



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**CORTIÇA COMO FASE EXTRATORA PARA A TÉCNICA DE
TF-SPME EM SISTEMA DE 96-WELL PLATE PARA A
EXTRAÇÃO DE CONTAMINANTES EMERGENTES DE
AMOSTRAS DE ÁGUA**

LUCAS MORÉS

Florianópolis
Julho/2016

Lucas Morés

**CORTIÇA COMO FASE EXTRATORA PARA A TÉCNICA DE
TF-SPME EM SISTEMA DE 96-WELL PLATE PARA A
EXTRAÇÃO DE CONTAMINANTES EMERGENTES DE
AMOSTRAS DE ÁGUA**

Relatório apresentado ao Departamento de Química
da Universidade Federal de Santa Catarina,
como requisito parcial da disciplina de
Estágio Supervisionado II (QMC 5512)

Orientador: PROFESSOR Dr. EDUARDO CARASEK DA ROCHA
Coorientadora: Dra. ADRIANA NEVES DIAS

Florianópolis
Julho/2016

Lucas Morés

**CORTIÇA COMO FASE EXTRATORA PARA A TÉCNICA DE
TF-SPME EM SISTEMA DE 96-WELL PLATE PARA A
EXTRAÇÃO DE CONTAMINANTES EMERGENTES DE
AMOSTRAS DE ÁGUA.**

Prof. Dr. Alexandre Luis Parize
Coordenador de Estágio do Curso de Química-Bacharelado

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Eduardo Carasek da Rocha
Orientador

Prof^a. Dra. Tatiane de Andrade Maranhão

Prof^a. Dra. Daiane Paula Cunha de Quadros

Florianópolis
Julho/2016

Este trabalho é dedicado aos meus pais,

Silvio e Marisa.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela minha vida, por ter me concedido essa oportunidade, ter me dado forças para enfrentar minhas dificuldades e me permitir esta vitória.

Aos meus pais, Silvio e Marisa, que sempre batalharam para me dar todas as coisas, me apoiando nos estudos e nas minhas escolhas. Vocês me criaram da melhor maneira e me tornaram uma pessoa incrível. As minhas conquistas foram graças a todos os seus ensinamentos. Eu amo vocês.

A minha Nona Nair e meu Nono Américo (*in memoriam*) que sempre se preocuparam comigo e sempre rezaram por mim. Nona, a senhora é incrível, cuidou de mim e cuida até hoje. Nono, o senhor não esteve durante minha graduação, mas sempre soube que estava do meu lado me apoiando nas horas difíceis e nas minhas alegrias. Eu amo vocês.

A meu Avô Tisatto e minha Avó Zulide. A distância entre nós é grande, mas vocês sempre me deram carinho e cuidaram de mim. Agradeço por ter avós iguais a vocês que são pessoas maravilhosas. Eu amo vocês.

A minha irmã Carla, que por mais que discutimos, somos companheiros e vamos nos dar forças quando precisarmos. O mano te ama.

A minha família, agradeço a todos pelos momentos, pelas risadas, pelo companheirismo e encontros. Vocês são demais.

Aos meus irmãos de coração, Gabriela e Gabriel. Nossa amizade vem desde pequenos, ultrapassa os 15 anos juntos, sempre superou qualquer barreira e vai perdurar por mais anos e anos. E também ao Manuel que hoje eu considero um grande amigo. Eu adoro vocês.

Aos meus amigos, Beatriz Zimmermann, Beatriz Comelli, Aline Kulkamp, Joseane Caroline, Beatriz Orzechovicz, Marina Coelho, Lucas Talamini, Nicole Zanato, Renata Braz, e a todos que estiveram comigo durante esta caminhada, muito obrigado pela amizade de vocês, cada um contribuiu de sua forma para que eu conseguisse realizar essa vitória.

A Adri e ao Josias. Adri, você é uma pessoa incrível, quero ser um profissional tão empenhado e interessado como você. Cuidou e me ajudou como uma mãe e me fez amadurecer. Josias, você me iniciou como um pesquisador e só tenho a lhe agradecer por todo o apoio. Aos dois, muito obrigado por todas as horas de descontração, por puxarem minha orelha, por me ouvirem nas horas boas e ruins. A minha formação acadêmica é em grande parte graças a vocês. Obrigado eu os adoro.

Ao Anderson, que se tornou uma pessoa importante para mim, me apoiando, me ajudando nos momentos difíceis, dividindo comigo risadas e tristezas. Obrigado por aparecer na minha vida.

A Ana Cristine, Francielle e Lucas Murara. Vocês são únicos e me fazem ter a certeza de que posso contar com vocês sempre. Meus dias ficam mais felizes quando estou com vocês, compartilhando risadas, tristezas, ensinamentos e críticas. A graduação acaba, mas seremos os eternos IC's Domina. Obrigado por serem meus amigos, é uma honra. Adoro vocês.

Aos meus colegas do CroMaas, Daniela, Gabriela Mafra, Mauana, Camila, Naysla, Vanessa Simão, Vanessa Dutra, Daiane, Heloísa, Edinho, Ivan, Sângela, Gabriela Corazza, Melaine, Jefferson e Lígia. Tenho gratidão em poder ter conhecido vocês e ter adquirido tanto aprendizado. Todos os momentos vividos fora e dentro do laboratório irão comigo para sempre. Obrigado a todos.

Ao meu orientador, Professor Eduardo Carasek, que me deu a oportunidade de ser seu orientado, me incentivando e ensinando. Ser seu aluno foi uma honra. Obrigado.

A UFSC, pelo espaço concedido, e ao ensino de qualidade gratuito.

Ao CNPq pela bolsa de iniciação concedida.

A todos os professores que me mostraram o prazer da química durante toda a graduação e a todos os colegas que me ajudaram durante minha caminhada, estando presentes hoje ou não. Obrigado a todos.

Sumário

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DA LITERATURA	12
2.1	Preparo de Amostra	12
2.1.1	Microextração em Fase Sólida – SPME	13
2.1.2	Microextração em Filme Fino – TFME	17
2.2	Sistema de 96–well plate	18
2.3	Biossorventes	19
2.3.1	Cortiça	20
2.4	Contaminantes Emergentes	21
2.5	Otimização de Técnicas Analíticas	24
2.6	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	26
2.6.1	Modo de Detecção	29
3	OBJETIVOS	30
3.1	Objetivo Geral	30
3.2	Objetivos Específicos	30
4	METODOLOGIA	31
4.1	Materiais e Reagentes	31
4.2	Preparo do Pó de Cortiça	31
4.3	Preparo dos Pentes para o Sistema de 96-well plate	31
4.4	Amostra de Água de Rio	32
4.5	Extração e Dessorção	32
4.6	Otimização dos Parâmetros para TF-SPME	33
4.6.1	Otimização do Tempo de Dessorção	33
4.6.2	Otimização do Solvente de Dessorção	33
4.6.3	Otimização do pH da Amostra	34
4.6.4	Otimização do Tempo de Extração e Adição de Sal (NaCl)	35
4.7	Instrumentação	36
4.8	Parâmetros de Validação	37
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1	Otimização Cromatográfica	38
5.2	Otimização das Condições de Extração	39

5.2.1	Otimização do Tempo de Dessorção	39
5.2.2	Otimização do Solvente de Dessorção.....	40
5.2.3	Otimização do pH da Amostra.....	41
5.2.4	Otimização do Tempo de Extração e Adição de Sal (NaCl)	43
5.3	Parâmetros de Mérito.....	44
6	CONCLUSÃO	49
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Sistema instrumental para SPME.....	14
Figura 2 - Representação dos modos de extração para SPME. a) DI-SPME e em b) HS-SPME.....	14
Figura 3 - Geometria retangular para as películas de TF-SPME com tamanhos de 1 cm de altura e 2 mm de largura.....	17
Figura 4 - a) Sistema manual 96- <i>well plate</i> ; b) pinos contendo o filme fino da fase extratora; c) escova contendo as 96 lâminas; d) poços para introdução da amostra.	19
Figura 5 – (A) Rolhas produzidas a partir do sobreiro e (B) pó de cortiça utilizada na técnica de TF-SPME.	20
Figura 6 - Representação dos poros através de microscópio eletrônico de varredura (SEM), nas direções não radial (NR direction) e radial (R direction).21	
Figura 7 - Estrutura dos analitos.....	23
Figura 8 - Planejamento Doehlert.....	25
Figura 9 - Superfície triangular.	26
Figura 10 - Instrumentação básica para cromatografia líquida de alta eficiência.	28
Figura 11 : Procedimento de preparo dos filmes de TF-SPME com cortiça.	32
Figura 12 - Planejamento Doehlert para a otimização do tempo de extração e quantidade de sal.	35
Figura 13 - Cromatograma da separação dos analitos segundo a condição de gradiente de solvente escolhida acompanhado em comprimento de onda de 226 nm.	39
Figura 14 - Gráfico resposta para a otimização da melhor condição para o tempo de dessorção.....	40
Figura 15 - Superfície triangular para determinação do melhor solvente de dessorção.....	41
Figura 16 - Gráfico resposta para escolha do pH da amostra.	42
Figura 17 - Planejamento Doehlert para a otimização entre tempo de extração e quantidade de sal.	44

- Figura 18** - Cromatograma comparativo entre o branco da amostra de água do Rio Quiriri em cinza e a fortificação para Bisfenol A e 4-Octilfenol em preto, acompanhados em 226 nm..... 47
- Figura 19** - Cromatograma comparativo entre o branco da amostra de água do Rio Quiriri em cinza e a fortificação para Etil Parabeno e Triclocarban em preto, acompanhados em 257 nm..... 47
- Figura 20** - Cromatograma comparativo entre o branco da amostra de água do Rio Quiriri em cinza e a fortificação para 4-Metilbenzilidênio Cânfora em preto, acompanhado em 298 nm..... 48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Propriedades dos compostos de estudo.....	24
Tabela 2 - Razão entre os solventes de dessorção para o planejamento de superfície triangular.....	34
Tabela 3 - Experimentos para otimização do tempo de extração e quantidade de sal pelo planejamento Doehlert.....	36
Tabela 4 - Gradiente de solvente para corrida cromatográfica.....	38
Tabela 5 - Valores obtidos para LOD, LOQ, faixa linear e coeficiente de correlação para o método, para determinação de contaminantes emergentes em amostras de rio.....	45
Tabela 6 - Parâmetros de precisão e ensaios de recuperação na amostra do Rio Quiriri. (ND = nada detectado).....	46

LISTA DE ABREVIATURAS

4-MBC – 4-metilbenzilidêno cânfora, do inglês *4-methylbenzylidene-camphor*.

4-OC – 4-Octilfenol, do inglês *4-octylphenol*.

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

BPA – Bisfenol A.

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

D – Deutério.

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

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

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

EtP – etil parabeno, do inglês *Ethylparaben*.

FLR – Detector de fluorescência, do inglês *Fluorescence Detection*.

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

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

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

HS – do inglês, *Headspace*.

IR – Detector de índice de refração, do inglês *Refractive Index Detection*.

K_{o/w} – coeficiente de partição n-octanol/água.

LC-MS – Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas, do inglês *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*.

LC-MS/MS – Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em tandem, do inglês *Liquid Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry*.

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

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

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

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

NR – Não radial.

R – Radial.

r^2 - Coeficiente de correlação linear.

REC – Recuperação.

RSD – Precisão.

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

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

SEM – Microscopia eletrônico de varredura, do inglês *Scanning Electron Microscopy*.

SFODME - Microextração com gota orgânica solidificada, do inglês *Solidification of Floating Organic Drop Microextraction*.

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

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

TCC – Triclocarban.

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

UV – Ultravioleta, do inglês *Ultraviolet*.

RESUMO

Este trabalho foi desenvolvido como uma proposta inédita do uso de um material biossorvente como fase extratora, em conjunto com a técnica recente de preparo de amostra, a microextração em filme fino (TF-SPME) e o sistema de 96-well plate. A cortiça foi aderida sobre os pentes por meio de uma fita adesiva e é um material de boa adsorção de compostos orgânicos, sendo possível determinar compostos como etil parabeno, bisfenol A, 4-metilbenzilideno cânfora, 4-octilfenol e triclocarban. Esses contaminantes possuem grande toxicidade aos organismos vivos, como o de seres humanos, e são provenientes de indústrias e efluentes domésticos despejados em rios, lagos, entre outros. Portanto, sua determinação e controle se mostra necessária. Desta forma, foi desenvolvido um método analítico e as condições ideais foram tempo de extração de 3 horas, pH da amostra de 5,5, adição de 5% de sal (NaCl), tempo de dessorção de 20 minutos em uma mistura de solventes de acetonitrila e metanol (1:1) e volume final de 300 µL. A separação e detecção dos analitos foi realizada em cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector por arranjo de diodos (HPLC-DAD), com corrida cromatográfica de 28 minutos. Os parâmetros de méritos determinados foram limites de detecção entre 2 a 27 µg/L, os limites de quantificação entre 5 e 80 µg/L, coeficiente de correção maiores que 0,99, ensaios de recuperação de 85 a 130% e precisões de 3 a 6%.

Palavras-chave: Cortiça, TF-SPME, 96-well plate, HPLC-DAD, contaminantes emergentes.

1 INTRODUÇÃO

Muitos experimentos necessitam de uma etapa prévia de preparo de amostra para que as análises tenham resultados satisfatórios. O objetivo desta etapa está em concentrar e isolar os analitos e adicioná-los a uma matriz compatível aos instrumentos analíticos. Conseqüentemente, melhora-se a seletividade e a simplificação para determinação de diversos compostos.

No preparo de amostra são utilizados diversos materiais como fase extratora, dentre os quais estão os biossorbentes. A cortiça é renovável e biodegradável e é um material promissor por apresentar boa adsorção de compostos orgânicos. Além disso, é um revestimento que visa a química verde por ser proveniente da casca de uma árvore, o que gera menos poluentes ambientais, além de não ser necessário derrubar as árvores e a casca é regenerada.

Uma técnica recentemente desenvolvida é a microextração em filme fino (TF-SPME), que tem por fundamento a alteração da geometria em relação a microextração em fase sólida (SPME), tornando a extração mais eficaz. No preparo de amostra, o tempo das extrações se torna algo determinante, pois com grandes quantidades de experimentos, a análise se torna muito demorada, e assim, inviável. Para corrigir este problema, um sistema foi desenvolvido para se realizar 96 experimentos de forma simultânea, sendo denominado *96-well plate*. Este é ideal para se trabalhar em conjunto com a TF-SPME, o que acarreta um menor tempo de análise laboratorial e, conseqüentemente, aumenta-se a frequência analítica.

Este trabalho foi elaborado com o objetivo de usar um biossorbente como fase extratora renovável e biodegradável, para a técnica de TF-SPME em conjunto com o sistema de *96-well plate*, o qual permite maior frequência analítica, para a determinação de contaminantes emergentes. São eles: etil parabeno, bisfenol A, 4-metilbenzilidêno cânfora, 4-octilfenol e triclocarban em amostra de água de rio, sendo a separação e detecção realizada em cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao arranjo de diodos (HPLC-DAD).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Preparo de Amostra

Métodos analíticos, em geral, necessitam de um tratamento prévio das amostras para que se tenha êxito. O preparo de amostra é fundamentado na dependência entre o analito e a matriz, onde consiste na concentração e isolamento dos analitos a níveis mais adequados, além de separá-los da matriz da amostra e adicioná-los a uma nova matriz compatível aos sistemas analíticos.^{1,2}

Técnicas instrumentais têm sido cada vez mais desenvolvidas, entretanto muitos equipamentos, dependendo da composição das amostras, não podem ter injeções das mesmas em sua forma bruta, ou seja, de forma direta, pois podem acarretar em interferências e incompatibilidade a estes sistemas.² Portanto, é aplicado o preparo de amostra para aumentar a seletividade, minimizar os efeitos de matriz, melhorar a detectabilidade e evitar problemas maiores nos sistemas analíticos.¹

Dentre os atributos pretendidos em técnicas de preparo de amostra, ressalta-se a simplicidade em seu manuseio, a rapidez, o baixo custo, o aumento da seletividade, miniaturização, automatização para minimização de erros provocados por manipulação humana e consumo reduzido de solventes orgânicos.³

Visando o desenvolvimento e miniaturização das técnicas tradicionais de preparo de amostra, busca-se torná-las mais eficientes e reduzir os procedimentos que são agressivos ao meio ambiente e desde a década do século XX até os dias de hoje, as técnicas de extração têm sido melhoradas. Dentre as principais, destacam-se as que tiveram o maior avanço, como a microextração em fase sólida (do inglês, *Solid Phase Microextraction; SPME*) e a microextração em fase líquida (do inglês, *Liquid Phase Microextraction; LPME*), sendo esta segunda apresentando diferentes abordagens, como a microextração em gota única (do inglês, *Single Drop Microextraction; SDME*), a microextração líquido-líquido dispersiva (do inglês, *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction; DLLME*), a microextração em fase líquida suportada com fibra

oca (do inglês, *Hollow Fiber-Liquid Phase Microextraction; HF-LPME*) e a microextração com gota orgânica solidificada (do inglês, *Solidification of Floating Organic Drop Microextraction; SFODME*).⁴

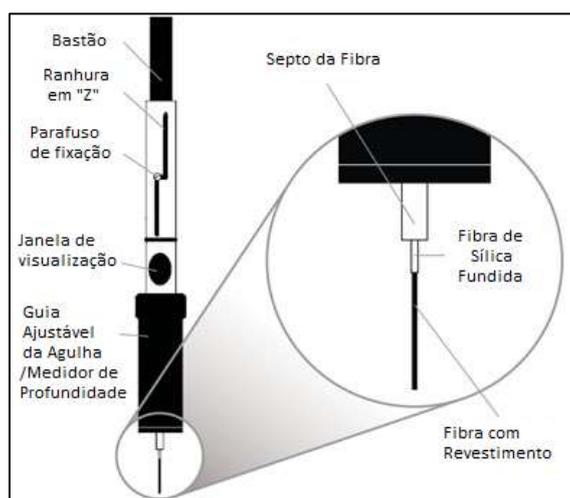
2.1.1 Microextração em Fase Sólida – SPME

A extração em fase sólida (do inglês, *Solid Phase Extraction; SPE*) é baseada na extração dos analitos a partir de uma superfície sólida e a dessorção dos mesmos é feita por meio térmico ou com uso de solventes. Entretanto, apresenta desvantagens como tempo de análises longos e substituição dos cartuchos o que eleva seu custo, além dos mesmos serem construídos de plástico onde pode ocorrer a adsorção do analito, aumentando interferências no estudo.⁵

A microextração em fase sólida (SPME) foi desenvolvida e proposta por Pawliszyn e seu grupo, em 1990, mantendo as vantagens da SPE, como redução do tempo de extração e uso de quantidades menores de solventes.⁵ Além disso, apresenta propriedades como simplicidade de operação, independência no uso de solventes orgânicos, automatização completa e fácil conexão a sistemas analíticos, principalmente aos cromatógrafos a gás (GC) e líquido (HPLC).⁶

A parte instrumental da técnica consiste de um amostrador como suporte para o bastão de fibra óptica, constituído de sílica fundida, sendo a extremidade da fibra revestida com a fase extratora que é selecionada de acordo com os analitos a serem trabalhados. A partir de uma ranhura em formato Z, a fibra pode ser exposta ou retraída. A superfície das fibras de SPME possuem geometria cilíndrica definida e são menos complexas do que os cartuchos de SPE, sendo a instrumentação básica para técnica apresentada na Figura 1 a seguir.⁷

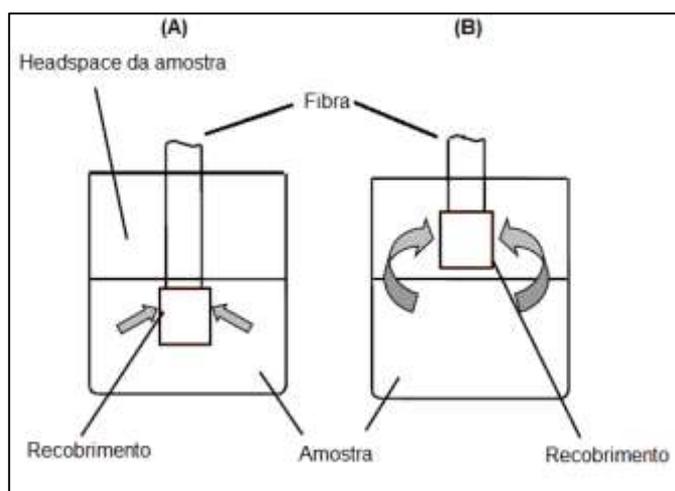
Figura 1 - Sistema instrumental para SPME.



(FONTE: ADAPTADO DE SIGMA ALDRICH, 2016).⁸

Diferentemente das técnicas clássicas de extração, a SPME é não exaustiva, ou seja, apenas uma parte dos analitos são extraídos. Ela apresenta dois modos principais de extração, a imersão direta (DI) utilizada principalmente para analitos que possuem baixa volatilidade ou amostras que não contenham material particulado capaz de decompor a fibra, e o *headspace* (HS) utilizado para analitos de alta e média volatilidade e matrizes com material particulado que pode acarretar em danificação da fibra, sendo ambos apresentados na Figura 2.⁷

Figura 2 - Representação dos modos de extração para SPME. a) DI-SPME e em b) HS-SPME.



(FONTE: DIAS, 2015).⁹

No modo de imersão direta, utilizado neste trabalho, a quantificação da técnica de SPME se baseia na quantidade de analito extraído através do equilíbrio de partição existente entre as fases extratora e da amostra sob condições otimizadas previamente. Quando ocorre o equilíbrio da concentração dos analitos entre a amostra e a fibra, a extração é tomada como completa. Cálculos descrevem este processo, onde inicialmente se tem a concentração do analito em equilíbrio na amostra e na fibra, através da constante de distribuição K_{fs} (equação 1):⁹

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

Conforme lei de conservação das massas, tem-se no sistema de equilíbrio descrito pela equação 2:

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

Onde cada variável representa:

C_0 = concentração inicial do analito

V_s = volume da amostra

C_s^∞ = concentração no equilíbrio do analito na amostra

C_f^∞ = concentração no equilíbrio do analito no recobrimento da fibra

V_f = volume do recobrimento da fibra

Rearranjando a equação (1), para isolar a concentração no equilíbrio do analito na amostra, tem-se (equação 3):

$$C_s^\infty = \frac{C_f^\infty}{K_{fs}} \quad (3)$$

Substituindo-se a equação (3) na equação (2), tem-se (equação 4):

$$\begin{aligned} C_0 V_s &= \frac{C_f^\infty V_s}{K_{fs}} + C_f^\infty V_f \\ K_{fs} C_0 V_s &= C_f^\infty V_s + K_{fs} C_f^\infty V_f \\ K_{fs} C_0 V_s &= C_f^\infty (V_s + K_{fs} V_f) \end{aligned}$$

$$C_0 V_s = \frac{C_f^\infty V_s + K_{fs} C_f^\infty V_f}{K_{fs}}$$

$$C_f^\infty = C_0 \frac{K_{fs} V_s}{K_{fs} V_f + V_s} \quad (4)$$

Através da relação entre concentração e número de mols, tem-se (equação 5):

$$C_f^\infty = \frac{n_f}{V_f} \quad (5)$$

Onde:

n_f = número de mols do analito no equilíbrio extraído pelo recobrimento

Por fim, substituindo-se a equação (5) na equação (4), tem-se (equação 6):

$$\frac{n_f}{V_f} = C_0 \frac{K_{fs} V_s}{K_{fs} V_f + V_s}$$

$$n_f = C_0 \frac{K_{fs} V_s V_f}{K_{fs} V_f + V_s} \quad (6)$$

Nestas equações descritas matematicamente e principalmente as equações 4 e 6, indicam a massa de analito que foi sorvida posterior ao equilíbrio ter ocorrido. Como o n_f é proporcional a concentração inicial do analito na amostra, é possível realizar a quantificação do método com a técnica de SPME.⁹

A SPME apresenta muitas vantagens descritas anteriormente, entretanto, possui algumas limitações, sendo uma delas a fragilidade da sílica fundida, quebrando-se facilmente, o pequeno volume da fase extratora que é proveniente de sua forma cilíndrica e também um tempo de vida limitado. Para

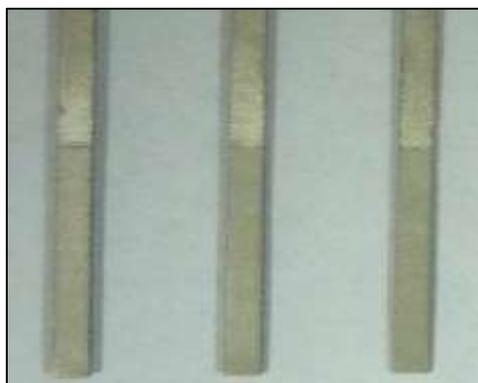
superar estes problemas, uma técnica derivada vem sendo desenvolvida, a microextração em filme fino (do inglês, *Thin-Film Microextraction; TF-SPME*).¹⁰

2.1.2 Microextração em Filme Fino – TFME

A TF-SPME foi introduzida por *Pawliszyn et. al.* (2003), com o objetivo de tornar o método mais sensível. Baseada principalmente na mudança de geometria cilíndrica presente na SPME, a TF-SPME modifica propriedades significativas no que se refere a melhora na extração dos analitos.^{11,12}

Com uma geometria retangular e em forma de uma película fina, a TF-SPME apresenta uma espessura da fase extratora menor em relação a SPME, o que por sua vez acarreta em uma área superficial maior da fase extratora. Esta configuração permite que o tempo de extração dos analitos seja reduzido ao passo que a quantidade extraída seja maior, sendo na Figura 3 apresentada as películas utilizadas em TF-SPME.¹²

Figura 3 - Geometria retangular para as películas de TF-SPME com tamanhos de 1 cm de altura e 2 mm de largura.



(FONTE: MIRNAGHI, 2012).¹⁴

De forma simplificada e como apresentado no item 2.2, a matemática realizada para determinação da quantidade de analito extraído na forma de imersão direta, se aplica para a TF-SPME. É possível avaliar os parâmetros que são alterados conforme a equação 6:

$$n_f = C_0 \frac{K_{fs}V_s V_f}{K_{fs}V_f + V_s} \quad (6)$$

Ao aumentar o volume da fase extratora, V_f , aumenta-se a quantidade de mols de analito extraído pelo recobrimento, o que é representado pela proporcionalidade do n_f e também da concentração inicial do analito na amostra, C_0 , provando a melhora na eficiência da extração e também demonstrando a quantificação da técnica.¹³

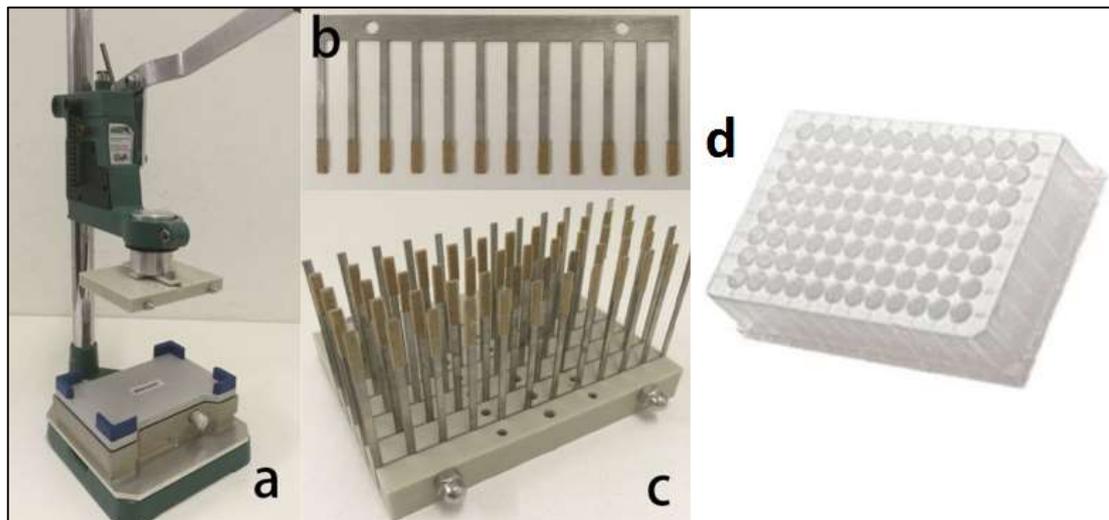
Recentemente, com o avanço e desenvolvimento da TF-SPME, uma instrumentação foi aplicada juntamente com esta técnica, o sistema de *96-well plate*.¹⁴

2.2 Sistema de 96-well plate

Muitas vezes o preparo de amostra tende a ser demorado. A automatização permite que as etapas de preparação sejam facilitadas e também as torna mais rápidas. Recentemente, um sistema foi desenvolvido para a utilização da SPME, principalmente no formato de filmes finos, que são característicos da TF-SPME.¹⁵

O sistema de *96-well plate* é composto de um amostrador automático ou manual e seu objetivo é a extração simultânea de até 96 amostras.¹² Através de conjunto de espaços, denominado poços, com volumes de até 2 mL, introduz-se a amostra contendo os analitos. Em uma escova, contendo 96 pinos, são incorporados os filmes da fase extratora, estando presentes em cada pino. Também pode ser realizada a etapa de dessorção, sendo introduzido um solvente em poços contendo volumes de 0,5 mL, imergindo-se as películas de fase extratora para a dessorção dos analitos. Na Figura 4 estão apresentadas as principais partes para um sistema manual de *96-well plate*.¹⁴

Figura 4 - a) Sistema manual 96-well plate; b) pinos contendo o filme fino da fase extratora; c) escova contendo as 96 lâminas; d) poços para introdução da amostra.



(FONTE: AUTORIA PRÓPRIA, 2016).

Esta instrumentação permite que as análises se tornem mais rápidas, ou seja, a frequência analítica aumente, e também pode ser utilizada em conjunto com a cromatografia líquida de alta eficiência.¹³

2.3 Biossorventes

A biomassa é definida por toda a matéria orgânica proveniente de origem animal, vegetal ou microbiana, sendo seus materiais provenientes de ações naturais ou artificiais. Esses materiais são capazes de realizar processos de biossorção, onde nestes estão presentes macromoléculas contendo grupos funcionais capazes de interagir de forma físico-química por diversos procedimentos, como sorção, complexação e troca iônica.^{16,17}

Este tipo de revestimento vem sendo desenvolvido como alternativa ao uso de revestimentos comerciais empregados em técnicas de microextração, como por exemplo a microextração em fase sólida, SPME. Baseado nisso, nosso grupo introduziu um novo tipo de biossorvente, a cortiça.¹⁷

2.3.1 Cortiça

Proveniente da casca externa, ou sobreiro, da árvore *Quercus Suber L*, sendo produzidas rolhas utilizadas comercialmente e o pó utilizado neste trabalho, apresentados na Figura 5. A cortiça possui diversas propriedades, sendo em sua composição uma gama de compostos, principalmente, suberina com 40% e lignina com 22%, dois biopolímeros hidrofóbicos, além de 20% de polissacarídeos, com ênfase para a celulose e hemicelulose com caráter hidrofílico, e 15% de ceras e outros extrativos presentes.¹⁸

Figura 5 – (A) Rolhas produzidas a partir do sobreiro e (B) pó de cortiça utilizada na técnica de TF-SPME.



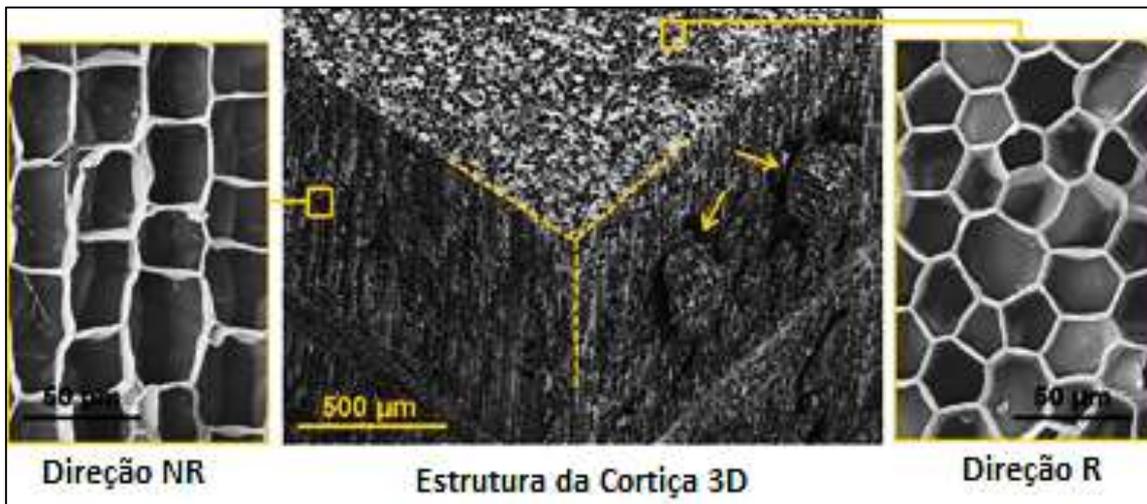
(FONTE: AUTORIA PRÓPRIA, 2016).

A cortiça já foi empregada em diversos trabalhos, dentre eles a determinação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos em amostras de águas de rios¹⁷ e pesticidas organoclorados em amostras aquosas¹⁹ utilizando a técnica de SPME em ambos, e parabenos, benzofenona e triclocarban em amostras de água em conjunto com a técnica de microextração adsortiva em barra (do inglês, *Bar Adsorptive Microextraction; BA μ E*).²⁰

O seu estudo e aplicação tem crescido principalmente por apresentar diversas qualidades, dentre as quais é um material leve, viscoelástico, impermeável a líquidos e gases, bom isolante térmico, acústico e elétrico, e além disso, é natural, renovável e biodegradável. Por estas peculiaridades, tem sido utilizada em diversas técnicas onde foi possível determinar que possui uma boa adsorção de compostos orgânicos poluentes, devido sobretudo à presença de lignina em sua composição e também pela presença de poros em

sua estrutura, apresentados pela microscopia eletrônica de varredura na Figura 6 abaixo.^{18,21}

Figura 6 - Representação dos poros através de microscópio eletrônico de varredura (SEM), nas direções não radial (NR direction) e radial (R direction).



(FONTE: FERNANDES, 2015).²¹

Com a heterogeneidade de sua composição e estrutura, a cortiça é um material promissor, pois além de suas propriedades atrativas, este sorvente é ecológico o que propicia o desenvolvimento de um novo revestimento em diversas técnicas de preparo de amostra e também visa a química verde, ou seja, causa um menor impacto ambiental, pois além de ser suas propriedades já descritas, as árvores não são derrubadas, sendo a casca renovada.¹⁸

2.4 Contaminantes Emergentes

Os contaminantes emergentes são definidos como substâncias naturais ou sintéticas que tem potencial danoso tanto ecologicamente quanto para a saúde dos seres humanos.²² O consumo destes compostos tem crescido muito nos últimos anos dentro das indústrias.²³

Devido a demanda industrial destes poluentes, a poluição de águas de rios e lagos tem se tornado cada vez maior. O foco em pesquisas em águas destes locais tem crescido, pois a maior parte destes poluentes apresenta características hidrofóbica o que acarreta na bioacumulação no ambiente.

Dentre os principais problemas causados por estes contaminantes, está em efeitos relacionados ao desregulamento endócrino, portanto sua determinação e controle é importante referente a potencialidade química que estes possuem.^{23,24}

Muitas dessas substâncias são utilizadas em diversas formas na indústria, tais como plastificantes, sendo o bisfenol A e o 4-octil fenol,^{25,28} conservantes como o etilparabeno,²⁶ filtros U.V. como a 4-metilbenzilideno cânfora²⁷ e agentes antissépticos com a triclocarban.³⁰

O bisfenol A (BPA) ou 2,2-bis(4-hidróxifenil) propano é sólido a temperatura ambiente e é mais comumente utilizado como um intermediário na manufatura de produtos policarbonatos e de resinas epóxi em enlatados. O BPA é apontado como um desregulador endócrino em humanos, podendo causar problemas reprodutores, carcinogênicos e mutagênicos.²⁵

O etil parabeno (EtP) ou 4-hidróxibenzoato de etila tem como função de conservante em alimentos, cosméticos e produtos de higiene pessoal. Estudos recentes têm sugerido um potencial carcinogênico e atividade estrogênica desse composto dentro do organismo humano, além de ser apontado como um desregulador endócrino.²⁶

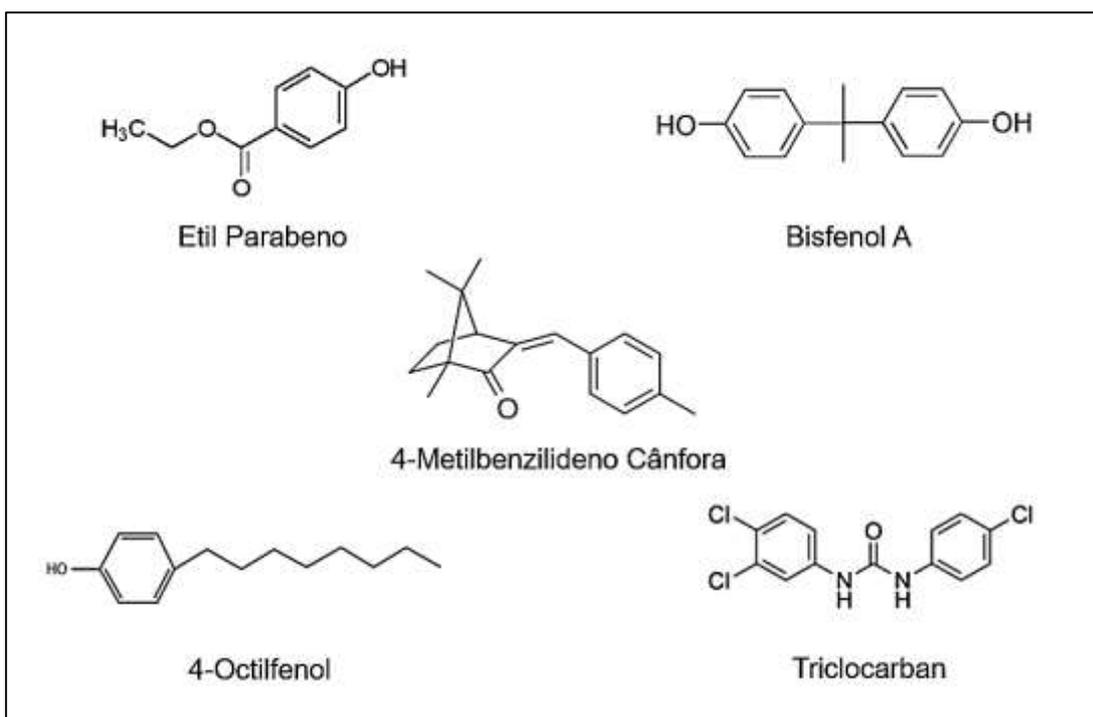
A 4-metilbenzilideno cânfora (4-MBC) é muito utilizada em filtros ultravioletas (UV), sendo causador de efeitos agudos e crônicos, principalmente influenciando na fertilidade e reprodução de peixes e invertebrados.²⁷

O 4-octilfenol (4-OC) é um plastificante utilizado na produção de garrafas plásticas, materiais de embalagem alimentícia e têxtil.²⁸ Esse composto tem poder de bioacumulação, sendo que sua acumulação no organismo desregula a produção hormonal, afetando principalmente a atividade reprodutora em animais.²⁹

A triclocarban (TCC) ou triclorocarbanilida é um antibactericida adicionado a diversos produtos utilizados em residências, como em xampus, sabonetes, cremes enxaguantes, bucais e dental. Pouco se sabe a respeito dos riscos da bioacumulação deste composto nos organismos, porém estudos recentes revelam que a degradação do mesmo gera produtos carcinogênicos.³⁰

A estrutura dos analitos descritos anteriormente está na Figura 7 abaixo:

Figura 7 - Estrutura dos analitos.



(FONTE: AUTORIA PRÓPRIA, 2016).

Na Tabela 1, estão descritas algumas das propriedades de cada um dos compostos, sendo a classe a que pertencem, a legislação para a concentração máxima permitida em águas de rios segundo a norma europeia de 2012³¹, o pKa e o coeficiente de partição octanol/água como logaritmo ($\log K_{o/w}$) que relaciona o equilíbrio de distribuição de um composto em um meio aquoso, sendo água, ou em um meio orgânico, sendo octanol.³²

Tabela 1 - Propriedades dos compostos de estudo.

Analito	Classe	Limite	pKa	Log K _{o/w}	Referência
BPA	Plastificante	-	9,6	2,20	33
EtP	Conservante	-	7,88	2,49	34
4-MBC	Filtro solar	-	-	5,92	35
4-OP	Plastificante	^a 0,01 µg.L ⁻¹	10,31	5,50	32, 36, ^a 37
TCC	Antisséptico	-	12,77	4,90	38

(FONTE: AUTORIA PRÓPRIA, 2016).

A análise dessas substâncias tem sido um importante desafio para os analistas devido a transformação em produtos com maior toxicidade do que os de partida, além de serem encontrados em concentrações muito baixas, fazendo-se necessário um preparo de amostra para que seja realizada uma pré-concentração destes analitos, onde otimizações são realizadas para que seja possível se obter a melhor determinação e possível controle destes contaminantes em águas de rios.^{23,37}

2.5 Otimização de Técnicas Analíticas

A otimização é empregada para aperfeiçoar o desempenho de um sistema, produto ou processo, onde tem como objetivo se obter a máxima eficiência. Em um método analítico, esta etapa é importante para se determinar as condições ideais e se obter as melhores respostas.³⁹

Em química analítica, a maior parte das otimizações são realizadas de forma univariada. Sendo assim, os parâmetros são avaliados de forma sequencial, um por vez, até se obter a resposta experimental. Entretanto, esta

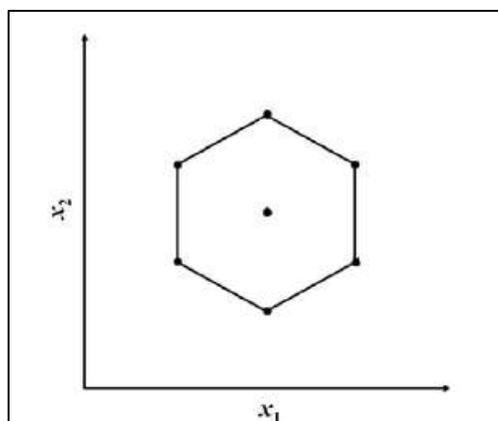
forma de análise apresenta desvantagens, como por exemplo, a não possibilidade de avaliar a influência entre as variáveis estudadas, o que pode acarretar em uma resposta incorreta devido a não retratar os efeitos completos entre elas. Além disso, é desfavorável trabalhar com otimização univariada, pois se gasta tempo e consumo de reagentes em maior quantidade.³⁹

Para correção e minimização desses problemas, foram introduzidas técnicas estatísticas multivariadas, sendo a mais utilizada as metodologias de superfície de resposta (do inglês, *Response Surface Methodology, RSM*). Este método baseia-se em modelos matemáticos empíricos, onde através de equações polinomiais, os dados experimentais são tratados de forma simultânea, sendo assim, pode-se avaliar a influência de diversas variáveis.⁴⁰

Crítérios como, boas estimativas dos coeficientes, minimização do número de experimentos e fornecer respostas a respeito das influências de cada variável, compõem um bom planejamento experimental. Um dos exemplos é o planejamento *Doehlert*.⁴⁰

O planejamento ou matriz *Doehlert* é um método bastante útil para experimentos de segunda ordem, ou seja, que envolvam a avaliação de dois parâmetros simultaneamente. Sua representação é feita em forma de um hexágono, composto por 6 pontos em seus vértices e um ponto central, sendo as variáveis estudadas apresentadas nos eixos, em que x_1 é avaliado em 3 pontos e x_2 em 5 pontos conforme apresentado na Figura 8.^{39,40}

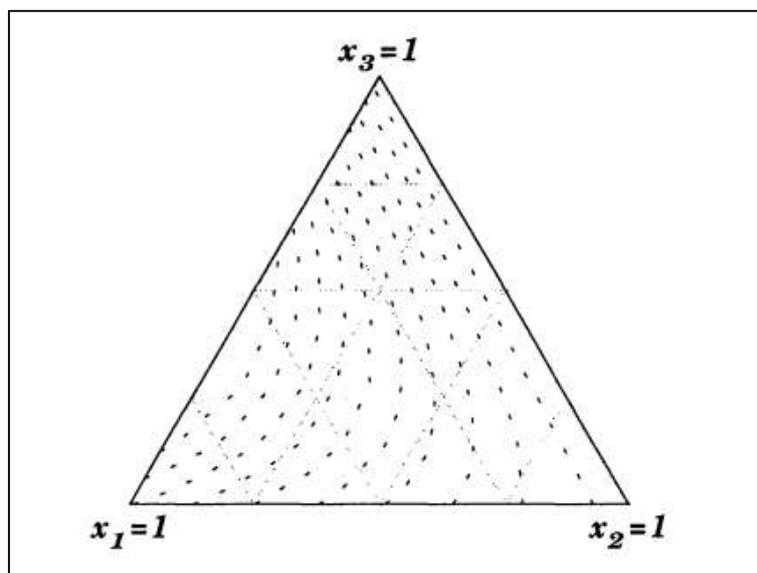
Figura 8 - Planejamento Doehlert.



(FONTE: ADAPTADO DE BEZERRA, 2008).³⁹

Outra metodologia de superfície resposta que pode ser utilizada é a mistura ternária, apresentada na Figura 9. Neste tipo, o *design* é constituído por uma superfície triangular, onde a condição ótima determinada pela influência das componentes é escolhida em um ponto dentro da superfície, sendo os 3 vértices as 3 variáveis estudadas. Este tipo de superfície é comumente utilizado quando se deseja avaliar a influência de solventes em parâmetros do método.⁴¹

Figura 9 - Superfície triangular.



(FONTE: NETO, 2001).⁴¹

2.6 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Como técnica de separação deste projeto, foi utilizada a cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, *High Performance Liquid Chromatography; HPLC*). Este instrumento se tornou indispensável nos laboratórios, pois é determinado pelo seu amplo uso na separação e determinação de uma gama de compostos, desde orgânicos à inorgânicos.⁴²

A fundamentação do HPLC se dá principalmente pela interação do analito com a fase estacionária, que está finamente dividida e preenchendo a coluna de separação, e com a fase móvel líquida, que apresenta altas vazões de solvente acarretando altas pressões. Por meio deste equilíbrio entre as duas

fases e de acordo com a partição dos analitos é possível separar e determinar as espécies presentes na amostra estudada.⁴²

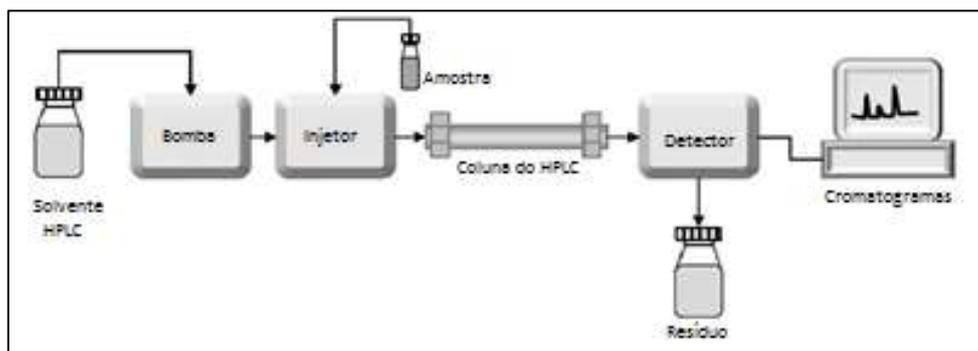
Dentre os principais tipos de mecanismos de separação e fase estacionária, a cromatografia líquida pode ser classificada em partição ou líquido-líquido, adsorção ou líquido-sólido, troca iônica ou de íons, exclusão, afinidade ou quiral.⁴² Neste trabalho foca-se na cromatografia líquida de alta eficiência por partição.

A cromatografia líquida de alta eficiência por partição é a mais utilizada, sendo uma delas a cromatografia líquida por fase ligada. Neste tipo, as partículas da fase estacionária são imobilizadas em um suporte do recheio. Esses recheios podem ser de diferentes polaridades, sendo a primeira de fase normal onde é formada por compostos polares e fases móveis apolares, como hexano e éter-propílico, e a segunda, a fase reversa.⁴²

A de fase reversa, mais comumente utilizada, é caracterizada por apresentar a fase estacionária apolar, geralmente um hidrocarboneto, e a fase móvel composta de solventes polares, sendo os principais, acetonitrila, metanol e água.⁴² Esse tipo de coluna recheada é ideal para separação de compostos orgânicos e com grupos polares, e neste trabalho são estudados 5 analitos desta natureza.

A coluna é um dos constituintes principais da cromatografia líquida, porém a instrumentação básica é formada também por um reservatório de introdução de solventes, um sistema de bombeamento, um injetor de amostra, um detector e um computador para recebimento dos dados e posterior tratamento dos mesmos, sendo as partes básicas apresentadas na Figura 10 a seguir.⁴³

Figura 10 - Instrumentação básica para cromatografia líquida de alta eficiência.



(FONTE: ADAPTADO DE LABORATORY INFO, 2016).⁴⁴

O sistema de fase móvel é constituído por solventes de alto grau de pureza, pouca quantidade de partículas e gases dissolvidos. A eluição pode ser realizada de duas formas, no modo isocrático ou no modo de gradiente. No modo isocrático é utilizada uma mistura constante de solventes, enquanto no modo de gradiente ocorre a mudança da porcentagem de solvente, sendo contínuo ou apenas em um período durante a corrida, para proporcionar a melhor separação das espécies.⁴³

Nos sistemas de bombeamentos, a fase móvel é impulsionada em altas vazões que provocam pressões elevadas no sistema, sendo estas mantidas de forma constante durante toda a análise. Na válvula de injeção, a amostra é introduzida, onde ocorrerá a mistura com a fase móvel e em seguida irá para a coluna. Na coluna, ocorrerá a separação dos analitos. Geralmente são construídas de aço inoxidável com diâmetros de 2 a 5 mm e comprimento de 10 a 30 cm. Para evitar o entupimento e aumento de vida útil das mesmas, são utilizadas colunas de guarda do mesmo material constituinte da coluna.^{42,44}

Após separação na coluna, a fase móvel contendo os analitos chega até os detectores. Existe uma grande variedade de detectores comercializados, sendo os mais comuns o de ultravioleta (do inglês, *Ultraviolet*; *UV*), arranjo de diodos (do inglês, *Diode Array Detector*; *DAD*), fluorescência (do inglês, *Fluorescence Detection*; *FLR*), índice de refração (do inglês, *Refractive Index Detection IR*), espectrometria de massas (do inglês, *Mass Spectrometry*; *MS*), dentre outros.⁴³

2.6.1 Modo de Detecção

Neste trabalho foi utilizado o detector de arranjo de diodos acoplado a cromatografia líquida de alta eficiência. Nele, um conjunto de lâmpadas de deutério (D) e tungstênio (W) emitem radiação na região do ultravioleta-visível, em uma faixa de aproximadamente 190 a 1024 nm. O feixe de luz incidente é disperso por uma rede holográfica, sendo centralizado em um conjunto de fotodiodos, onde permite o armazenamento e análise dos espectros de todos os comprimentos de onda de forma simultânea.⁴⁵

Além disso, esse detector é vantajoso pois gera espectros tridimensionais, que relaciona a absorbância, o comprimento de onda e o tempo de retenção, e permite determinar a pureza do pico, através da razão entre espectros de absorbância, escolhidos em um certo comprimento de onda. Desta forma, permite uma maior exatidão e precisão dos comprimentos de onda, gerando uma boa resolução e alta sensibilidade.^{45,47}

Os analitos estudados apresentam grupos que absorvem radiação na região do UV-Visível, através dos grupos cromóforos presentes nas ligações duplas conjugadas, o que permite a sua detecção por meio do DAD.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Uso de cortiça como fase extratora para a técnica de microextração em filme fino (TF-SPME) para determinação de contaminantes emergentes em amostras de água, em conjunto com o sistema de *96-well plate* e separação e detecção por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector por arranjo de diodos (HPLC-DAD).

3.2 Objetivos Específicos

- Otimização dos parâmetros para separação e detecção no HPLC-DAD.
- Preparação de filmes de fase extratora com o pó de cortiça e uso de fita adesiva para colagem das partículas nos pentes do sistema de *96-well plate*.
- Otimização dos parâmetros de extração e dessorção da microextração em filme fino.
- Avaliar os parâmetros de mérito, como limite de quantificação (LOQ), limite de detecção (LOD), faixa linear, coeficiente de correlação (r^2), recuperação (REC.) e precisão (RSD%) do método proposto.
- Aplicação do método desenvolvido em amostra de água de rio.

4 METODOLOGIA

4.1 Materiais e Reagentes

Foram utilizados padrões dos analitos envolvidos, obtidos da Sigma Aldrich ®, e a partir destes foram preparadas soluções padrão de cada em solvente metanol (J.T. Baker ®) e acetonitrila (Merck). A cortiça foi obtida de rolhas descartáveis de vinhos, sendo seu pó produzido por uma lixa de madeira e peneirado com granulometria média de 200 mesh. Para ajuste de pH, foram preparadas soluções de hidróxido de sódio (Quimex ®) e ácido clorídrico (Sigma Aldrich ®) em concentrações de 0,1M. Para o efeito salino, utilizou-se padrão analítico de cloreto de sódio (Synth ®). A água ultrapura foi produzida no instrumento *MegaPurity*, modelo MEGA RO/UP.

4.2 Preparo do Pó de Cortiça

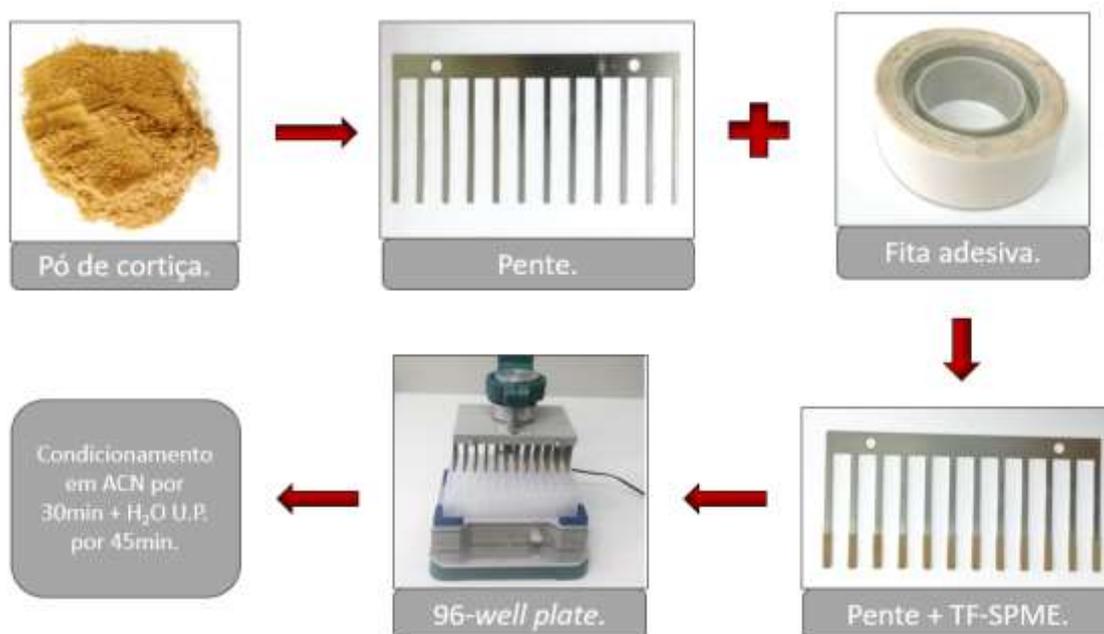
Rolhas descartáveis foram obtidas em estabelecimentos comerciais de Florianópolis-SC. Em um béquer, iniciou-se a lavagem das rolhas em água ultrapura por um período de 2 horas. Esta etapa se fez necessária onde foi possível observar que a água não apresentou coloração amarelada ou rosada, sendo a limpeza considerada como completa. Em seguida, as rolhas molhadas foram colocadas em uma estufa a uma temperatura de 110°C por um período de 12 horas. Após secas, estas foram lixadas em lixa de madeira. Em uma peneira de granulometria de 200 mesh, peneirou-se o pó obtido afim de se atingir um tamanho médio das partículas.

4.3 Preparo dos Pentes para o Sistema de 96-well plate

Os pentes do sistema de 96-*well plate* inicialmente foram lavados e lixados para se retirar qualquer impureza impregnada. Em seguida, mediu-se 1 cm, a partir da base para cima, em cada um dos pinos presentes nos pentes. A partir do fluxograma apresentado na Figura 11, com uma fita adesiva, colocou-se o pó de cortiça, nessa parte medida, em cada um dos pinos. Por fim, foi realizado o condicionamento para retirada do excesso das partículas e limpeza

das mesmas, sendo a primeira etapa feita em 300 μ L de acetonitrila por um período de 30 minutos e a segunda em água ultrapura em 300 μ L por um período de 45 minutos.

Figura 11: Procedimento de preparo dos filmes de TF-SPME com cortiça.



(FONTE: AUTORIA PRÓRIA, 2016).

4.4 Amostra de Água de Rio

A amostra utilizada neste trabalho para aplicação do método desenvolvido foi água de rio, obtida do Rio Quiriri, Joinville – SC, sendo armazenada em frasco âmbar e preservada em temperatura de 4°C.

4.5 Extração e Dessorção

A etapa de extração foi realizada em poços de 2 mL para o sistema de 96-*well plate*. O volume utilizado foi de 1,5 mL, sendo a amostra com pH e força iônica ajustados. Para o processo de dessorção, poços de 0,5 mL foram empregados, sendo o volume do solvente de dessorção de 0,3 mL.

4.6 Otimização dos Parâmetros para TF-SPME

4.6.1 Otimização do Tempo de Dessorção

Um dos primeiros passos para se obter bons resultados é a etapa de otimização do tempo de dessorção. Para este procedimento realizou-se a extração com condições de concentração 600 µg/L para EtP e 4-OC, 300 µg/L para BPA e 4-MBC e 100 µg/L para TCC, volume de amostra de 1,5 mL, sem adição de sal, pH igual a 6,00 e tempo de extração de 1 hora. Para dessorção, foi utilizada uma mistura de acetonitrila e metanol, com proporção de 1:1, sendo o volume de 300 µL e 3 tempos escolhidos de 10, 20 e 30 min, todos realizados em triplicata.

4.6.2 Otimização do Solvente de Dessorção

A escolha dos solventes de dessorção foi realizada através de um planejamento de superfície triangular. As extrações foram realizadas em um período de 1 hora, com concentração de 600 µg/L para EtP e 4-OC, 300 µg/L para BPA e 4-MBC e 100 µg/L para TCC e volume final de 1,5 mL. A etapa de dessorção foi realizada com volume final de 300 µL e tempo de 20 min de dessorção. Os solventes testados foram acetonitrila, metanol e água ultrapura, sendo a razão entre eles apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Razão entre os solventes de dessorção para o planejamento de superfície triangular.

Experimento	H ₂ O – prop. (v/v) %	H ₂ O – prop. (v/v) µL	MeOH – prop. (v/v) %	MeOH – prop. (v/v) µL	ACN – prop. (v/v) %	ACN – prop. (v/v) µL
1	1,0000	300	0,0000	0	0,0000	0
2	0,0000	0	1,0000	300	0,0000	0
3	0,0000	0	0,0000	0	1,0000	300
4	0,5000	250	0,5000	250	0,0000	0
5	0,5000	250	0,0000	0	0,5000	250
6	0,0000	0	0,5000	250	0,5000	250
7	0,6667	333	0,1667	84	0,1667	84
8	0,1667	84	0,6667	333	0,1667	84
9	0,1667	84	0,1667	84	0,6667	333
10	0,3333	400	0,3333	400	0,3333	400
11	0,3333	400	0,3333	400	0,3333	400
12	0,3333	400	0,3333	400	0,3333	400

4.6.3 Otimização do pH da Amostra

Os analitos possuem pKa's acima de 7,5, o que implica que as extrações são realizadas em meios mais ácidos para se obter melhor eficiência. Desta forma, 3 pH's foram escolhidos, 5,0, 5,5 e 6,0, onde foram ajustados com soluções de NaOH e HCl, ambas em concentração de 0,1 mol/L. As condições de extração foram 600 µg/L para EtP e 4-OC, 300 µg/L para BPA e 4-MBC e 100 µg/L para TCC, 1 hora de extração, sem adição de sal e volume de amostra de 1,5 mL. Para a dessorção realizou-se em 20 minutos e volume final de 300 µL em ACN/MeOH (1:1).

4.6.4 Otimização do Tempo de Extração e Adição de Sal (NaCl)

A última otimização foi baseada no planejamento multivariado *Doehlert*, apresentado na Figura 12. Para a extração, manteve-se 600 µg/L para EtP e 4-OC, 300 µg/L para BPA e 4-MBC e 100 µg/L para TCC, volume final de 1,5 mL e pH de 5,5. Para a dessorção, o volume final foi de 300 µL, com tempo de 20 minutos e solventes ACN/MeOH (1:1). Na Tabela 3 é apresentado a proporção entre o tempo de extração e a quantidade de sal empregada no experimento. Os experimentos de 1 a 6 foram realizados em duplicata e 7, 8 e 9 são a triplicata do ponto central.

Figura 12 - Planejamento Doehlert para a otimização do tempo de extração e quantidade de sal.

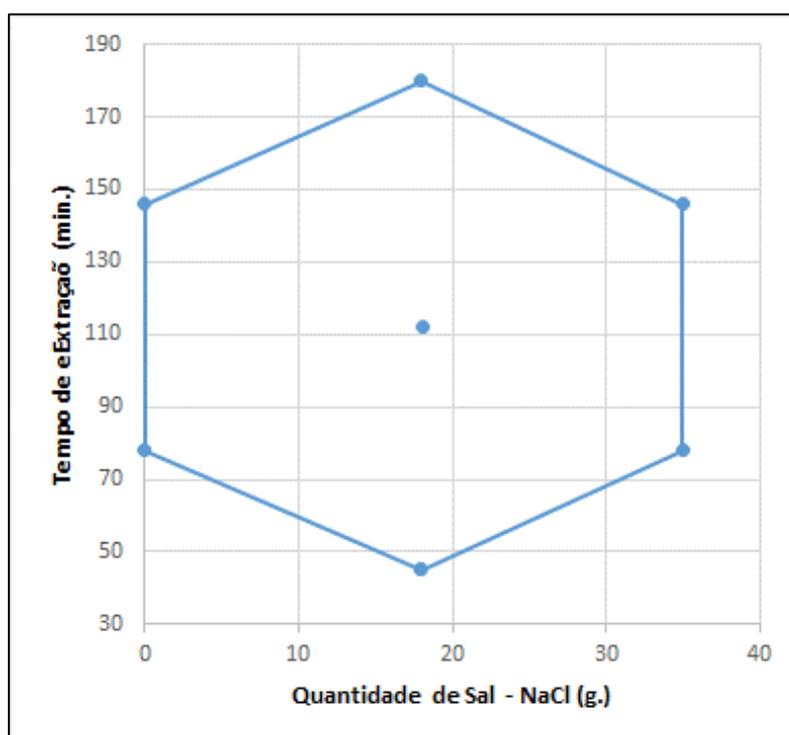


Tabela 3 - Experimentos para otimização do tempo de extração e quantidade de sal pelo planejamento Doehlert.

Experimento	Tempo de Extração	Sal (NaCl) / 100 mL
1	180 min	18 g
2	146 min	35 g
3	45 min	18 g
4	78 min	0 g
5	146 min	0 g
6	78 min	35 g
7	112 min	18 g
8	112 min	18 g
9	112 min	18 g

4.7 Instrumentação

Para a etapa de extração utilizou-se o sistema de 96-*well plate* (Brüder Mannesmann, Werkzeuge) de forma manual com 2 tipos de poços. Para as análises, foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência com loop de injeção manual de 20 μ L (Shimadzu LC-20AT) acoplado ao detector por arranjo de diodos (Shimadzu SPD-M20A). As separações cromatográficas foram realizadas em uma coluna de fase reversa C18, com partículas de 5 μ m, diâmetro de 4,6 mm e comprimento de 250 mm (Agilent Technologies), a qual apresenta uma faixa trabalho de pH entre 2,0 a 9,0. Os comprimentos de onda acompanhados foram 257 nm para etil parabeno, 226 nm para bisfenol A e 4-octilfenol, 298 nm para 4-metilbenzilideno cânfora e 265 nm para triclocarban. A fase móvel teve uma vazão de 1,0 mL/min, com volume de injeção de 20 μ L, sendo utilizado um gradiente entre acetonitrila e água ultrapura.

4.8 Parâmetros de Validação

Os parâmetros de mérito estudados foram limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), faixa linear, coeficiente de correlação linear (r^2), ensaios de recuperação (REC.) e precisão (RSD%).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Otimização Cromatográfica

Para se iniciar os estudos, foram realizadas otimizações para a escolha da melhor fase móvel afim de que a separação cromatográfica dos analitos fosse a mais eficiente. Os testes realizados tiveram como base um gradiente de solvente, variando-se a proporção entre eles durante a corrida cromatográfica, sendo escolhidos acetonitrila e água ultrapura.

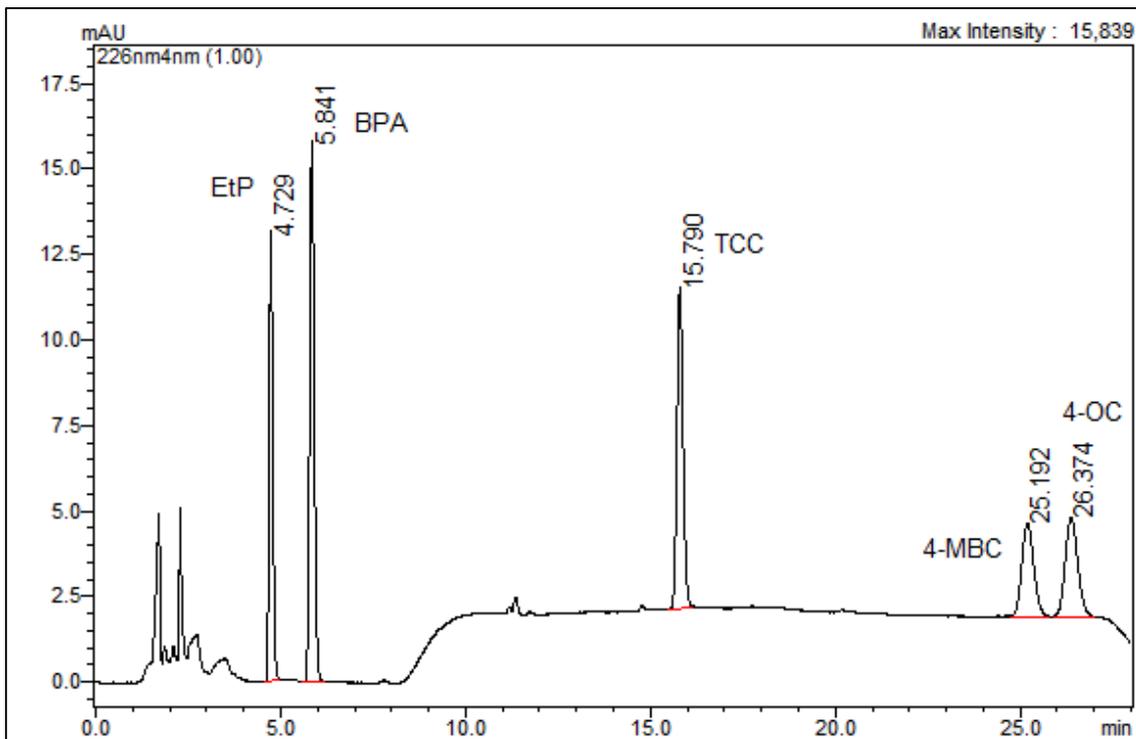
A solução dos analitos foi de 5 mg/L, e a partir da Tabela 4 determinou-se o melhor gradiente de solvente, com um tempo de corrida de 28 minutos. A partir do cromatograma na Figura 13, é possível definir a separação de todos os analitos com boa resolução e também foi estabelecido os tempos de retenção para cada um dos compostos estudados, sendo 4,7 minutos para Etilparabeno, 5,8 minutos para Bisfenol A, 15,8 minutos para Triclocarban, 25,2 minutos para 4-Metilbenzilidênio Cânfora e 26,4 minutos para 4-Octilfenol.

Tabela 4 - Gradiente de solvente para corrida cromatográfica.

Tempo (min)	Água U.P. (%)	Acetonitrila (%)
0,0 – 3,5	50	50
3,5 – 4,0	30	70
4,0 -22,5	30	70
22,5 – 23,5	50	50
23,5 – 28,0	50	50

(FONTE: AUTORIA PRÓPRIA, 2016).

Figura 13 - Cromatograma da separação dos analitos segundo a condição de gradiente de solvente escolhida acompanhado em comprimento de onda de 226 nm.



(FONTE: AUTORIA PRÓPRIA, 2016).

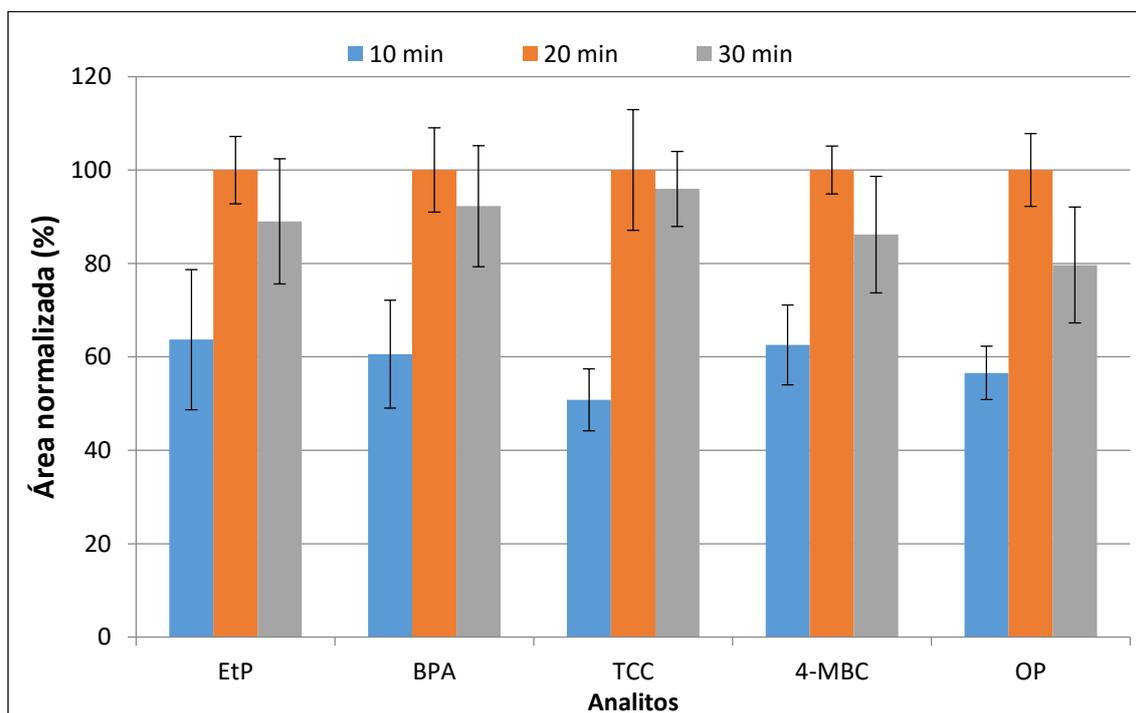
*Injeção de 20 μ L dos analitos com concentração de 5 mg/L para todos os analitos.

5.2 Otimização das Condições de Extração

5.2.1 Otimização do Tempo de Dessorção

A primeira etapa de otimização foi a escolha do melhor tempo de dessorção dos analitos. Foram testados três tempos diferentes, sendo eles 10 minutos, 20 minutos e 30 minutos, ambos em triplicata. Conforme a Figura 14, é possível observar que apesar do TCC apresentar um valor maior de RSD para 20 minutos em relação aos outros dois tempos, os demais analitos apresentaram menores valores de RSD, além de todos apresentarem maior área de resposta para o tempo de 20 minutos, portanto esta foi escolhida como condição de trabalho.

Figura 14 - Gráfico resposta para a otimização da melhor condição para o tempo de dessorção.



(FONTE: AUTORIA PRÓPRIA, 2016).

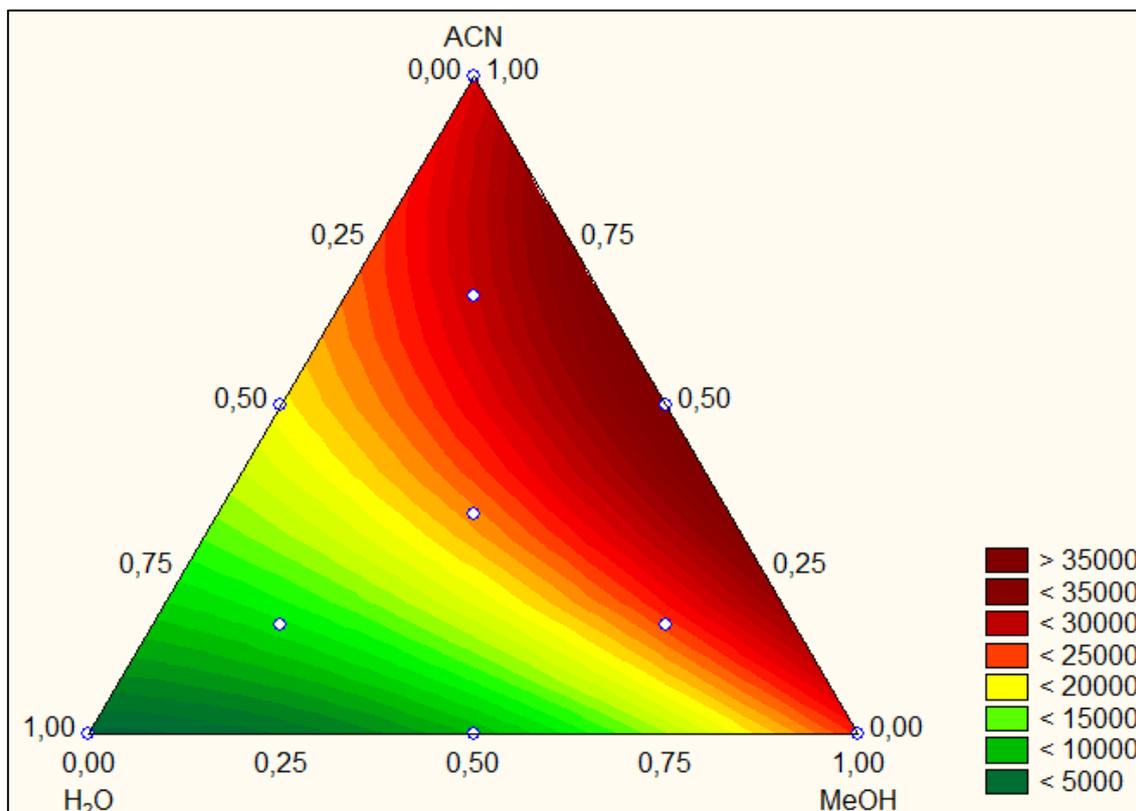
*Condições TF-SPME: Concentração de 600 µg/L para EtP e 4-OC, 300 µg/L para BPA e 4-MBC e 100 µg/L para TCC, tempo de extração de 60 minutos, sem adição de sal, pH igual a 6,00, volume de amostra de 1,5 mL, solvente de dessorção 300 µL (1:1) de ACN:MeOH.

5.2.2 Otimização do Solvente de Dessorção

Para o procedimento de escolha do solvente de dessorção foi realizado o planejamento de superfície triangular, envolvendo os solventes acetonitrila, metanol e água ultrapura. O gráfico foi construído a partir de uma função quadrática e apresentou um r^2 igual a 0,9505. Fixou-se 20 minutos determinados na etapa anterior para o tempo de dessorção e na Figura 15 pode-se observar que a região entre acetonitrila e metanol apresentou o melhor resultado. Isto é explicado pela afinidade que os analitos apresentam com os solventes, sendo o metanol o mais apolar interagindo mais com os analitos apolares como a TCC, a 4-MBC e o 4-OC e a acetonitrila o solvente polar da

mistura, interagindo mais com o EtP e o BPA, portanto essa mistura de solventes foi escolhida como melhor resposta em uma proporção de 1:1.

Figura 15 - Superfície triangular para determinação do melhor solvente de dessorção.



(FONTE: AUTORIA PRÓPRIA, 2016).

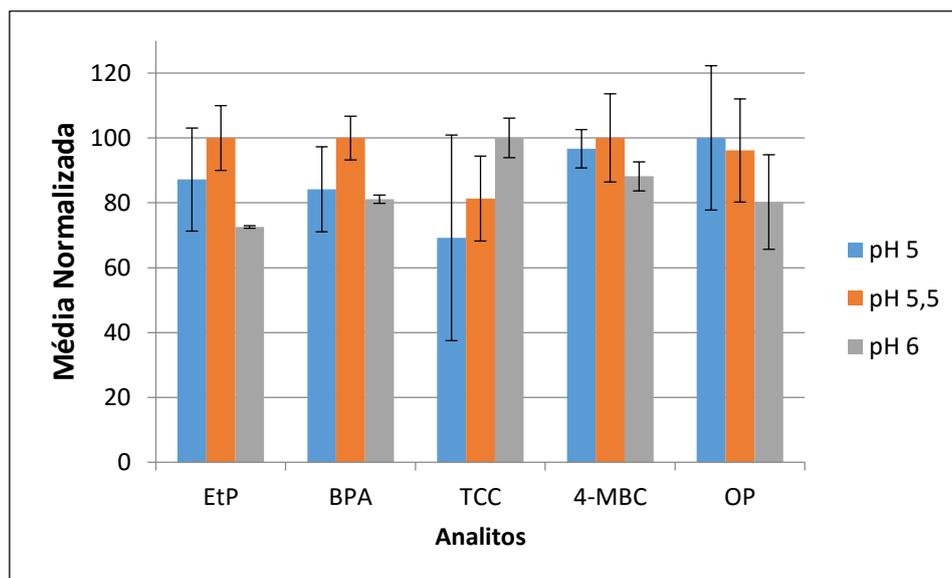
*Condições da TF-SPME: Concentração de 600 µg/L para EtP e 4-OC, 300 µg/L para BPA e 4-MBC e 100 µg/L para TCC, tempo de extração de 60 minutos, sem adição de sal, pH igual a 6,00, volume da amostra de 1,5 mL, com tempo de dessorção de 20 minutos e volume de dessorção de 300 µL.

5.2.3 Otimização do pH da Amostra

O procedimento de escolha do melhor pH foi estudado baseando-se que os analitos apresentam valores de pKa's acima de 7,5, portanto o pH deve estar em valores abaixo para que todos os analitos estejam em sua forma protonada para poder interagir com a coluna de fase reversa do cromatógrafo líquido e ocorrer uma boa separação. Além disto, os analitos EtP, BPA, 4-OC e

TCC são ionizáveis, já a 4-MBC não é ionizável e estudos já realizados na literatura indicam que para os 4 ionizáveis a faixa de pH de melhor trabalho é levemente ácida estando entre 5,0 a 5,5.^{20,45} Desta forma, três pH's foram testados, sendo eles 5,0, 5,5 e 6,0. O gráfico de barras da Figura 16 foi construído baseando-se na média das áreas de cada triplicata, para cada um dos pH's estudados para os 5 analitos, onde foi normalizada a partir de que a maior média foi tomada como 100% e as demais calculadas em relação a ela, sendo em cada pH para cada composto. A partir disso, é possível observar que o pH de 5,5 apresentou valores melhores para EtP, BPA e 4-MBC, entretanto para o TCC foi um pH 6,0 que apresentou melhor valor e para o 4-OC foi de pH 5,0. Apesar destes resultados, ambos se apresentam em sua forma não ionizada em pH 5,5, além dos resultados obtidos para os dois últimos serem considerados bons para se trabalhar neste pH, portanto foi escolhido como condição compromisso para a etapa de extração.

Figura 16 - Gráfico resposta para escolha do pH da amostra.



(FONTE: AUTORIA PRÓPRIA, 2016).

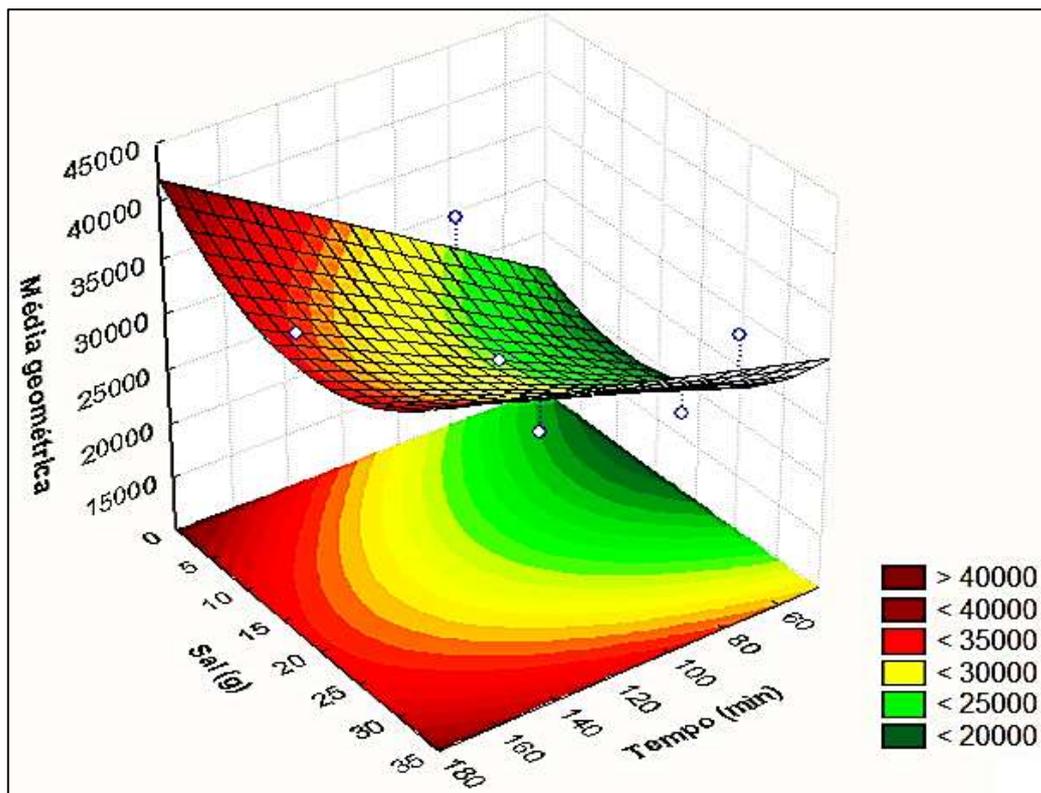
*Condições da TF-SPME: Concentração de 600 µg/L para EtP e 4-OC, 300 µg/L para BPA e 4-MBC e 100 µg/L para TCC, tempo de extração de 60 minutos, sem adição de sal, volume de amostra de 1,5 mL, tempo de dessorção de 20 minutos em solvente ACN/MeOH (1:1) com volume de 300 µL.

5.2.4 Otimização do Tempo de Extração e Adição de Sal (NaCl)

A última etapa de otimização realizada foi para determinar o melhor tempo de extração e a quantidade de sal utilizada na amostra, sendo a massa adicionada em gramas para 100 mL de solução.

Foram construídos gráficos de superfície para todos os analitos, e a partir deles foi obtido um gráfico de superfície resposta compromisso, apresentado na Figura 17, onde sua construção foi baseada em uma função quadrática e apresentou um r^2 igual a 0,8208. Pode-se avaliar que o tempo de extração demonstrou melhor resultado para 180 minutos, ou seja, por um período de 3 horas. A força iônica apresentou duas condições de trabalhos semelhantes, em 5 g e 35 g. Isso é explicado pela questão de polaridade dos analitos e pelo coeficiente de partição n-octanol/água ($K_{o/w}$). Os analitos EtP e BPA apresentam uma maior polaridade em relação aos demais, além de o coeficiente $K_{o/w}$ apresentar valores menores do que 3,5. Isso indica que a maior quantidade de sal adicionada faz com que as moléculas de água solvatem esses íons salinos e deixa estes compostos mais livres para migrarem para a fase extratora, sendo representado pelo valor de 35 g onde este máximo também é verificado em suas superfícies respostas individuais. Já para 4-MBC, TCC e 4-OC, a polaridade é menor e apresentam coeficientes $K_{o/w}$ com valores maiores do que 3,5. Em grandes quantidades de sal esses analitos tem a extração debilitada, pois em altas concentrações salinas as moléculas tendem a migrar para as paredes do material do frasco ou para a superfície da matriz, prejudicando a etapa de extração, representando o máximo em 5 g que também é observado nas 3 superfícies individuais desses analitos. Portanto, a partir destes estudos e como o único a apresentar legislação é o 4-OC, foi escolhido o de 5 g.

Figura 17 - Planejamento Doehlert para a otimização entre tempo de extração e quantidade de sal.



(FONTE: AUTORIA PRÓPRIA, 2016).

*Condições da TF-SPME: Concentração de 600 µg/L para EtP e 4-OC, 300 µg/L para BPA e 4-MBC e 100 µg/L para TCC, volume de amostra de 1,5 mL, tempo de dessorção dos analitos de 20 minutos e solvente de dessorção ACN/MeOH (1:1) com volume final de 300 µL.

5.3 Parâmetros de Mérito

As curvas de calibração foram construídas baseando-se nas faixas lineares, apresentada na Tabela 5, onde os analitos foram extraídos e em seguida, dessorvidos, sendo a injeção realizada no HPLC para separação e detecção no DAD. A partir disto, o método analítico proposto neste trabalho foi avaliado através dos parâmetros de mérito apresentados na Tabela 5 a seguir, sendo os dados das curvas obtidos no software Origin 8.0, e o limite de detecção e quantificação calculados a partir das equações abaixo:

$$\text{Limite de Detecção: LOD} = \frac{3 \times \text{Desvio Padrão}}{\text{Coef. Ang. da Reta}}$$

$$\text{Limite de Quantificação: LOQ} = \frac{10 \times \text{Desvio Padrão}}{\text{Coef. Ang. da Reta}}$$

Tabela 5 - Valores obtidos para LOD, LOQ, faixa linear e coeficiente de correlação para o método, para determinação de contaminantes emergentes em amostras de rio.

Composto	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)	Faixa linear (µg/L)	Curva de calibração	r ²
Etilparabeno	10	30	30 - 300	y= 43,503 x + 747,38	0,9992
Bisfenol A	5	15	15 - 150	y= 136,93 x + 740,29	0,9996
Triclocarban	2	5	5 - 50	y= 552,77 x - 494,53	0,9997
4 - Metilbenzilideno -cânfora	16	50	50 - 250	y= 214,7 x - 6496,4	0,9967
4-octilfenol	27	80	80 - 400	y= 97,447 x - 2741,8	0,9951

(FONTE: AUTORIA PRÓPRIA, 2016).

A partir dos dados obtidos, todos os coeficientes r² apresentaram valores maiores do que 0,99, sendo satisfatórios, pois indicam uma linearidade proporcional entre as concentrações dos analitos e a área obtida pelos cromatogramas gerados no HPLC-DAD. Analisando-se os LOD e LOQ para todos os analitos, observa-se que apresentaram valores relativamente altos, principalmente para o 4-octilfenol, que apresentou um valor igual a 27 µg/L pelo método proposto, sendo que a norma europeia de 2012 designa um limite

máximo permitido igual a 0,01 µg/L. Isto pode estar relacionado a instrumentação utilizada, sendo o HPLC-DAD, e para corrigir isto e diminuir estes limites, seria ideal a utilização de outro equipamento que apresente uma maior detectabilidade, como LC-MS ou LC-MS/MS.

Para os parâmetros de precisão (RSD) e ensaios de recuperação (REC.), foi realizada a aplicação do método na amostra de água do Rio Quiriri, onde não foi detectada a presença dos analitos no branco da amostra, podendo estar em concentrações abaixo dos limites de detecção obtidos pelo método. Os dados obtidos encontram-se na Tabela 6 abaixo:

Tabela 6 - Parâmetros de precisão e ensaios de recuperação na amostra do Rio Quiriri. (ND = nada detectado).

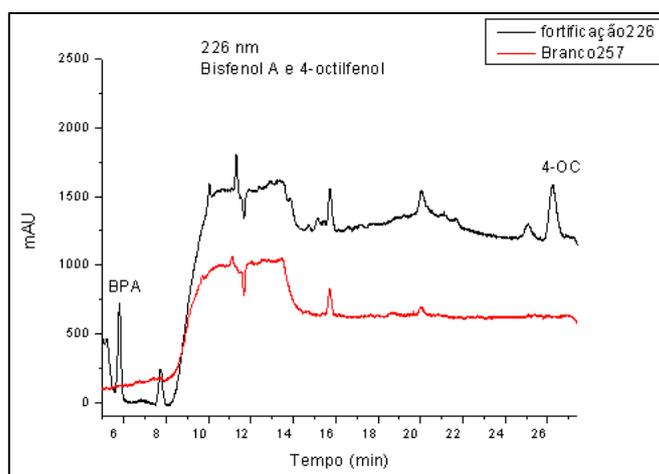
Composto	Concentração na Amostra	Nível fortificado (µg L⁻¹)	REC (%)	RSD (%)
Etilparabeno	ND	100	85	6
Bisfenol A	ND	50	95	6
Triclocarban	ND	16	99	5
Metilbenzilideno-cânfora	ND	50	130	4
4-octilfenol	ND	100	112	3

(FONTE: AUTORIA PRÓPRIA, 2016).

Através das fortificações realizadas, foram encontrados valores satisfatórios, pois foram utilizados diferentes pentes e mesmo assim a precisão apresentou resultados menores ou igual 6%. Para os ensaios de recuperação a faixa estendeu-se de 85 a 130%. Para o EtP, BPA, TCC e 4-OC as recuperações obtidas foram boas, entretanto para o 4-MBC a recuperação de 130% pode ter sido ocasionada por alguma diferença nos pentes, sendo uma maior quantidade de analito extraída, alcançando-se um valor de área maior do que em relação ao teórico obtido na curva de calibração. Nas Figuras 18,19 e 20 são apresentados os cromatogramas comparativos entre o branco da

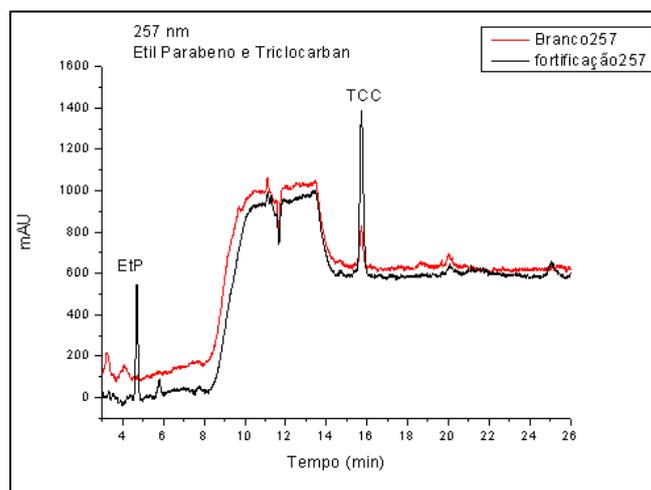
amostra (em cor vermelha) e a fortificação dos analitos (em cor preta) em diferentes comprimentos de onda, sendo na Figura 17 apresentado para o bisfenol A e o 4-octilfenol em 226 nm, na Figura 18 para o etilparabeno e a triclocarban em 257 nm, sendo a segunda apresentada neste comprimento de onda apenas para comparação, e na Figura 19 para o 4-metilbenzilideno cânfora em 298 nm.

Figura 18 - Cromatograma comparativo entre o branco da amostra de água do Rio Quiriri em cinza e a fortificação para Bisfenol A e 4-Octilfenol em preto, acompanhados em 226 nm.



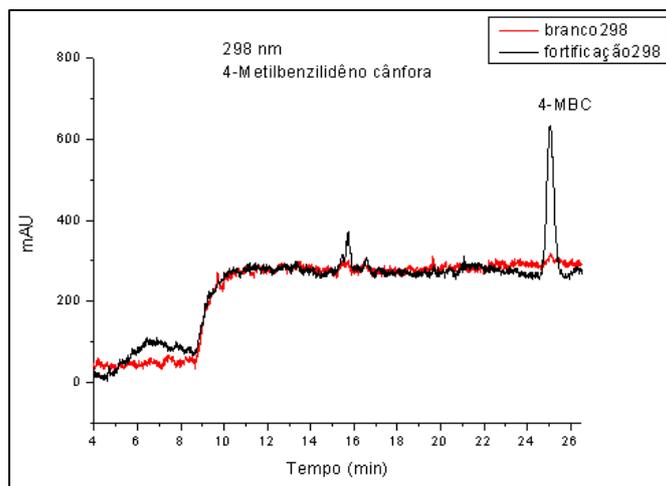
(FONTE: AUTORIA PRÓPRIA, 2016).

Figura 19 - Cromatograma comparativo entre o branco da amostra de água do Rio Quiriri em cinza e a fortificação para Etil Parabeno e Triclocarban em preto, acompanhados em 257 nm.



(FONTE: AUTORIA PRÓPRIA, 2016).

Figura 20 - Cromatograma comparativo entre o branco da amostra de água do Rio Quiriri em cinza e a fortificação para 4-Metilbenzilidêno Cânfora em preto, acompanhado em 298 nm.



(FONTE: AUTORIA PRÓPRIA, 2016).

6 CONCLUSÃO

O método analítico desenvolvido neste trabalho demonstrou bons resultados para a extração dos cinco analitos, sendo limites de quantificação, limites de detecção, coeficiente de correlação linear, precisão e ensaios de recuperação confiáveis.

A cortiça utilizada neste estudo apresentou boa eficiência para extração dos compostos estudados sendo utilizada como fase extratora para a técnica de microextração em filme fino. Além disso, por ser um recobrimento biodegradável, renovável e de grande disponibilidade, gera uma menor quantidade de resíduos causando menor impacto ambiental, portanto visa a química analítica verde.

As otimizações ocorreram de forma rápida e competente tanto para extração quanto para a dessorção. A etapa de extração efetuou-se em um período de 3 horas, entretanto com o uso do sistema de *96-well plate* foi possível realizar até 96 extrações simultâneas, o que garantiu uma frequência analítica alta de aproximadamente 2 minutos por experimento. Para a etapa de dessorção o tempo foi relativamente curto, de 20 minutos, sendo a frequência analítica de 12,5 segundos por experimento.

A corrida cromatográfica realizada no HPLC-DAD apresentou um tempo de 28 minutos em um gradiente de água e acetonitrila. A partir dos parâmetros obtidos, obteve-se resultados confiáveis, entretanto, os limites de detecção apresentaram valores altos, bem como o 4-octilfenol que possui legislação, obteve-se um valor acima do permitido. Para corrigir esse obstáculo, estudos estão sendo realizados em um cromatógrafo líquido acoplado ao espectrômetro de massas, a fim de diminuir estes limites.

Baseado nestes princípios, o método de microextração em filme fino com a cortiça como fase extratora e uso do sistema de *96-well plate* apresentou boa eficiência para a extração dos contaminantes emergentes presentes neste trabalho, representando uma expectativa para o controle destes compostos em rios e lagos que apresentam uma grande periculosidade aos organismos vivos e ao ecossistema.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ROCHA, D. L., BATISTA, A. D., ROCHA, F. R. P., DONATI, G. L., NÓBREGA, J. A. Greening sample preparation in inorganic analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, 2013. Vol. 45, p. 79-92.
2. MERIB, J., CARASEK, E. Microextração em fase líquida suportada com fibra oca (HF-LPME): Fundamentos e aplicações recentes. **Scientia Chromatographica**, 2013. Vol. 5, n. 4, p. 249-262.
3. QUEIROZ, M. E. C., MAGALHÃES, I. R. S., BONATO, P. S., OLIVEIRA, A. R. M. Fundamentos e avanços recentes da microextração em fase líquida empregando membranas cilíndricas ocas (LPME). **Scientia Chromatographica**, 2009. Vol. 1, n. 4, p. 11-17.
4. FARAJZADEH, M. A., DJOZAN, D., KHORRAM, P. Development of a new dispersive liquid-liquid microextraction method in a narrow-bore tube for preconcentration of triazole pesticides from aqueous samples. **Analytica Chimica Acta**, 22 nov. 2011. Vol. 713, p. 70-78.
5. PAWLISZYN, A. C. L. Solid-phase microextraction with thermal-desorption using fused-silica optical fibers. **Analytical Chemistry**, 1990. Vol. 62, p. 2145-2148.
6. LI, J., WANG, Y. B., LI, K. Y., CAO, Y. Q., WU, S., WU, L. Advances in different configurations of solid-phase microextraction and their applications in food and environmental analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, 2015. Vol. 72, p. 141-152.
7. OUYANG, G. PAWLISZYN, J. A critical review in calibration methods for solid-phase microextraction. **Analytica Chimica Acta**, 2008. Vol. 627, p. 184-197.
8. Sigma Aldrich. Bioanalysis with SPME. Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/reporter-us/bioanalysis-with-spme.html>. Acessado em: 09 de maio de 2016.
9. DIAS, A. N. Cortiça: uma nova abordagem como fase extratora para microextração em fase sólida e microextração em barra adsortiva. 2015. 151 f. **Tese (Doutorado em Química)**. Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

10. SUN, M. WU, Q., WANG, C., WANG, Z. Thin-film microextraction for the preconcentration of some endocrine disrupting chemicals in aqueous samples before chromatographic analysis. **Analytical Methods**, 11 mar. 2014. P. 6316-6321.
11. BRUHEIM, I., LIU, X., PAWLISZYN, J. Thin-filme microextraction. **Analytical Chemistry**, 2003. Vol. 75, p. 1002-1010.
12. BOYACI, E., GORYŃSKI, K., VITERI, C. R., PAWLISZYN, J. A study of thin film solid phase microextraction methods for analysis of fluorinated benzoic acids in seawater. **Journal of Chromatography A**, 2016. Vol. 1436, p. 51-58.
13. JIANG, R., PAWLISZYN, J. Thin-film microextraction offers another geometry for solid-phase microextraction. **Trends in Analytical Chemistry**, 2012. Vol. 32, p. 245-253.
14. MIRNAGHI, F. S., MONTON, M. R. N., PAWLISZYN, J. Thin-film octadecyl-silica glass coating for automated 96-blade solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography–tandem mass spectrometry for analysis of benzodiazepines. **Journal of Chromatography A**, 2012. Vol. 1246, p. 2-8.
15. MIRNAGHI, F. S., MOUSAVI, F., ROCHA, S. M., PAWLISZYN, J. Automated determination of phenolic compounds in wine, berry, and grape samples using 96-blade solid phase microextraction system coupled with liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 2013. Vol. 1276, p. 12-19.
16. MONTEIRO, R. A. Avaliação do potencial de adsorção de U, Th, Pb, Zn e Ni pelas fibras de coco. 2009. 79 f. **Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Materiais)**. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. São Paulo.
17. DIAS, A. N., SIMÃO, V., MERIB, J., CARASEK, E. Cork as a new (green) coating for solid-phase microextraction: Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples by gas chromatography–mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, 2013. Vol. 772, p. 33-39.
18. OLIVELLA, M. À., FERNÁNDEZ, I., CANO, L. JOVÉ, P., OLIVERAS, A. Role of chemical components of cork on sorption of aqueous polycyclic

- aromatic hydrocarbons. **International Journal of Environmental Research**, 2 aug. 2012. Vol. 7, p. 225-234.
19. DIAS, A. N., SIMÃO, V., MERIB, J., CARASEK, E. Use of green coating (cork) in solid-phase microextraction for the determination of organochlorine pesticides in water by gas chromatography-electron capture detection. **Talanta**, 20 nov. 2014. Vol. 134, p. 409-414.
20. DIAS, A. N., SILVA, A. C., SIMÃO, V., MERIB, J., CARASEK, E. A novel approach to bar adsorptive microextraction: Cork as extractor phase for determination of benzophenone, triclocarban and parabéns in aqueous samples. **Analytica Chimica Acta**, 2015. Vol. 888, p. 59-66.
21. FERNANDES, E. M., CORRELO, V. M., MANO, J. F., REIS, R. L. Cork-polymer biocomposites: Mechanical, structural and thermal properties. **Materials and Design**, 21 may 2015. Vol. 82, p. 282-289.
22. DE LA CRUZ, N., GIMÉNEZ, J., ESPLUGAS, S., GRANDJEAN, D., DE ALENCASTRO, L. F., PULGARÍN, C. Degradation of 32 emergent contaminants by UV and neutral photo-fenton in domestic wastewater effluent previously treated by activated sludge. **ScieVerse ScienceDirect**, 2012. Vol. 46, 1947-1957.
23. GÓMEZ, M. J., GÓMEZ-RAM, M. M., AGÜERA, A., MEZCUA, M., HERRERA, S., FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. A new gas chromatography/mass spectrometry method for the simultaneous analysis of target and non-target organic contaminants in water. **Journal of Chromatography A**, 2009. Vol. 1216, 4071-4082.
24. MORRISON, S. A., SIEVE, K. K., RATAJCZAK, R. E., BRINGOLF, R. B., BELDEN, J. B. Simultaneous extraction and cleanup of high-lipid organs from white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) for multiple legacy and emerging organic contaminants using QuEChERS sample preparation. **Talanta**, 2016. Vol. 146, p. 16-22.
25. ROCHA, B. A., DA COSTA, B. R. B., DE ALBUQUERQUE, N. C. P., DE OLIVEIRA, A. R. M., SOUZA, J. M. O., AL-TAMEEMI, M., CAMPIGLIA, A. D., JUNIOR, F. B. A fast method for bisphenol A and six analogues (S, F, Z, P, AF, AP) determination in urine samples based on dispersive liquid-liquid microextraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Talanta**, 2016, Vol. 154, p. 511-519.

26. PAPAPOPOULOS, C., FRONTISTIS, Z., ANTONOPOULOU, M., VENIERI, D., KONSTANTINOY, I., MANTZAVINOS, D. Sonochemical degradation of ethyl paraben in environmental samples: Statistically important parameters determining kinetics, by-products and pathways. **Ultrasonics Sonochemistry**, 2016. Vol. 31, p. 62-70.
27. FENT, K., KUNZ, P. Y., ZENKER, A., RAPP, M. A tentative environmental risk assessment of the UV-filters 3-(4-methylbenzylidene-camphor), 2-ethyl-hexyl-4-trimethoxycinnamate, benzophenone-3, benzophenone-4 and 3-benzylidene camphor. **Marine Environmental Research**, 2010. Vol. 69, p. S4-S6.
28. LONG, F., ZHANG, Z., WANG, J., YAN, L., ZHOU, B. Cobalt-nickel bimetallic nanoparticles decorated graphene sensitized imprinted electrochemical sensor for determination of octylphenol. **Electrochimica Acta**, 9 ap 2015. Vol. 168, p. 337-345.
29. LI, X., LIU, J., ZHANG, Y. Octylphenol induced gene expression in testes of roq, *Rana chensinensis*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 2016. Vol. 128, p. 75-82.
30. GUO, J.-H., LI, X.-H., CAO, X.-L., LI, Y., WANG, X.-Z., XU, X.-B. Determination of triclosan, triclocarban and methyl-triclosan in aqueous samples by dispersive liquid-liquid microextraction combined with rapid liquid chromatography. **Journal Of Chromatography A**, 2009. Vol. 1216, p. 3038-3043.
31. COMISSÃO EUROPÉIA, Diretiva que relaciona as substâncias prioritárias nas águas: Brussels 31/1/2012, COM (2011) 876 final.
32. KOKOSA, J. M., PRZYJAZNY, A., JEANNOT, M. A. **Solvent Microextraction – Theory and Practice**. Editora Wiley, 2009, New Jersey, Canada. 323 p.
33. STAPLES, C. A., DOM, P. B., KLECKA. G. M., O'BLOCK, S. T., HARRIS, L. R. A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A. **Pergamon**, 14 oct 1997. Vol. 36, p. 2149-2173.
34. ALMEIDA, C., NOGUEIRA, J. M . F. Determination of trace levels of parabens in real matrices by bar adsorptive microextraction using

- selective sorbent phases. **Journal of Chromatography A**, 24 april 2014. Vol. 1384, p. 17-26.
35. SØEBORG, T., GANDERUP, N. C., KRISTENSEN, J. H., BJERREGAARD, P., PEDERSEN, K. L., BOLLEN, P., HANSEN, S. H., SØRENSEN, B. H. Distribution of the UV filter 3-benzylidene camphor in rat following topical application. **Journal of Chromatography B**, 6 mar 2006. Vol. 834, p. 117-121.
36. 4-octylphenol. Disponível em: <http://www.chemicalize.org/structure/#!mol=4-OCTYLPHENOL&source=fp>. Acesso em: 27 de abril de 2016.
37. SERÔDIO, P., NOGUEIRA, J. M. F. Multi-residue screening of endocrine disrupters chemicals in water samples by stir bar sorptive extraction-liquid desorption-capillary gas chromatography-mass spectrometry detection. **Analytica Chimica Acta**, 26 ap 2004. Vol. 517, p. 21-32.
38. CHU, S., METCALFE, C. D. Simultaneous determination of triclocarban and triclosan in municipal biosolids by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 11 july 2007. Vol. 1164, p. 212-218.
39. BEZERRA, M. A., SANTELLI, R. E., OLIVEIRA, E. P., VILLAR, L. S., CALEIRA, L. A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, 2008. Vol. 76, p. 965-977.
40. TEÓFILO, R. F., FERREIRA, M. M. C. Quimiometria ii: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, 2006. Vol. 29, p. 338-350.
41. NETO, B. B., SCAMINIO, I. S., BRUNS, R. E. Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. Editora Unicamp. 2º Edição, 2001. Campinas, SP. 412 p.
42. SKOOG, A. D., WEST, D. M., HOLLER, F. J., CROUCH, R. S. **Fundamentos de química analítica**. Editora Thomson, Learning, 2006. Tradução da 8ª edição norte-americana.
43. HARRIS, D.C. **Análise Química Quantitativa**. Tradução da 7ª edição, Rio de Janeiro: Editora LTC, 2008. 867 p.
44. Laboratory Info. Instrumentação HPLC. Disponível em: <http://laboratoryinfo.com/hplc/>. Acesso em 02 de maio de 2016.

45. COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; **BONATO, P. S. Fundamentos de Cromatografia. Campinas:** Editora da Unicamp, 2006. 456 p.
46. RAIMUNDO JR., I.M., PASQUINI. C. Espectrofotometria Multicanal E Arranjos De Fotodiodo. **Química Nova**, jan - fev. 1997. Vol. 20, n.1, p. 83-88.
47. NENG, N. R., NOGUEIRA, J. M. F. Determination of phenol compounds in surface water matrices by bar adsorptive microextraction-high performance liquid chromatography-diode array detection. **Molecules**, 2014. v. 19, p. 9369-9379.