3 – Mecanismo de síntese da PANi. Onde: x - representa o número de unidades de repetição.



Fonte: Adaptado de Bhandari (2018).

A PANi pode existir em diferentes estados de oxidação, conforme é possível observar na Figura 4. A forma leucoesmeraldina (coloração amarela), consiste no estado totalmente reduzido em que os átomos de hidrogênio estão ligados a átomos de nitrogênio, enquanto a pernigranilina (coloração violeta) é a forma totalmente oxidada, onde nenhum átomo de hidrogênio está ligado a átomos de nitrogênio e por fim, a esmeraldina, que consiste no estado parcialmente oxidado (Bhandari, 2018).

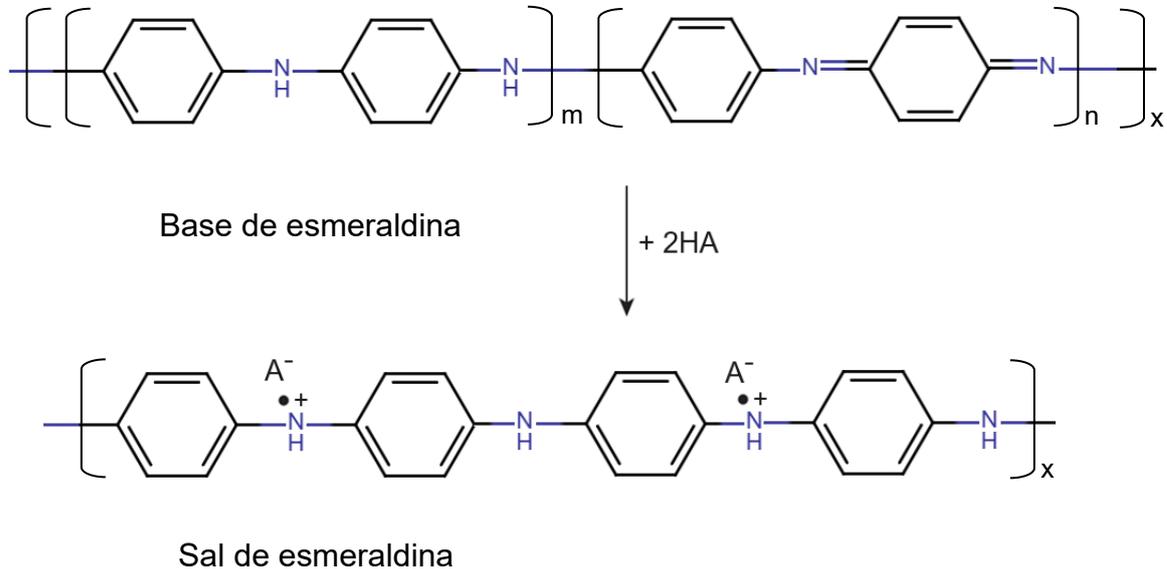
Figura 4 – Estrutura química da PANi em diferentes estados de oxidação. Onde: x - representa o número de unidades de repetição; m - representa a proporção da estrutura constituída por anéis benzoídes e n - representa a proporção da estrutura constituída por quinóides.



Fonte: Adaptado de Bhandari (2018).

A esmeraldina ou base esmeraldina (coloração azul) difere substancialmente em relação as outras duas formas, pois uma maior condutividade elétrica pode ser obtida após o processo de dopagem por protonação (Figura 5), em que não ocorre alteração do número de elétrons associados à cadeia polimérica, resultando no sal de esmeraldina (coloração verde). A proporção de anéis benzoídes e quinóides, representada por m:n e mostrada na Figura 4, deve ser de 1:0, para leucoesmeraldina, 0:1 para pernigranilina e 1:1 para base de esmeraldina (K; Rout, 2021; Li, 2015).

Figura 5 – Representação da dopagem por protonação da PANi na forma base de esmeraldina resultando no sal de esmeraldina. Onde: HA - representa o dopante ácido.



Fonte: Adaptado de Beygisangchin *et al.* (2021) e Bhandari (2018).

A PANi se destaca em relação aos outros PICs, pela fácil preparação a partir da anilina, sendo este um monômero de menor valor agregado se comparado com outros monômeros como por exemplo o pirrol e o 3,4-etilenodioxitiofeno. Além disso, a PANi apresenta boa estabilidade e capacidade de sorção, o que favorece o seu uso em técnicas de preparo de amostra (Momina; Ahmad, 2021; Mota *et al.*, 2019).

### 2.3 APLICAÇÃO DA POLIANILINA EM TÉCNICAS DE PREPARO DE AMOSTRA

A PANi pode ser considerada uma fase extratora alternativa em técnicas de preparo de amostra e a sua aplicação já vem sendo abordada na literatura pois ela tem-se mostrado muitas vezes mais eficiente que fases extratoras comerciais. Este fato pode ser relacionado principalmente pelos diferentes tipos interações (eletrostáticas, hidrofóbicas,  $\pi$ - $\pi$ , ligação de hidrogênio) de seus grupos multifuncionais com os analitos e pela possibilidade de adição de substituintes ou dopantes, que melhoram as suas propriedades e possibilitam a determinação de analitos ionizados provenientes de matrizes complexas (Chaves *et al.*, 2015; Naveen; Gurudatt; Shim, 2017; Sowa *et al.*, 2022).

Geralmente matrizes complexas não podem ser analisadas de forma direta, logo uma etapa de pré-tratamento, também conhecida como preparo de amostra, se faz necessária. Além de eliminar possíveis interferentes presentes na matriz, esta etapa tem como finalidade pré-concentrar os analitos em níveis adequados para posterior detecção e quantificação, considerando que estes, geralmente, são encontrados em baixas concentrações (Kanu, 2021; Li *et al.*, 2021; Moldoveanu; David, 2015).

Várias técnicas de preparo de amostra já foram e ainda vem sendo desenvolvidas nos últimos anos, entretanto vale ressaltar que as mais conhecidas são a extração líquido-líquido (LLE) e a extração em fase sólida (SPE), chamadas de técnicas clássicas de preparo de amostra. Apesar de serem utilizadas e aceitas internacionalmente, muitas vezes, envolvem o consumo elevado de solventes orgânicos, acarretando a geração excessiva de resíduos, além de demandarem muito tempo associado ao procedimento e manipulação extensa, ocasionando assim uma possível perda dos analitos (Alampanos; Samanidou, 2021; Boyacı *et al.*, 2015). Com o objetivo de superar a maior parte destas limitações e desvantagens, desde o início dos anos 90, estão sendo introduzidas técnicas miniaturizadas. Estas técnicas visam reduzir o tempo empregado no procedimento, a geração de resíduos e os custos envolvidos, ser ambientalmente amigáveis e reutilizáveis, melhorar o desempenho do método analítico e até mesmo possibilitar a automatização da análise (Dimpe; Nomngongo, 2016; Jalili *et al.*, 2021; Niu *et al.*, 2018; Soares da Silva Burato *et al.*, 2020).

A viabilidade na utilização de fases extratoras baseadas em PANi já vem sendo comprovada por outros pesquisadores, como observado na Tabela 1. Estes trabalhos encontram-se disponíveis na literatura e descrevem o uso de técnicas miniaturizadas de preparo de amostra para determinação de diferentes classes de compostos, provenientes de matrizes ambientais, alimentícias, farmacêuticas e biológicas. Técnicas como a microextração em fase sólida (SPME), a extração em ponteira dispersiva (DPX), a extração sortiva em barra de agitação (SBSE) e a microextração em fase sólida de filme fino (TF-SPME) são relatadas.

A SPME foi utilizada no maior número de trabalhos encontrados. Como por exemplo, PANi dopada com ácido perfluorooctanosulfônico para determinação de clorofenóis em água (He *et al.*, 2014); PANi para determinação de bisfenol A em água e bebidas (Liu *et al.*, 2014); PANi/polipirrol para determinação de parabenos em

água, leite e suco de frutas (Asiabi *et al.*, 2015); nanotubos de carbono/PAni para determinação de antioxidantes em plantas e mel (Ghiasvand *et al.*, 2015); grafeno/PAni para determinação de aldeídos em condensado de ar exalado (Li; Xu, 2015); estruturas orgânicas metálicas de PAni para determinação de clorobenzenos em água (Bagheri *et al.*, 2016); poliéster/PAni a fim de avaliar a adulteração de suco de limão através da determinação de compostos orgânicos voláteis (VOCs) (Alizadeh; Pirsá; Faraji, 2017); nanotubos de titânio/PAni para determinação de filtros ultravioleta (UV) em água (Ma *et al.*, 2017); nanotubos de carbono/PAni para determinação de benzaldeído em formulações farmacêuticas injetáveis (Masoumi *et al.*, 2017); grafeno sulfonado/PAni para determinação de nicotina em cabelo e tabaco (Ghiasvand *et al.*, 2018); sílica/PAni para determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno (BTEX) em solo (Dalvand; Ghiasvand, 2019); polioxomolibdato/PAni para determinação de antidepressivos em urina e sangue (Amoli; Yamini; Darmani, 2020); fibras de carbono funcionalizadas com PAni/dióxido de titânio para determinação de ésteres de ftalato em água (Sun *et al.*, 2021); PAni para determinação de organoarsênicos e organofosforados em solo (Dziedzic *et al.*, 2022) e sumaúma revestida com PAni para determinação de pesticidas em água (Wang *et al.*, 2024).

A DPX, a SBSE e a TF-SPME podem ser consideradas técnicas alternativas à SPME, mas apenas alguns estudos foram encontrados abordando o uso de fases extratoras baseadas em PAni nestas técnicas (Tabela 1).

Na DPX, foram encontrados apenas dois trabalhos, os quais utilizaram polianilina/copolímero estireno divinilbenzeno para determinação de antidepressivos em amostras de plasma (Chaves *et al.*, 2015) e de dexametasona em fluido sinovial (Soares *et al.*, 2019), enquanto que na SBSE, foram encontrados quatro trabalhos, dentre os quais, foram utilizados nanotubos de carbono e PAni/hidroxil para determinação de fenóis, anti-inflamatórios não esteroidais e organoclorados em água e sedimentos (Hu *et al.*, 2015); polipirrol/PAni para determinação de HPAs (Mollahosseini *et al.*, 2016) e  $\alpha$ -ciclodextrina/PAni para determinação de organoclorados (Lei *et al.*, 2016), ambos em amostras de água e polidimetilsiloxano/PAni para determinação de hormônios em água e alimentos de origem animal (Fan *et al.*, 2020). Até o momento, apenas um único trabalho foi encontrado na literatura relatando o uso náilon 6/PAni como de fase extratora na

técnica de TF-SPME para determinação de clorobenzenos em água (Bagheri; Aghakhani, 2012).

Tabela 1 – Trabalhos envolvendo fases extratoras baseadas em PANi em técnicas miniaturizadas de preparo de amostra.

(continua)

<b>Fase extratora</b>	<b>Técnica</b>	<b>Amostra</b>	<b>Analito(s)</b>	<b>Instrumentação</b>	<b>Ref.</b>
PAni dopada com ácido perfluorooctanosulfônico	SPME	Água	Clorofenóis	HPLC-DAD	He <i>et al.</i> (2014)
PAni	SPME	Água e bebidas	Bisfenol A	HPLC-UV	Liu <i>et al.</i> (2014)
PAni/polipirrol	SPME	Água, leite e suco de frutas	Parabenos	HPLC-UV	Asiabi <i>et al.</i> (2015)
Nanotubos de carbono/PAni	SPME	Plantas e mel	Timol e carvacrol (antioxidantes)	HPLC-UV	Ghiasvand <i>et al.</i> (2015)
Grafeno/PAni	SPME	Condensado de ar exalado	Aldeídos	HPLC-UV	Li e Xu (2015)
Estrutura orgânica metálica de PANi	SPME	Água	Clorobenzenos	GC-MS	Bagheri <i>et al.</i> (2016)
Poliéster/PAni	SPME	Suco de limão	VOCs	GC-FID	Alizadeh, Pirsá e Faraji (2017)
Nanotubos de titânio/PAni	SPME	Água	Filtros UV	HPLC-UV	Ma <i>et al.</i> (2017)

Tabela 1 – Trabalhos envolvendo fases extratoras baseadas em PANi em técnicas miniaturizadas de preparo de amostra.

(continua)

<b>Fase extratora</b>	<b>Técnica</b>	<b>Amostra</b>	<b>Analito(s)</b>	<b>Instrumentação</b>	<b>Ref.</b>
Nanotubos de carbono/PAni	SPME	Formulação farmacêutica injetável	Benzaldeído	GC-FID	Masoumi <i>et al.</i> (2017)
Grafeno sulfonado/PAni	SPME	Cabelo e tabaco	Nicotina	GC-FID	Ghiasvand <i>et al.</i> (2018)
Sílica/PAni	SPME	Solo	HPAs e BTEX	GC-FID	Dalvand e Ghiasvand (2019)
Polioxomolibdato/PAni	SPME	Urina e sangue	Antidepressivos	HPLC-UV	Amoli, Yamini e Darmani (2020)
Fibras de carbono funcionalizadas com PANi/dióxido de titânio	SPME	Água	Ésteres de ftalato	HPLC-DAD	Sun <i>et al.</i> (2021)
PAni	SPME	Solo	Organoarsênicos e organofosforados	GC-MS/MS	Dziedzic <i>et al.</i> (2022)
Sumaúma revestida com PANi	SPME	Água	Pesticidas	GC-MS	Wang <i>et al.</i> (2024)
Náilon 6/PAni	TF-SPME	Água	Clorobenzenos	GC-MS	Bagheri e Aghakhani (2012)

Tabela 1 – Trabalhos envolvendo fases extratoras baseadas em PANi em técnicas miniaturizadas de preparo de amostra.

(conclusão)

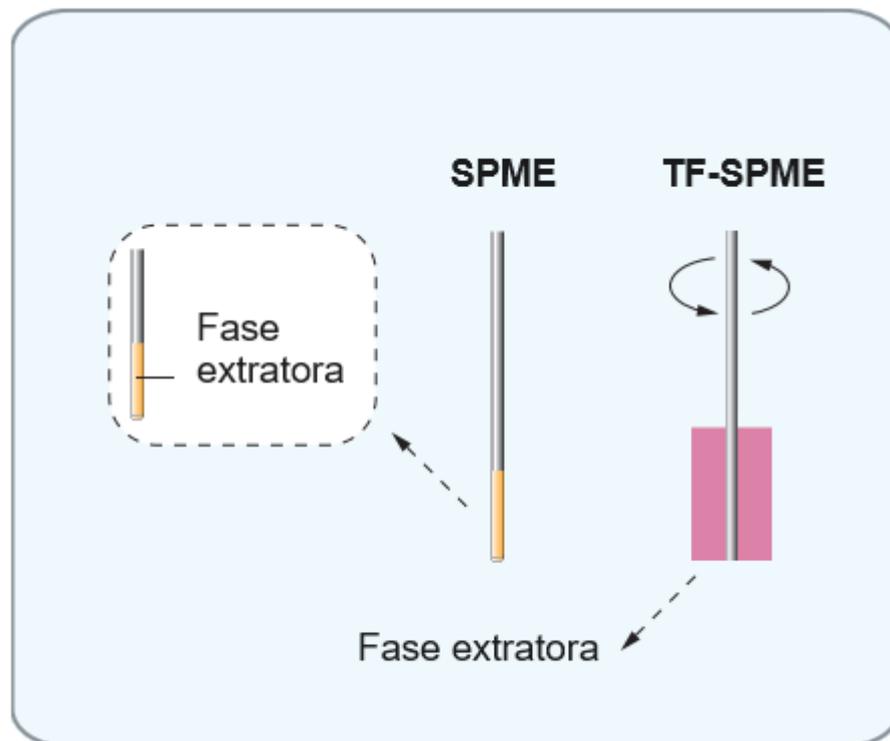
Fase extratora	Técnica	Amostra	Analito(s)	Instrumentação	Ref.
Polianilina/copolímero estireno divinilbenzeno	DPX	Plasma	Antidepressivos	HPLC-FLD	Chaves <i>et al.</i> (2015)
Polianilina/copolímero estireno divinilbenzeno	DPX	Fluído sinovial	Dexametasona	HPLC-UV	Soares <i>et al.</i> (2019)
Nanotubos de carbono e PANi/hidroxil	SBSE	Água e sedimentos	Fenóis, anti-inflamatórios não esteroidais e organoclorados	HPLC-UV	Hu <i>et al.</i> (2015)
Polipirrol/PANi	SBSE	Água	HPAs	GC-FID	Mollahosseini <i>et al.</i> (2016)
$\alpha$ -ciclodextrina/PANi	SBSE	Água	Organoclorados	HPLC-UV	Lei <i>et al.</i> (2016)
Polidimetilsiloxano/PANi	SBSE	Água e alimentos de origem animal	Hormônios	HPLC-UV	Fan <i>et al.</i> (2020)

DPX: extração em ponteira dispersiva; SPME: microextração em fase sólida; TF-SPME: microextração em fase sólida de filme fino; SBSE: extração sortiva em barra de agitação; HPLC-DAD: cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos; HPLC-FLD: cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência; HPLC-UV: cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta; GC-MS: cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas; GC-FID: cromatografia gasosa com detecção por ionização de chama; GC-MS/MS: cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas em tandem.

### 2.3.1 Microextração em fase sólida de filme fino

A microextração em fase sólida de filme fino (TF-SPME) foi desenvolvida por Bruheim, Liu e Pawliszyn no ano de 2003 e surgiu como uma geometria alternativa à SPME, em que um filme fino é usado como fase extratora. Nessa configuração, um ganho na eficiência de extração acaba acontecendo pois o volume de fase extratora é maior, enquanto a espessura permanece constante ou ainda mais fina se comparado à fibra cilíndrica de SPME, conforme mostrado na Figura 6 (Bruheim; Liu; Pawliszyn, 2003; Cárdenas-Soracá *et al.*, 2020; Jiang; Pawliszyn, 2012).

Figura 6 – Comparação da geometria cilíndrica da fibra de SPME com a geometria de filme fino da TF-SPME.

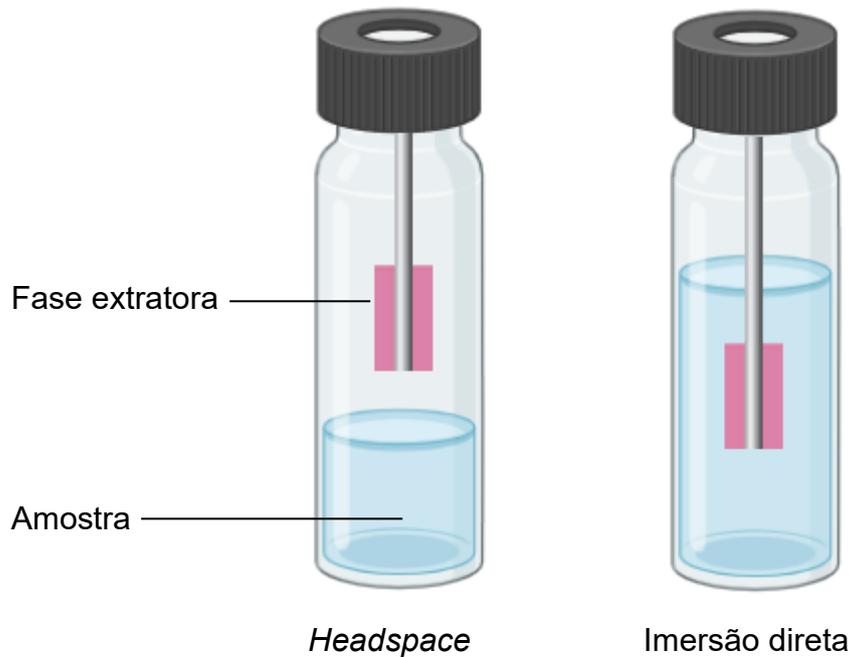


Fonte: Adaptado de Kataoka (2015).

Tanto na SPME como na TF-SPME, a extração dos analitos pode ocorrer de duas formas, por imersão direta (Murtada *et al.*, 2022), onde a fase extratora fica em contato direto com a amostra ou por *headspace* (Marín-San Román *et al.*, 2022), onde a fase extratora é inserida no espaço vazio acima da amostra, conforme mostrado na Figura 7. Em ambas as formas, a extração irá ocorrer por meio de equilíbrios de distribuição do analito na amostra e na fase extratora, e a sua

eficiência depende de alguns fatores experimentais que devem ser otimizados (Carasek; Morés; Merib, 2018; Soares da Silva Burato *et al.*, 2020).

Figura 7 – Formas de extração na TF-SPME.



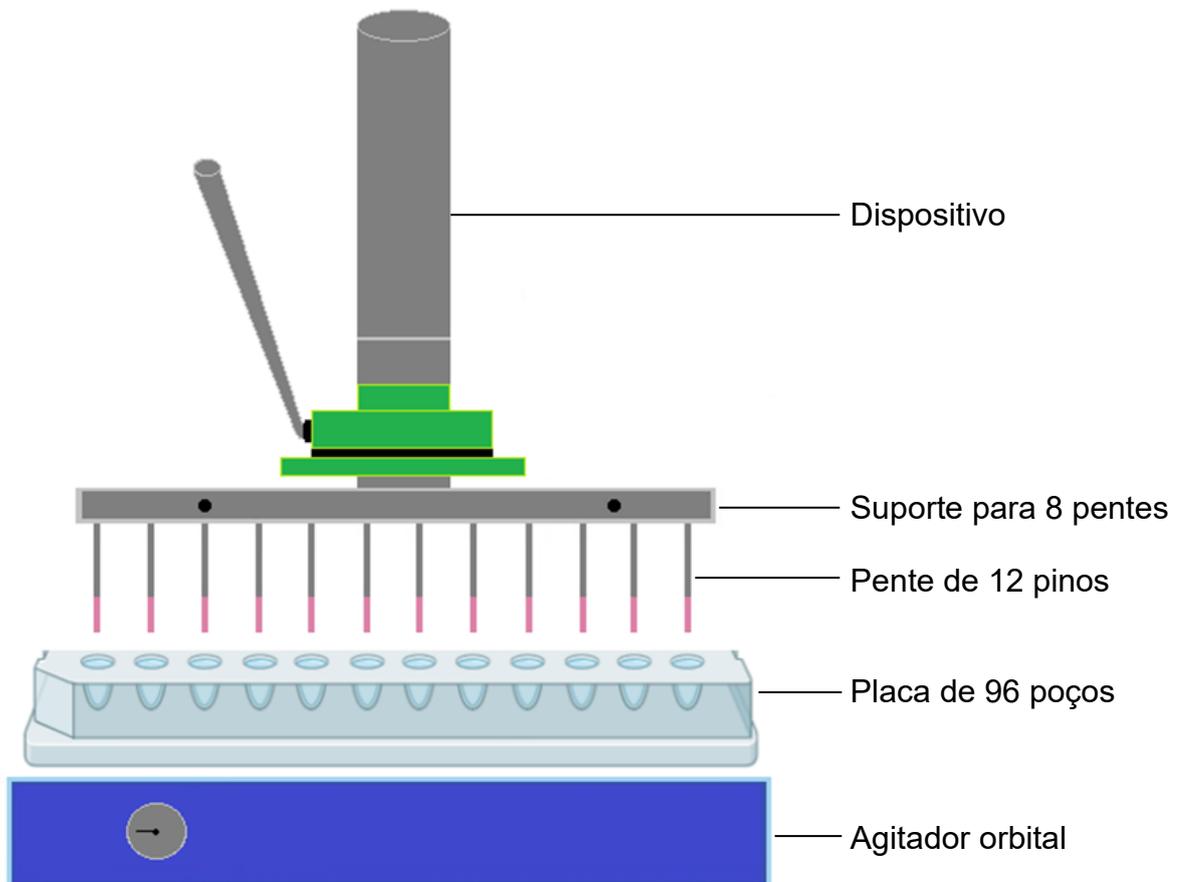
Fonte: Autoria própria (2024).

Dentre os fatores que geralmente são otimizados na TF-SPME, se pode citar o solvente de dessorção, que é otimizado inicialmente para garantir que o maior número de analitos seja dessorvido da fase extratora e este solvente deve ser capaz de romper a interação fase extratora-analito. O tempo de dessorção e tempo de extração também merecem ser estudados, pois devem ser suficientes para atingir o equilíbrio de distribuição do analito no solvente de dessorção e na fase extratora; e do analito na amostra e na fase extratora, respectivamente. O pH da amostra pode influenciar na forma em que os analitos se encontram, ou seja, dependendo do pKa, estes podem estar em sua forma neutra ou ionizada, e isso irá afetar o tipo de interação com a fase extratora. A força iônica também pode ser otimizada, uma vez que a adição de sal (geralmente é utilizado cloreto de sódio, NaCl) na amostra pode acarretar o efeito *salting out*, no qual, a solubilidade dos analitos diminuiu e a sua migração para fase extratora é favorecida (Pereira *et al.*, 2014; Xu; Ouyang, 2018).

Outra vantagem da TF-SPME em relação à SPME, é que o custo envolvido na produção de filmes finos é muito mais vantajoso se comparado à compra de

fibras comerciais de SPME. Além disso, essa técnica pode ser associada ao sistema de placas de 96 poços de amostragem, permitindo realizar extrações simultâneas de até 96 amostras (Figura 8), ao invés de uma única extração por vez, resultando assim em um aumento significativo na frequência analítica do método (Boyacı *et al.*, 2016; Piri-Moghadam; Alam; Pawliszyn, 2017).

Figura 8 – Representação do dispositivo que engloba a técnica de TF-SPME associada ao sistema de placas de 96 poços de amostragem.



Fonte: Autoria própria (2024).

Dessa forma, o desenvolvimento de metodologias de alta frequência analítica envolvendo o uso do sistema de placas de 96 poços de amostragem juntamente a técnica de TF-SPME vêm demonstrando diversas vantagens e vale a pena ser explorado.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Explorar e ampliar o uso de diferentes PANis como fase extratora na técnica de TF-SPME acoplada ao sistema de placas de 96 poços de amostragem para determinação de hormônios em amostras de urina e de anti-inflamatórios não esteroidais em amostras de água envolvendo o desenvolvimento de metodologias analíticas distintas.

#### 3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Sintetizar as PANis, PANi dopada com HCl, PANi dopada com ácido oxálico, PANi-sílica dopada com HCl e PANi-sílica dopada com ácido oxálico e caracterizá-las por medidas de condutividade elétrica, microscopia eletrônica de varredura, espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier, espectrofotometria na região do ultravioleta-visível e por fim, determinar a área superficial específica e distribuição de poros;
- Preparar filmes finos adesivos através da fixação das PANis previamente sintetizadas para empregá-las na técnica de TF-SPME;
- Avaliar a separação cromatográfica dos hormônios e dos anti-inflamatórios não esteroidais por HPLC-FLD e HPLC-DAD, respectivamente;
- Investigar a eficiência de extração das PANis para determinação de hormônios em urina e anti-inflamatórios não esteroidais em amostras aquosas, além de otimizar as condições de dessorção e extração através de otimizações univariadas e multivariadas, incluindo solvente e tempo de dessorção, tempo de extração e pH da amostra (hormônios) e solvente e tempo de dessorção, pH da amostra, tempo de extração e % de NaCl (anti-inflamatórios não esteroidais);
- Determinar os parâmetros analíticos de mérito das metodologias desenvolvidas, incluindo faixa linear de trabalho, equação da reta, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), coeficiente de correlação linear (r), exatidão (através de ensaios de recuperação relativa), precisões intradia e interdia (através do desvio padrão relativo (RSD));

- Comparar as metodologias desenvolvidas outras metodologias reportadas na literatura para determinação de hormônios em urina e anti-inflamatórios não esteroidais em amostras de água, respectivamente;
- Avaliar a aplicabilidade das metodologias desenvolvidas em amostras reais.

## **4 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS POLIANILINAS**

### **4.1 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **4.1.1 REAGENTES E MATERIAIS**

Neste trabalho, o monômero de anilina foi adquirido da Neon Comercial (Suzano, SP, Brasil) e este foi previamente destilado sob vácuo e armazenado a 4 °C. Todos os demais reagentes foram utilizados conforme recebidos. O persulfato de amônio foi adquirido da Neon Comercial (Suzano, SP, Brasil), ácido clorídrico (HCl) da Química Moderna (Barueri, SP, Brasil), ácido oxálico e suspensão de sílica coloidal Ludox® TM-40 da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA) foram utilizados para as sínteses.

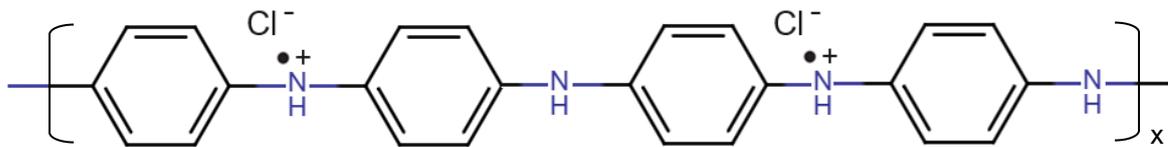
### **4.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL**

As sínteses foram realizadas através da oxidação química da anilina em meio aquoso ácido, pH aproximadamente igual a 3, a fim de obter o sal de esmeraldina (Boeva; Sergeyev, 2014) na presença de persulfato de amônio como agente oxidante, com algumas mudanças no meio reacional conforme descrito a seguir.

#### **4.2.1 Síntese da PAni dopada com HCl**

O procedimento experimental utilizado para o preparo da PAni dopada com HCl (Figura 9) teve como base o trabalho de Chiang e MacDiarmid (1986) com algumas modificações. Primeiramente, 11,52 g de persulfato de amônio e 20 mL de anilina foram diluídos separadamente em 200 mL e 300 mL de HCl 1 mol L<sup>-1</sup>, respectivamente. A solução de persulfato de amônio foi adicionada à solução de anilina e a mistura resultante foi agitada por 1 hora a 5 °C. O precipitado obtido na reação passou por filtração e lavagem com solução de HCl 1 mol L<sup>-1</sup>. Finalmente, a PAni dopada com HCl foi seca sob vácuo dinâmico por 48 h a 60 °C.

Figura 9 – Estrutura química da PANi dopada com HCl.

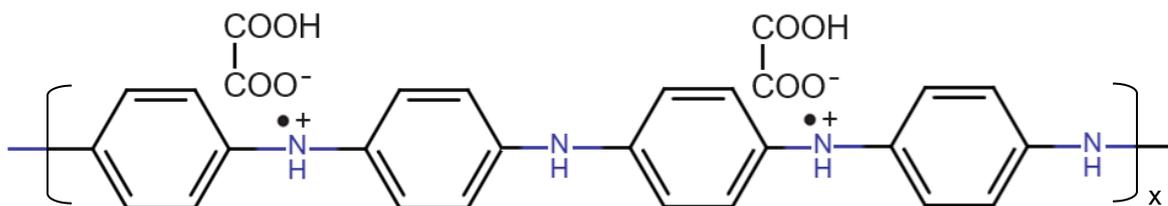


Fonte: Autoria própria (2023).

#### 4.2.2 Síntese da PANi dopada com ácido oxálico

Nesta síntese, a PANi dopada com ácido oxálico (Figura 10) foi preparada empregando o procedimento experimental descrito por Fernando e Vedhi (2022), sendo que algumas condições foram adaptadas. Foram preparados 500 mL de uma solução de ácido oxálico  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e 250 mL dessa solução foram adicionados em 2,5 mL de anilina. Em seguida, 6,5 g de persulfato de amônio foram adicionados à solução previamente preparada que foi mantida sob agitação magnética por 10 horas à temperatura ambiente ( $21 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Por fim, a PANi dopada com ácido oxálico foi obtida, filtrada e lavada com solução de ácido oxálico  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e seca sob vácuo dinâmico por 48 horas a  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Figura 10 – Estrutura química da PANi dopada com ácido oxálico.



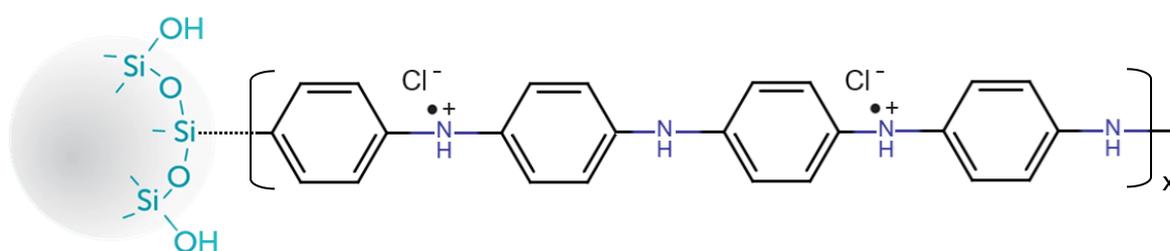
Fonte: Autoria própria (2023).

#### 4.2.3 Síntese da PANi-sílica dopada com HCl

Para obtenção da PANi-sílica dopada com HCl (Figura 11), o procedimento experimental utilizado teve como base o trabalho de Roosz *et al.* (2017), adaptando algumas condições. Em um béquer, foram adicionados 2,5 mL de anilina juntamente

com 200 mL de água destilada na presença de 10 mL da suspensão de sílica coloidal Ludox® TM-40 que atuou como fonte de sílica e uma solução de HCl 1 mol L<sup>-1</sup> foi usada para o ajuste de pH (pH = 3). A solução foi mantida sob agitação magnética por 1 hora à temperatura ambiente (21 ± 3 °C) e, após esse período, 6,5 g de persulfato de amônio, dissolvidos em 25 mL de água destilada, foram adicionados à reação, que foi mantida sob agitação magnética por 12 horas à temperatura ambiente. O produto da reação foi filtrado, lavado sucessivamente com água destilada e seco sob vácuo dinâmico por 48 horas a 60 °C.

Figura 11 – Estrutura química da PAni-sílica dopada com HCl.

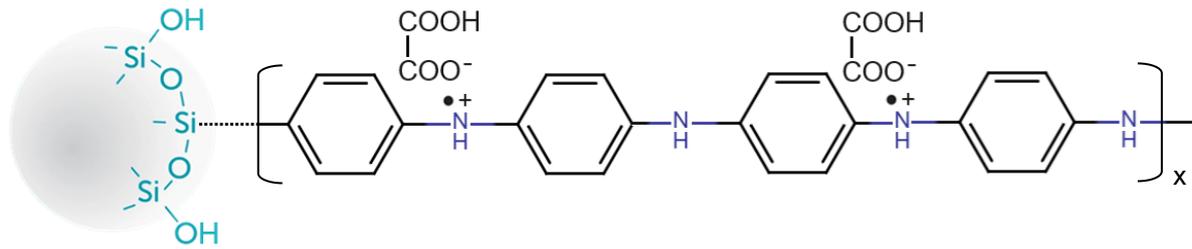


Fonte: Autoria própria (2023).

#### 4.2.4 Síntese da PAni-sílica dopada com ácido oxálico

Nesta síntese, a PAni-sílica dopada com ácido oxálico (Figura 12) foi obtida através do procedimento experimental descrito por Kaur, Saini e Kaur (2019), modificando algumas condições. Utilizando 2,5 mL de anilina juntamente com 250 mL da solução de ácido oxálico 0,1 mol L<sup>-1</sup> previamente preparada e 10 mL da suspensão de sílica coloidal Ludox® TM-40 como fonte de sílica. A solução foi mantida sob agitação magnética por 1 hora à temperatura ambiente (21 ± 3 °C) e, após esse período, 6,5 g de persulfato de amônio foram adicionados à reação, que foi mantida sob agitação magnética por 12 horas à temperatura ambiente. Por fim, o produto da reação foi filtrado, lavado sucessivamente com solução de ácido oxálico 0,1 mol L<sup>-1</sup> e seco sob vácuo dinâmico por 48 horas a 60 °C.

Figura 12 – Estrutura química da PANi-sílica dopada com ácido oxálico.



Fonte: Autoria própria (2023).

### 4.3 CARACTERIZAÇÕES

#### 4.3.1 Condutividade elétrica

As PANis foram caracterizadas por condutividade elétrica à temperatura ambiente ( $21 \pm 3$  °C) pelo método padrão da sonda de quatro pontas em um eletrômetro Keithley, modelo 6517A, equipado com uma fonte de corrente contínua, modelo 6220, localicado no Grupo de Pesquisa em Polímeros e Manufatura Aditiva (GPMA), da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Para isso, pastilhas de 13 mm de diâmetro foram preparadas a partir da compressão do pó de cada PANi, a uma pressão de aproximadamente 10 MPa por um período de 5 minutos em uma prensa hidráulica manual Bovenau, modelo P15 ST. Um micrômetro Digimees foi utilizado para verificar a espessura média (em triplicata) das pastilhas, que foi de  $0,662 \pm 0,089$  mm. A condutividade elétrica foi calculada utilizando a Equação 1 (Chinnappan *et al.*, 2018), onde as medidas de diferença de potencial (V) foram feitas em triplicata.

$$\sigma = \frac{i}{V.d} \times \frac{\ln 2}{\pi} \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

$\sigma$ : condutividade elétrica ( $\text{S.cm}^{-1}$ );

$i$ : corrente elétrica (A);

$V$ : a diferença de potencial (V);

$d$ : espessura (cm) e

$\ln 2/\pi$ : o fator de correção.

#### **4.3.2 Microscopia eletrônica de varredura**

A morfologia de cada uma das PANis foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura, utilizando o microscópio Tescan, modelo Vega 3, localizado no Laboratório de Materiais (LabMat) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Para realização desta análise, o pó de cada PANi foi fixado em suporte metálico com fita carbono dupla face e revestido com ouro. Uma tensão de aceleração de 15 kV foi utilizada juntamente com ampliações de até 20.000x.

#### **4.3.3 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier**

As análises de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier foram feitas no espectrômetro Bruker, modelo ALPHA, localizado na Central de Análises do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), utilizando-se 16 varreduras com resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$  foi utilizada na faixa de  $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ . Os espectros foram obtidos através de pastilhas de KBr preparadas com o pó de cada PANi.

#### **4.3.4 Espectrofotometria na região do ultravioleta-visível**

As amostras de PANi foram analisadas na forma de pó com o auxílio de uma esfera integradora em um espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV-2600, sendo realizada uma varredura na faixa de 200-800 nm. Essa análise foi feita no Laboratório de Espectroscopia (ESPEC), localizado na Universidade Estadual de Londrina (UEL).

#### **4.3.5 Área superficial específica e distribuição de poros**

As medidas de área superficial específica e tamanho de poros foram feitas através do analisador de sorção de nitrogênio QuantaChrome Instruments, modelo NOVA2200e, localizado na Central de Análises do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). As PANis foram desgaseificadas por 15 horas a  $120\text{ }^{\circ}\text{C}$  antes da análise. Os resultados foram

obtidos pelos métodos de Brunauer, Emmet e Teller (BET) e Barrett, Joyner e Halenda (BJH) por meio do *software* do equipamento.

#### 4.4 RESULTADOS EXPERIMENTAIS

##### 4.4.1 Condutividade elétrica

Inicialmente, foram realizadas as medidas de condutividade elétrica das PANis com a finalidade de verificar qual seria o efeito causado pelas alterações no meio reacional, ou seja, pela dopagem com HCl ou com ácido oxálico e pela presença ou não de sílica, os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 2.

Tabela 2 – Condutividade elétrica obtida para as PANis sintetizadas.

PANis	Condutividade elétrica (S.cm <sup>-1</sup> )
PAni dopada com HCl	1,35 x 10 <sup>+1</sup>
PAni dopada com ácido oxálico	1,85 x 10 <sup>-1</sup>
PAni-sílica dopada com HCl	1,17 x 10 <sup>-2</sup>
PAni-sílica dopada com ácido oxálico	3,14 x 10 <sup>-4</sup>

Fonte: Autoria própria (2023).

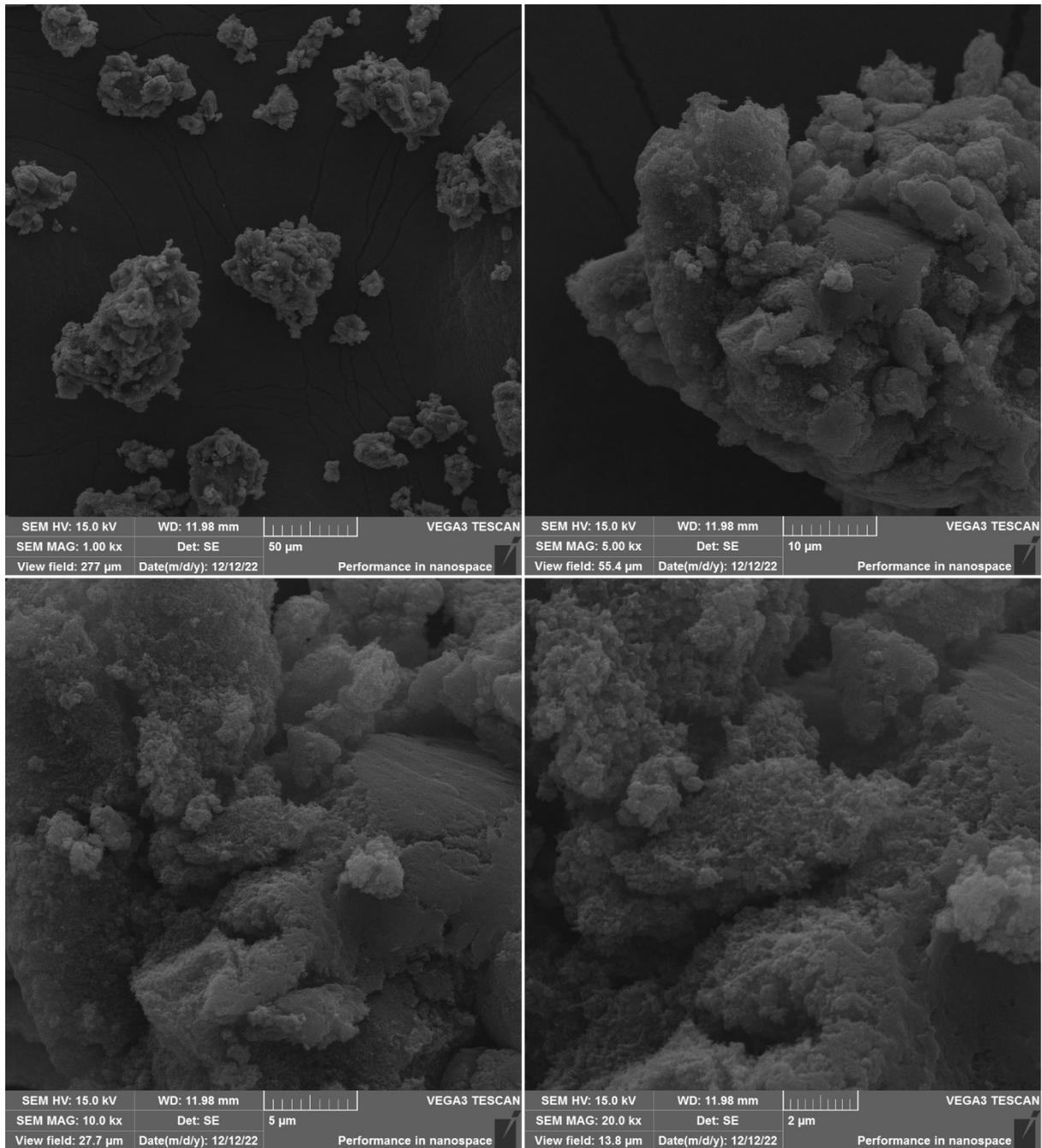
Observa-se na Tabela 2 que ocorreu uma mudança de duas ordens de magnitude na condutividade das PANis quando utilizado ácido oxálico se comparado ao valor de condutividade quando utilizado HCl, de 1,85 x 10<sup>-1</sup> S.cm<sup>-1</sup> (PAni dopada com ácido oxálico) para 1,35 x 10<sup>+1</sup> S.cm<sup>-1</sup> (PAni dopada com HCl), respectivamente. Esse comportamento ocorre devido a diferença de tamanho e mobilidade dos contra-íons. O ânion oxalato é maior que o ânion cloreto, resultando em uma diminuição na mobilidade de carga ao longo da cadeia polimérica, por impedimento estérico, e conseqüentemente, reduzindo a condutividade elétrica (Rehman *et al.*, 2022; Zimmermann *et al.*, 2020). A presença de sílica também provoca uma redução na condutividade, de 1,17 x 10<sup>-2</sup> S.cm<sup>-1</sup> (PAni-sílica dopada com HCl) para 3,14 x 10<sup>-4</sup> S.cm<sup>-1</sup> (PAni-sílica dopada com ácido oxálico), o que já era esperado, considerando que a sílica não é de natureza condutora (Ramlan *et al.*, 2017). Comumente a condutividade de PICs não dopados está na faixa de 10<sup>-9</sup> a 10<sup>-6</sup> S.cm<sup>-1</sup>, sendo assim,

pode-se concluir que as PANis sintetizadas apresentam certo grau de dopagem, ou seja, se encontram na forma de sal de esmeraldina e que a condutividade elétrica é diretamente dependente do meio reacional (Li, 2015).

#### **4.4.2 Microscopia eletrônica de varredura**

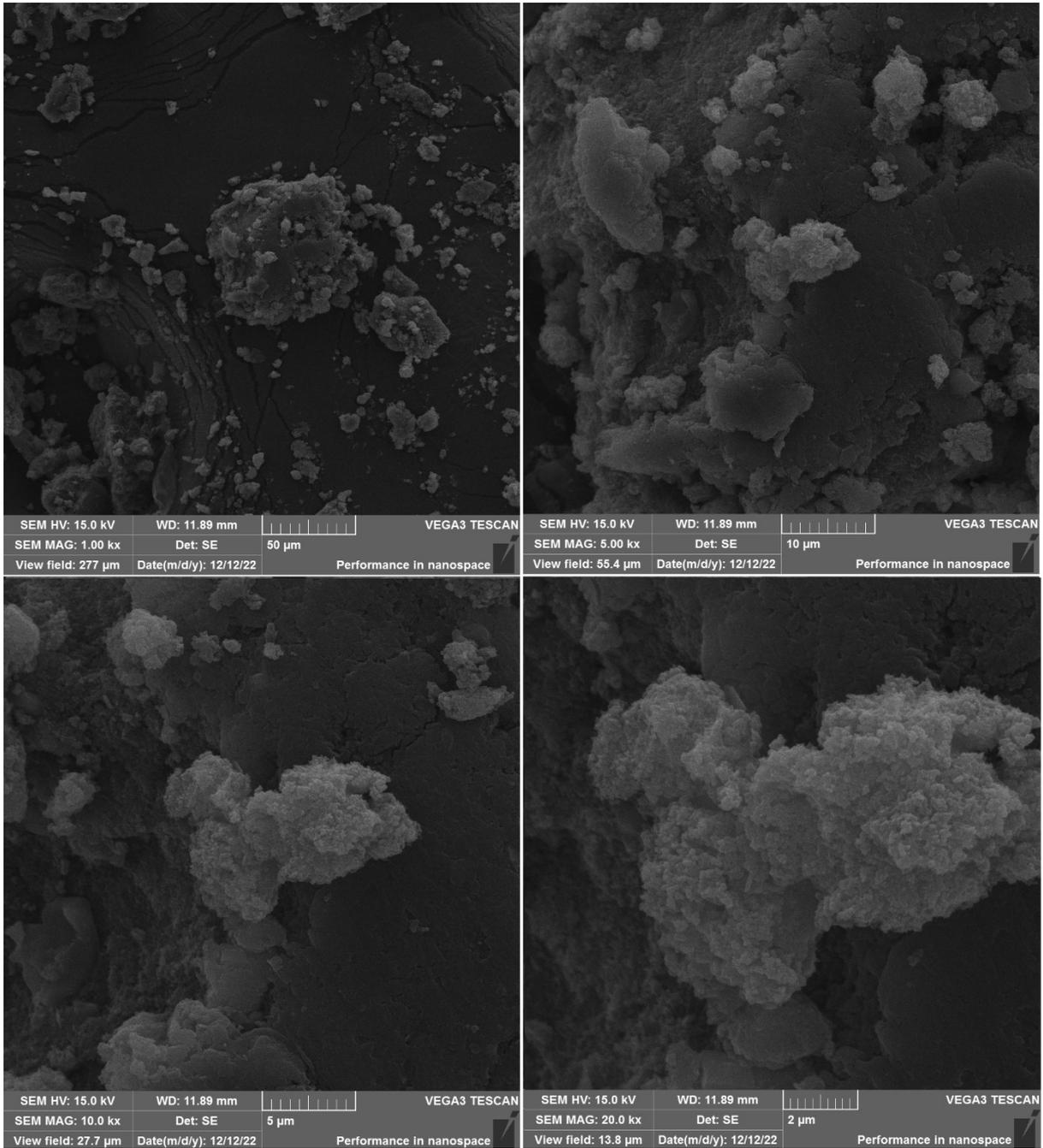
Na sequência, a microscopia eletrônica de varredura foi feita com a finalidade de caracterizar a morfologia da superfície de cada uma das PANis e os resultados podem ser observados nas Figura 13 à Figura 16. A PANi dopada com HCl (Figura 13) e a PANi dopada com ácido oxálico (Figura 14) apresentaram morfologias semelhantes, assim como a PANi-sílica dopada com HCl (Figura 15) e a PANi-sílica dopada com ácido oxálico (Figura 16), sugerindo que a mudança do dopante (HCl ou ácido oxálico) no meio reacional, não provoca uma alteração visível na morfologia. A morfologia encontrada foi do tipo granular com a presença de alguns aglomerados de diferentes tamanhos. Estes aglomerados possivelmente foram formados durante a filtração realizada após a síntese (Araujo *et al.*, 2018). As micrografias da PANi-sílica dopada com HCl e da PANi-sílica dopada com ácido oxálico apresentaram partículas esféricas bem definidas, principalmente em ampliações de 20.000x, o que pode ser justificado pela presença de sílica no meio reacional. Os resultados obtidos são semelhantes e estão de acordo com o que foi relatado por Fernando e Vedhi (2022), Kaur, Saini e Kaur (2019) e Roos et al. (2017).

Figura 13 – Micrografias obtidas para PANi dopada com HCl, com aplicações de 1.000x até 20.000x.



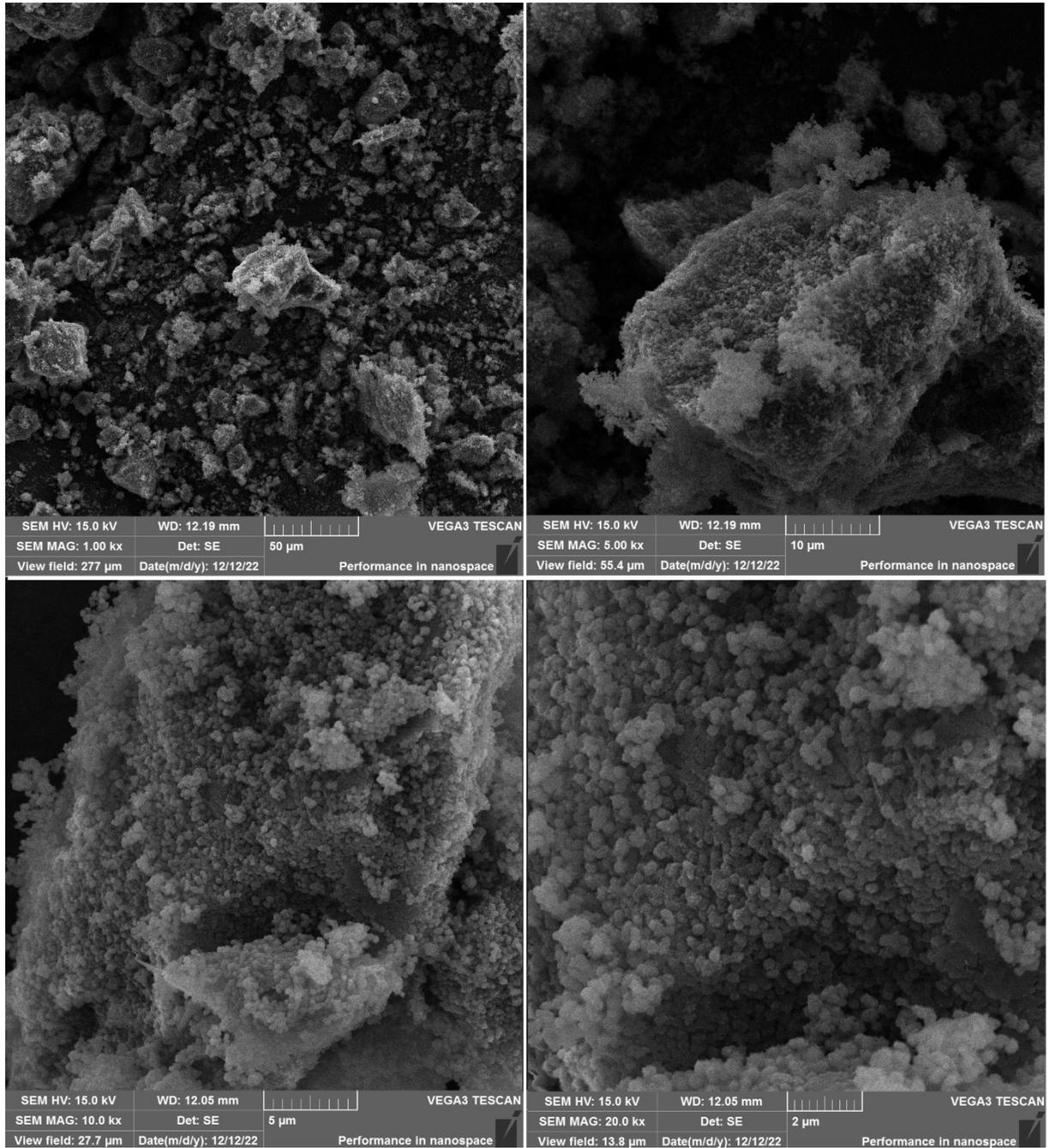
Fonte: Aatoria própria (2023).

Figura 14 – Micrografias obtidas para PAni dopada com ácido oxálico, com ampliações de 1.000x até 20.000x.



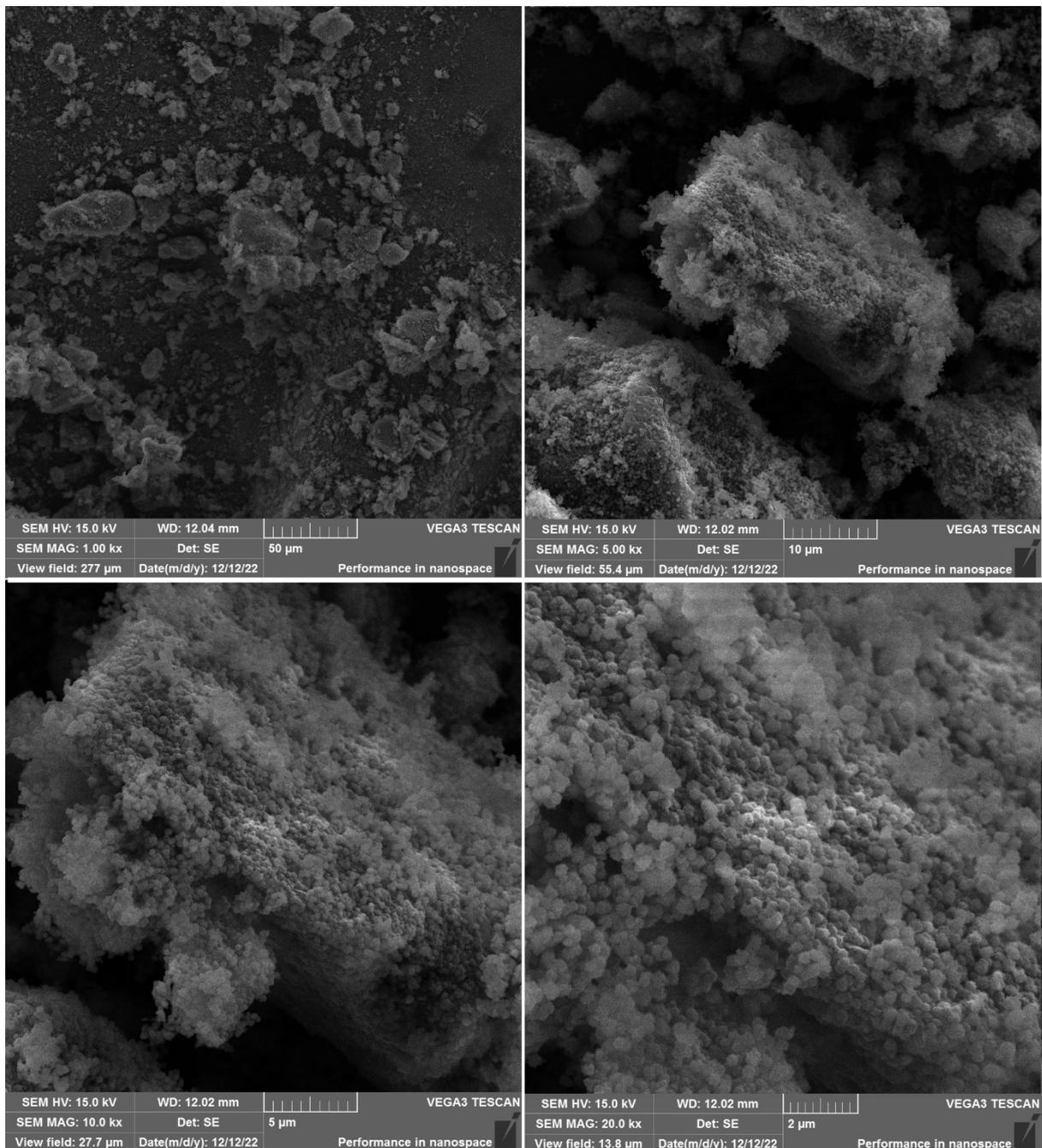
Fonte: Autoria própria (2023).

Figura 15 – Micrografias obtidas para PAni-sílica dopada com HCl, com ampliações de 1.000x até 20.000x.



Fonte: Autoria própria (2023).

Figura 16 – Micrografias obtidas para PAni-sílica dopada com ácido oxálico, com ampliações de 1.000x até 20.000x.



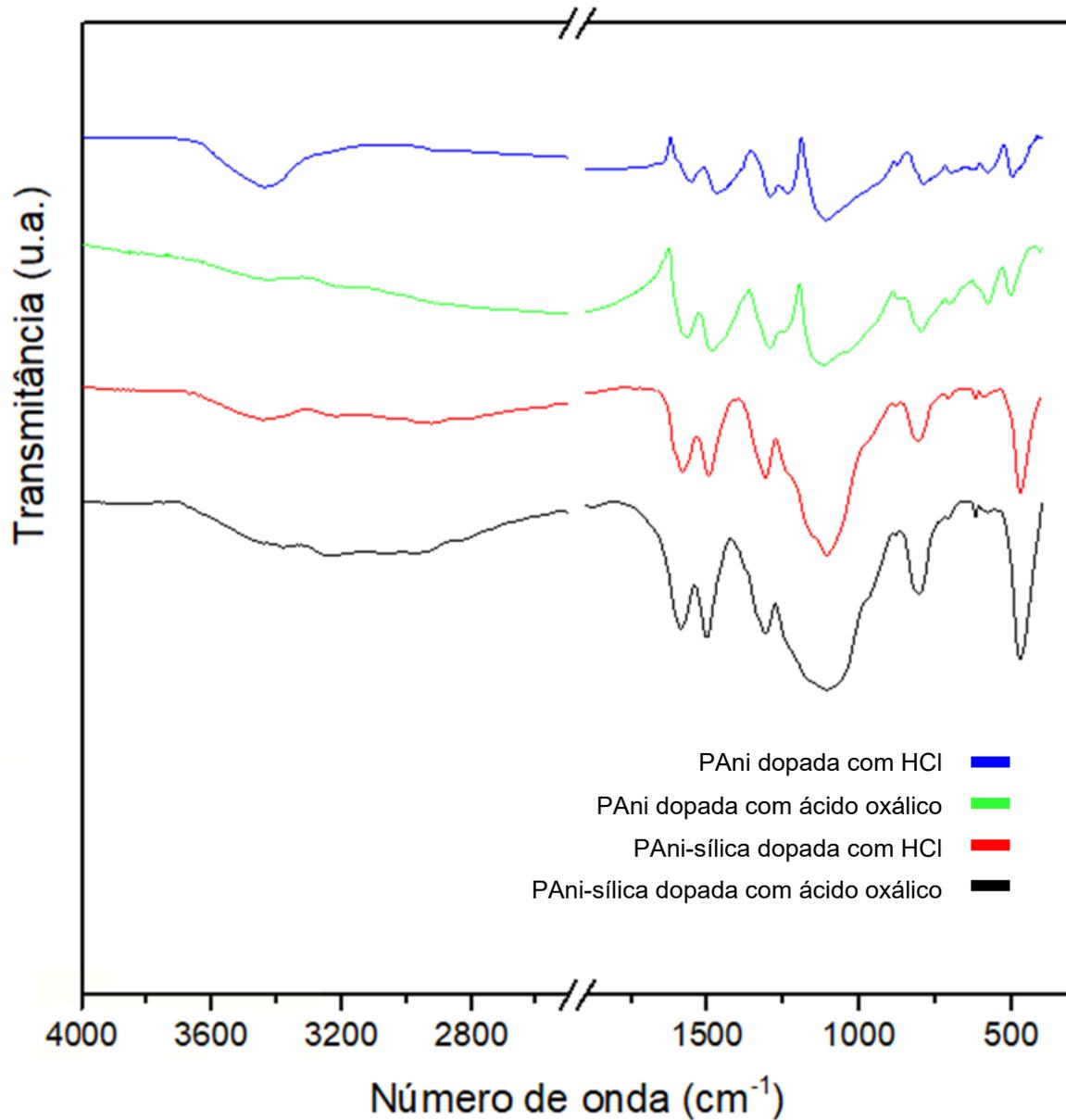
Fonte: Autoria própria (2023).

#### 4.4.3 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

Foram realizadas análises por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier a fim de identificar as bandas de absorção características

dos grupos funcionais presentes nas PANis e os seus respectivos espectros são mostrados na Figura 17. O espectro da PANi dopada com HCl apresenta bandas em torno de 1462 e 1561  $\text{cm}^{-1}$ , que são atribuídas às vibrações de estiramento do anel benzóide e do anel quinóide, respectivamente. Estas bandas também são observadas nos demais espectros em torno de 1484 e 1569  $\text{cm}^{-1}$  para PANi dopada com ácido oxálico, 1496 e 1581  $\text{cm}^{-1}$  para PANi-sílica dopada com HCl e 1502 e 1588  $\text{cm}^{-1}$  para PANi-sílica dopada com ácido oxálico. A banda observada entre 1298-1310  $\text{cm}^{-1}$  ocorre devido ao estiramento C-N da amina aromática secundária (Ćirić-Marjanović *et al.*, 2009). A banda que aparece entre 1000 e 1200  $\text{cm}^{-1}$  pode ser atribuída a vibração de estiramento referente a grupamentos de imina protonada ou C-N-H, mas também contém um ombro que pode ser atribuído a ligação C-O do ácido oxálico, que apresenta uma banda característica em torno de 1097  $\text{cm}^{-1}$ , no caso da PANi dopada com ácido oxálico e da PANi-sílica dopada com ácido oxálico ou ligações de siloxano (Si-O-Si, vibrações assimétricas) para PANi-sílica dopada com HCl e PANi-sílica dopada com ácido oxálico. A presença de sílica também pode ser confirmada pelas bandas de estiramento O-Si-O em 468  $\text{cm}^{-1}$  e bandas de vibração simétrica em torno de 803  $\text{cm}^{-1}$  e 810  $\text{cm}^{-1}$  nos espectros da PANi-sílica dopada com HCl e PANi-sílica dopada com ácido oxálico, respectivamente. As bandas aqui citadas são características da PANi na forma de sal de esmeraldina, o que converge com as caracterizações realizadas anteriormente. Além disso, um pequeno deslocamento das bandas é observado para maiores números de onda, o que está de acordo com o que foi relatado em outros estudos na literatura (Fernando; Vedhi, 2022; Kaur; Saini; Kaur, 2019; Roosz *et al.*, 2017).

Figura 17 – Espectros de infravermelho das PANis.



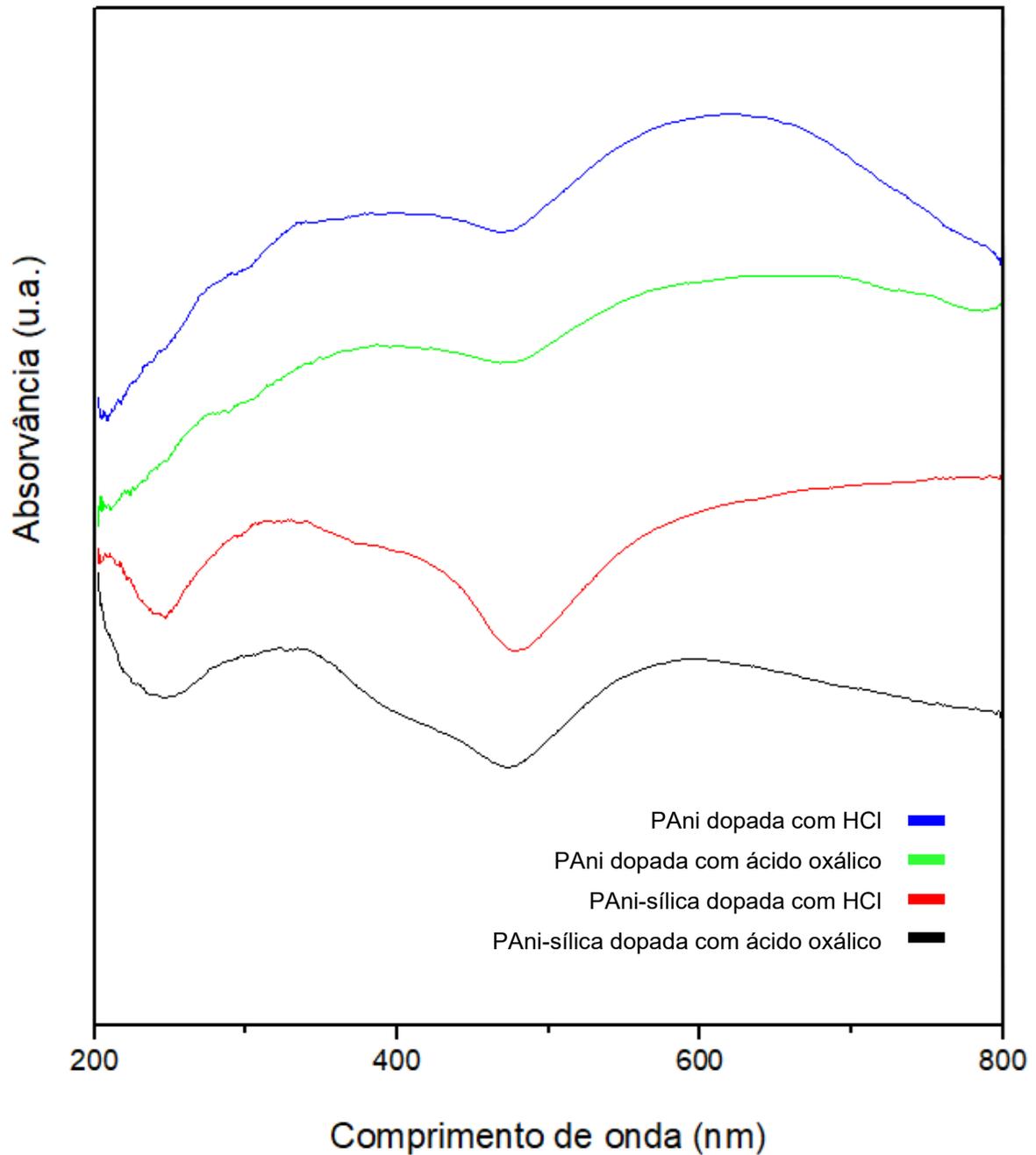
Fonte: Autoria própria (2023).

#### 4.4.4 Espectrofotometria na região do ultravioleta-visível

A espectrofotometria na região do ultravioleta-visível foi feita com a finalidade de verificar possíveis alterações nas bandas de absorção que pudessem evidenciar o grau de dopagem das PANis e os seus respectivos espectros estão apresentados na Figura 18. Normalmente, três bandas características são reportadas para a PAni, dependendo do estado de oxidação. De acordo com a literatura, as duas bandas de absorção na região de 330-430 nm, são referentes às

transições  $\pi$ - $\pi^*$  do anel em sua forma benzóide e a banda entre 680-750 nm é referente a transições intramoleculares entre os anéis quinóides e benzóides (Bednarczyk *et al.*, 2021; Bhandari, 2018; Ramlan *et al.*, 2017). Neste caso, as duas primeiras bandas acabaram se unindo e formando uma única banda. Além disso, um deslocamento para menores comprimentos de onda (deslocamento hipsocrômico) foi observado o que pode indicar que a imina não está completamente protonada e isso pode ser verificado comparando os espectros da PANi dopada com HCl e PANi dopada com ácido oxálico (na faixa de 360 nm e 617 nm), em relação à PANi-sílica dopada com HCl e PANi-sílica dopada com ácido oxálico (na faixa de 322 nm e 590 nm). Aparentemente a presença de sílica influencia para um menor grau de protonação (dopagem), que pode ser justificado, uma vez que a presença dos grupos hidroxila (-OH) presentes na sílica podem acabar competindo com as interações ácido-imina. Estes resultados são semelhantes com os resultados encontrados na literatura (Bednarczyk *et al.*, 2021; Nepomuceno *et al.*, 2021; Rehman *et al.*, 2022; Remya Devi, 2021).

Figura 18 – Espectros na região do ultravioleta-visível das PANis.



Fonte: Autoria própria (2023).

#### 4.4.5 Área superficial específica e distribuição de poros

As medidas de área superficial específica e distribuição de poros presentes nas PANis foram realizadas e os resultados estão apresentados na Tabela 3. As PANis apresentaram medidas semelhantes de área superficial, variando de 30,75  $\text{m}^2\text{g}^{-1}$  para PAni dopada com HCl, 31,40  $\text{m}^2\text{g}^{-1}$  para PAni dopada com ácido oxálico,

34,54 m<sup>2</sup>g<sup>-1</sup> para PAni-sílica dopada com HCl e 34,03 m<sup>2</sup>g<sup>-1</sup> para PAni-sílica dopada com ácido oxálico. Os diâmetros médios de poro variaram de 32,63 nm para PAni dopada com HCl, 42,94 nm para PAni dopada com ácido oxálico, 20,45 nm para PAni-sílica dopada com HCl e 21,20 nm para PAni-sílica dopada com ácido oxálico. A relação inversa entre área superficial específica e diâmetro médio de poro acaba resultando em uma maior disponibilidade de sítios de ligação, o que posteriormente pode ser vantajoso e favorecer na interação da PAni com os analitos em técnicas de microextração (Duhan; Kaur, 2020; Lal Meena; Kumar Saini; Kumar Surela, 2023). Os resultados obtidos nesta caracterização estão próximos dos resultados encontrados em outros trabalhos na literatura (Budi *et al.*, 2017; Dlamini *et al.*, 2021).

Tabela 3 – Área superficial específica, volume total de poros e diâmetro médio de poro das PAnis sintetizadas.

<b>PAnis</b>	<b>Área superficial específica (m<sup>2</sup>g<sup>-1</sup>)</b>	<b>Volume total de poros (cm<sup>3</sup>g<sup>-1</sup>)</b>	<b>Diâmetro médio de poro (nm)</b>
PAni dopada com HCl	30,75	0,2509	32,63
PAni dopada com ácido oxálico	31,40	0,3371	42,94
PAni-sílica dopada com HCl	34,54	0,1766	20,45
PAni-sílica dopada com ácido oxálico	34,03	0,1804	21,20

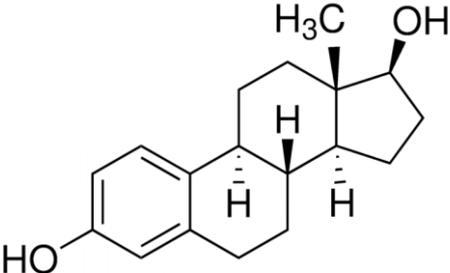
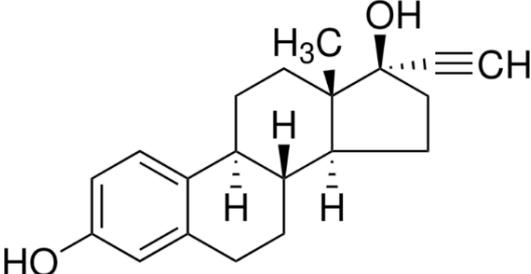
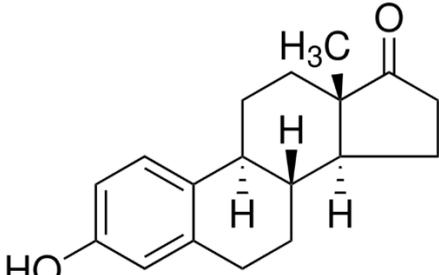
Fonte: A autoria própria (2023).

## 5 POLIANILINA-SÍLICA DOPADA COM ÁCIDO OXÁLICO COMO FASE EXTRATORA EM TF-SPME PARA DETERMINAÇÃO DE HÔRMONIOS EM URINA E DETECÇÃO POR HPLC-FLD

### 5.1 INTRODUÇÃO

Hormônios ou estrogênios esteroides podem ser classificados como compostos naturais ou endógenos, como é o caso do 17- $\beta$ -estradiol (E2) e da estrona (E1), e sintéticos ou exógenos, como o 17- $\alpha$ -etinilestradiol (EE2) (Merib *et al.*, 2018). A estrutura química e algumas das propriedades físico-químicas destes compostos podem ser encontradas na Tabela 4.

Tabela 4 – Estrutura química e propriedades dos hormônios.

Analito	Estrutura Química	log Kow	pKa	Ref.
E2		3,94	10,6	Adeel <i>et al.</i> , 2017
EE2		3,67	10,4	Adeel <i>et al.</i> , 2017
E1		3,43	10,3	Adeel <i>et al.</i> , 2017

Fonte: Autoria própria (2023).

Responsáveis pelas características sexuais dos seres humanos, esses compostos atuam no desenvolvimento dos órgãos reprodutivos, nas funções cognitivas e cardiovasculares. No caso de indivíduos de sexo feminino, esses hormônios são empregados para regular e tratar anomalias envolvendo ciclos menstruais, além disso, são amplamente utilizados na formulação de contraceptivos orais e em suplementação hormonal (Adeel *et al.*, 2017; Carmo; Merib; Carasek, 2019; Merib *et al.*, 2018).

Uma vez que esses hormônios são excretados principalmente através da urina, a sua determinação nessa amostra auxilia no monitoramento da saúde da mulher, ademais, alterações na concentração hormonal vem sendo relacionadas com cânceres de mama, endométrio e ovário, além de ser considerada uma ferramenta útil no diagnóstico pré-natal (Ma; Yates, 2018; Smy; Straseski, 2018).

Amostras biológicas, como é o caso da urina, são provenientes de matrizes complexas, uma vez que apresentam em sua composição proteínas, lipídios, entre outros componentes, que podem ser considerados interferentes, pois dificultam na determinação dos analitos (hormônios). Logo, conforme mencionado anteriormente, é necessário pré-concentrar os analitos, que muitas vezes estão presentes em baixas concentrações nessas matrizes e eliminar a maioria desses interferentes através de uma técnica de preparo de amostra que anteceda a análise instrumental (Grecco; de Souza; Queiroz, 2021; Niu *et al.*, 2018).

Inúmeras metodologias analíticas baseadas no uso de cromatografia líquida ou gasosa já foram reportadas na literatura para análise de urina com propósito de quantificar hormônios (Amorim; Andrade, 2017; Carmo; Merib; Carasek, 2019; de Oliveira *et al.*, 2019; Dmitrieva *et al.*, 2020, 2022; Gao *et al.*, 2018; Liao *et al.*, 2016; Lopes *et al.*, 2022b; Mafra *et al.*, 2018; Merib *et al.*, 2018; Robles *et al.*, 2017; Will *et al.*, 2020). Entretanto, conforme observado na Tabela 1 – Trabalhos envolvendo fases extratoras baseadas em PANi em técnicas miniaturizadas de preparo de amostra. Tabela 1, não existem estudos relatando o uso de PANi como fase extratora em técnicas miniaturizadas de preparo de amostra para determinação de hormônios em amostras de urina.

Desta forma, esta seção aborda o desenvolvimento de uma nova metodologia visando avaliar a aplicabilidade de diferentes PANis como fase extratora na determinação de E2, EE2 e E1 em urina utilizando a técnica de TF-SPME, associada ao sistema placas de 96 poços de amostragem semiautomatizado,

empregando cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência (HPLC-FLD). Esse trabalho foi publicado na revista *Journal of Separation Science* (Turazzi *et al.*, 2023).

## 5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.2.1 Reagentes e Materiais

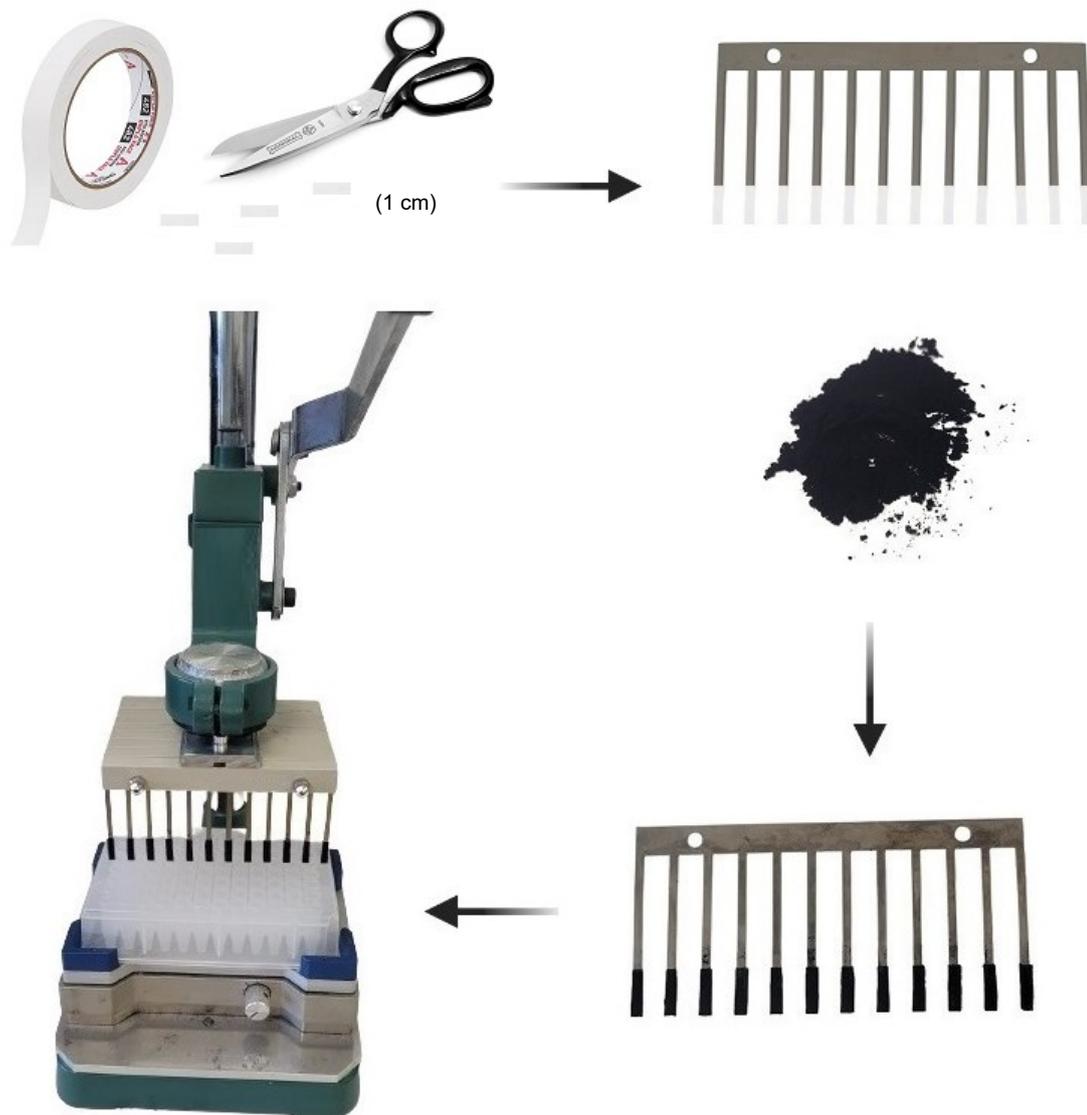
Os padrões analíticos com pureza  $\geq 98\%$ , incluindo 17- $\beta$ -estradiol (E2), 17- $\alpha$ -etinilestradiol (EE2) e estrona (E1), foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA) e uma solução estoque de cada um dos analitos foi preparada na concentração de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  em metanol. Em seguida, uma solução de trabalho contendo todos os analitos foi preparada na concentração de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  em metanol, por diluição apropriada das soluções estoque. Os solventes acetonitrila (ACN) e metanol (MeOH) foram obtidos da JT Baker (Mallinckrodt, NJ, EUA) e acetato de etila (AcOEt) da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA). A água ultrapura utilizada foi obtida através de um sistema de purificação da Mega Pureza (Billerica, MA, EUA). Para o ajuste do pH foram utilizadas soluções de HCl e hidróxido de sódio (NaOH)  $1 \text{ mol L}^{-1}$  da Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

### 5.2.2 Preparação dos filmes finos

Antes do preparo dos filmes finos, cada PAni foi peneirada em uma peneira de granulometria de 200 mesh ( $74 \mu\text{m}$ ). Em seguida, o método de preparo dos filmes finos foi adaptado conforme descrito por Carmo, Merib e Carasek (2019). Inicialmente, filmes adesivos de dupla face foram cortados no tamanho de 1 cm de altura x 0,2 cm de largura e fixados em cada superfície das lâminas de aço inoxidável. Dando continuidade, o pó de cada uma das PANis foi colocado em excesso sobre o adesivo, para garantir que toda área estaria preenchida com a fase extratora, mas para retirar o excesso, um procedimento de condicionamento foi realizado, o qual também garantiu a remoção de possíveis oligômeros de cadeia curta de anilina (Wójciak-Kosior *et al.*, 2019).

Para isso, as lâminas revestidas foram condicionadas com 1,5 mL de água ultrapura por 10 minutos e 2 ciclos em 300  $\mu$ L de ACN/MeOH (50:50 v/v) por 10 minutos em cada ciclo. Foi utilizado o sistema de placas de 96 poços de amostragem sob agitação constante de 500 rpm neste procedimento. Um esquema representativo do preparo é apresentado na Figura 19.

Figura 19 – Esquema representativo do preparo dos filmes finos com o pó de PANi.



Condicionamento:

\* 1,5 mL de água ultrapura por 10 minutos;

\* 2 ciclos em 300  $\mu$ L de ACN/MeOH (50:50 v/v) por 10 minutos em cada ciclo.

Fonte: Autoria própria (2023).

Utilizou-se aproximadamente 1 mg de fase extratora, sendo que esta massa foi estimada pela pesagem da lâmina de aço inoxidável com os filmes adesivos fixados sobre ela e após aderir a fase extratora e realizar o condicionamento, sendo feita novamente a pesagem da lâmina até a completa evaporação do solvente utilizado no condicionamento.

### 5.2.3 Amostras de urina

As amostras de urina foram coletadas e armazenadas em frascos de 40 mL com septos PTFE/silicone sob refrigeração a 4 °C. Foram obtidas sete amostras de urina de voluntárias saudáveis do sexo feminino (idades de 21 a 54 anos). Uma delas foi utilizada para otimização da metodologia e nos ensaios de recuperação relativa e precisões (intradia e interdia) e as outras seis amostras, para aplicação do método, sendo que algumas informações referentes às amostras analisadas seguem no Quadro 1. Para realização da curva de calibração, uma amostra de urina de um voluntário do sexo masculino (27 anos) foi utilizada. Todos os voluntários concordaram previamente em participar deste estudo, que foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Santa Catarina, sob o número 00913718.3.0000.0121.

Quadro 1 – Informações referentes as amostras de urina analisadas.

<b>Amostra</b>	<b>Procedência, características e informações</b>
A	Mulher, 26 anos, faz uso de anticoncepcional à base de hormônio
B	Mulher, 27 anos, faz uso de anticoncepcional à base de hormônio
C	Mulher, 26 anos, faz uso de anticoncepcional à base de hormônio
D	Mulher, 54 anos, faz reposição hormonal intradérmica
E	Mulher, 52 anos, não faz uso de nenhum tipo de hormônio
F	Mulher, 21 anos, faz uso de anticoncepcional à base de hormônio

Fonte: Autoria própria (2023).

#### 5.2.4 Instrumentação e condições cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo líquido, modelo LC 20 AT da Shimadzu, equipado com detector de fluorescência, modelo RF 20A, com *loop* de 20  $\mu\text{L}$  e injetor manual Rheodyne, modelo 7725i. Uma coluna C18 (250 mm de comprimento x 4,6 mm de diâmetro interno e espessura de filme de 5  $\mu\text{m}$ ) da Agilent Technologies foi usada para separação cromatográfica. A vazão da fase móvel foi de 1  $\text{mL min}^{-1}$  empregando o modo gradiente. A condição inicial foi constituída de uma mistura de 50% de ACN (A) e 50% de água ultrapura (B), esta condição se manteve por 5,5 minutos, de 5,5 a 7,5 minutos, a composição mudou para 80% de A e 20% de B, mantida até 10 minutos, de 10,10 a 15 minutos a condição inicial foi retomada. Os comprimentos de onda de excitação e de emissão monitorados foram de 280 e 310 nm, respectivamente.

#### 5.2.5 Otimização da metodologia

Para a otimização desta metodologia foram avaliados alguns parâmetros associados às etapas de dessorção e extração, como solvente de dessorção, tempo de dessorção, tempo de extração e pH da urina. Neste estudo, a adição de sal não foi avaliada, uma vez que a urina já possui sais em sua composição e esta concentração irá variar de acordo com a alimentação e hidratação de cada indivíduo (Lopes *et al.*, 2022b). Vale ressaltar que as amostras de urina utilizadas não passaram por diluição.

##### 5.2.5.1 Solvente de dessorção

A otimização do solvente de dessorção foi feita de forma multivariada, através de um planejamento *simplex-centróide*. Foram realizados 12 experimentos (incluindo triplicata no ponto central), utilizando as proporções descritas na Tabela 5, empregando os solventes ACN, MeOH e AcOEt, sendo que estes solventes foram escolhidos levando em consideração as suas propriedades físico-químicas, pela sua disponibilidade no laboratório e por serem compatíveis com o instrumento analítico, neste caso, o HPLC-FLD.

Tabela 5 – Experimentos realizados no planejamento *simplex-centróide*.

Experimentos	ACN		MeOH		AcOEt	
	Cod.	( $\mu$ L)	Cod.	( $\mu$ L)	Cod.	( $\mu$ L)
1	1	300	0	0	0	0
2	0	0	1	300	0	0
3	0	0	0	0	1	300
4	0,5	150	0,5	150	0	0
5	0,5	150	0	0	0,5	150
6	0	0	0,5	150	0,5	150
7	0,666	150	0,167	75	0,167	75
8	0,167	75	0,666	150	0,167	75
9	0,167	75	0,167	75	0,666	150
10	0,333	100	0,333	100	0,333	100
11	0,333	100	0,333	100	0,333	100
12	0,333	100	0,333	100	0,333	100

Fonte: Autoria própria (2023).

#### 5.2.5.2 *Tempo de dessorção*

A otimização do tempo de dessorção foi feita em triplicata de forma univariada, utilizando os tempos de 10, 20 e 30 minutos, sendo realizados um total de 9 experimentos.

#### 5.2.5.3 *Tempo de extração e pH*

A otimização do tempo de extração e pH da urina foi feita através de um planejamento multivariado *Doehlert*, onde 9 experimentos foram realizados (incluindo triplicata no ponto central) variando as condições utilizadas, conforme descrito na Tabela 6.

Tabela 6 – Experimentos realizados no planejamento *Doehlert* para otimização do tempo de extração e pH da urina.

Experimentos	Tempo de extração		pH	
	Cod.	(min)	Cod.	Valor
1	-0,5	60	0,866	10
2	0,5	120	0,866	10
3	-1	30	0	6
4	0	90	0	6
5	1	150	0	6
6	-0,5	60	-0,866	2
7	0,5	120	0,866	2
8	0	90	0	6
9	0	90	0	6

Fonte: Autoria própria (2023).

Também foi avaliada a PAni que iria proporcionar a melhor eficiência de extração empregando condições pré-estabelecidas. Os dados experimentais obtidos foram avaliados empregando estratégias multivariadas e univariadas utilizando os softwares Statistica 8.0 e Microsoft Excel 2016.

### 5.2.6 Parâmetros analíticos de mérito

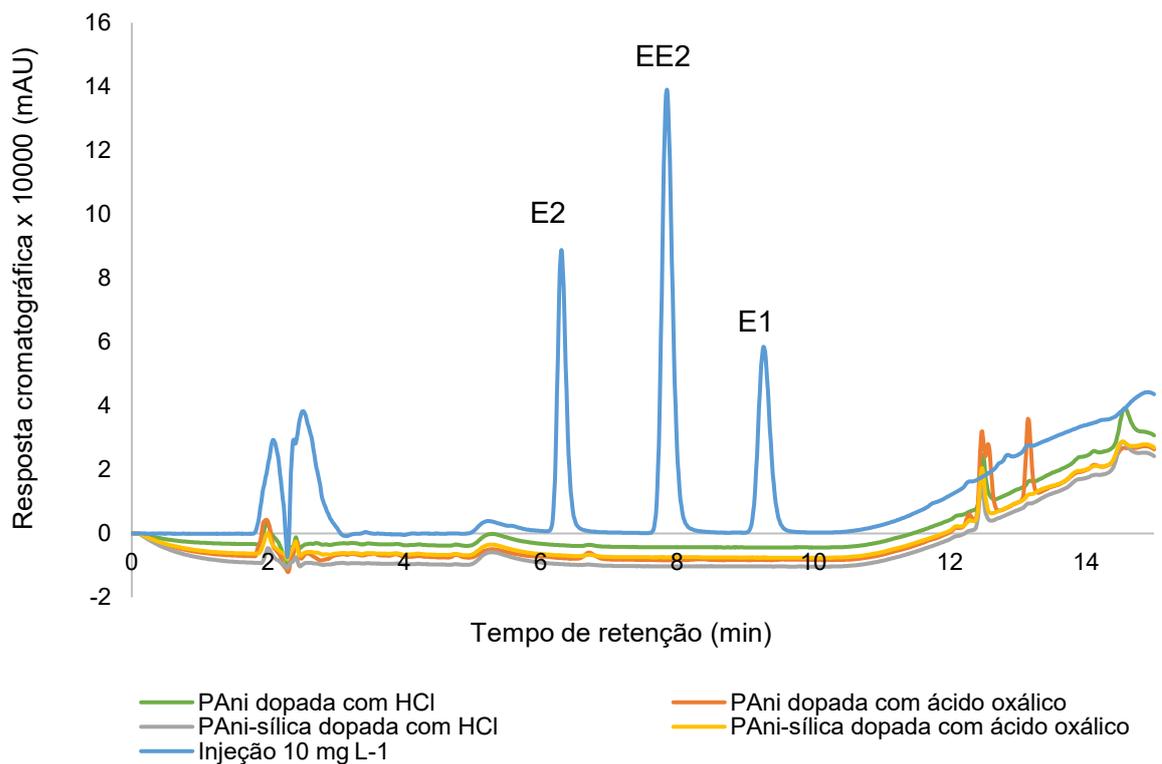
Os parâmetros analíticos de mérito foram obtidos através de curvas analíticas construídas por adição de padrão na matriz da amostra (urina) nas concentrações de  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  a  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  para o E2, de  $5 \mu\text{g L}^{-1}$  a  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  para o EE2 e de  $20 \mu\text{g L}^{-1}$  a  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  para o E1, com no mínimo 6 pontos, feitos em triplicata. A faixa linear de trabalho, equação da reta, coeficiente de determinação ( $R^2$ ), limite de quantificação (LOQ), limite de detecção (LOD), recuperação relativa e precisões intradia e interdia foram avaliados. O LOQ foi considerado o primeiro ponto da faixa linear de trabalho para cada analito, pois foi a menor concentração quantificável pelo método e o LOD foi definido como LOQ dividido por 3,3 (Lopes *et al.*, 2022a). A recuperação está relacionada com a exatidão e a precisão com o desvio padrão relativo (RSD), sendo assim, os ensaios de recuperação relativa e as precisões intradia e interdia foram avaliados utilizando uma amostra de urina diferente daquela que foi utilizada na curva de calibração, em 2 níveis de concentração em comum para todos os analito.

## 5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.3.1 Seleção da PAni para fase extratora

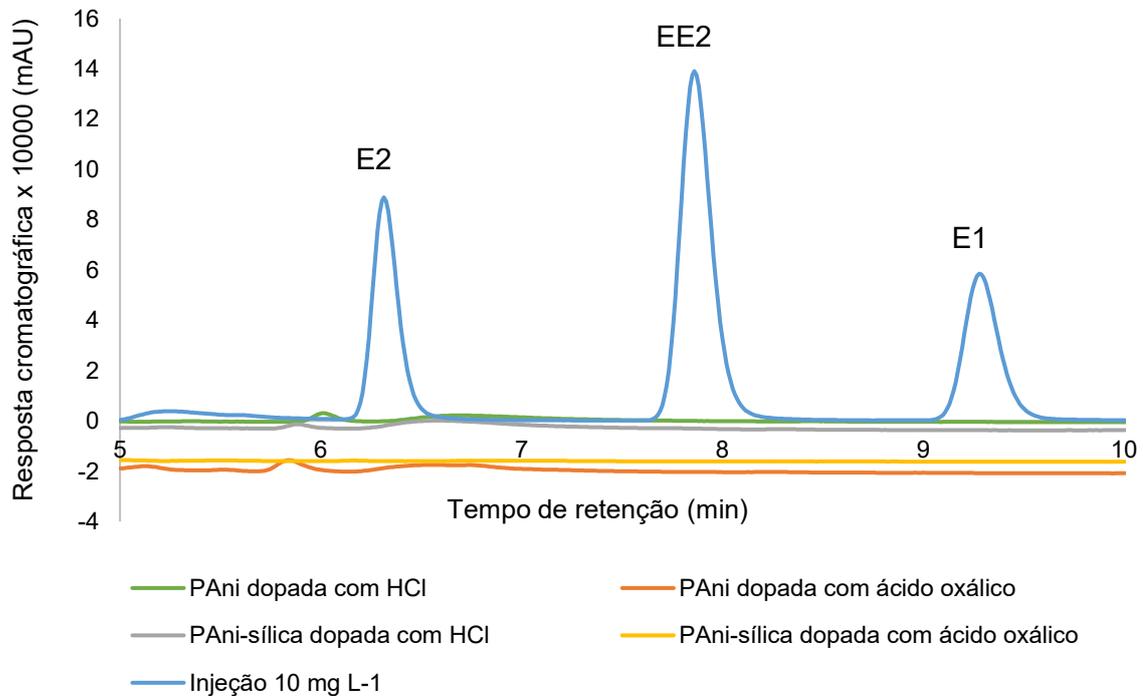
Inicialmente, para garantir que não fossem observados picos interferentes provenientes de cada uma das PAnis e da urina no tempo de retenção dos analitos, amostras de água ultrapura e urina foram submetidas às extrações e os cromatogramas obtidos podem ser vistos na Figura 20 e Figura 21, respectivamente.

Figura 20 – Cromatogramas do branco obtido para cada uma das PAnis e injeção direta de 10 mg L<sup>-1</sup>. Condições TF-SPME: 1,5 mL de água ultrapura, 90 minutos de extração, sem mudança de pH e sem adição de sal, dessorção líquida com 300 µL de ACN e 20 minutos de dessorção.



Fonte: Autoria própria (2023).

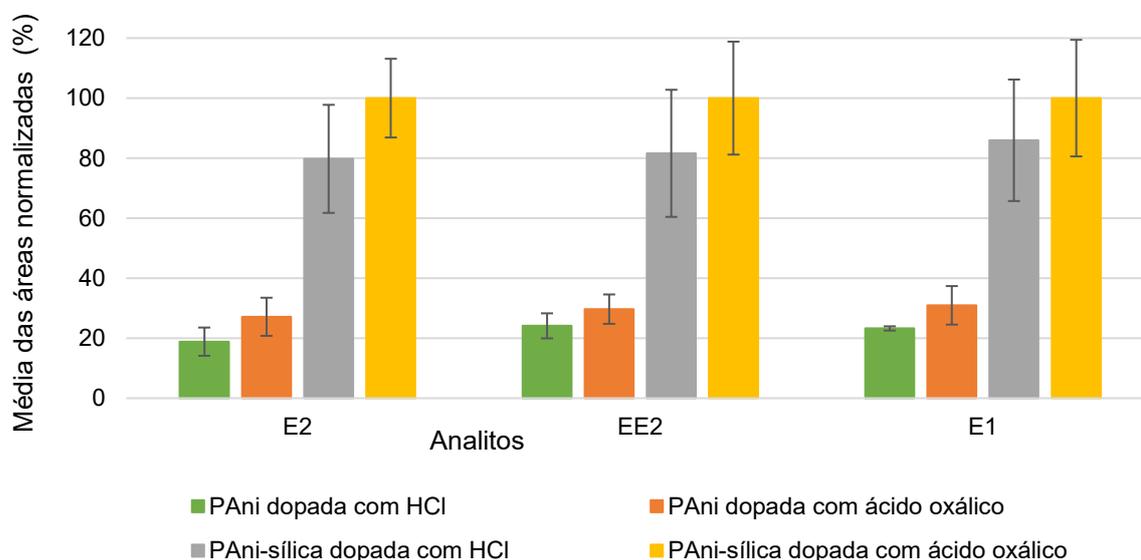
Figura 21 – Cromatogramas do branco obtido para cada uma das PAnis e injeção direta de 10 mg L<sup>-1</sup>. Condições TF-SPME: 1,5 mL de urina, 90 minutos de extração, sem mudança de pH e sem adição de sal, dessorção líquida com 300 µL de ACN e 20 minutos de dessorção.



Fonte: Autoria própria (2023).

Em seguida, a fim de avaliar a eficiência de cada PAAni para extração dos hormônios foram realizadas extrações em urina (1,5 mL) fortificada com 500 µg L<sup>-1</sup> de cada analito, com tempo de extração de 90 minutos. Nesta etapa não foi feita adição de sal e o pH da amostra não foi alterado. Na etapa de dessorção, foram utilizados 300 µL de ACN e o tempo de dessorção utilizado foi de 20 minutos. Esta otimização foi realizada de forma univariada em triplicata e os resultados obtidos estão apresentados na Figura 22.

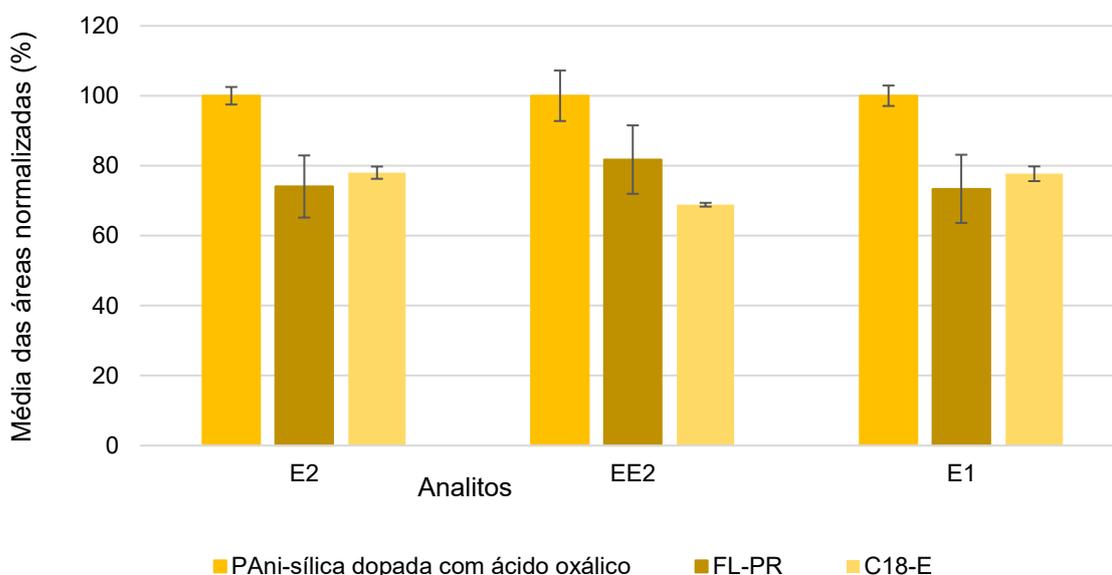
Figura 22 – Gráfico de barras obtido para avaliar a eficiência de extração de cada uma das PANis. Condições TF-SPME: 1,5 mL de urina fortificada com  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  de cada analito, 90 minutos de extração, sem mudança de pH e sem adição de sal, dessorção líquida com 300  $\mu\text{L}$  de ACN e 20 minutos de dessorção.



Fonte: Autoria própria (2023).

Nota-se que a resposta cromatográfica variou de acordo com a composição da fase extratora. As extrações empregando a PANi dopada com HCl e PANi dopada com ácido oxálico apresentaram as menores respostas cromatográficas. Por outro lado, a PANi-sílica dopada com ácido oxálico exibiu as maiores respostas cromatográficas na extração dos hormônios. Isso pode ser justificado pelo uso de partículas de sílica na síntese desta PANi, que acaba proporcionando uma combinação das características hidrofóbicas da sílica com as características deste polímero orgânico, como um aumento da área superficial específica, levando a uma melhor interação com os analitos (Lee; Yoo, 2016). Por esta razão, a PANi-sílica dopada com ácido oxálico foi escolhida para estudos posteriores. Além disso, a eficiência de extração da PANi-sílica dopada com ácido oxálico foi comparada à de outros materiais comercialmente disponíveis (FL-PR e C18-E) provenientes de cartuchos de SPE. A escolha de FL-PR e C18-E se baseou no fato de que essas fases comerciais podem ser utilizadas para extração de analitos polares ou hidrofóbicos, respectivamente. Os resultados desta comparação podem ser vistos na Figura 23.

Figura 23 – Gráfico de barras obtido para avaliar a eficiência de extração da PAni-sílica dopada com ácido oxálico, em comparação com materiais comerciais. Condições TF-SPME: 1,5 mL de urina fortificada com  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  de cada analito, 90 minutos de extração, sem mudança de pH e sem adição de sal, dessorção líquida com  $300 \mu\text{L}$  de ACN e 20 minutos de dessorção.



Fonte: Autoria própria (2023).

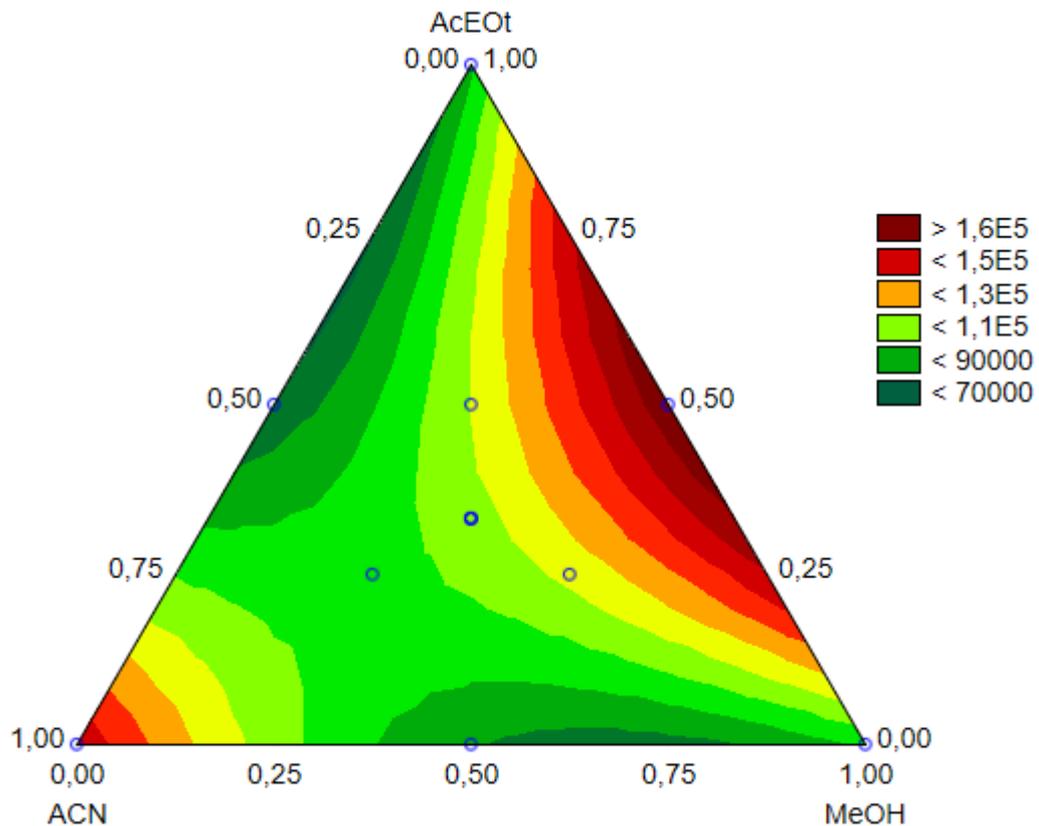
Conforme é possível observar na Figura 23, a eficiência de extração da PAni-sílica dopada com ácido oxálico é maior se comparada aos demais materiais comercialmente disponíveis, sendo assim uma alternativa inovadora para determinação destes analitos, uma vez que reduz os custos envolvidos no procedimento de preparo de amostra, pois os cartuchos de SPE geralmente são utilizados apenas uma única vez.

### 5.3.2 Otimização do solvente de dessorção

A otimização do solvente de dessorção foi feita com a finalidade de verificar qual o melhor solvente ou mistura de solventes que seria capaz de romper a interação entre a PAni-sílica dopada com ácido oxálico com os analitos. Os experimentos foram realizados variando os solventes utilizados, conforme descrito na Tabela 5. Através do planejamento *simplex-centróide*, uma superfície de resposta foi gerada a partir da média geométrica das áreas dos picos cromatográficos e está

apresentada na Figura 24, esta superfície foi baseada em uma função quadrática, apresentando um  $R^2 = 0,8942$ . Além disso, a Tabela ANOVA é apresentada na Tabela 1-A (Apêndice A).

Figura 24 – Superfície de resposta obtida utilizando um planejamento *simplex-centróide* para otimização do solvente de dessorção ( $R^2 = 0,8942$ ). Condições TF-SPME: 1,5 mL de urina fortificada com  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  de cada analito, 90 minutos de extração, sem mudança de pH e sem adição de sal, dessorção líquida com  $300 \mu\text{L}$  de diferentes solventes e 20 minutos de dessorção.



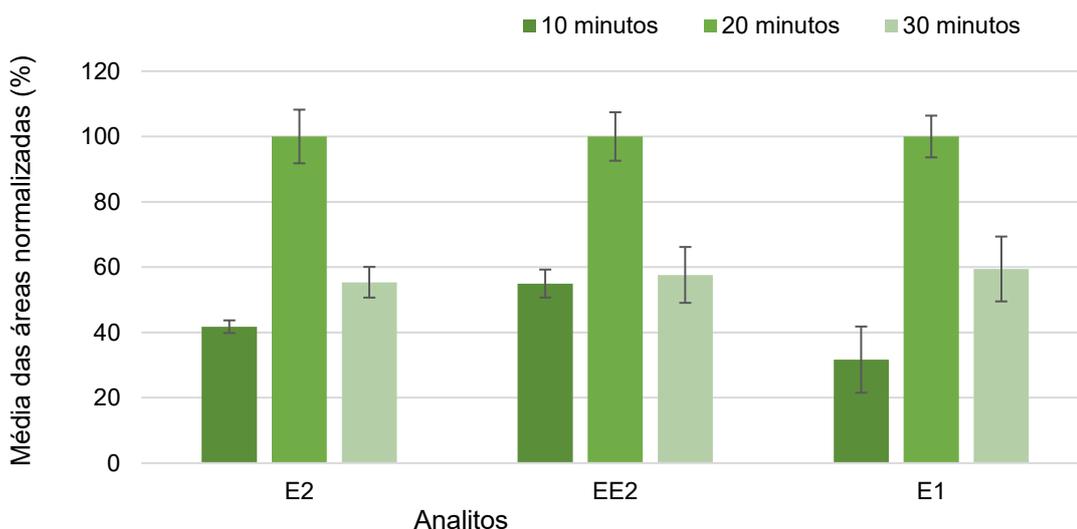
Fonte: Autoria Própria (2023).

De acordo com a Figura 24, são observadas duas regiões de resposta máxima, em que uma delas é composta por 100% de ACN e a outra pela mistura dos solventes MeOH e AcOEt (50:50 v/v). Com o objetivo de reduzir os erros envolvidos no procedimento de preparo de amostra pela utilização de uma mistura de solventes, a ACN foi escolhida como solvente de dessorção e esta condição otimizada foi mantida para os experimentos posteriores.

### 5.3.3 Otimização do tempo de dessorção

Outro parâmetro otimizado foi o tempo de dessorção, que deve ser suficiente para atingir o equilíbrio de distribuição dos analitos no solvente de dessorção e na fase extratora. Esta otimização foi feita variando os tempos de dessorção, conforme descrito anteriormente na seção 5.2.5.2, enquanto que as demais condições foram mantidas. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 25.

Figura 25 – Gráfico de barras obtido para otimização do tempo de dessorção. Condições TF-SPME: 1,5 mL de urina fortificada com  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  de cada analito, 90 minutos de extração, sem mudança de pH e sem adição de sal, dessorção líquida com  $300 \mu\text{L}$  de ACN e diferentes tempos de dessorção.



Fonte: Autoria própria (2023).

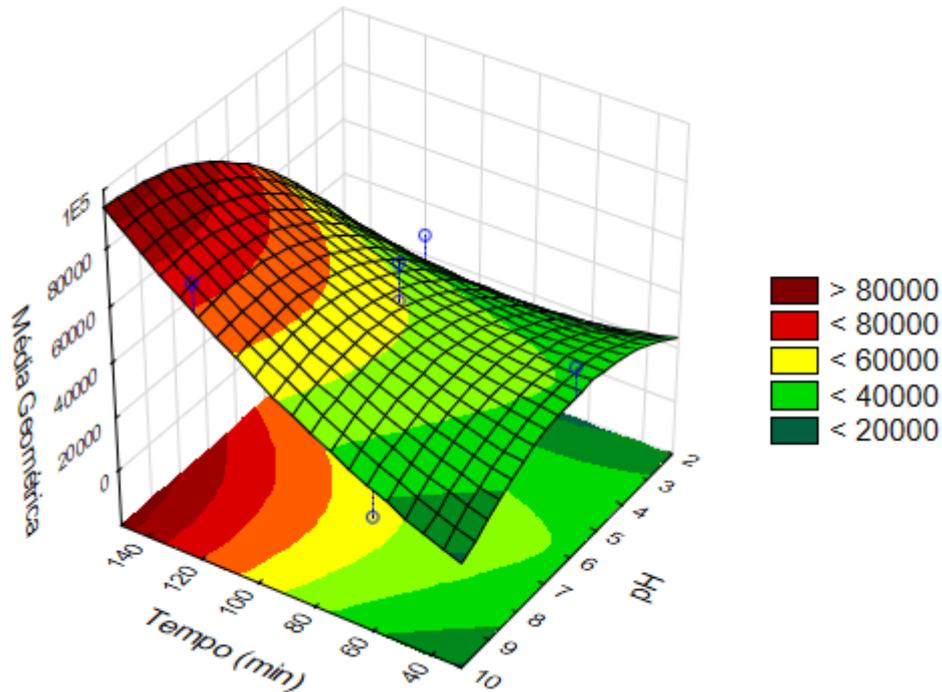
É possível notar que quando utilizado 10 e 30 minutos de dessorção, as respostas cromatográficas encontradas são inferiores à resposta encontrada quando empregado 20 minutos de dessorção. Uma provável justificativa é que 10 minutos não sejam efetivos para que ocorra a dessorção, ou seja, uma certa quantidade dos analitos ainda estaria retida na fase extratora e que este tempo não seja suficiente para atingir o equilíbrio de distribuição dos analitos no solvente de dessorção e na fase extratora. E que com 30 minutos, ocorra uma possível retroextração, ou seja, quando o solvente de dessorção fica saturado com os analitos, ao invés destes

permanecerem no solvente de dessorção, acabam migrando novamente para fase extratora, uma vez que os sítios da fase extratora (PAni-sílica dopada com ácido oxálico) encontram-se agora disponíveis para que ocorram as interações com os analitos. Portanto, o tempo de 20 minutos foi selecionado como condição otimizada por proporcionar os melhores resultados na dessorção dos analitos e esta condição foi mantida nas otimizações posteriores.

#### **5.3.4 Otimização do tempo de extração e pH da amostra**

Assim como o tempo de dessorção, o tempo de extração foi otimizado para garantir que o equilíbrio de distribuição dos analitos na amostra e na fase extratora fosse alcançado. Considerando que o pH da amostra influencia na forma que os analitos se encontram, esse parâmetro foi avaliado juntamente com o tempo de extração através do planejamento *Doehlert*. Os experimentos foram realizados variando as condições de tempo de extração e pH da amostra, conforme descrito anteriormente na Tabela 6. A partir da média geométrica das áreas dos picos cromatográficos foi obtida a superfície de resposta apresentada na Figura 26, que foi baseada em uma função quadrática gerando um  $R^2 = 0,7949$ . Ademais, a Tabela ANOVA é apresentada na Tabela 2-A (Apêndice A).

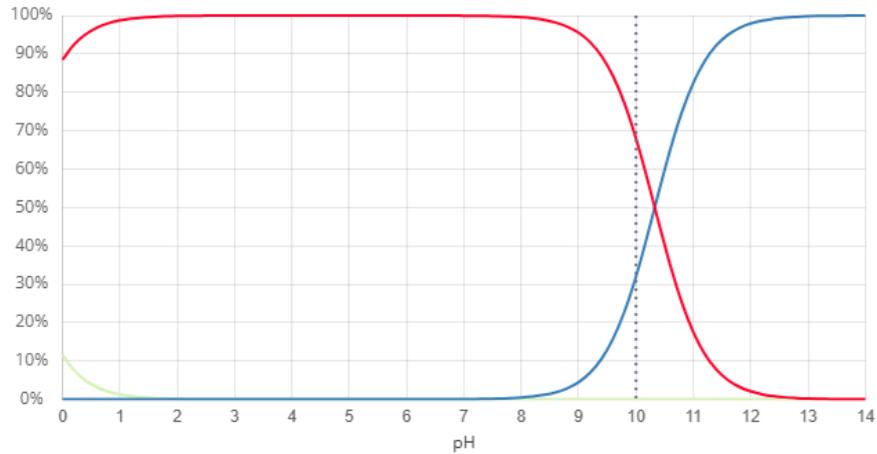
Figura 26 – Superfície de resposta obtida utilizando o planejamento *Doehlert* para otimização do tempo de extração e pH da urina ( $R^2 = 0,7949$ ). Condições TF-SPME: 1,5 mL de urina fortificada com  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  de cada analito, variando o tempo de extração e o pH da urina, sem adição de sal, dessorção líquida com 300  $\mu\text{L}$  de ACN e 20 minutos de dessorção.



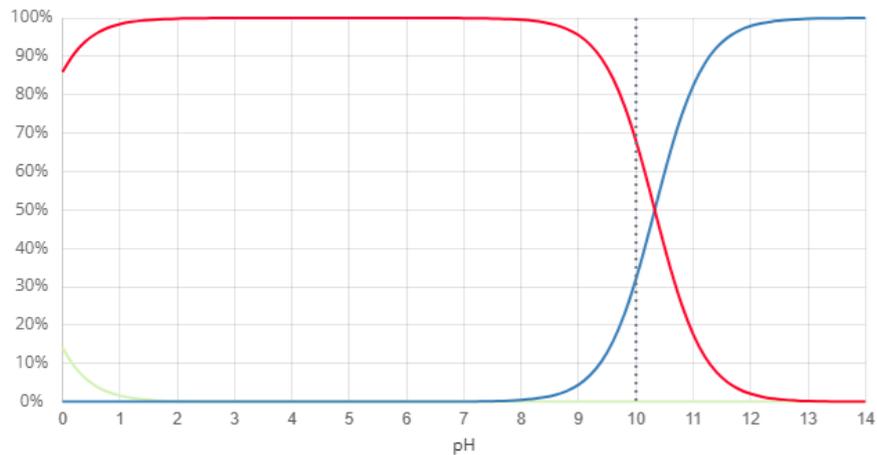
Fonte: Autoria própria (2023).

Conforme pode ser observado na Figura 26, tempos de extração e pHs maiores proporcionaram os melhores resultados, sendo assim, um tempo de extração de 150 minutos e pH = 10 foram estabelecidos como condições otimizadas. Através do gráfico de distribuição de espécies (Figura 27) a escolha do pH pode ser justificada. Abaixo de pH = 10, há um predomínio da espécie neutra dos analitos, já em pH = 10, os analitos podem ser encontrados tanto na sua forma neutra, como na forma ionizada, assim, além de interações  $\pi$ - $\pi$  e ligações de hidrogênio, também podem ocorrer interações do tipo eletrostática entre os analitos e a PANi-sílica dopada com ácido oxálico (Davis *et al.*, 2011; Meng *et al.*, 2023).

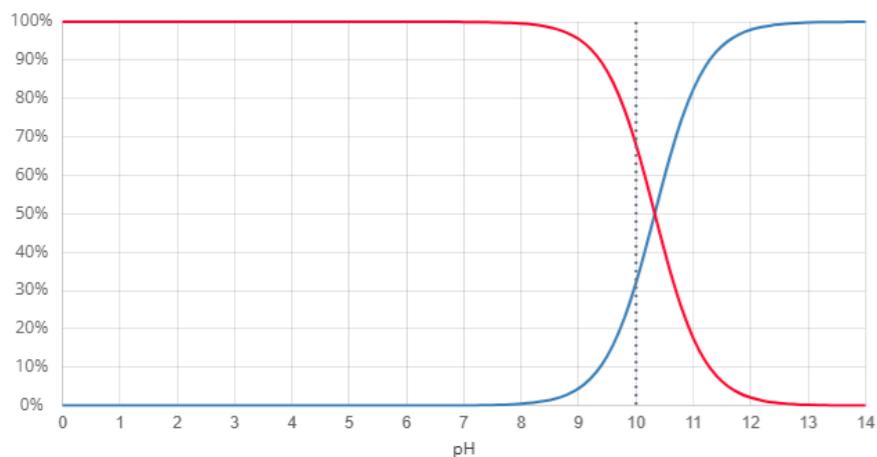
Figura 27 – Gráfico de distribuição de espécies em função do pH da amostra, pH = 10. Sendo que a linha em azul representa a espécie ionizada e a linha vermelha representa a espécie neutra.



E2



EE2



E1

Fonte: Autoria própria (2024).

Após finalizar esta otimização, as condições ótimas para este método ficaram definidas empregando a PANi-sílica dopada com ácido oxálico como fase

extratora, 1,5 mL de urina, 150 minutos de extração, pH ajustado para 10 e sem adição de sal. Para dessorção, 300 µL de ACN e 20 minutos de dessorção.

### 5.3.5 Parâmetros analíticos de mérito

A validação do método foi feita primeiramente através da obtenção dos parâmetros analíticos de mérito, onde as curvas analíticas (Figura 1-A, do Apêndice A) foram construídas por adição de padrão na matriz da amostra (urina isenta do analito) e os resultados estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Faixa linear de trabalho, equação linear, coeficiente de determinação ( $R^2$ ), LOD e LOQ dos analitos no método proposto.

Analitos	Faixa linear		$R^2$	LOD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LOQ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
	de trabalho ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Equação linear			
E2	1 – 500	$y = 10521x + 154618$	0,9969	0,30	1
EE2	5 – 500	$y = 23148x - 34436$	0,9973	1,51	5
E1	10 – 500	$y = 152,82x - 442,54$	0,9979	3,03	10

Fonte: Autoria própria (2023).

De acordo com a Tabela 7, os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) variaram de 0,9969 para E2, 0,9973 para EE2 e 0,9979 para E1, o que indica boas correlações entre os dados e que estes se encontram pouco dispersos em relação à curva analítica. Os valores de LOD e LOQ variaram de 0,30 e 1  $\mu\text{g L}^{-1}$  para E2, 1,51 e 5  $\mu\text{g L}^{-1}$  para EE2 e 3,03 e 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  para E1, sendo estes limites aceitáveis, considerando que a quantidade que é excretada na urina varia de acordo com o estado de saúde da mulher. Por exemplo, mulheres grávidas podem excretar 308  $\mu\text{g}$  por dia de E2 na urina. Fora desse período, a excreção varia de 1,5 a 7  $\mu\text{g}$  por dia. No caso do EE2, que é um estrogênio sintético, ou seja, este hormônio não é produzido pelo organismo da mulher e só será excretado na urina de mulheres que fazem o uso de contraceptivos ou que realizam reposição hormonal. Estima-se que 4,5  $\mu\text{g}$  por dia de EE2 sejam excretados na urina (Barreiros *et al.*, 2016). Uma

concentração entre 2 a 20 µg por dia de E1 é excretada pelo organismo e concentrações mais elevadas podem ser encontradas em mulheres no período gestacional ou após a menopausa, especificamente associado ao câncer de mama (de Oliveira *et al.*, 2019; Yaghjyan *et al.*, 2022).

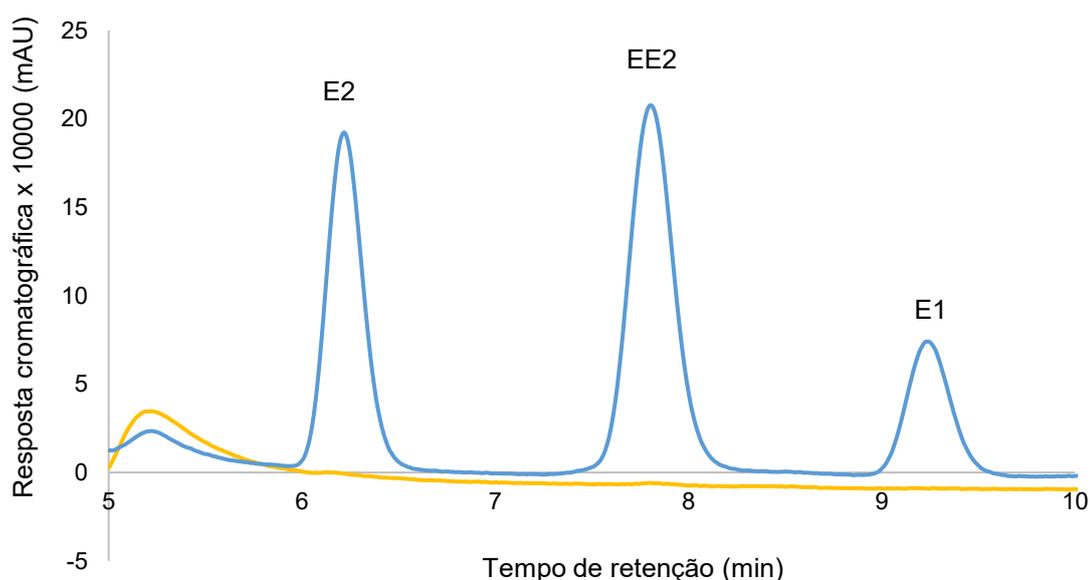
A fim de avaliar a aplicabilidade e a exatidão desta metodologia, as precisões intradia e interdia e as recuperações relativas para cada um dos analitos foi avaliada e os resultados podem ser observados na Tabela 8. Neste estudo, uma amostra de urina diferente daquela que foi utilizada na curva de calibração, foi empregada e um dos cromatogramas obtidos pode ser visualizado na Figura 28.

Tabela 8 – Recuperação relativa e precisões intradia e interdia.

Analitos	Fortificação (µg L <sup>-1</sup> )	Recuperação	Precisão	Precisão
		relativa (%) (n=3)	intradia (RSD) (%) (n=3)	interdia (RSD) (%) (n=9)
E2	200	107	2	13
	500	115	12	14
EE2	200	71	4	20
	500	87	7	13
E1	200	80	3	19
	500	89	9	14

Fonte: Autoria própria (2023).

Figura 28 – Cromatogramas do branco da urina (amarelo) e da urina fortificada (azul), obtidos no estudo da recuperação relativa. Condições TF-SPME: 1,5 mL de urina fortificada com  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  de cada analito, 150 minutos de extração, pH da urina ajustado para 10 e sem adição de sal, dessorção líquida com  $300 \mu\text{L}$  de ACN e 20 minutos de dessorção.



Fonte: Autoria própria (2023).

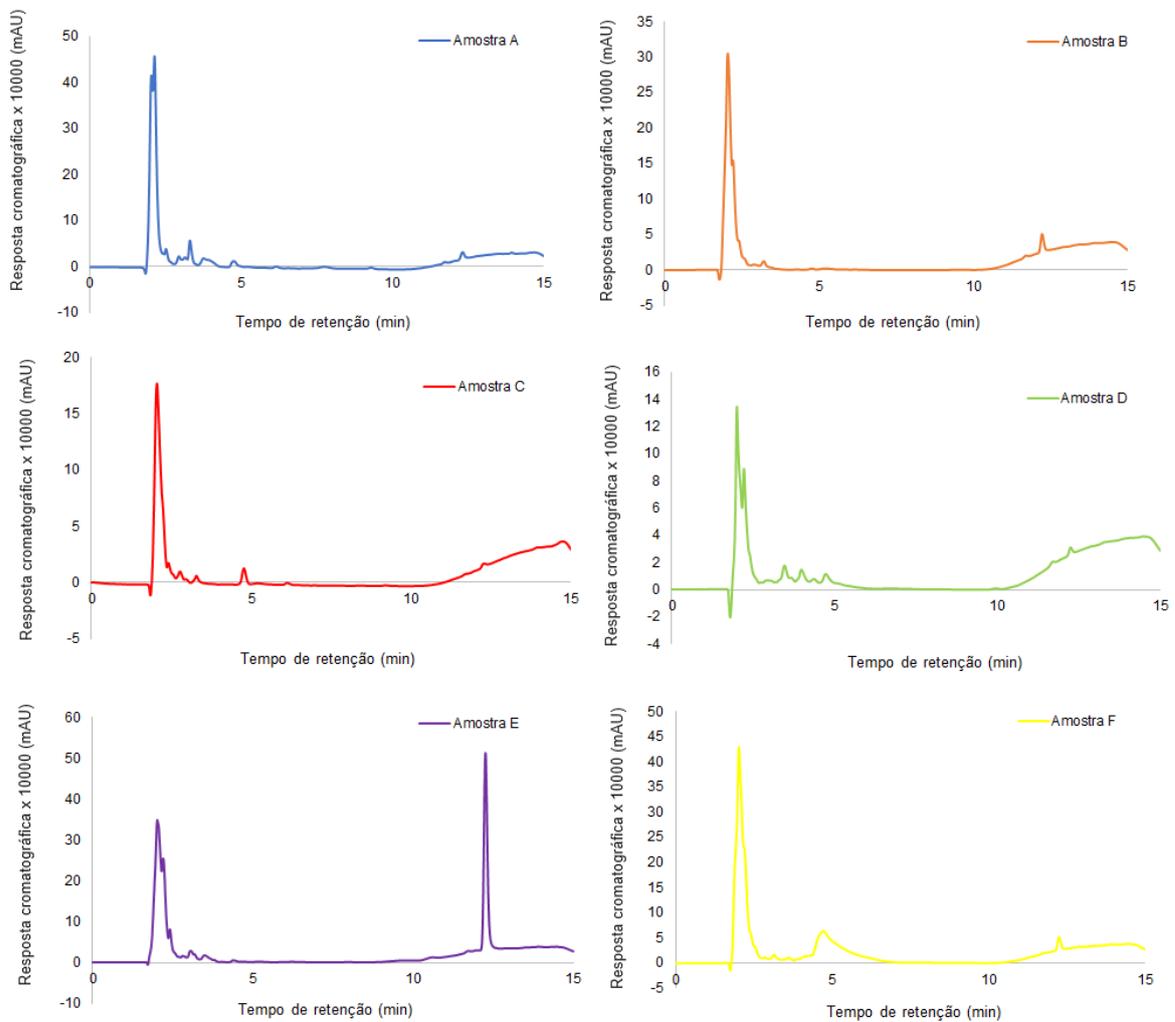
Conforme pode ser visto na Tabela 8, a maioria dos analitos apresentou valores adequados de recuperação relativa. As precisões intradia e interdia variaram de 2% a 12% e de 13% a 20%, respectivamente, estando próximo aos valores estabelecidos no Guia de Validação da Associação de Químicos Analíticos Oficiais (AOAC). De acordo com a AOAC, os valores considerados como aceitáveis para recuperação relativa estão entre 80-110% e para precisão, devem ser menores ou iguais a 15% em concentrações de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  até  $1 \text{ mg L}^{-1}$  (AOAC, 2016).

Considerando que a amostra de urina não foi diluída e esta é uma amostra complexa, ou seja, possui outros componentes que podem ocasionar efeito de matriz, logo, essa pequena variação nos valores obtidos pode ser considerada aceitável. Neste caso, poderia ser realizado um teste de diluição da urina para verificar se diminuindo a concentração de possíveis interferentes (competidores pela fase), melhoraria os valores de recuperação e precisão.

Foram analisadas seis amostras de urina coletadas de voluntárias. Os cromatogramas obtidos podem ser observados na Figura 29 e não foram detectadas

concentrações dos analitos ou estes estavam abaixo do LOQ do método proposto (Amostra A). Vale ressaltar que todas as voluntárias que concordaram em contribuir com este estudo eram saudáveis, apenas quatro faziam uso regular de contraceptivos orais de baixa dose (0,03 mg de EE2/dia), nenhuma delas estava grávida no momento da coleta de urina ou apresentava qualquer tipo de câncer, conforme as informações descritas no Quadro 1.

Figura 29 – Cromatogramas obtidos para análise de amostras de urina de seis voluntárias. Condições TF-SPME: 1,5 mL de urina, 150 minutos de extração, pH da urina ajustado para 10 e sem adição de sal, dessorção líquida com 300 µL de ACN e 20 minutos de dessorção.



Fonte: Autoria própria (2023).

Além disso, foi realizada uma análise comparativa do método desenvolvido com outros métodos relatados na literatura para determinação destes hormônios em urina, e esta comparação pode ser observada na Tabela 9.

Tabela 9 – Comparação do método proposto com outros métodos relatados na literatura para a determinação de hormônios em urina.

(continua)

<b>Analitos</b>	<b>LOQ (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</b>	<b>Técnica de extração</b>	<b>Fase extratora</b>	<b>Volume de urina e tempo total de preparo por amostra</b>	<b>Técnica Analítica</b>	<b>Ref.</b>
E2	1	TF-SPME	PAni-sílica	1,5 mL	HPLC-FLD	Este estudo
EE2	5		dopada com	e 2 min		
E1	10		ácido oxálico			
E2	4	TF-SPME	Bráctea	37 $\mu\text{L}$	HPLC-FLD	Carmo, Merib e
EE2	20			e 2,4 min		Carasek (2019)
E1	40					
E2	0,10	HF-MMLLE	1-Octanol	37 $\mu\text{L}$	HPLC-FLD	Lopes <i>et al.</i>
EE2	1,0			e 0,6 min		(2022)
E1	15					
E2	10	DPX	Cortiça	158 $\mu\text{L}$	HPLC-FLD	Mafra <i>et al.</i>
EE2	10			e 2,5 min		(2018)
E1	10					

Tabela 9 – Comparação do método proposto com outros métodos relatados na literatura para a determinação de hormônios em urina.

(continua)

Analitos	LOQ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Técnica de extração	Fase extratora	Volume de urina e tempo total de preparo por amostra	Técnica Analítica	Ref.
E2 EE2 E1	0,089 0,14 0,15	SPME	AMED	5 mL e 55 min	HPLC-DAD	Liao <i>et al.</i> (2016)
E2 EE2 E1	- - 0,5	SPE	Cartucho Strata C-18-E	1 mL e >60 min	HPLC-Q-TOF	Dmitrieva <i>et al.</i> (2022)
E2 EE2 E1	- 20 20	DLLME	[P <sub>6,6,6,14</sub> <sup>+</sup> ] <sub>2</sub> [MnCl <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ]	150 $\mu\text{L}$ e 11 min	HPLC-DAD	Will <i>et al.</i> (2020)
E2 EE2 E1	85,6 - 91,4	CPE	Tensoativo não- iônico Tergitol TMN-6	10 mL e 48 min	HPLC-EC	Amorim e Andrade (2017)

Tabela 9 – Comparação do método proposto com outros métodos relatados na literatura para a determinação de hormônios em urina.

							(conclusão)
<b>Analitos</b>	<b>LOQ (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</b>	<b>Técnica de extração</b>	<b>Fase extratora</b>	<b>Volume de urina e tempo total de preparo por amostra</b>	<b>Técnica Analítica</b>	<b>Ref.</b>	
E2	0,1	SPE	Cartucho	500 $\mu\text{L}$	HPLC-MS	You <i>et al.</i> (2019)	
EE2	0,1		Oasis HLB 1	e 20 min			
E1	0,1						
E2	50	DLLME	Acetonitrila/clorofórmio	3 mL	UHPLC-	Dmitrieva <i>et al.</i>	
EE2	-			e 30 min	HRMS	(2020)	
E1	50						

TF-SPME: microextração em fase sólida de filme fino; HF-MMLLE: extração líquido-líquido em membrana microporosa de fibra oca; DPX: extração dispersiva em ponteira; SPME: microextração em fase sólida; SPE: extração em fase sólida; DLLME: microextração líquido-líquido dispersiva; CPE: extração de ponto nuvem; HPLC-FLD: cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência; HPLC-DAD: cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos; HPLC-Q-TOF: cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por quadrupolo e espectrometria de massas por tempo de voo; HPLC-EC: cromatografia líquida de alta eficiência com detecção eletroquímica; HPLC-MS: cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por espectrometria de massas; UHPLC-HRMS: cromatografia líquida de ultra-alta eficiência com detecção por espectrometria de massas de alta resolução.

De acordo com a Tabela 9, os valores de LOQ, obtidos neste método foram satisfatórios, podendo ser melhorados se utilizado uma técnica analítica instrumental mais sensível, como HPLC-MS. A fase extratora empregada foi a PAni-sílica dopada com ácido oxálico, sendo de fácil síntese, baixo custo e ambientalmente correta, enquanto que os demais métodos empregaram o uso de solventes tóxicos como clorofórmio para extração. As análises neste método utilizaram pequenos volumes de amostra (1,5 mL), considerando que não foi necessária a realização de diluição de urina, reduzindo assim possíveis erros associados a esta etapa. Um tempo total de preparo de  $\approx 2$  minutos foi necessário por amostra quando o sistema de placas de poços de amostragem foi operado na capacidade máxima (96 amostras), o que favorece para uma alta frequência analítica, pois várias amostras podem ser analisadas simultaneamente, enquanto os outros métodos requerem tempos muito maiores, de até 1 hora por amostra.

#### 5.4 CONCLUSÕES PARCIAIS

Neste estudo foi possível comprovar a versatilidade da PAni como fase extratora na técnica de TF-SPME para a determinação de estrogênios esteroides em amostras biológicas. A metodologia foi otimizada e validada. Sendo as condições otimizadas obtidas utilizando PAni-sílica dopada com ácido oxálico como fase extratora, com 1,50 mL de urina, pH da amostra ajustado para aproximadamente 10 e 1,50 minutos de tempo de extração por amostra, 300  $\mu\text{L}$  de acetonitrila (ACN) e 0,20 segundos de tempo de dessorção por amostra, ou seja, o tempo quando utilizado o sistema de placas de poços de amostragem na capacidade máxima (96 poços). As vantagens da metodologia desenvolvida incluem um procedimento de síntese simples e baixo custo para obter cada PAni, um caráter ecologicamente correto pode ser destacado devido ao uso de um volume reduzido de solvente orgânico. Ademais, a frequência analítica, que está relacionada como o tempo total de preparo por amostra foi de aproximadamente 2 minutos por amostra. Os parâmetros analíticos de mérito foram satisfatórios, exibindo LOQs aceitáveis, comparáveis ou até melhores do que os relatados anteriormente em outros métodos. Os valores de coeficiente de correlação ( $r$ ) foram superiores a 0,9969. Os limites de detecção (LODs) e os limites de quantificação (LOQs) variaram de 0,30 a 3,03  $\mu\text{g L}^{-1}$  e 1,0 a 10,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente. As recuperações relativas variaram de 71%

a 115%, e as precisões intradia e interdia ( $n = 3$  e  $n = 9$ , respectivamente) foram inferiores a 20%, sendo considerados valores adequados, conforme estabelecido pelo Guia de Validação da Associação de Químicos Analíticos Oficiais.

## 6 POLIANILINA-SÍLICA DOPADA COM ÁCIDO CLORÍDRICO COMO FASE EXTRATORA EM TF-SPME PARA DETERMINAÇÃO DE ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROIDAIIS EM AMOSTRAS DE ÁGUA E DETECÇÃO POR HPLC-DAD

### 6.1 INTRODUÇÃO

Os anti-inflamatórios não esteroidais pertencem à classe dos fármacos mais utilizados internacionalmente para alívio de dor, febre e inflamação. A aspirina (ASP), o naproxeno (NAP), a indometacina (IND), ibuprofeno (IBU) e o ácido mefenâmico são alguns exemplos destes medicamentos (Izadi *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2018). A estrutura química e algumas das propriedades físico-químicas destes compostos podem ser encontradas na Tabela 10.

Tabela 10 – Estrutura química e algumas propriedades dos analitos.

(continua)

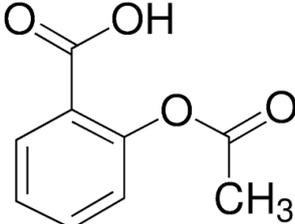
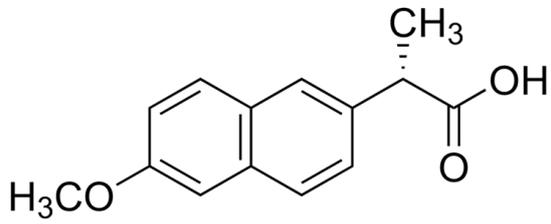
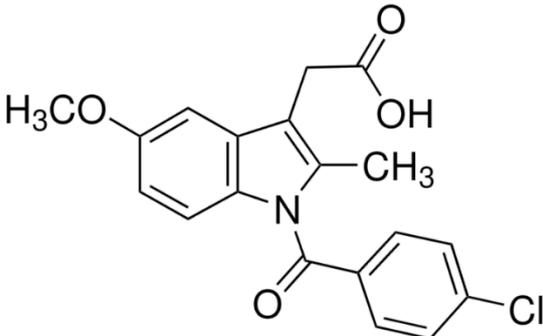
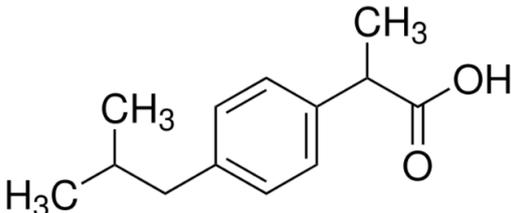
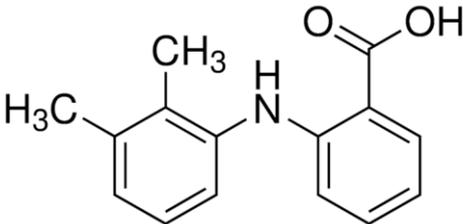
Analito	Estrutura Química	log Kow	pKa	Ref.
ASP		1,19	3,49	Li <i>et al.</i> (2018)
NAP		3,18	4,15	Li <i>et al.</i> (2018)

Tabela 10 – Estrutura química e algumas propriedades dos analitos.

(conclusão)

Analito	Estrutura Química	log Kow	pKa	Ref.
IND		4,51	4,50	Li <i>et al.</i> (2018)
IBU		3,97	4,96	Li <i>et al.</i> (2018)
AME		5,12	5,12	Izadi <i>et al.</i> (2020)

Fonte: Autoria própria (2023).

Atualmente, a presença de anti-inflamatórios não esteroidais no ambiente, mesmo quando presentes em baixas concentrações, tornou-se motivo de preocupação, pois além de não serem removidos de forma eficiente por estações de tratamento, posteriormente, são descartados em águas superficiais. Estes compostos também são considerados contaminantes emergentes, ou seja, não possuem uma regulamentação específica que estabeleça uma concentração máxima permitida. Diante disso, precisam ser monitorados, uma vez que os seus impactos e efeitos no meio ambiente ainda não são totalmente conhecidos e podem vir a ser prejudiciais tanto para os ecossistemas aquáticos quanto para saúde

humana (Chang *et al.*, 2018; Martinez-Sena *et al.*, 2016; Wang; Li; Chen, 2018; Zhou *et al.*, 2021).

Dentro deste contexto, diversas metodologias (Darvishnejad; Raoof; Ghani, 2021; Hu *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2018; Manzo *et al.*, 2014; Sarafray-Yazdi *et al.*, 2012; Wang; Li; Chen, 2018; Yang *et al.*, 2023) envolvendo técnicas de preparo de amostra distintas já foram desenvolvidas a fim de pré-concentrar e tornar possível a determinação e monitoramento destes analitos em amostras aquosas (rios, lagos). Contudo, conforme visto na Tabela 1, até o momento, não foi encontrado nenhum trabalho empregando uma técnica de preparo de amostra miniaturizada que utilizou uma fase extratora baseada em PANi para determinação de ASP, NAP, IBU, IND e AME em amostras de água.

Logo, esta seção propõe o desenvolvimento de uma metodologia analítica utilizando uma fase extratora baseada em PANi na técnica de TF-SPME associada ao sistema de placas de poços de amostragem para determinação de ASP, NAP, IND, IBU e AME em amostras aquosas, por cromatografia líquida de alta eficiência com detector por arranjo de diodos (HPLC-DAD).

## 6.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 6.2.1 Reagentes e Materiais

Os padrões utilizados foram de grau analítico, incluindo aspirina (ASP), naproxeno (NAP), indometacina (IND), ibuprofeno (IBU) e ácido mefenâmico (AME), adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA) e uma solução estoque de cada um dos analitos foi preparada na concentração de 100 mg L<sup>-1</sup> em metanol. Em seguida, uma solução de trabalho foi preparada na concentração de 10 mg L<sup>-1</sup> em metanol, por diluição apropriada das soluções estoque.

### 6.2.2 Preparação dos filmes finos

A preparação dos filmes finos foi conduzida pelo mesmo procedimento descrito anteriormente na seção 5.2.2.

### 6.2.3 Amostras de água

As amostras de água foram coletadas e armazenadas em frascos âmbar sob refrigeração a 4 °C até o momento da análise. A coleta foi feita em diferentes cidades (Brusque e Florianópolis) do estado de Santa Catarina e os pontos de coleta estão identificados no Quadro 2.

Quadro 2 – Pontos de coleta das amostras de água.

Ponto de coleta	Coordenadas geográficas	Ponto de coleta	Coordenadas geográficas
1	-27.207393, -48.950980	4	-27.600077, -48.522403
2	-27.099874, -48.933707	5	-27.600097, -48.521657
3	-27.597998, -48.522916	6	-27.595789, -48.517259

Fonte: Autoria própria (2023).

### 6.2.4 Instrumentação e condições Cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo líquido, modelo LC 20 AT da Shimadzu, equipado com detector de arranjo de diodos, modelo SPD-M20A, com *loop* de 20 µL e injetor manual Rheodyne, modelo 7725i. Uma coluna C18 (250 mm de comprimento x 4,6 mm de diâmetro interno e espessura de filme de 5 µm) da Agilent Technologies foi usada para separação cromatográfica. A vazão da fase móvel foi de 1 mL min<sup>-1</sup>, constituída de uma mistura de 55% de acetonitrila e 45% de água ultrapura acidificada com ácido fórmico 0,1%, empregando o modo isocrático por 18 minutos. Os comprimentos de onda monitorados foram de 230 nm para o NAP e 200 nm para os demais analitos.

### 6.2.5 Otimização da metodologia

Para a otimização desta metodologia foram otimizados alguns parâmetros associados às etapas de dessorção e extração, como solvente de dessorção, tempo de dessorção, pH da água, tempo de extração e % de NaCl na extração.

#### 6.2.5.1 *Solvente de dessorção*

O solvente de dessorção foi otimizado conforme mencionado anteriormente na seção 5.2.5.1. Foram realizados 12 experimentos (incluindo triplicata no ponto central), utilizando diferentes proporções dos solventes ACN, MeOH e AcOEt para dessorção dos analitos, conforme descrito anteriormente na Tabela 5. A extração foi feita em água ultrapura.

#### 6.2.5.2 *Tempo de dessorção*

O tempo de extração foi otimizado de forma univariada, empregando tempos de 10, 20 e 30 minutos de dessorção. As extrações foram realizadas de forma univariada em quadruplicata.

#### 6.2.5.3 *pH*

O pH da amostra foi avaliado de 2 a 6, levando em consideração que cada analito apresenta um valor distinto de pKa, conforme descrito na Tabela 10. Esta otimização foi feita de forma univariada em quadruplicata.

#### 6.2.5.4 *Tempo de extração e % de NaCl*

O efeito da força iônica (% de NaCl) na amostra foi outro parâmetro importante avaliado, juntamente com o tempo de extração, através de um planejamento *Doehlert*, onde 9 experimentos foram realizados (incluindo triplicata no ponto central) variando as condições utilizadas, conforme descrito na Tabela 11.

Tabela 11 – Experimentos realizados no planejamento *Doehlert* para otimização do tempo de extração e % de NaCl.

Experimentos	Tempo de extração		% de NaCl	
	Cod.	(min)	Cod.	Valor
1	-0,5	60	0,866	20
2	0,5	120	0,866	20
3	-1	30	0	10
4	0	90	0	10
5	1	150	0	10
6	-0,5	60	-0,866	0
7	0,5	120	0,866	0
8	0	90	0	10
9	0	90	0	10

Fonte: Autoria própria (2023).

Também foi avaliada a PANi que proporcionou a melhor eficiência de extração utilizando condições pré-estabelecidas. Os dados experimentais obtidos foram avaliados empregando estratégias multivariadas e univariadas utilizando os softwares Statistica 8.0 e Microsoft Excel 2016.

### 6.2.6 Parâmetros analíticos de mérito

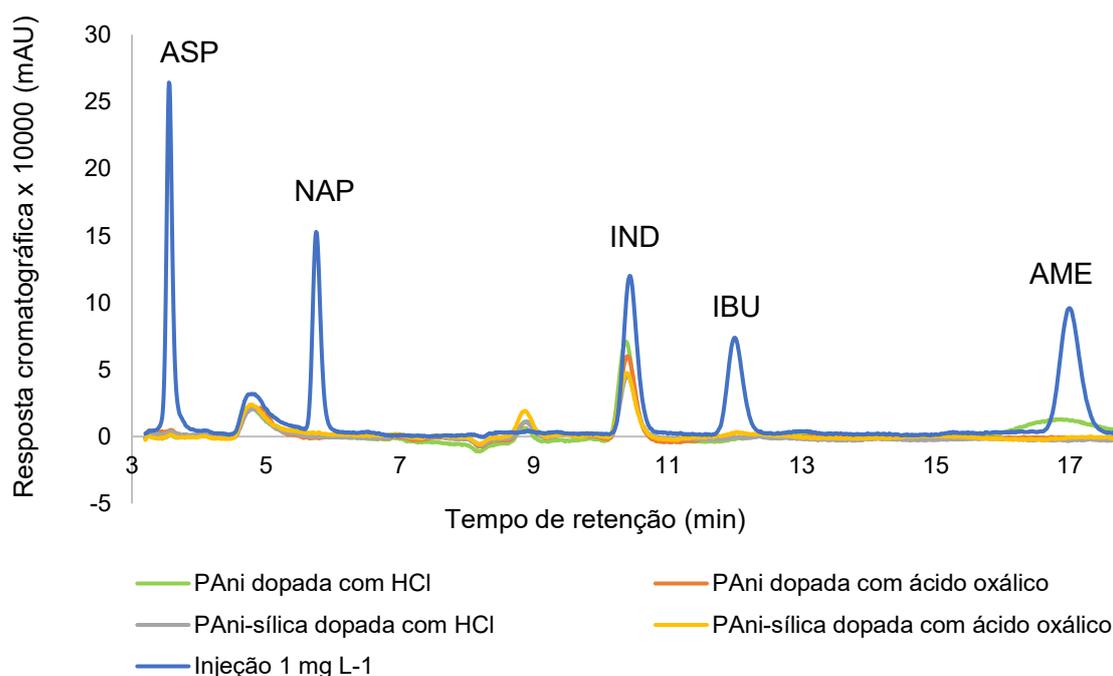
Os parâmetros analíticos de mérito foram obtidos através de curvas de calibração construídas com adição de padrão em água ultrapura, nas concentrações de  $15 \mu\text{g L}^{-1}$  a  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  para todos os analitos, com 9 pontos, feitos em triplicata. A faixa linear de trabalho, equação da reta, coeficiente de determinação ( $R^2$ ), limite de quantificação (LOQ), limite de detecção (LOD), recuperação relativa e precisões intradia e interdia foram avaliados. O LOQ foi determinado como primeiro ponto da faixa linear de trabalho para cada analito. O LOD foi calculado utilizando o LOQ dividido por 3,3 (Lopes *et al.*, 2022a). A recuperação está relacionada com a exatidão e a precisão com o desvio padrão relativo (RSD), sendo assim, os ensaios de recuperação relativa e as precisões intradia e interdia foram avaliados utilizando a amostra de água coletada no Ponto 1, diferente daquela que foi utilizada na curva de calibração (água ultrapura), em 3 níveis de concentração em comum para todos os analito.

## 6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.3.1 Seleção da PAni para fase extratora

Primeiramente, foi realizada à extração em água ultrapura para avaliar se haviam picos interferentes no tempo de retenção dos analitos, provenientes de cada uma das PAnis. Os cromatogramas obtidos podem ser observados na Figura 30.

Figura 30 – Cromatogramas do branco obtido para cada uma das PAnis e injeção direta de 1 mg L<sup>-1</sup>. Condições TF-SPME: 1,5 mL de água ultrapura, 90 minutos de extração, sem mudança de pH e sem adição de sal, dessorção líquida com 300 µL de ACN e 20 minutos de dessorção.  $\lambda = 200$  nm.

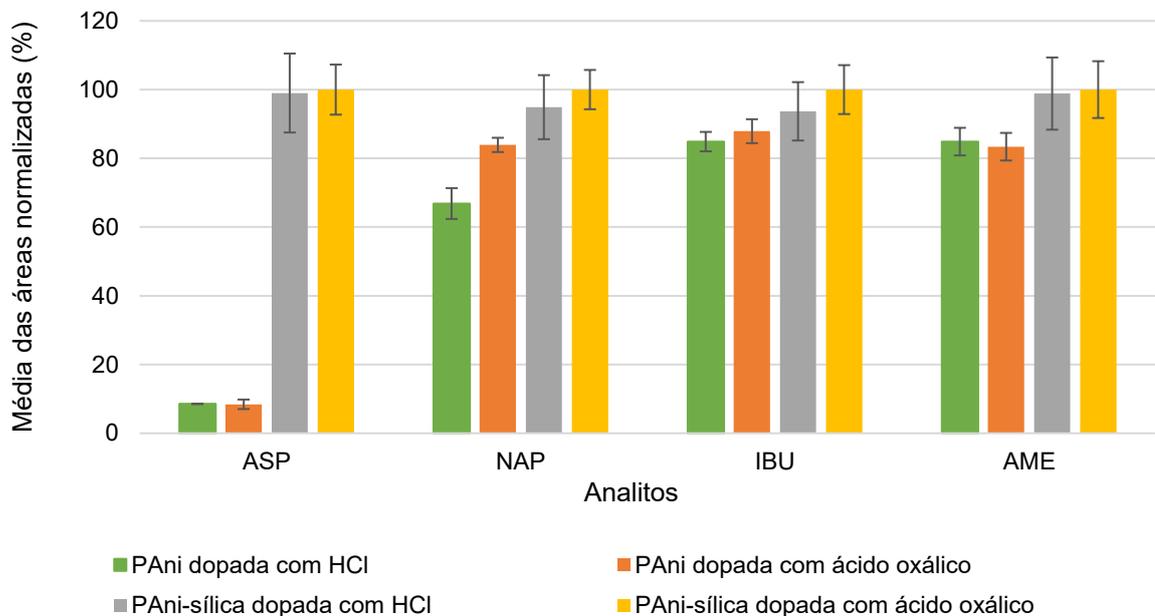


Fonte: Autoria própria (2023).

De acordo com a Figura 30, em todos os cromatogramas, há um pico proveniente das PAnis que coincide no tempo de retenção da IND, desta forma, não foi possível realizar a quantificação deste analito. Dando continuidade, foram realizados estudos com a finalidade de verificar qual PAni apresentaria uma maior eficiência na extração dos anti-inflamatórios não esteroidais. Foram realizadas extrações utilizando as seguintes condições pré-estabelecidas: 1,5 mL de água

ultrapura fortificada com  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  de cada analito, tempo de extração de 90 minutos, nesta etapa não foi feita adição de sal e o pH da amostra foi alterado para 3. Para etapa de dessorção, foram utilizados  $300 \mu\text{L}$  de ACN e o tempo de dessorção foi de 20 minutos. Esta primeira otimização foi realizada de forma univariada em quadruplicata e os resultados obtidos estão apresentados na Figura 31.

Figura 31 – Gráfico de barras obtido para avaliar a eficiência de extração de cada uma das PANis. Condições TF-SPME:  $1,5 \text{ mL}$  de água ultrapura fortificada com  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  de cada analito, 90 minutos de extração,  $\text{pH} = 3$  e sem adição de sal, dessorção líquida com  $300 \mu\text{L}$  de ACN e 20 minutos de dessorção.



Fonte: Autoria própria (2023).

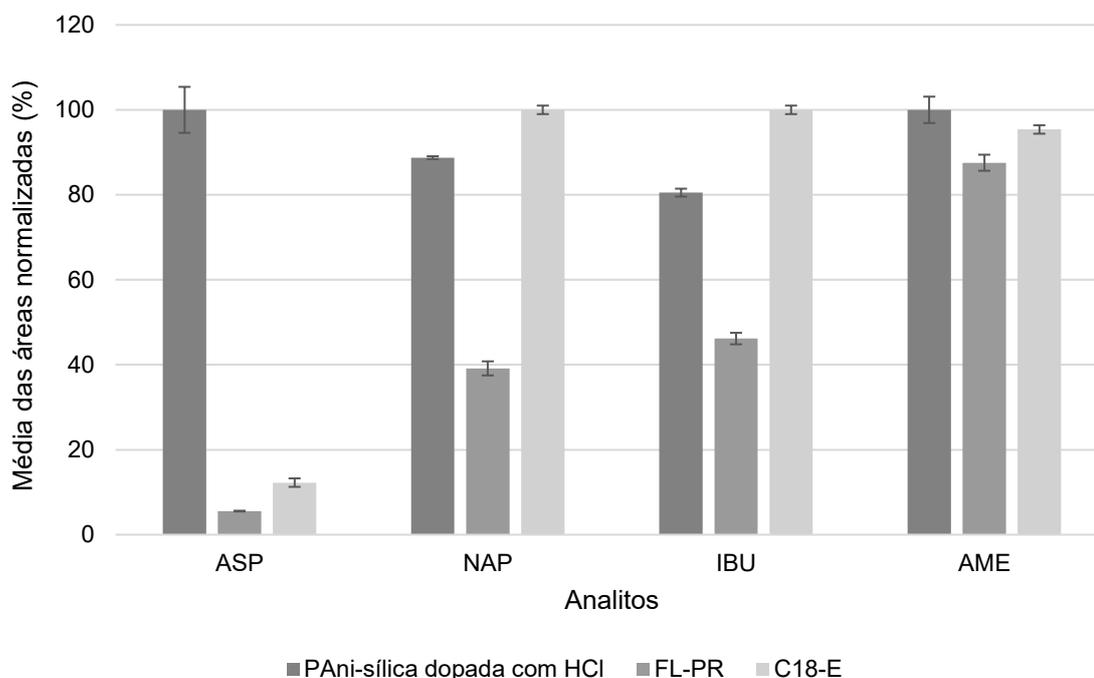
De acordo com o gráfico de barras apresentado na Figura 31, percebe-se que quando foi utilizado a PANi dopada com HCl e a PANi dopada com ácido oxálico, a resposta cromatográfica da ASP foi inferior à dos demais analitos. Isso não aconteceu quando a PANi-sílica dopada com HCl ou a PANi-sílica dopada com ácido oxálico foram utilizadas. Conforme mencionado anteriormente, o uso de partículas de sílica na síntese destas PANis, possivelmente proporcionou um aumento no número de interações dos analitos com a fase extratora, uma vez que a sílica apresenta grupos hidroxila (-OH) provenientes de silanóis residuais, e estes grupos

podem interagir principalmente por ligações de hidrogênio com os analitos. Além disso, foi verificado na seção 4.4.5 que, as PANis apresentaram valores semelhantes de área superficial específica, entretanto, os valores encontrados para PANi-sílica dopada com HCl e para a PANi-sílica dopada com ácido oxálico foram maiores que as demais PANis, ou seja, uma maior quantidade de superfície encontra-se disponível para interação com os analitos.

Visando a quantificação de todos os analitos, considerou-se que os melhores resultados (>80%) foram obtidos usando a PANi-sílica dopada com HCl e a PANi-sílica dopada com ácido oxálico, sendo que as respostas cromatográficas foram muito próximas. A fim de empregar uma fase extratora diferente daquela utilizada anteriormente na seção 5, foram realizados testes de variância ANOVA (fator único), garantindo assim, que não haveria diferença significativa ( $F < F_{\text{crítico}}$ ) entre utilizar a PANi-sílica dopada com HCl ou a PANi-sílica dopada com ácido oxálico, sendo que os resultados destes testes podem ser observados na Tabela 3-A do Apêndice A. Desta forma, a PANi-sílica dopada com HCl foi selecionada e utilizada nas otimizações posteriores.

Uma comparação foi feita avaliando a eficiência de extração da PANi-sílica dopada com HCl à de outros materiais comercialmente disponíveis (FL-PR e C18-E) provenientes de cartuchos de SPE. O uso destas fases comerciais pode ser justificado pela sua disponibilidade no laboratório no momento do estudo em questão e também pelo fato de que esses materiais podem ser utilizados para extração de analitos polares ou hidrofóbicos. Os resultados desta comparação podem ser vistos na Figura 32.

Figura 32 – Gráfico de barras obtido para avaliar a eficiência de extração da PAni-sílica dopada com HCl, em comparação com materiais comerciais. Condições TF-SPME: 1,5 mL de água ultrapura fortificada com  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  de cada analito, 90 minutos de extração, pH = 3 e sem adição de sal, dessorção líquida com  $300 \mu\text{L}$  de ACN e 20 minutos de dessorção.



Fonte: Autoria própria (2023).

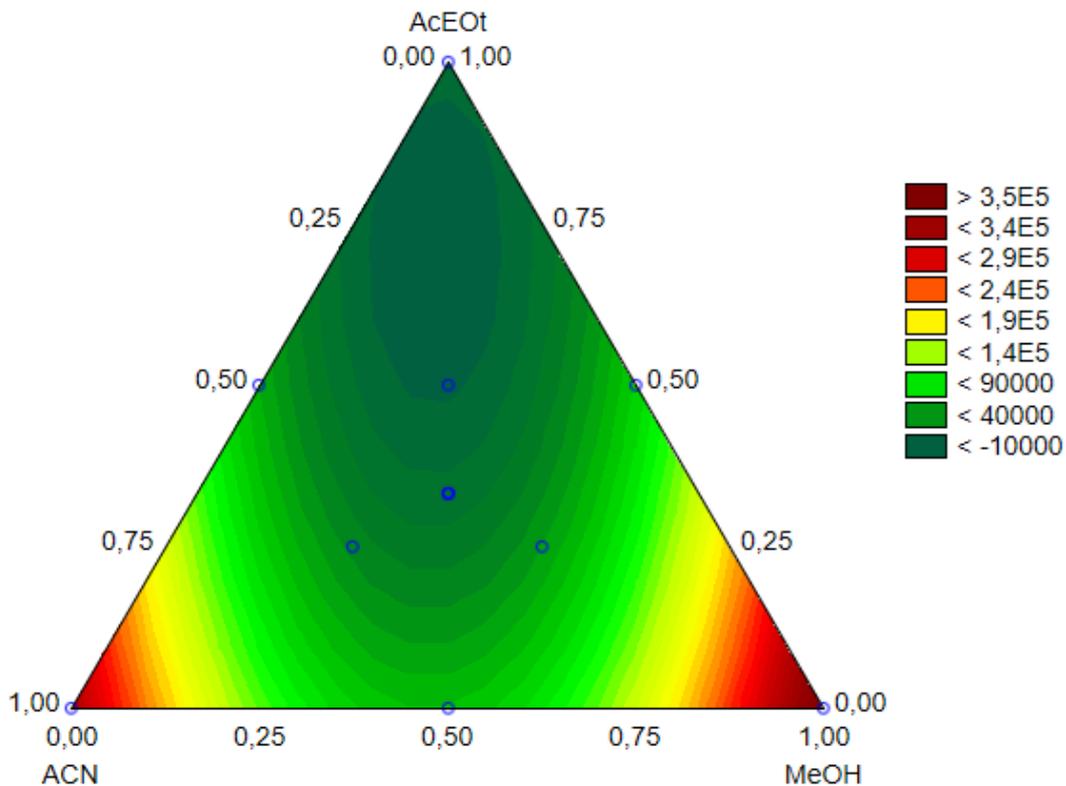
Como visto na Figura 32, comparando a PAni-dopada com HCl com as fases extratoras comerciais, a extração da ASP e do AME empregando a PAni-sílica dopada com HCl apresentou as maiores respostas cromatográficas (100%), entretanto, os resultados encontrados na extração do NAP e do IBU também podem ser considerados satisfatórios (>80%), uma vez que o objetivo deste trabalho é realizar a determinação/quantificação de todos os analitos, o que não poderia ser feito para ASP, utilizando fases extratoras comerciais.

### 6.3.2 Otimização do solvente de dessorção

Conforme mencionado anteriormente, a otimização do solvente de dessorção é uma etapa de extrema importância, pois tem como finalidade verificar qual o solvente ou mistura de solventes seria mais eficaz para dessorver uma maior quantidade de analitos que estariam interagindo, neste caso, com a PAni-sílica

dopada com HCl e conseqüentemente, fornecer as melhores respostas cromatográficas. Os resultados obtidos podem ser observados na Figura 33.

Figura 33 – Superfície de resposta obtida utilizando um planejamento *simplex-centróide* para otimização do solvente de dessorção ( $R^2 = 0,9538$ ). Condições TF-SPME: 1,5 mL de água ultrapura fortificada com  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  de cada analito, 90 minutos de extração, pH da água ajustado para 3 e sem adição de sal, dessorção líquida com  $300 \mu\text{L}$  de diferentes solventes e 20 minutos de dessorção.



Fonte: Autoria própria (2023).

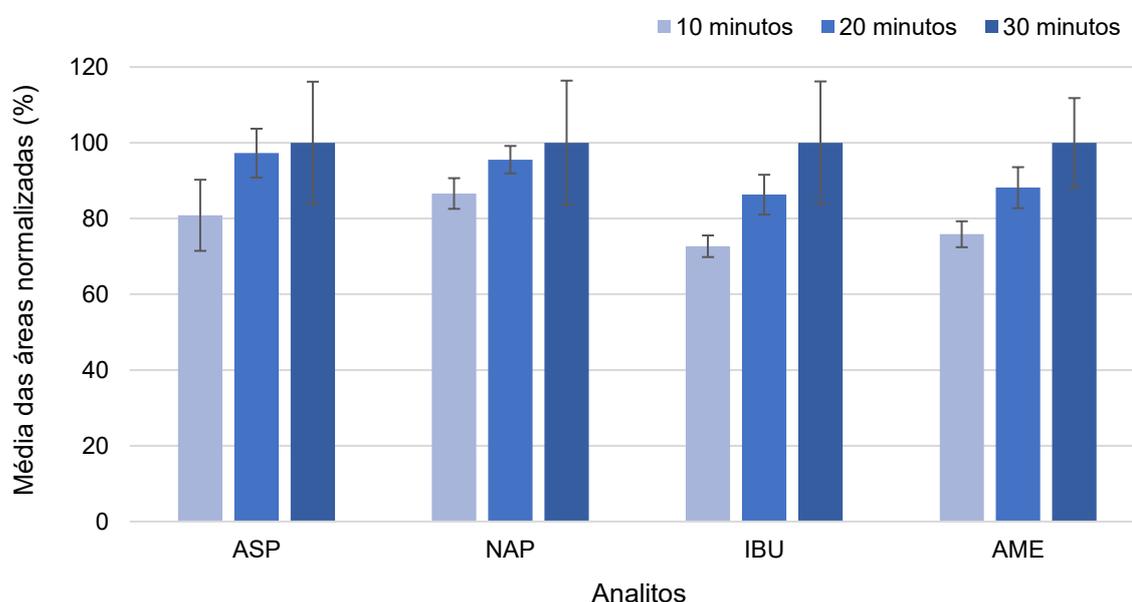
De acordo com a Figura 33, a superfície de resposta foi obtida a partir da média geométrica das áreas dos picos cromatográficos, utilizando uma função quadrática ( $R^2 = 0,9538$ ) e a Tabela ANOVA referente a esta superfície é apresentada na Tabela 4-A do Apêndice A. As menores respostas foram obtidas em experimentos que utilizaram AcEot, independente da proporção, pois este solvente causava uma interferência no cromatograma, sendo que os picos de alguns analitos não eram visualizados quando se utilizava este solvente. Duas regiões de resposta máxima são observadas, sendo uma delas composta por 100% de ACN e outra por

100% de MeOH. Considerando que um dos solventes utilizados como fase móvel na separação cromatográfica era ACN, optou-se pela seleção e utilização de ACN como solvente de dessorção, sendo esta condição mantida nas otimizações posteriores.

### 6.3.3 Otimização do tempo de dessorção

Nesta metodologia, o tempo de dessorção também foi otimizado, conforme descrito anteriormente na seção 6.2.5.2. Os resultados obtidos para essa otimização estão apresentados na Figura 34.

Figura 34 – Gráfico de barras obtido para otimização do tempo de dessorção. Condições TF-SPME: 1,5 mL de água ultrapura fortificada com  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  de cada analito, 90 minutos de extração, pH da água ajustado para 3 e sem adição de sal, dessorção líquida com  $300 \mu\text{L}$  de ACN e diferentes tempos de dessorção.



Fonte: Autoria própria (2023).

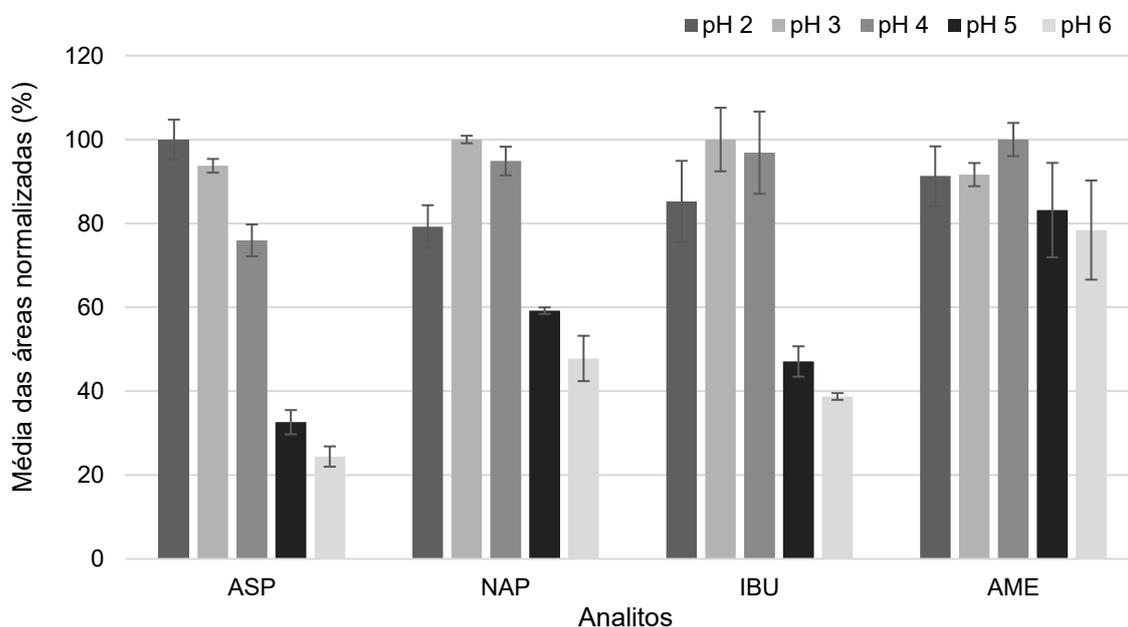
De acordo com os resultados obtidos no gráfico de barras apresentado na Figura 34, a medida que o tempo de dessorção foi aumentando, a média das áreas normalizadas para cada um dos analitos também aumentou, e esse comportamento provavelmente aconteceu porque quanto maior o tempo envolvido na dessorção, uma maior quantidade de analitos é dessorvida. Os melhores resultados (>80%)

foram obtidos em 20 e 30 minutos de dessorção, entretanto, 30 minutos apresentou os maiores valores de RSD. Com a finalidade de favorecer a frequência analítica do método, foram realizados testes de variância ANOVA, onde se pode verificar, através dos resultados apresentados na Tabela 5-A (Apêndice A), que não havia diferença significativa ( $F < F_{\text{crítico}}$ ) entre utilizar 20 ou 30 minutos de dessorção, logo, optou-se por selecionar o tempo de 20 minutos como condição otimizada.

#### 6.3.4 Otimização do pH da amostra

A otimização do pH da amostra foi feita e os resultados obtidos estão apresentados na Figura 35.

Figura 35 – Gráfico de barras obtido para otimização do pH da amostra. Condições TF-SPME: 1,5 mL de água ultrapura fortificada com  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  de cada analito, 90 minutos de extração, diferentes valores de pH e sem adição de sal, dessorção líquida com  $300 \mu\text{L}$  de ACN e 20 minutos de dessorção.

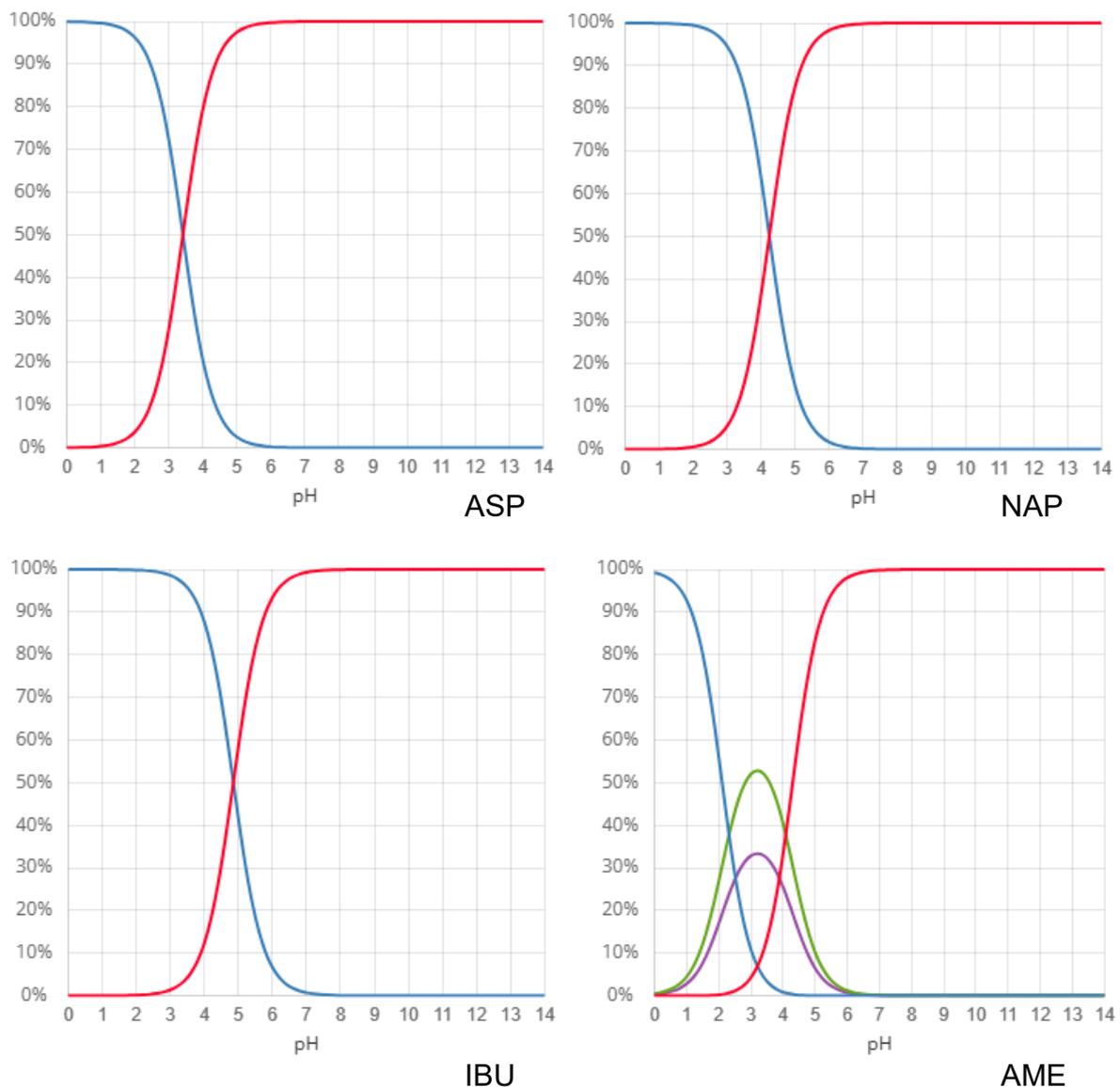


Fonte: Autoria própria (2023).

De acordo com a Figura 35, nota-se que a média das áreas normalizadas de cada analito variou conforme foi feita a mudança do pH da amostra. Geralmente, em técnicas de preparo de amostra, a extração dos analitos é favorecida quando estes

se encontram em sua forma neutra (pH da amostra < pKa do analito), pois ocorre um aumento no número de interações do tipo  $\pi$ - $\pi$  e ligações de hidrogênio com a fase extratora (Comelli *et al.*, 2022; Yang *et al.*, 2023). Sendo assim, juntamente com o gráfico de distribuição de espécies (Figura 36), o comportamento de cada analito pode ser justificado.

Figura 36 – Gráfico de distribuição de espécies em função do pH da amostra. \*Analitos: ASP, NAP e IBU, a linha em azul representa a espécie neutra e a linha vermelha representa a espécie ionizada. No caso do AME, existem quatro linhas, sendo uma delas representando a espécie neutra (verde) e as outras, as espécies ionizadas.



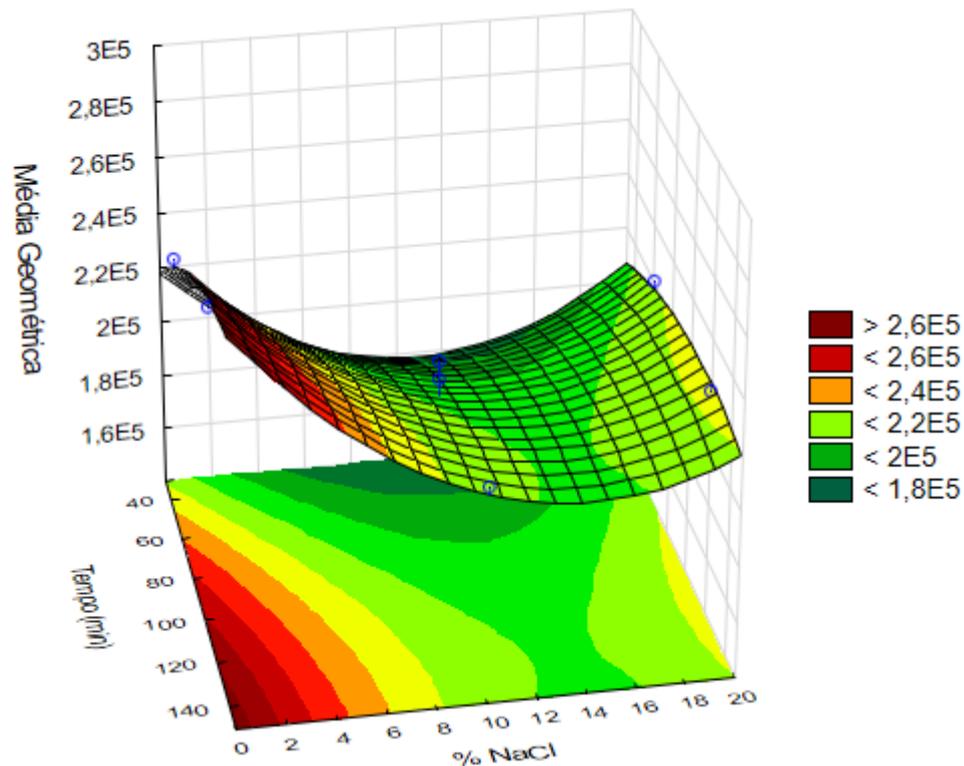
Fonte: Autoria própria (2023).

Na extração da ASP, os melhores resultados (>80%) foram obtidos em valores de pH 2 e pH 3, isso porque o pKa da ASP é 3,49; logo, abaixo deste valor de pH, uma proporção maior do analito estará presente na amostra em sua forma neutra. No caso do NAP e do IBU, o perfil da resposta cromatográfica foi semelhante, o que era esperado, pois estes analitos apresentam valores de pKas próximos (NAP – 4,15 e IBU – 4,96). Os resultados obtidos para o AME diferem dos resultados obtidos para o NAP, mesmo ambos tendo praticamente o mesmo valor de pKa (AME – 5,12), isso provavelmente aconteceu porque o AME apresenta mais de um hidrogênio ionizável, ou seja, após a mudança de pH, este analito pode ser encontrado em mais de duas formas na amostra. Apesar de que não foram obtidos bons resultados empregando valores de pH maiores que o pKa, ainda foi possível observar que ocorrem interações eletrostáticas, mesmo que em menores proporções, entre a fase extratora e os analitos em sua forma ionizada. Como os melhores resultados (>80%) foram obtidos em pH 3, este pH foi selecionado e mantido como condição otimizada.

### **6.3.5 Otimização do tempo de extração e % de NaCl**

Para esta otimização, os experimentos foram feitos variando as condições de tempo de extração e % de NaCl na amostra, conforme descrito anteriormente na Tabela 11. A partir da média geométrica das áreas dos picos cromatográficos foi obtida a superfície de resposta apresentada na Figura 37, que foi baseada em uma função quadrática gerando um  $R^2 = 0,9010$ . Ademais, a Tabela ANOVA é apresentada na Tabela 6-A (Apêndice A). A condição ótima de extração foi obtida empregando um tempo de extração de aproximadamente 100 minutos e sem a adição de NaCl.

Figura 37 – Superfície de resposta obtida utilizando o planejamento *Doehlert* para otimização do tempo de extração e % de NaCl ( $R^2 = 0,9010$ ). Condições TF-SPME: 1,5 mL de água ultrapura fortificada com  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  de cada analito, pH da água ajustado para 3, variando o tempo de extração e o percentual de NaCl, dessorção líquida com  $300 \mu\text{L}$  de ACN e 20 minutos de dessorção.



Fonte: Autoria própria (2023).

A questão do tempo de extração pode ser justificada, pois conforme mencionado anteriormente, assim como na técnica de SPME, na TF-SPME, o tempo de extração deve ser suficiente para atingir o equilíbrio de distribuição dos analitos na fase extratora e na amostra. Neste caso, o aumento no % de NaCl não forneceu boas respostas cromatográficas, isso provavelmente aconteceu, pois, a polaridade dos analitos é relativamente baixa ( $\log Kow \geq 3,97$ ), exceto no caso da ASP ( $\log Kow = 1,19$ ) e do NAP ( $\log Kow = 3,18$ ), ou seja, a eficiência de extração não foi influenciada pelo efeito *salting out*, que ocorre principalmente quando a solubilidade dos analitos de média a alta polaridade ( $\log Kow < 3,5$ ), diminui com a adição de sal na amostra, fazendo com que a sua migração para fase extratora seja favorecida (Corazza *et al.*, 2017; Dias *et al.*, 2015). Além de que, a presença de sal pode ter

provocado um aumento da viscosidade da amostra e conseqüentemente, limitando a migração dos analitos para a fase extratora (PAni-sílica dopada com HCl).

Por fim, as condições otimizadas deste método foram estabelecidas empregando PAni-sílica dopada com ácido oxálico como fase extratora, 1,5 mL de água ultrapura, 100 minutos de extração, pH ajustado para 3 e sem adição de sal. Na etapa de dessorção, 300 µL de ACN e 20 minutos de dessorção.

### 6.3.6 Parâmetros analíticos de mérito

A validação do método foi feita primeiramente através da obtenção dos parâmetros analíticos de mérito, onde as curvas de calibração (Figura 2-A, do Apêndice A) foram construídas com adição de padrão em água ultrapura e os resultados estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 – Faixa linear de trabalho, equação linear, coeficiente de determinação ( $R^2$ ), LOD e LOQ dos analitos no método proposto.

Analitos	Faixa linear		$R^2$	LOD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LOQ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
	de trabalho ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Equação linear			
ASP	15 – 500	$y = 157,98x + 2856,4$	0,9971	4,55	15
NAP	15 – 500	$y = 1868,2x - 6656,4$	0,9991	4,55	15
IBU	15 – 500	$y = 363,55x - 1332,1$	0,9987	4,55	15
AME	15 – 500	$y = 839,63x - 1676,1$	0,9957	4,55	15

Fonte: Autoria própria (2023).

De acordo com a Tabela 12, os coeficientes de correlação linear variaram de 0,9971 para ASP, 0,9991 para NAP, 0,9987 para IBU e 0,9957 para AME, o que indica boas correlações entre os dados e que estes se encontram pouco dispersos em relação à curva de calibração. Os valores de LOD e LOQ variaram de 4,55 e 15  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente. A aplicabilidade e a exatidão da metodologia foram avaliadas por meio dos ensaios de precisão intradia e interdia e recuperações relativas para cada um dos analitos. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela

13. Neste estudo, a amostra de água utilizada foi aquela coletada no Ponto 1 (Quadro 2), ou seja, uma amostra diferente da que foi utilizada na curva de calibração (água ultrapura) e um dos cromatogramas obtidos pode ser visualizado na Figura 38. As demais amostras foram analisadas para aplicação do método.

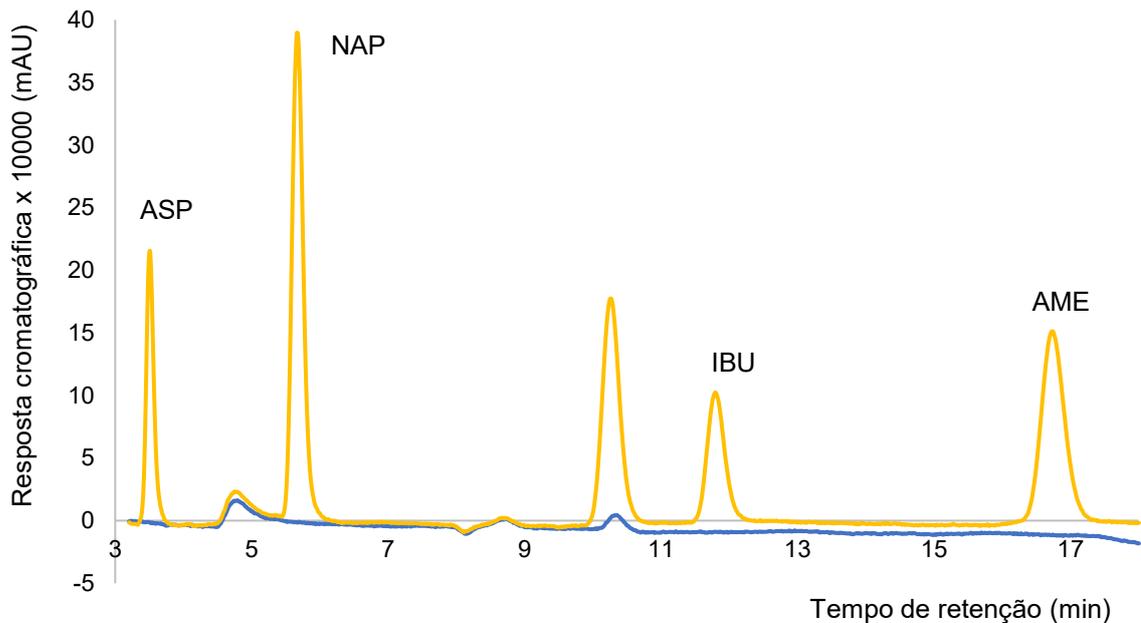
Tabela 13 – Recuperação relativa e precisões intradia e interdia.

Analitos	Fortificação ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Recuperação	Precisão	Precisão
		relativa (%) (n=3)	intradia (RSD) (%) (n=3)	interdia (RSD) (%) (n=9)
ASP	50	93	6	15
	200	112	5	12
	500	117	2	14
NAP	50	110	6	15
	200	102	3	9
	500	100	2	6
IBU	50	84	4	9
	200	92	1	9
	500	97	3	6
AME	50	81	8	12
	200	90	6	14
	500	89	4	11

Fonte: Autoria própria (2023).

Como visto na Tabela 13, os valores de precisão intradia e interdia variaram de 1 a 8% e de 6 a 15%, respectivamente, ambos considerados satisfatórios. As recuperações relativas dos analitos variaram de 81 a 117% e estão de acordo com o que é estabelecido pelo Guia de Validação da Associação de Químicos Analíticos Oficiais (AOAC, 2016).

Figura 38 – Cromatogramas do branco (azul) e da amostra de água fortificada (amarelo), obtidos no estudo da recuperação relativa. Condições TF-SPME: 1,5 mL de água com  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  de cada analito, 100 minutos de extração, pH da água ajustado para 3 e sem adição de sal, dessorção líquida com  $300 \mu\text{L}$  de ACN e 20 minutos de dessorção.



Fonte: Autoria própria (2023).

Seis amostras de água foram coletadas em diferentes pontos, conforme descrito no Quadro 2 e analisadas sem fortificação, sendo que os resultados obtidos estão descritos na Tabela 14, como visto, os analitos NAP e IBU não foram detectados em nenhuma das amostras analisadas, enquanto que a ASP e o AME foram identificados e determinados nas amostras coletadas nos pontos 2, 3, 5 e 6 e não foram detectados nas amostras de água coletadas nos pontos 1 e 4. As concentrações encontradas foram de 23 a  $62 \mu\text{g L}^{-1}$  para ASP e de 27 a  $46 \mu\text{g L}^{-1}$  para o AME. A presença destes analitos em diferentes amostras de água pode ser atribuída à uma possível contaminação, decorrente de descarte inadequado do esgoto doméstico lançado no ambiente próximo aos pontos onde as amostras foram coletadas, considerando que estas foram coletadas em regiões de alta densidade demográfica.

Tabela 14 – Análise das amostras de água.

Ponto de coleta	Concentração encontrada ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )			
	ASP	NAP	IBU	AME
1	ND	ND	ND	ND
2	42	ND	ND	46
3	23	ND	ND	27
4	ND	ND	ND	ND
5	60	ND	ND	42
6	62	ND	ND	44

ND: não detectado. Fonte: Autoria própria (2023).

Foi feita uma comparação do método desenvolvido com outros métodos publicados na literatura para a determinação de anti-inflamatórios não esteroidais e esta comparação está apresentada na Tabela 15. Conforme é possível observar, os valores de LOQ para este método foram elevados, quando comparados aos valores encontrados em outros métodos. No entanto, deve-se ressaltar que os outros métodos utilizaram diferentes formas de cálculo do LOQ e outras técnicas analíticas instrumentais, como LC-MS ou GC-MS, que apresentam uma maior sensibilidade. O método proposto foi o primeiro a utilizar TF-SPME com PAni-sílica dopada com HCl como fase extratora na quantificação de todos os analitos (ASP, NAP, IBU e AME), sendo esta fase obtida facilmente através da síntese, utilizando poucos reagentes, o que reduz o custo envolvido em relação ao custo de uma fase extratora comercial, como por exemplo, Oasis<sup>TM</sup> HBL. Além disso, os métodos encontrados na literatura utilizaram grandes volumes de amostra (variando de 5 mL a 300 mL) e tempos totais de preparo por amostra mais longos (de 3,5 min a 110 min). O método aqui relatado requer apenas 1,5 mL e um tempo total de preparo de aproximadamente 1,5 min por amostra, se o sistema de placas de 96 poços de amostragem for operado na capacidade máxima, logo o método apresenta alta frequência analítica, já que várias amostras podem ser analisadas simultaneamente.

Tabela 15 – Comparação do método proposto com outros métodos relatados na literatura para a determinação de anti-inflamatórios não esteroidais em amostras de água.

(continua)

Analitos	LOQ (ug L <sup>-1</sup> )	Técnica de extração	Fase extratora	Volume de amostra – Tempo total de preparo por amostra	Técnica analítica	Ref.
ASP NAP IBU AME	15	TF-SPME	PAni-sílica dopada com HCl	1,5 mL – 1,5 min	HPLC-DAD	Este estudo
ASP NAP IBU	2,74 0,44 1,89	SPE	COF@PS-GMA	10 mL – 11 min	HPLC-UV	Li <i>et al.</i> (2018)
ASP NAP IBU AME	0,032 0,024 0,007 0,019	RDSE	Cartucho Oasis™ HBL	50 mL – 110 min	GC-MS	Manzo <i>et al.</i> (2014)
NAP IBU AME	0,60 3,20 0,78	MSPE	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @MIL-101(Cr)	5 mL – 3,5 min	HPLC-UV	Yang <i>et al.</i> (2023)
NAP IBU	*	SPE	MOF-199	50 mL – não informado	HPLC-UV	Amiri e Ghaemi (2021)
IBU	0,271	SPE	Cartucho Oasis™ HBL	300 mL – 80 min	LC-MS	Matongo <i>et al.</i> (2015)

Tabela 15 – Comparação do método proposto com outros métodos relatados na literatura para a determinação de anti-inflamatórios não esteroidais em amostras de água.

(conclusão)

Analitos	LOQ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Técnica de extração	Fase extratora	Volume de amostra – Tempo total de preparo por amostra	Técnica analítica	Ref.
ASP NAP IBU	1,287 0,642 0,015	SPE	LDH-ACA	10 mL – 11 min	HPLC-UV	Shafiei-Navid, Hosseinzadeh e Ghani (2022)
NAP IBU	36,9 20,2	SPE	poli(HEMA-co-EDMA)	25 mL – 60 min	HPLC-DAD	Medina, Acquaviva e Reta (2020)
NAP IBU	0,40 0,9	MSPE	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @IL- HCP	25 mL – 12 min	HPLC-DAD	Han <i>et al.</i> (2023)
NAP IBU	8 98	SPE	MWCNTs	10 mL – 30 min	HPLC-DAD	Al-Khateeb e Dahas (2021)
NAP IBU	0,495 0,282	MSPE	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @MON-PEI <sub>600</sub>	10 mL – 20 min	HPLC-UV	He <i>et al.</i> (2021)
NAP IBU	0,10 0,05	MSPE	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @PSB	Não informado – 5 min	HPLC-UV	Yeganeh-Salman <i>et al.</i> (2022)

\*Apenas o LOD foi informado (NAP e IBU, LOD = 0,01 e 0,02  $\mu\text{g L}^{-1}$ ); TF-SPME: microextração em fase sólida de filme fino; SPE: extração em fase sólida; RDSE: extração sortiva em disco rotativo; MSPE: extração em fase sólida magnética; HPLC-DAD: cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos; HPLC-UV: cromatografia líquida de alta eficiência por detecção ultravioleta; GC-MS: cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas; LC-MS: cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massas.

#### 6.4 CONCLUSÕES PARCIAIS

Neste estudo, uma metodologia de alta frequência analítica foi desenvolvida com sucesso para extração e determinação de quatro anti-inflamatórios não esteroidais (ASP, NAP, IBU e AME) em amostras de água usando PANi-sílica dopada com HCl como nova fase extratora na técnica de TF-SPME associada ao sistema de placas de 96 poços de amostragem. A condição otimizada foi obtida com 1,5 mL de água, com ajuste de pH para aproximadamente pH = 3 e sem adição de sal, 300 µL de ACN foram utilizados na dessorção. O tempo de extração foi de aproximadamente 1 minuto por amostra e o tempo de dessorção foi de 0,20 segundos por amostra, mais uma vez, considerou-se esta condição quando a capacidade máxima do sistema de placas de poços de amostragem é utilizada. A metodologia exibiu resultados satisfatórios, incluindo valores de LOD e LOQ na faixa de 4,55 a 15%, os coeficientes de correlação linear ( $r$ ) foram iguais ou superiores a 0,995. As recuperações relativas variaram de 81% a 117%, e as precisões intradia e interdia ( $n = 3$  e  $n = 9$ , respectivamente) foram iguais ou inferiores a 15%, sendo considerados valores aceitáveis, uma vez que estão de acordo com o que foi estabelecido pelo Guia de Validação da Associação de Químicos Analíticos Oficiais. A quantificação de dois dos analitos (ASP e AME) foi realizada em amostras reais a partir desta metodologia. Ademais, alguns aspectos amigáveis podem ser destacados, se comparados se comparados com outros métodos reportados na literatura, como um menor uso de amostra, fase extratora e consumo de solvente orgânico, logo a geração de resíduos foi reduzida.

## 7 CONCLUSÃO FINAL E PERSPECTIVAS

A partir deste trabalho foi possível comprovar que diferentes PANis podem ser utilizadas como fase extratora em TF-SPME. A simplicidade da síntese e o baixo custo envolvido possibilitou obter facilmente estas PANis, as quais foram posteriormente caracterizadas e avaliadas em metodologias distintas. Em ambas as metodologias, otimizações univariadas e multivariadas foram utilizadas, o tempo total de preparo por amostra foi relativamente baixo, uma vez que aproximadamente 1,5 minutos são requeridos, o que favorece para uma boa frequência analítica dos métodos, ressaltando o uso do sistema de placas de poços de amostragem. Na primeira metodologia, os valores de coeficiente de determinação foram maiores ou iguais a 0,9969, a recuperação relativa variou de 71-115%, os valores de precisão intradia foram menores ou iguais a 12% e precisão interdía menores ou iguais a 20%. Já na segunda metodologia, os valores de coeficiente de determinação foram maiores ou iguais a 0,9957, a recuperação relativa variou de 81-117%, os valores de precisão intradia foram menores ou iguais a 8% e precisão interdía menores ou iguais a 15%. Estando de acordo com os limites aceitáveis estabelecidos pela AOAC. Diante dos resultados obtidos neste trabalho e de todo o conhecimento adquirido durante a sua realização, como perspectivas futuras sugere-se uma continuação desta linha de pesquisa, aprofundando o estudo da utilização destas PANis em outras técnicas miniaturizadas de preparo de amostra, buscando a extração/determinação de outras classes de compostos em outras matrizes, como amostras alimentícias ou até mesmo amostras biológicas, como por exemplo, saliva e plasma. Um diferencial também seria averiguar outras possíveis formas de caracterização a se fazer, como a espectroscopia fotoeletrônica de raios-X (XPS), que teria como finalidade fornecer informações detalhadas sobre o estado de oxidação e composição elementar de cada PANi e a análise termogravimétrica (TGA), que visa avaliar o comportamento térmico a partir da variação de massa em função da temperatura, desta forma, o embasamento científico relacionado a identificação e compreensão destas PANis seria aprofundado.

## REFERÊNCIAS

ADEEL, Muhammad *et al.* Environmental impact of estrogens on human, animal and plant life: A critical review. **Environ Int**, v. 99, p. 107–119, 2017.

ALAMPANOS, Vasileios; SAMANIDOU, Victoria. An overview of sample preparation approaches prior to liquid chromatography methods for the determination of parabens in biological matrices. **Microchemical Journal**, v. 164, p. 105995, 2021.

ALIZADEH, Mohammad; PIRSA, Sajad; FARAJI, Nasrin. Determination of Lemon Juice Adulteration by Analysis of Gas Chromatography Profile of Volatile Organic Compounds Extracted with Nano-Sized Polyester-Polyaniline Fiber. **Food Analytical Methods**, v. 10, n. 6, p. 2092–2101, 2017.

AL-KHATEEB, Lateefa A.; DAHAS, Fatimah A. Green method development approach of superheated water liquid chromatography for separation and trace determination of non-steroidal anti-inflammatory compounds in pharmaceutical and water samples and their extraction. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 14, n. 7, p. 103226, 2021.

AMIRI, Amirhassan; GHAEMI, Ferial. Solid-phase extraction of non-steroidal anti-inflammatory drugs in human plasma and water samples using sol–gel-based metal-organic framework coating. **Journal of Chromatography A**, v. 1648, p. 462168, 2021.

AMOLI, Hossein Salar; YAMINI, Yadollah; DARMANI, Hossein. Polyoxomolybdate/polyaniline nanocomposite as a novel fiber for solid-phase microextraction of antidepressant drugs in biological samples. **Journal of Separation Science**, v. 43, n. 13, p. 2636–2645, 2020.

AMORIM, K. P. de; ANDRADE, L. S. Development and application of a cloud point method for the extraction of natural estrogens E1 and E2 from urine samples and their simultaneous determination by HPLC-EC using a BDD electrode. **Anal Methods**, v. 9, p. 1627–1633, 2017.

AOAC. **Official Methods of Analysis, Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements**. 2016.

ARAUJO, Joyce R. *et al.* Characterization of Polyaniline-Based Blends, Composites, and Nanocomposites. **POLYANILINE BLENDS, COMPOSITES, AND NANOCOMPOSITES**. Elsevier, 2018. p. 209–233.

ASIABI, Hamid *et al.* Electroplating of nanostructured polyaniline–polypyrrole composite coating in a stainless-steel tube for on-line in-tube solid phase microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1397, p. 19–26, 2015.

BAGHERI, Habib *et al.* A metal organic framework-polyaniline nanocomposite as a fiber coating for solid phase microextraction. **J Chromatogr A**, v. 1431, p. 27–35, 2016.

BAGHERI, Habib; AGHAKHANI, Ali. Polyaniline-nylon-6 electrospun nanofibers for headspace adsorptive microextraction. **Anal Chim Acta**, v. 713, p. 63–69, 2012.

BEDNARCZYK, Katarzyna *et al.* Effect of polyaniline content and protonating dopants on electroconductive composites. **Sci Rep**, v. 11, p. 7487, 2021.

BEYGISANGCHIN, Mahnoush *et al.* Preparations, Properties, and Applications of Polyaniline and Polyaniline Thin Films—A Review. **Polymers**, v. 13, n. 12, p. 2003, 2021.

BHANDARI, Subhendu. Polyaniline: Structure and Properties Relationship. **POLYANILINE BLENDS, COMPOSITES, AND NANOCOMPOSITES**. Elsevier, 2018. p. 23–60.

BOEVA, Zh. A.; SERGEYEV, V. G. Polyaniline: Synthesis, properties, and application. **Polym Sci Ser C**, v. 56, n. 1, p. 144–153, 2014.

BOYACI, Ezel *et al.* A study of thin film solid phase microextraction methods for analysis of fluorinated benzoic acids in seawater. **Journal of Chromatography A**, v. 1436, p. 51–58, 2016.

BOYACI, Ezel *et al.* Sample preparation with solid phase microextraction and exhaustive extraction approaches: Comparison for challenging cases. **Analytica Chimica Acta**, v. 873, p. 14–30, 2015.

BRUHEIM, Inge; LIU, Xiaochuan; PAWLISZYN, Janusz. Thin-Film Microextraction. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 4, p. 1002–1010, 2003.

BUDI, S *et al.* Surface area and conductivity of polyaniline synthesized under UV irradiation. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, v. 172, p. 012049, 2017.

CANPOLAT, Gurbet *et al.* Sample Preparation with Conductive Polymers. **Acs Symposium Series**, 2022. p. 119–140.

CARASEK, Eduardo; MORÉS, Lucas; MERIB, Josias. Basic principles, recent trends and future directions of microextraction techniques for the analysis of

aqueous environmental samples. **Trends in Environmental Analytical Chemistry**, v. 19, p. e00060, 2018.

CÁRDENAS-SORACÁ, Diana M. *et al.* Development of thin-film solid-phase microextraction coating and method for determination of artificial sweeteners in surface waters. **Talanta**, v. 211, p. 120714, 2020.

CARMO, Sângela Nascimento do; MERIB, Josias; CARASEK, Eduardo. 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. **J Chromatogr B**, v. 1118–1119, p. 17–24, 2019.

CHANG, Bea-Ven *et al.* Removal of emerging contaminants using spent mushroom compost. **Science of The Total Environment**, v. 634, p. 922–933, 2018.

CHAVES, Andréa R. *et al.* The development of a new disposable pipette extraction phase based on polyaniline composites for the determination of levels of antidepressants in plasma samples. **J Chromatogr A**, [s. l.], v. 1399, p. 1–7, 2015.

CHIANG, Jin-Chih; MACDIARMID, Alan G. 'Polyaniline': Protonic acid doping of the emeraldine form to the metallic regime. **Synth Met**, v. 13, p. 193–205, 1986.

CHINNAPPAN, Amutha *et al.* Fabrication of MWCNT/Cu nanofibers via electrospinning method and analysis of their electrical conductivity by four-probe method. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 43, n. 2, p. 721–729, 2018.

ĆIRIĆ-MARJANOVIĆ, Gordana *et al.* Synthesis and Characterization of Self-Assembled Polyaniline Nanotubes/Silica Nanocomposites. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 113, n. 20, p. 7116–7127, 2009.

COMELLI, Heloisa *et al.* Disposable Pipette Extraction (DPX) Coupled to HPLC-DAD as an Alternative for the Determination of Phthalic Monoesters in Urine Samples. **Separations**, v. 9, n. 10, p. 294, 2022.

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

DALVAND, Kolsoum; GHIASVAND, Alireza. Simultaneous analysis of PAHs and BTEX in soil by a needle trap device coupled with GC-FID and using response surface methodology involving Box-Behnken design. **Analytica Chimica Acta**, v. 1083, p. 119–129, 2019.

DARVISHNEJAD, Fatemeh; RAOOF, Jahan Bakhsh; GHANI, Milad. In-situ synthesis of nanocubic cobalt oxide @ graphene oxide nanocomposite reinforced hollow fiber-solid phase microextraction for enrichment of non-steroidal anti-inflammatory drugs from human urine prior to their quantification via high-performance liquid chromatography-ultraviolet detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1641, p. 461984, 2021.

DAVIS, Peter J. *et al.* Pharmacology of Pediatric Anesthesia. *In: SMITH'S ANESTHESIA FOR INFANTS AND CHILDREN*. Elsevier, 2011. p. 179–261.

DE OLIVEIRA, Hanna Leijoto *et al.* Microextraction by packed sorbent using a new restricted molecularly imprinted polymer for the determination of estrogens from human urine samples. **Microchem J**, v. 150, p. 104162, 2019.

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

DIMPE, K. Mogolodi; NOMNGONGO, Philiswa N. Current sample preparation methodologies for analysis of emerging pollutants in different environmental matrices. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 82, p. 199–207, 2016.

DLAMINI, Mbongiseni Lungelo *et al.* Polyaniline nanofibers, a nanostructured conducting polymer for the remediation of Methyl orange dye from aqueous solutions in fixed-bed column studies. **Heliyon**, [s. l.], v. 7, n. 10, p. e08180, 2021.

DMITRIEVA, Ekaterina *et al.* Quantification of steroid hormones in human urine by DLLME and UHPLC-HRMS detection. **J Chromatogr B**, v. 1159, p. 122390, 2020.

DMITRIEVA, E.V. *et al.* Solid-phase analytical derivatization as a tool for the quantification of steroid hormones in human urine with HPLC-Q-ToF detection. **J Pharm Biomed Anal**, v. 214, p. 114736, 2022.

DUHAN, Monika; KAUR, Raminder. Adsorptive removal of methyl orange with polyaniline nanofibers: an unconventional adsorbent for water treatment. **Environmental Technology**, v. 41, n. 23, p. 2977–2990, 2020.

DZIEDZIC, Daniel *et al.* Nanostructured polyaniline SPME fiber coating for chemical warfare agents analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 1202, p. 339649, 2022.

FAN, Wenying *et al.* Spiral stir bar sorptive extraction with polyaniline-polydimethylsiloxane sol-gel packings for the analysis of trace estrogens in environmental water and animal-derived food samples. **Journal of Separation Science**, v. 43, n. 6, p. 1137–1144, 2020.

FERNANDO, Jessica; VEDHI, C. Synthesis, spectral characterization and electrochemical behavior of oxalic acid doped polyanilines. **Mater Today Proc**, v. 48, p. 174–180, 2022.

FUMES, Bruno Henrique *et al.* Recent advances and future trends in new materials for sample preparation. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 9–25, 2015.

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

GHIASVAND, Alireza *et al.* A comparison study on a sulfonated graphene-polyaniline nanocomposite coated fiber for analysis of nicotine in solid samples through the traditional and vacuum-assisted HS-SPME. **J Pharm Biomed Anal**, v. 149, p. 271–277, 2018.

GHIASVAND, Alireza *et al.* A solid-phase microextraction platinized stainless steel fiber coated with a multiwalled carbon nanotube-polyaniline nanocomposite film for the extraction of thymol and carvacrol in medicinal plants and honey. **Journal of Chromatography A**, v. 1406, p. 87–93, 2015.

GRECCO, Caroline Fernandes; DE SOUZA, Israel Donizeti; QUEIROZ, Maria Eugênia Costa. Novel materials as capillary coatings for in-tube solid-phase microextraction for bioanalysis. **Journal of Separation Science**, v. 44, n. 8, p. 1662–1693, 2021.

HAN, Pengzhao *et al.* Dispersive solid-phase extraction of non-steroidal anti-inflammatory drugs in water and urine samples using a magnetic ionic liquid hypercrosslinked polymer composite. **Journal of Chromatography A**, v. 1689, p. 463745, 2023.

HE, Xin-Qiao *et al.* Fabrication of polyethyleneimine modified magnetic microporous organic network nanosphere for efficient enrichment of non-steroidal anti-inflammatory drugs from wastewater samples prior to HPLC-UV analysis. **Talanta**, v. 233, p. 122471, 2021.

HE, Huan *et al.* Solid-phase microextraction based on polyaniline doped with perfluorooctanesulfonic acid coupled to HPLC for the quantitative determination of chlorophenols in water samples. **Journal of Separation Science**, v. 37, n. 4, p. 427–433, 2014.

HU, Cong *et al.* Simultaneous determination of polar and apolar compounds in environmental samples by a polyaniline/hydroxyl multi-walled carbon nanotubes composite-coated stir bar sorptive extraction coupled with high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1394, p. 36–45, 2015.

IDUMAH, Christopher Igwe. Novel trends in conductive polymeric nanocomposites, and bionanocomposites. **Synthetic Metals**, v. 273, p. 116674, 2021.

IUPAC. Intrinsically Conducting Polymer. *In*: THE IUPAC COMPENDIUM OF CHEMICAL TERMINOLOGY. Research Triangle Park, NC: International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), 2014.

IZADI, Parnian *et al.* Non-steroidal anti-inflammatory drugs in the environment: Where were we and how far we have come?. **Environmental Pollution**, v. 267, p. 115370, 2020.

JADOUN, Sapana *et al.* Tailoring of conducting polymers via copolymerization – A review. **European Polymer Journal**, v. 155, p. 110561, 2021.

JALILI, Vahid *et al.* A comprehensive review on microextraction techniques for sampling and analysis of fuel ether oxygenates in different matrices. **Microchemical Journal**, v. 168, p. 106437, 2021.

JALILI, Vahid; BARKHORDARI, Abdullah; GHIASVAND, Alireza. New extraction media in microextraction techniques. A review of reviews. **Microchemical Journal**, v. 153, p. 104386, 2020.

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

K, Namsheer; ROUT, Chandra Sekhar. Conducting polymers: a comprehensive review on recent advances in synthesis, properties and applications. **RSC Advances**, v. 11, n. 10, p. 5659–5697, 2021.

KANU, A Bakarr. Recent developments in sample preparation techniques combined with high-performance liquid chromatography: A critical review. **Journal of Chromatography A**, v. 1654, p. 462444, 2021.

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

KAUR, Harpreet; SAINI, Deepak; KAUR, Anupreet. Synthesis and Application of Oxalic Acid Doped Silica-Polyaniline Nanocomposition. **J Electron Commun Eng**, v. 15, p. 44–47, 2019.

LAL MEENA, Parmeshwar; KUMAR SAINI, Jitendra; KUMAR SURELA, Ajay. Granite waste mediated synthesis of polyaniline nanofibers for the catalytic reduction of hazardous organic water toxins. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 152, p. 110688, 2023.

LEE, Dong Won; YOO, Bok Ryul. Advanced silica/polymer composites: Materials and applications. **J Ind Eng Chem**, v. 38, p. 1–12, 2016.

LEI, Yun *et al.* Polyaniline/cyclodextrin composite coated stir bar sorptive extraction combined with high performance liquid chromatography-ultraviolet detection for the analysis of trace polychlorinated biphenyls in environmental waters. **Talanta**, v. 150, p. 310–318, 2016.

LETHEBY, H. XXIX.—On the production of a blue substance by the electrolysis of sulphate of aniline. **J. Chem. Soc.**, v. 15, n. 0, p. 161–163, 1862.

LI, Yongfang. Conducting Polymers. **Lecture Notes In Chemistry**, 2015. p. 23–50.

LI, Nan *et al.* Recent advances in sample preparation techniques for quantitative detection of pharmaceuticals in biological samples. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 142, p. 116318, 2021.

LI, Weixia *et al.* Self-assembling covalent organic framework functionalized poly (styrene-divinyl benzene-glycidylmethacrylate) composite for the rapid extraction of non-steroidal anti-inflammatory drugs in wastewater. **Journal of Chromatography A**, v. 1571, p. 76–83, 2018.

LI, Yu; XU, Hui. Development of a novel graphene/polyaniline electrodeposited coating for on-line in-tube solid phase microextraction of aldehydes in human exhaled breath condensate. **Journal of Chromatography A**, v. 1395, p. 23–31, 2015.

LIAO, Keren *et al.* Multiple monolithic fiber solid-phase microextraction based on a polymeric ionic liquid with high-performance liquid chromatography for the determination of steroid sex hormones in water and urine. **J Sep Sci**, v. 39, p. 566–575, 2016.

LIU, Li *et al.* Rapid preparation of robust polyaniline coating on an etched stainless steel wire for solid-phase microextraction of dissolved bisphenol A in drinking water and beverages. **Anal. Methods**, v. 6, n. 10, p. 3467–3473, 2014.

LOPES, Daniela *et al.* A New Approach for Histamine Functionalized Nanoparticles as Sorbent Phase for Bar Adsorptive Microextraction (BA $\mu$ E) and Determination of Parabens in Water by HPLC-DAD. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2022a.

LOPES, Daniela *et al.* Determination of hormones in urine by hollow fiber microporous membrane liquid–liquid extraction associated with 96-well plate system and HPLC-FLD detection. **J Chromatogr B**, v. 1207, p. 123406, 2022b.

MA, Mingguang *et al.* Development of nitrogen-enriched carbonaceous material coated titania nanotubes array as a fiber coating for solid-phase microextraction of ultraviolet filters in environmental water. **Talanta**, v. 167, p. 118–125, 2017.

MA, Li; YATES, Scott R. Dissolved organic matter and estrogen interactions regulate estrogen removal in the aqueous environment: A review. **Science of The Total Environment**, v. 640–641, p. 529–542, 2018.

MAFRA, Gabriela *et al.* Expanding the applicability of cork as extraction phase for disposable pipette extraction in multiresidue analysis of pharmaceuticals in urine samples. **J Chromatogr B**, v. 1102–1103, p. 159–166, 2018.

MANZO, Valentina *et al.* Microextraction of non-steroidal anti-inflammatory drugs from waste water samples by rotating-disk sorptive extraction. **Talanta**, v. 128, p. 486–492, 2014.

MARÍN-SAN ROMÁN, Sandra *et al.* Optimization of thin film-microextraction (TF-SPME) method in order to determine musts volatile compounds. **Analytica Chimica Acta**, v. 1226, p. 340254, 2022.

MARTINEZ-SENA, Teresa *et al.* Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in water and urine using selective molecular imprinted polymer extraction and liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 131, p. 48–53, 2016.

MASOUMI, Vahideh *et al.* Application of polyaniline–multiwalled carbon nanotubes composite fiber for determination of benzaldehyde in injectable pharmaceutical formulations by solid-phase microextraction GC–FID using

experimental design. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 72, n. 3, p. 264–271, 2017.

MATONGO, Solomon *et al.* Pharmaceutical residues in water and sediment of Msunduzi River, KwaZulu-Natal, South Africa. **Chemosphere**, v. 134, p. 133–140, 2015.

MEDINA, Giselle S.; ACQUAVIVA, Agustín; RETA, Mario. Development of monolithic sorbent cartridges (m-SPE) for the extraction of non-steroidal anti-inflammatory drugs from surface waters and their determination by HPLC. **Microchemical Journal**, v. 159, p. 105447, 2020.

MENG, Qinghu *et al.* Synthesis of hypercross-linked hybrid polyanilines from hollow spherical polyaniline and octavinylsilsesquioxane and its dye adsorption performance. **Mater Today Commun**, v. 34, p. 105488, 2023.

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

MOLDOVEANU, Serban; DAVID, Victor. The Role of Sample Preparation. *In*: MODERN SAMPLE PREPARATION FOR CHROMATOGRAPHY. Elsevier, 2015. p. 33–49.

MOLLAHOSSEINI, Afsaneh *et al.* Mechanical stir bar sorptive extraction followed by gas chromatography as a new method for determining polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples. **Microchemical Journal**, v. 126, p. 431–437, 2016.

MOMINA; AHMAD, Kafeel. Study of different polymer nanocomposites and their pollutant removal efficiency: Review. **Polymer**, v. 217, p. 123453, 2021.

MOTA, María L. *et al.* Synthesis and Novel Purification Process of PANI and PANI/AgNPs Composite. **Molecules**, v. 24, n. 8, p. 1621, 2019.

MURTADA, Khaled *et al.* Thin-film microextraction combined with comprehensive two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry screening for presence of multiclass organic pollutants in drinking water samples. **Talanta**, v. 242, p. 123301, 2022.

NASAR, Abu; MASHKOOR, Fouzia. Application of polyaniline-based adsorbents for dye removal from water and wastewater—a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 6, p. 5333–5356, 2019.

NAVEEN, Malenahalli Halappa; GURUDATT, Nanjanagudu Ganesh; SHIM, Yoon-Bo. Applications of conducting polymer composites to electrochemical sensors: A review. **Applied Materials Today**, v. 9, p. 419–433, 2017.

NEPOMUCENO, N.C. *et al.* Evaluation of conductivity of nanostructured polyaniline/cellulose nanocrystals (PANI/CNC) obtained via in situ polymerization. **Journal of Solid State Chemistry**, v. 302, p. 122372, 2021.

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

PEREIRA, Jorge *et al.* Re-exploring the high-throughput potential of microextraction techniques, SPME and MEPS, as powerful strategies for medical diagnostic purposes. Innovative approaches, recent applications and future trends. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, n. 8, p. 2101–2122, 2014.

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

PŁOTKA-WASYLKA, Justyna *et al.* Modern trends in solid phase extraction: New sorbent media. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 77, p. 23–43, 2016.

QAZI, Taimoor H.; RAI, Ranjana; BOCCACCINI, Aldo R. Tissue engineering of electrically responsive tissues using polyaniline based polymers: A review. **Biomaterials**, v. 35, n. 33, p. 9068–9086, 2014.

RAMLAN, Siti Nur Amalina *et al.* Electrically conductive palm oil-based coating with UV curing ability. **Progress in Organic Coatings**, v. 112, p. 9–17, 2017.

RAZA, Saleem *et al.* A comprehensive overview of common conducting polymer-based nanocomposites; Recent advances in design and applications. **European Polymer Journal**, v. 160, p. 110773, 2021.

REHMAN, Sehrish *et al.* Synthesis and Characterization of Polyaniline Doped with Dodecylbenzenesulfonic and Oxalic Acids. **Russ J Phy Chem A**, v. 96, p. S87–S94, 2022.

REMYA DEVI, P.S. Synthesis and characterization of polyaniline composites with silica gel, styrene-divinyl benzene resin beads, calcium alginate and tetraethoxy silane substrates. **Synthetic Metals**, v. 276, p. 116760, 2021.

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

ROOSZ, Nicolas *et al.* Synthesis and characterization of polyaniline-silica composites: Raspberry vs core-shell structures. Where do we stand?. **J Colloid Interface Sci**, v. 502, p. 184–192, 2017.

SARAFRAZ-YAZDI, Ali *et al.* Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in urine by hollow-fiber liquid membrane-protected solid-phase microextraction based on sol–gel fiber coating. **Journal of Chromatography B**, v. 908, p. 67–75, 2012.

SCOPUS. **Polyaniline**. 2023. Disponível em: <https://www-scopus.ez46.periodicos.capes.gov.br/results/results.uri?sort=plf-f&src=s&st1=Polyaniline&sid=73ed246a28f87cf056f5d564bcd2b41e&sot=b&sdt=b&sl=26&s=TITLE-ABS-KEY%28polyaniline%29&origin=searchbasic&editSaveSearch=&yearFrom=Before+1960&yearTo=Present&sessionSearchId=73ed246a28f87cf056f5d564bcd2b41e&limit=10>. Acesso em: 28 fev. 2024.

SHAFIEI-NAVID, Saied; HOSSEINZADEH, Rahman; GHANI, Milad. Solid-phase extraction of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in urine and water samples using acidic calix[4]arene intercalated in LDH followed by quantification via HPLC-UV. **Microchemical Journal**, v. 183, p. 107985, 2022.

SHOAIE, Nahid *et al.* Electrochemical sensors and biosensors based on the use of polyaniline and its nanocomposites: a review on recent advances. **Microchimica Acta**, v. 186, n. 7, p. 465, 2019.

SMY, Laura; STRASESKI, Joely A. Measuring estrogens in women, men, and children: Recent advances 2012–2017. **Clin Biochem**, v. 62, p. 11–23, 2018.

SOARES, Francielle Q. *et al.* Disposable pipette extraction phase based on styrene–divinylbenzene/permanganiline composite, applied for dexamethasone determination in synovial fluid by HPLC with UV detector. **Acta Chromatogr**, v. 31, p. 1–5, 2019.

SOARES DA SILVA BURATO, Juliana *et al.* Recent advances and trends in miniaturized sample preparation techniques. **Journal of Separation Science**, v. 43, n. 1, p. 202–225, 2020.

SOWA, Ireneusz *et al.* Application of solid phase extraction with the use of silica modified with polyaniline film for pretreatment of samples from plant material before HPLC determination of triterpenic acids. **Talanta**, v. 122, p. 51–57, 2014.

SOWA, Ireneusz *et al.* Polyaniline and Polyaniline-Based Materials as Sorbents in Solid-Phase Extraction Techniques. **Materials**, v. 15, n. 24, p. 8881, 2022.

SUN, Min *et al.* Polyaniline/titanium dioxide nanorods functionalized carbon fibers for in-tube solid-phase microextraction of phthalate esters prior to high performance liquid chromatography-diode array detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1642, p. 462003, 2021.

TAGHIZADEH, Ali *et al.* Conductive polymers in water treatment: A review. **Journal of Molecular Liquids**, v. 312, p. 113447, 2020.

TORABI, Elham *et al.* Advanced materials in sorbent-based analytical sample preparation. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 506, p. 215680, 2024.

TURAZZI, Francielle Crocetta *et al.* Polyaniline-silica doped with oxalic acid as a novel extractor phase in thin film solid-phase microextraction for determination of hormones in urine. **Journal of Separation Science**, v. 46, n. 17, 2023.

WANG, Bin *et al.* Polyaniline-coated kapok fibers for convenient in-syringe solid-phase microextraction and determination of organochlorine and pyrethroid pesticide residues in aqueous samples. **Talanta**, v. 271, p. 125706, 2024.

WANG, Rong; LI, Wenqing; CHEN, Zilin. Solid phase microextraction with poly(deep eutectic solvent) monolithic column online coupled to HPLC for determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Analytica Chimica Acta**, v. 1018, p. 111–118, 2018.

WILL, Camila *et al.* Expanding the applicability of magnetic ionic liquids for multiclass determination in biological matrices based on dispersive liquid–liquid microextraction and HPLC with diode array detector analysis. **J Sep Sci**, v. 43, p. 2657–2665, 2020.

WÓJCIAK-KOSIOR, Magdalena *et al.* Polyaniline based material as a new SPE sorbent for pre-treatment of Chelidonium majus extracts before chromatographic analysis of alkaloids. **Talanta**, v. 194, p. 32–37, 2019.

XU, Jianqiao; OUYANG, Gangfeng. Extraction: Solid-Phase Microextraction. *In: REFERENCE MODULE IN CHEMISTRY, MOLECULAR SCIENCES AND CHEMICAL ENGINEERING.* Elsevier, 2018.

YAGHJYAN, Lusine *et al.* Associations of established breast cancer risk factors with urinary estrogens in postmenopausal women. **Cancer Causes Control**, v. 33, n. 2, p. 279–291, 2022.

YANG, Li *et al.* Deep eutectic solvent - loaded Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@MIL-101(Cr) with core–shell structure for the magnetic solid phase extraction of non-steroidal anti-inflammatory drugs in environmental water samples. **Microchemical Journal**, v. 184, p. 108150, 2023.

YEGANEH-SALMAN, Elham *et al.* Poly Schiff-base based on polyimides functionalized with magnetic nanoparticles as novel sorbent for magnetic solid-phase extraction of non-steroidal anti-inflammatory drugs in environmental water samples. **Microchemical Journal**, v. 183, p. 108000, 2022.

YOU, Jia *et al.* Rapid quantification of human urinary estrogens and estrogen metabolites by HPLC mass spectrometry. **Microchem J**, v. 147, p. 157–162, 2019.

ZHOU, Yiyuan *et al.* Development and application of metal-organic framework@GA based on solid-phase extraction coupling with UPLC-MS/MS for the determination of five NSAIDs in water. **Talanta**, v. 225, p. 121846, 2021.

ZIMMERMANN, Camila Aparecida *et al.* Facile approach to produce water-dispersible conducting polyaniline powder. **Synth Met**, v. 267, p. 116451, 2020.

## APÊNDICE A

Figura 1-A. Curvas analíticas dos hormônios em urina.

(continua)

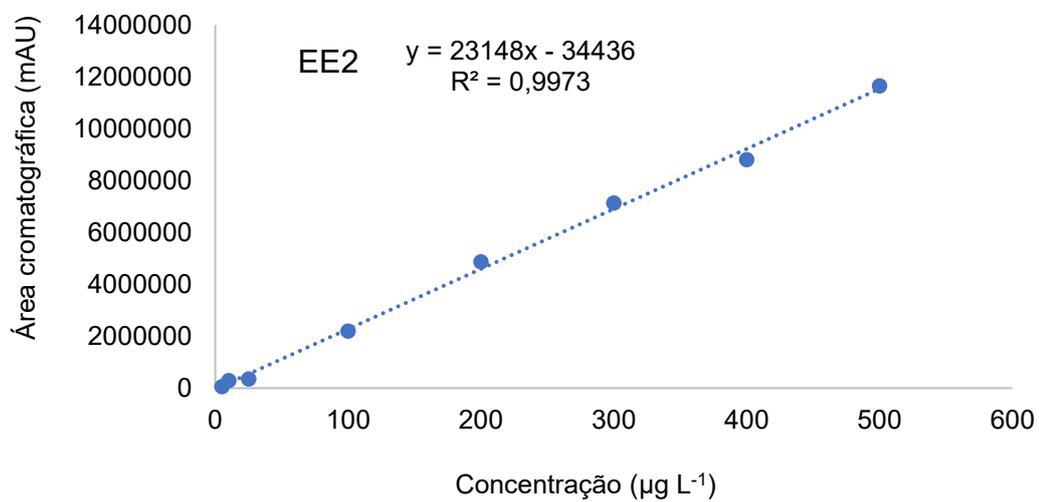
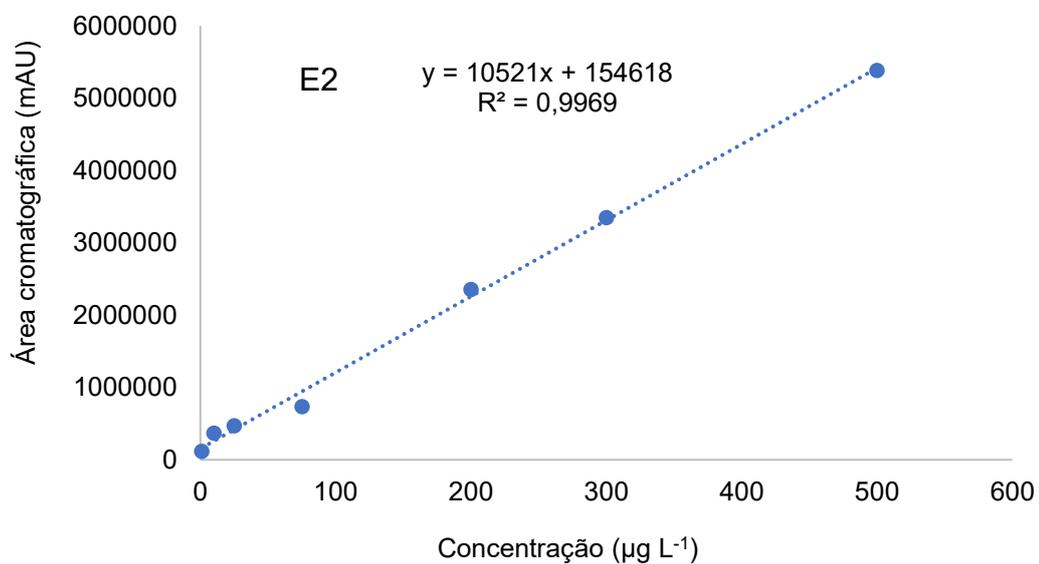


Figura 1-A. Curvas analíticas dos hormônios em urina.

(conclusão)

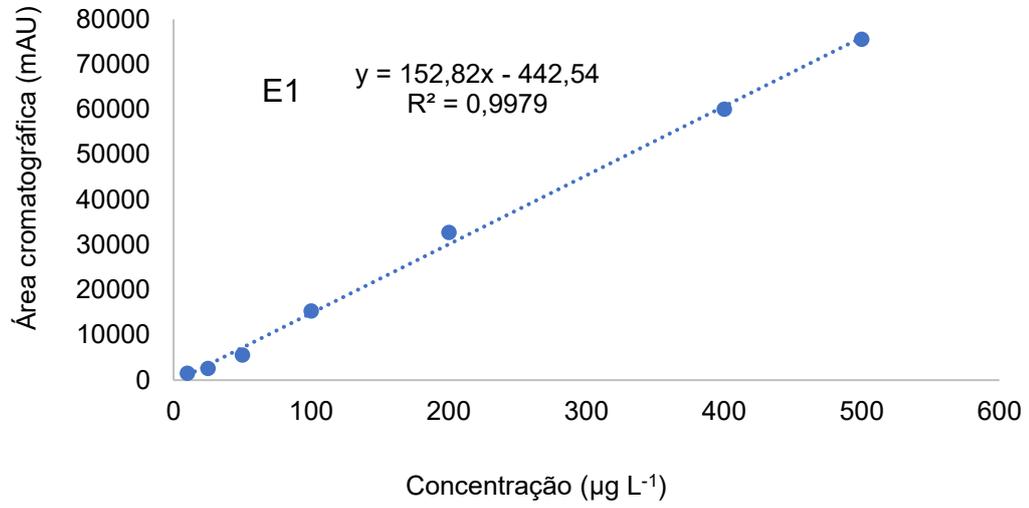


Figura 2-A. Curvas de calibração dos anti-inflamatórios não esteroidais em água ultrapura.

(continua)

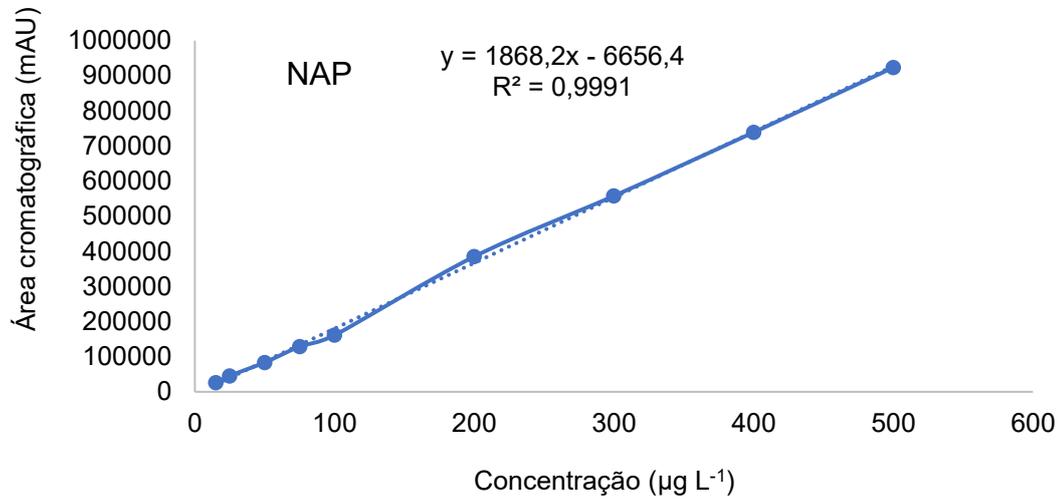
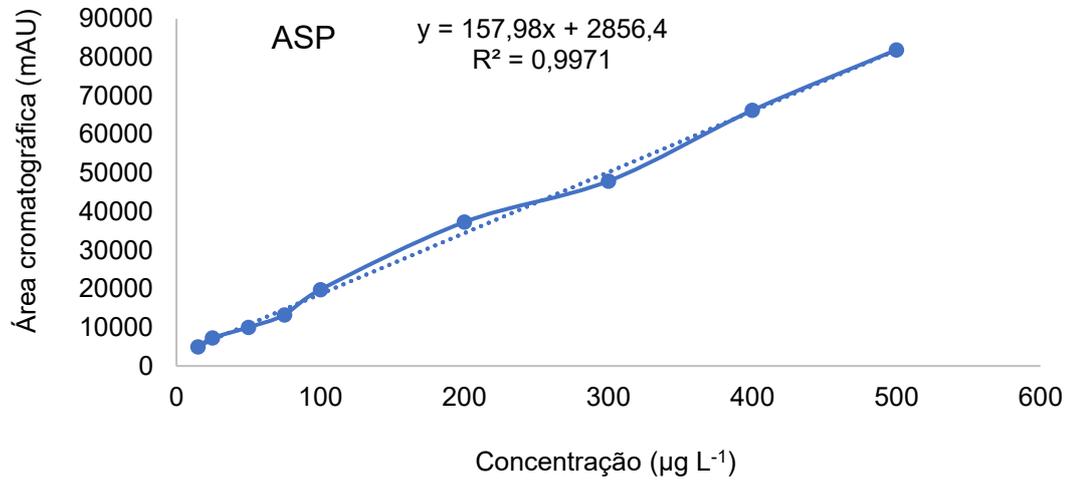


Figura 2-A. Curvas de calibração dos anti-inflamatórios não esteroidais em água ultrapura.

(conclusão)

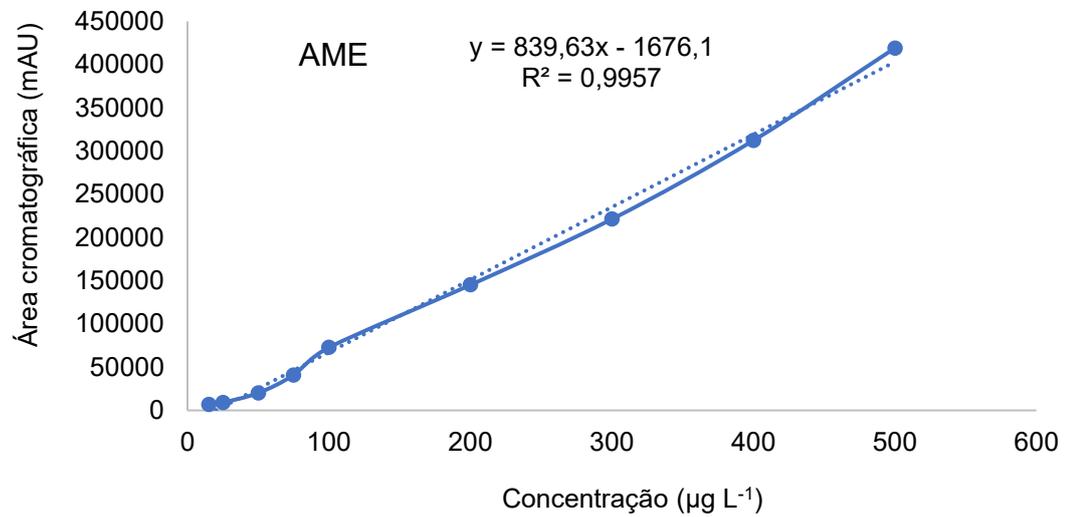
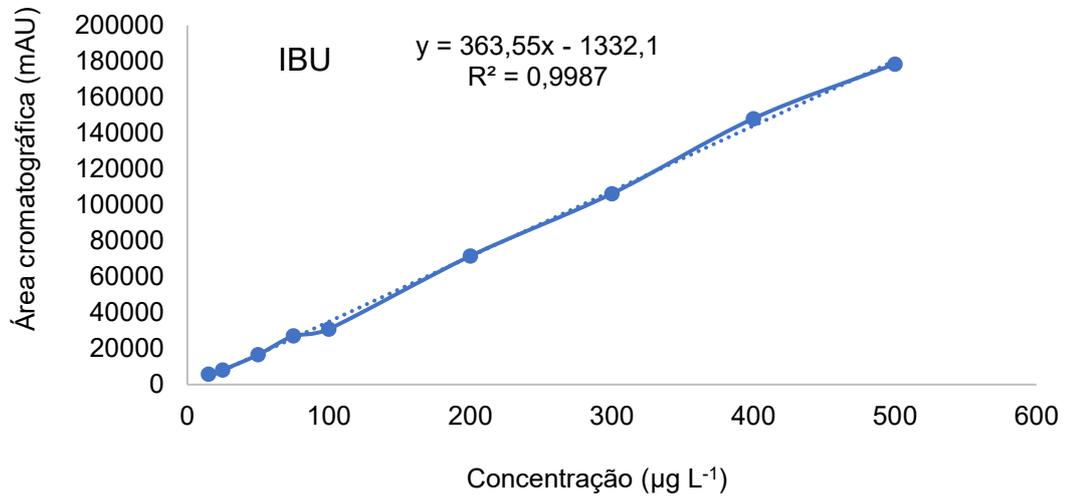


Tabela 1-A. Tabela ANOVA obtida para o planejamento *simplex-centróide*.

Fonte	SS	df	MS	F	p
Modelo	7,999560E+09	5	1,599912E+09	10,14006	0,006870
Erro total	9,466876E+08	6	1,577813E+08		
Falta de ajuste	3,447025E+08	4	8,617562E+07	0,28630	0,867421
Erro puro	6,019851E+08	2	3,009926E+08		
Total ajustado	8,946247E+09	11	8,132952E+08		

Tabela 2-A. Tabela ANOVA obtida para o planejamento *Doehlert*.

Fonte	SS	df	MS	F	p
(1) Tempo (min) (L)	1,057164E+09	1	1,057164E+09	3,615713	0,153404
Tempo (min) (Q)	6,323562E+07	1	6,323562E+07	0,216279	0,673567
(2) pH (L)	1,074909E+09	1	1,074909E+09	3,676407	0,151024
pH (Q)	7,163202E+08	1	7,163202E+08	2,449960	0,215496
1L by 2L	3,674930E+08	1	3,674930E+08	1,256900	0,343888
Falta de ajuste	6,121815E+08	1	6,121815E+08	4,620940	0,164579
Erro	8,771412E+08	3	2,923804E+08		
Total SS	4,277424E+09	8			

Tabela 3-A Resultados dos testes ANOVA fator único com 95% de confiança realizados para cada um dos analitos.

(continua)

ASP						
Grupo	Contagem	Soma	Média	Variância		
PAni-sílica dopada com HCl	4	586628	146657	217294280		
PAni-sílica dopada com ácido oxálico	4	600283	150070,8	4648324,3		
ANOVA						
Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	23307378,13	1	23307378	<b>0,2100307</b>	0,662873	<b>5,987378</b>
Dentro dos grupos	665827812,8	6	1,11E+08			
Total	689135190,9	7				

Tabela 3-A Resultados dos testes ANOVA fator único com 95% de confiança realizados para cada um dos analitos.

(conclusão)

<b>NAP</b>						
<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>		
PAAni-sílica dopada com HCl	4	3082526	770631,5	143448074		
PAAni-sílica dopada com ácido oxálico	4	3181505	795376,3	1,168E+09		
<i>ANOVA</i>						
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	1224605305	1	1,22E+09	<b>1,8671426</b>	0,220794	<b>5,987378</b>
Dentro dos grupos	3935227944	6	6,56E+08			
Total	5159833249	7				
<b>IBU</b>						
<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>		
PAAni-sílica dopada com HCl	4	843207	210801,8	82966732		
PAAni-sílica dopada com ácido oxálico	4	875639	218909,8	296190809		
<i>ANOVA</i>						
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	131479328	1	1,31E+08	<b>0,693534</b>	0,436852	<b>5,987378</b>
Dentro dos grupos	1137472622	6	1,9E+08			
Total	1268951950	7				
<b>AME</b>						
<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>		
PAAni-sílica dopada com HCl	4	1827665	456916,3	376819072		
PAAni-sílica dopada com ácido oxálico	4	1842030	460507,5	301704158		
<i>ANOVA</i>						
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	25794153,13	1	25794153	<b>0,0760303</b>	0,792002	<b>5,987378</b>
Dentro dos grupos	2035569690	6	3,39E+08			
Total	2061363843	7				

Tabela 4-A. Tabela ANOVA obtida para o planejamento *simplex-centróide*.

Fonte	SS	df	MS	F	p
Modelo	1,883570E+11	5	3,767140E+10	24,77	0,000614
Erro total	9,124623E+09	6	1,520770E+09		
Falta de ajuste	9,124264E+09	4	2,281066E+09	12723,59	0,000079
Erro puro	3,585570E+05	2	1,792785E+05		
Total ajustado	1,974816E+11	11	1,795287E+10		

Tabela 5-A Resultados dos testes ANOVA fator único com 95% de confiança realizados para cada um dos analitos.

(continua)

ASP						
Grupo	Contagem	Soma	Média	Variância		
20 minutos	4	453472	113368	56529865		
30 minutos	4	466306	116576,5	352904646		
ANOVA						
Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	20588944,5	1	20588945	<b>0,1005726</b>	0,761888639	<b>5,987377607</b>
Dentro dos grupos	1228303533	6	2,05E+08			
Total	1248892478	7				
NAP						
Grupo	Contagem	Soma	Média	Variância		
20 minutos	4	1355177	338794,3	164612931		
30 minutos	4	1418474	354618,5	3,38E+09		
ANOVA						
Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	500813776,1	1	5,01E+08	<b>0,282559</b>	0,614123965	<b>5,987377607</b>
Dentro dos grupos	10634531210	6	1,77E+09			
Total	11135344986	7				
IBU						
Grupo	Contagem	Soma	Média	Variância		
20 minutos	4	600292	150073	83326194		
30 minutos	4	695593	173898,3	792097992		
ANOVA						
Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	1135285075	1	1,14E+09	<b>2,5936799</b>	0,158416606	<b>5,987377607</b>
Dentro dos grupos	2626272559	6	4,38E+08			
Total	3761557634	7				

Tabela 5-A Resultados dos testes ANOVA fator único com 95% de confiança realizados para cada um dos analitos.

(conclusão)

		<b>AME</b>				
<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>		
20 minutos	4	1603666	400916,5	605304306		
30 minutos	4	1819328	454832	2,875E+09		
ANOVA						
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	5813762281	1	5,81E+09	<b>3,3406394</b>	0,117354793	<b>5,987377607</b>
Dentro dos grupos	10441885327	6	1,74E+09			
Total	16255647608	7				

Tabela 6-A. Tabela ANOVA obtida para o planejamento *Doehlert*.

<b>Fonte</b>	<b>SS</b>	<b>df</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>	
(1) Tempo (min) (L)	9,323326E+08	1	9,323326E+08	3,672989	0,195356	
Tempo (min) (Q)	1,131580E+08	1	1,131580E+08	0,445794	0,573070	
(2) % NaCl (L)	1,143958E+09	1	1,143958E+09	4,506703	0,167759	
% NaCl (Q)	2,384620E+09	1	2,384620E+09	9,394376	0,091994	
1L by 2L	1,271628E+08	1	1,271628E+08	0,500967	0,552441	
Falta de ajuste	4,405539E+07	1	4,405539E+07	0,173559	0,717422	
Erro	5,076697E+08	2	2,538348E+08			
Total SS	5,573472E+09	8				