

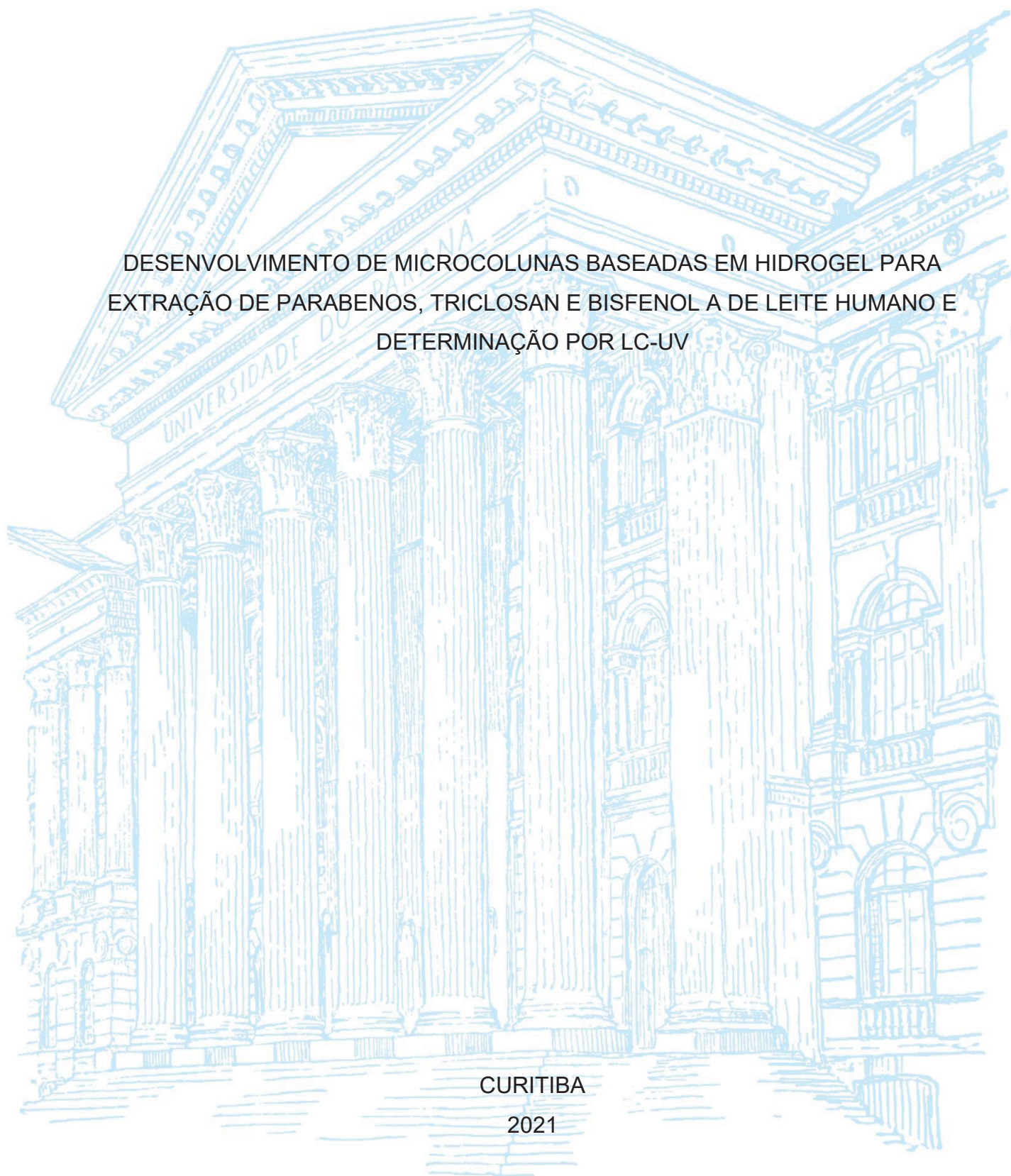
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

NAIARA MARIANA FIORI MONTEIRO SAMPAIO

DESENVOLVIMENTO DE MICROCOLUNAS BASEADAS EM HIDROGEL PARA
EXTRAÇÃO DE PARABENOS, TRICLOSAN E BISFENOL A DE LEITE HUMANO E
DETERMINAÇÃO POR LC-UV

CURITIBA

2021



NAIARA MARIANA FIORI MONTEIRO SAMPAIO

DESENVOLVIMENTO DE MICROCOLUNAS BASEADAS EM HIDROGEL PARA
EXTRAÇÃO DE PARABENOS, TRICLOSAN E BISFENOL A DE LEITE HUMANO E
DETERMINAÇÃO POR LC-UV

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Química.

Orientador: Prof. Dr. Bruno José Gonçalves da Silva

Coorientadora: Profa. Dra. Izabel Cristina Riegel-Vidotti

CURITIBA

2021

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

S192d Sampaio, Naiara Mariana Fiori Monteiro

Desenvolvimento de microcolunas baseadas em hidrogel para extração de parabenos, triclosan e bisfenol A de leite humano e determinação por LC-UV [recurso eletrônico] / Naiara Mariana Fiori Monteiro Sampaio – Curitiba, 2021.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Química.

Orientador: Prof. Dr. Bruno José Gonçalves da Silva

Coorientadora: Profa. Dra. Izabel Cristina Riegel Vidotti

1. Leite - composição. 2. Leite humano. I. Silva, Bruno José Gonçalves da. II. Vidotti, Izabel Cristina Riegel. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 649.33

Bibliotecária: Vilma Machado CRB-9/1563

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação QUÍMICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **NAIARA MARIANA FIORI MONTEIRO SAMPAIO** intitulada: **Desenvolvimento de microcolunas baseadas em hidrogel para extração de parabenos, triclosan e bisfenol A de leite humano e determinação por LC-UV**, sob orientação do Prof. Dr. BRUNO JOSÉ GONÇALVES DA SILVA, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de doutora está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 17 de Dezembro de 2021.



BRUNO JOSÉ GONÇALVES DA SILVA
Presidente da Banca Examinadora



EDVANI CURTI MUNIZ
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ - UEM
E UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ - UFPI)



FREDERICO LUIS FELIPE SOARES
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)



ANDREA PINTO DE OLIVEIRA
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)



LEANDRO WANG HANFAO
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS)

Dedico a todas as pessoas cujo direito à educação foi negado. Por uma educação mais inclusiva e democrática!

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Maria Zilda e José Altair por todo o apoio, incentivo e compreensão fundamentais para a realização deste trabalho.

Ao professor Dr. Bruno José Gonçalves da Silva agradeço à orientação, paciência, apoio e confiança durante a realização do doutorado.

À professora Dra. Izabel Riegel-Vidotti pela coorientação e contribuições para este trabalho.

À professora Dra. Andrea de Oliveira pela dedicação na correção dos relatórios anuais, bem como às suas contribuições no exame de qualificação. Agradeço também por aceitar participar da banca de defesa da tese e pelas importantes contribuições para este trabalho.

Aos professores Dr. Frederico Soares e Dr. Leandro Hantao pelas valiosas contribuições no exame de qualificação, bem como por aceitarem a participar da banca de defesa de tese e por suas contribuições.

Ao professor Dr. Edvani Muniz pelo aceite em participar da banca de defesa de tese e suas importantes contribuições.

Aos amigos e colegas dos grupos de pesquisa CroMe, GQA, TECNOTRATER e GAQQ, pela ajuda, companhia, carinho e aos momentos de descontração que facilitaram esse processo.

À CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro concedido durante o período de realização deste Doutorado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ) da Universidade Federal do Paraná.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta tese e para a minha formação acadêmica.

Ao João Paulo Vita Damasceno pelo apoio, paciência e amor fundamentais para a finalização desta jornada. Agradeço também às nossas infinitas conversas científicas, que foram muito importantes durante a realização deste trabalho.

Palavra não é privilégio de algumas pessoas, mas o direito de todos.

(Paulo Freire, 1968)

RESUMO

A técnica de microextração em fase sólida no tubo (*in-tube* SPME) tem se destacado devido a sua facilidade de automação com a cromatografia líquida e possibilidade de utilização de segmentos de colunas comerciais de cromatografia gasosa como dispositivo de extração para matrizes complexas. Todavia, essas fases comerciais podem apresentar baixa estabilidade em meio aquoso e/ou orgânico e dificuldade para extrair compostos polares de matrizes aquosas. Desse modo, o desenvolvimento de fases extratoras polares é necessário e os hidrogéis poliméricos têm se mostrado promissores para essa aplicação, devido à presença de diversos grupos polares em altas concentrações na estrutura desses materiais. Nesse sentido, este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de dispositivos de extração para *in-tube* SPME com fase sorvente baseada em hidrogéis de álcool polivinílico (PVOH) para a extração de metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno, butilparabeno, bisfenol A e triclosan de amostras de leite humano e determinação por cromatografia líquida com detecção espectrofotométrica na região do ultravioleta (LC-UV). Os dispositivos de extração foram obtidos a partir da silanização de capilares de sílica fundida e modificação covalente com hidrogel de PVOH, utilizando glutaraldeído como agente de reticulação. A eficiência de extração dos dispositivos obtidos foi avaliada e o dispositivo mais eficiente foi caracterizado e selecionado para a aplicação em amostras de leite humano. O dispositivo de extração preparado apresentou maior eficiência de extração para os compostos menos polares em amostras de água ultrapura. Contudo, o leite humano apresentou elevado efeito matriz para os analitos com maior $\log K_{ow}$, de forma que o método de extração por *in-tube* SPME foi aplicado apenas para a extração dos parabenos. O método de extração por *in-tube* SPME e determinação por LC-UV obteve limites de quantificação entre 10,0 e 15,0 ng mL⁻¹ para esses compostos. No ensaio intra-dia foram obtidos valores de RSD de 5,6 a 13,6 % e exatidão de 74,5 a 114,4 %. Para os ensaios inter-dia os valores alcançados para o RSD foram de 7,6 a 16,5 % e para a exatidão de 81,1 a 128,6 %. O método obtido foi aplicado na determinação de parabenos em seis amostras reais de leite humano, nas quais os analitos não foram detectados (< LOD). O dispositivo de *in-tube* SPME foi utilizado por até 250 vezes sem perder eficiência de extração, teve um baixo custo de obtenção e permitiu a dessorção dos analitos com água, sem a necessidade de empregar solventes orgânicos nessa etapa. Os resultados obtidos para o dispositivo de *in-tube* SPME modificado com hidrogel de PVOH evidenciam o grande potencial de uso desse material como fase extratora, o qual ainda é pouco explorado pela literatura.

Palavras-chave: Interferentes endócrinos. Leite humano. *In-tube* SPME. Hidrogel. Álcool polivinílico. LC-UV.

ABSTRACT

The in-tube solid phase microextraction (in-tube SPME) technique has stood out due to its easy automation with liquid chromatography and the possible use of gas chromatography columns segments as extraction device. However, the commercial phases can have low stability in aqueous and/or organic media and limitations in extracting polar compounds from aqueous matrices. Thus, the development of polar extraction phases is necessary, and polymeric hydrogels are promising materials for this application, due to the high concentrations of several polar groups in their structures. In this sense, this work aimed to develop extraction devices for in-tube SPME with sorbent phase based on hydrogels of polyvinyl alcohol (PVOH) for the extraction of methylparaben, ethylparaben, propylparaben, butylparaben, bisphenol A and triclosan from human milk samples and determination by liquid chromatography with spectrophotometric detection in ultraviolet region (LC-UV). The extraction devices were obtained by silanization of fused silica capillaries and covalent modification with PVOH hydrogel, using glutaraldehyde as crosslinking agent. The extraction efficiency of the obtained devices was evaluated, the most efficient device was characterized and selected for the application in human milk samples. The extraction device showed higher extraction efficiency for the less polar compounds, in ultrapure water samples. However, human milk samples showed high matrix effect for the analytes with higher $\log K_{o/w}$, thus the in-tube SPME was applied only for the extraction of parabens. For these compounds, the limits of quantification obtained for the method of in-tube SPME with determination by LC-UV were between 10.0 and 15.0 ng mL⁻¹. In the intra-day assay, RSD values from 5.6 to 13.6% and accuracy from 74.5 to 114.4 % were obtained. For the inter-day essays, RSD values of 7.6 to 16.5 % and accuracy of 81.1 to 128.6% were achieved. The method was applied for the determination of parabens in six real samples of human milk, in which the analytes were not detected (< LOD). The in-tube SPME device was used up to 250 times without losing extraction efficiency, had a low production cost and allowed the analytes desorption using water, with no need of organic solvents in this step. The results obtained for the in-tube SPME device modified with PVOH hydrogel showed great potential for utilization as extraction phases, which is still little explored in the literature.

Keywords: Endocrine disruptors. Human milk. *In-tube* SPME. Hydrogel. Polyvinyl alcohol. LC-UV.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – REPERESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA CASEÍNA MOSTRANDO (A) O MODELO DE ORGANIZAÇÃO EM SUBMICELAS PROPOSTO POR WALSTRA E (B) UMA REPRESENTAÇÃO DAS EXTREMIDADES ELETRICAMENTE CARREGADAS DE κ -CASEÍNA.	22
FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PRINCÍPIO BÁSICO DO MECANISMO DE PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	24
FIGURA 3 – DISPOSITIVOS PARA <i>in-tube</i> SPME EMPREGANDO CAPILARES REVESTIDOS INTERNAMENTE (A) OU EMPACOTADOS (B) COM A FASE SORVENTE.....	31
FIGURA 4 – (A) FOTOGRAFIA DO INJETOR MANUAL (RHEODYNE) COM OS PRINCIPAIS COMPONENTES INDICADOS; REPRESENTAÇÕES ESQUEMÁTICAS DOS PROCESSOS DE (B) EXTRAÇÃO (POSIÇÃO CARREGAR) E DE (C) DESSORÇÃO (POSIÇÃO INJETAR).....	32
FIGURA 5 – (A) FOTOGRAFIA DE GELATINA; (B) IMAGEM DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE GEL DE ÁLCOOL POLIVINÍLICO; (C) AEROGEL DE SÍLICA; (D) HIDROGEL DE POLÍMERO CONDUTOR (POLIANILINA/POLI(4-ESTIRENOSULFONATO)); (E) ESQUEMA DE SÍNTESE DE HIDROGEL POR POLIMERIZAÇÃO TRIDIMENSIONAL A PARTIR DE MONÔMERO HIDROFÍLICO; (F) ESQUEMA DE SÍNTESE DE HIDROGEL A PARTIR DE POLÍMERO HIDROFÍLICO.....	36
FIGURA 6 – ESTRUTURA POSSÍVEL DO POLÍMERO DE PVOH (A) E DOS MONOSSACARÍDEOS QUE FORMAM O ALGINATO, β -D-MANURONATO (B) E α -L-GULURONATO (C), E A PECTINA, ÁCIDO GALACTURÔNICO (D).....	38
FIGURA 7 – REPRESENTAÇÃO DA REAÇÃO DE RETICULAÇÃO DO PVOH COM GLUTARALDEÍDO.....	39
FIGURA 8 – FOTOGRAFIA DE DISPOSITIVO DE EXTRAÇÃO PREPARADO A PARTIR DE CAPILAR DE SÍLICA FUNDIDA COM COMPRIMENTO DE 40 cm, DIÂMETRO INTERNO DE 0,53 mm E FASE SORVENTE BASEADA EM HIDROGEL DE PVOH.....	47

FIGURA 9 – PROCEDIMENTO DE MODIFICAÇÃO DOS CAPILARES DE SÍLICA FUNDIDA.	49
FIGURA 10 – CROMATOGRAMAS OBTIDOS PARA OS ANALITOS (MPB, EPB, BPA, PPB E TCS - 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) APÓS SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA EM COLUNA ECLIPSE XDB-C18 (150 $\times$ 4,6 mm, 5 μm) E (A) 40 %, (B) 50 % E (C) 60 % (v/v) DE ACN COM VAZÃO DE 1 mL min^{-1}	62
FIGURA 11 – CROMATOGRAMAS OBTIDOS PARA OS ANALITOS (MPB, EPB, BPA, PPB E TCS - 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) APÓS SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA EM COLUNA ECLIPSE XDB-C18 (150 $\times$ 4,6 mm, 5 μm) EMPREGANDO OS MÉTODOS (A) 5 E (B) 6.	64
FIGURA 12 – CROMATOGRAMAS OBTIDOS PARA OS ANALITOS (MPB, EPB, BPA, PPB E TCS - 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) APÓS SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA EM COLUNA ECLIPSE XDB-C18 (150 $\times$ 4,6 mm, 5 μm) E (A) 60 % (v/v) DE MeOH OU (B) 80 % (v/v) DE MeOH COM VAZÃO DE 1 mL min^{-1}	66
FIGURA 13 – CROMATOGRAMAS OBTIDOS PARA OS ANALITOS (MPB, EPB, BPA, PPB E TCS - 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) APÓS SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA EM COLUNA PURSUIT 3 (200 $\times$ 3,0 mm, 3 μm) PARA OS MÉTODOS (A) 11 (B) 12 E (C) 13.	69
FIGURA 14 – CROMATOGRAMA OBTIDO PARA OS ANALITOS (MPB, EPB, BPA, PPB, BPB, TCS - 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$; E DES - 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) APÓS SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA EM COLUNA SYNERGI HYDRO-RP NA CONDIÇÃO DE COMPROMISSO.	72
FIGURA 15 – ESPECTROS DE ABSORÇÃO NO UV DOS ANALITOS MPB, EPB, PPB, BPB, BPA E TCS	73
FIGURA 16 – CROMATOGRAMAS OBTIDOS PARA OS ANALITOS (MPB, EPB, BPA, PPB, BPB, TCS - 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$; E DES - 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) APÓS SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA EM COLUNA SYNERGI HYDRO-RP NA CONDIÇÃO DE COMPROMISSO.	74
FIGURA 17 – REPRESENTAÇÃO DAS REAÇÕES ENVOLVIDAS NAS ETAPAS DE (A) ATIVAÇÃO DA SÍLICA FUNDIDA, (B) SILANIZAÇÃO E (C) ADIÇÃO DE ALDEÍDO.....	76

FIGURA 18 – GRÁFICO DAS ÁREAS DE PICOS (n = 3) EM FUNÇÃO DE CADA ANALITO OBTIDAS PARA OS CAPILARES HOSPEDEIRO E MODIFICADOS COM PVOH (MÉTODO 4), PVOH COM PECTINA (MÉTODO 5) E PVOH (SEM ETAPA DE SILANIZAÇÃO; MÉTODO 6) APÓS EXTRAÇÃO DOS ANALITOS (1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) DE ÁGUA ULTRAPURA.	77
FIGURA 19 – (A) ÁREAS DE PICO (n = 5) OBTIDAS APÓS EXTRAÇÃO COM OS CAPILARES HOSPEDEIRO, DE PVOH (MÉTODO 10), PVOH COM PECTINA (MÉTODO 11) E PVOH COM ALGINATO (MÉTODO 12); (B) CROMATOGRAMA MÉDIO (n = 5) OBTIDO APÓS A EXTRAÇÃO DOS ANALITOS (100 ng mL^{-1}) DE ÁGUA ULTRAPURA COM O CAPILAR DE PVOH.....	80
FIGURA 20 – REPETIBILIDADE DO DISPOSITIVO DE IN-TUBE SPME E COMPORTAMENTO APÓS 250 EXTRAÇÕES (n = 5).	84
FIGURA 21 – IMAGENS DE MEV DA SUPERFÍCIE DO HIDROGEL DE PVOH LIOFILIZADO COM MAGNIFICAÇÕES DE (A) 20 kx E (B) 109 kx. ...	86
FIGURA 22 – IMAGENS DE MEV DO (A) CAPILAR DE SÍLICA FUNDIDA NÃO MODIFICADO (206 x); E DA (B) SUPERFÍCIE INTERNA NÃO MODIFICADO (10 kx).	87
FIGURA 23 – IMAGENS DE MEV DA SUPERFÍCIE INTERNA DO CAPILAR DE SÍLICA FUNDIDA MODIFICADO COM GEL DE PVOH NAS MAGNIFICAÇÕES DE (A) 5 kx E (b) 20 kx.....	87
FIGURA 24 – ISOTERMA DE FISISSORÇÃO DE N_2 OBTIDA PARA O GEL DE PVOH LIOFILIZADO.	88
FIGURA 25 – (A) GRAU DE INTUMESCIMENTO E (B) PERDA DE SOLVENTE (20°C) DO DISCO DE HIDROGEL DE PVOH EM ÁGUA (AZUL) E NA FASE MÓVEL (VERMELHO).	90
FIGURA 26 – ESPECTROS DE INFRAVERMELHO ADQUIRIDOS NO MODO ATR PARA O PVOH PURO (PÓ) E DO GEL DE PVOH (DISCO).	91
FIGURA 27 – PERFIS DE EXTRAÇÃO EM FUNÇÃO DO (A) TEMPO DE EXTRAÇÃO; E DO (B) NÚMERO DE CICLOS DE EXTRAÇÃO.	93
FIGURA 28 – ÁREAS DE PICOS MÉDIAS (n = 5) OBTIDAS APÓS EXTRAÇÃO DE TODOS OS ANALITOS (AZUL), DE TODOS OS ANALITOS SEM O	

TCS (VERMELHO) E SOMENTE DOS PARABENOS (VERDE) NA CONCENTRAÇÃO DE 100 ng mL ⁻¹	95
FIGURA 29 – ISOTERMAS DE SORÇÃO PARA OS ANALITOS MPB, EPB, PPB, BPB E BPA.	96
FIGURA 30 – CROMATOGRAMAS OBTIDOS PARA 10 INJEÇÕES DA FÓRMULA INFANTIL COM APLICAÇÃO DE DIFERENTES NÚMEROS DE LAVAGENS COM ÁGUA E DETECÇÃO FEITA EM (A) 227 nm E (B) 254 nm.	98
FIGURA 31 – CROMATOGRAMAS OBTIDOS A PARTIR DA EXTRAÇÃO DOS ANALITOS (100 ng mL ⁻¹) DA FÓRMULA INFANTIL E COM DETECÇÃO EM 227, 245 E 254 nm.....	99
FIGURA 32 – FOTOGRAFIAS DA PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS ANTES (A, C, E, G) E APÓS A CENTRIFUGAÇÃO (B, D, F, H) EMPREGANDOS OS SOLVENTES: (A-B) ACN; (C-D) ISOPROPANOL; (E-F) DCM; (G- H) ACN:THF (1:1, v/v).....	102
FIGURA 33 – CROMATOGRAMAS OBTIDOS APÓS PRECIPITAÇÃO DAS PROTEÍNAS COM ACN, ISOPROPANOL E MISTURA DE ACN:THF (1:1, v/v) COM PROPORÇÃO DE LEITE:SOLVENTE ORGÂNICO DE 1:2 (v/v).	103
FIGURA 34 – GRÁFICO DE DISTRIBUIÇÃO NORMAL DOS EFEITOS PADRONIZADOS PARA O TCS.....	107
FIGURA 35 – REPRESENTAÇÃO GEOMÉTRICA DOS EFEITOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ³ COM PONTO CENTRAL PARA OS ANALITOS (A) MPB, (B) EPB, (C) BPA, (D) PPB, (E) BPB E (F) TCS.	108
FIGURA 36– EFEITO DO VOLUME DE AMOSTRA E DA PRÉ-CONCENTRAÇÃO (n = 3) SOBRE AS ÁREAS DE PICOS DOS ANALITOS MPB, EPEB, BPA, PPB, BPB E TCS E DO PADRÃO INTERNO (DES).	110
FIGURA 37 – EFEITO DO NÚMERO DE INJEÇÕES (n = 3) SOBRE AS ÁREAS DE PICOS DOS ANALITOS MPB, EPEB, BPA, PPB, BPB E TCS E DO PADRÃO INTERNO (DES).	111
FIGURA 38 – PERFIL DE DESSORÇÃO EM FUNÇÃO DO SOLVENTE E TEMPO DE CONTATO (n = 3) SOBRE AS ÁREAS DE PICOS DOS	

ANALITOS MPB, EPB, BPA, PPB, BPB E TCS E DO PADRÃO INTERNO (DES).	113
FIGURA 39 – PERFIL DE DESSORÇÃO COM ÁGUA EM FUNÇÃO DO TEMPO DE CONTATO PARA (A) ÁREA DE PICO E (B) ALTURA DO PICO. ...	114
FIGURA 40 – CROMATOGRAMAS OBTIDOS APÓS A EXTRAÇÃO DE AMOSTRA DE LEITE HUMANO BRANCO ENRIQUECIDA COM OS ANALITOS EM CONCENTRAÇÃO DE 100 ng mL ⁻¹ (n = 3).	116
FIGURA 41 – (A) EXTRATOS RECONSTITUÍDOS; (B) ÁREAS DE PICO PÓS EXTRAÇÃO PARA FÓRMULA INFANTIL E LEITE HUMANO.	117
FIGURA 42 – CROMATOGRAMAS OBTIDOS PARA O AJUSTE DO MÉTODO DE PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS (A) 227 nm (B) 254 nm.	119
FIGURA 43 – FOTOGRAFIAS DE AMOSTRA DE LEITE HUMANO ENRIQUECIDA COM OS ANALITOS EM 100 ng mL ⁻¹ EM CADA ETAPA DO PRÉ-PREPARO DE AMOSTRA.	120
FIGURA 44 – CURVAS ANALÍTICAS EXTRAÍDAS OBTIDAS PARA OS PARABENOS (MPB, EPB, PPB E BPB).	123
FIGURA 45 – CROMATOGRAMAS OBTIDOS APÓS EXTRAÇÃO DE AMOSTRA DE LEITE HUMANO ENRIQUECIDA COM 300 ng mL ⁻¹ E DE AMOSTRAS BRANCO DE LEITE HUMANO.	126
FIGURA 46 – FOTOGRAFIAS DE EXTRATOS OBTIDOS APÓS A PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS DE AMOSTRAS DE LEITE HUMANO BRANCO (A) E DE DOADORAS (B E C).	128

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS ANALITOS ^[33,34]	19
TABELA 2 – MÉTODOS DE PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS EM AMOSTRAS DE LEITE HUMANO.	26
TABELA 3 – MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DE PARABENOS, TRICLOSAN E BISPENOL A EM AMOSTRAS DE LEITE MATERNO.	28
TABELA 4 – PRÉ-PREPARO DE AMOSTRA E FASES EXTRATORAS EMPREGAS PARA EXTRAÇÃO DE ANALITOS DIVERSOS DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS POR <i>in-tube</i> SPME.	33
TABELA 5 – PROPRIEDADES DAS COLUNAS CROMATOGRÁFICAS EMPREGADAS NA SEPARAÇÃO DOS ANALITOS.	44
TABELA 6 – PROCEDIMENTOS AVALIADOS PARA A OBTENÇÃO DOS DISPOSITIVOS DE <i>in-tube</i> SPME.....	48
TABELA 7 – CONDIÇÕES AVALIADAS NO PLANEJAMENTO 2 ³ COM PONTO CENTRAL.	54
TABELA 8 – CONDIÇÕES AVALIADAS PARA PRECIPITAÇÃO E PROTEÍNAS E REMOÇÃO DE LIPÍDEOS DE AMOSTRAS DE LEITE HUMANO	56
TABELA 9 – PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS OBTIDOS PARA ELUIÇÃO NOS MODOS ISOCRÁTICO (1 A 3) E GRADIENTE (4 A 6) COM FASE MÓVEL COMPOSTA POR ÁGUA E ACN.....	61
TABELA 10 – PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS OBTIDOS AOS EMPREGAR FASE MÓVEL COMPOSTA POR ÁGUA E ACN (MÉTODO 7) OU ÁGUA ACIDIFICADA E ACN (MÉTODO 8).	65
TABELA 11 – PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS OBTIDOS PARA FASE MÓVEL COMPOSTA POR ÁGUA E METANOL NOS MODOS ISOCRÁTICO (MÉTODO 9) E GRADIENTE (MÉTODO 10).....	65
TABELA 12 – PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS PARA OS MÉTODOS 11 A 16 COM FASE MÓVEL COMPOSTA POR ÁGUA E ACN, ELUIÇÃO POR GRADIENTE OU ISOCRÁTICA E DIFERENTES VAZÕES.....	68
TABELA 13 – PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS OBTIDOS PARA ELUIÇÃO POR GRADIENTE COM FASE MÓVEL COMPOSTA POR ACETONITRILA E ÁGUA (MÉTODO 17) OU TAMPÃO FOSFATO 10 mmol L ⁻¹ EM pH 6 (MÉTODO 18) E pH 3 (MÉTODO 19).	71

TABELA 14 – PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO SELECIONADO.....	72
TABELA 15 – MÉDIA ARITMÉTICA, ESTIMATIVA DO DESVIO PADRÃO, DESVIO PADRÃO RELATIVO, F_{CALC} E DIFERENÇA MÍNIMA SIGNIFICATIVA PARA AS ÁREAS DE PICOS DOS ANALITOS (100 ng mL ⁻¹) APÓS EXTRAÇÃO.	82
TABELA 16 – RESPOSTAS OBTIDAS NO PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ³ COM PONTO CENTRAL PARA O PRÉ PREPARO DA AMOSTRA DE FÓRMULA INFANTIL.....	105
TABELA 17 – EFEITOS PRINCIPAIS E DE INTERAÇÃO DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ³ COM PONTO CENTRAL.....	106
TABELA 18 – FAIXA LINEAR, PARÂMETROS DA REGRESSÃO LINEAR E LLOQ.	123
TABELA 19 – RESULTADOS DOS ENSAIOS DE PRECISÃO E EXATIDÃO INTRA-DIA E INTER-DIA (n = 5).	125
TABELA 20 – RESULTADOS OBTIDOS APÓS A ANÁLISE DE AMOSTRAS REAIS DE LEITE HUMANO POR IN-TUBE SPME LC-UV.	127

LISTA DE ABREVIATURAS

ACE	- Acetato de Etila
ACN	- Acetonitrila
APTS	- 3-aminopropil-trietoxissilano
ATR	- Reflectância Total Atenuada (<i>Attenuated Total Reflectance</i>)
BPA	- Bisfenol A
BPB	- Butilparabeno
BSA	- Albumina Sérica Bovina (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
C18	- Octadecilsilano
DCM	- Diclorometano
DES	- Dietilestilbestrol
DLLME	- Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (<i>Dispersive Liquid-Liquid Microextraction</i>)
DMS	- Diferença Mínima Significativa
DVB	- Divinilbenzeno
EPB	- Etilparabeno
EtOH	- Etanol
FTIR	- Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>)
GC	- Cromatografia Gasosa (<i>Gas Chromatography</i>)
GC-MS	- Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (<i>Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry</i>)
GC-MS/MS	- Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas Sequencial (<i>Gas Chromatography coupled to Tandem Mass Spectrometry</i>)
GM	- Grau de Metoxilação
HF-LPME	- Microextração em Fase Líquida com Fibra Oca (<i>Hollow Fiber Liquid-Phase Microextraction</i>)
HPLC	- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
IgAS	- Imunoglobulina Secretora
<i>In-tube</i> SPME	- Microextração em Fase Sólida no Tubo (<i>In-tube Solid Phase Microextraction</i>)
ISO	- Isopropanol

IUPAC	- União Internacional de Química Pura e Aplicada (<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>)
LC	- Cromatografia Líquida (<i>Liquid Chromatography</i>)
LC-MS	- Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas (<i>Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry</i>)
LC-MS/MS	- Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas sequencial (<i>Liquid Chromatography coupled to Tandem Mass Spectrometry</i>)
LC-UV	- Cromatografia Líquida com Detecção Ultravioleta (<i>Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection</i>)
LLE	- Extração Líquido-Líquido (<i>Liquid-Liquid Extraction</i>)
LLOQ	- Limite Inferior de Quantificação (<i>Lower Limit of Quantification</i>)
LOD	- Limite de Detecção (<i>Limit of Detection</i>)
log K _{o/w}	- Coeficiente de Partição Octanol-Água
LOQ	- Limite de Quantificação (<i>Limit of Quantification</i>)
MeOH	- Metanol
MEPS	- Microextração com Sorvente Empacotado (<i>Microextraction by Packed Sorbent</i>)
MEV	- Microscopia Eletrônica de Varredura
MFGM	- Membrana do Glóbulo de Gordura do Leite (<i>Milk Fat Globule Membrane</i>)
MISPE	- Extração em Fase Sólida com Polímero Molecularmente Impresso (<i>Solid Phase Extraction Using Molecular Imprinting Polymers</i>)
MIP	- Polímero Molecularmente Impresso (<i>Molecularly Imprinted Polymer</i>)
MPB	- Metilparabeno
MWCO	- Limite de Massa Molecular (<i>Molecular Weight Cut-off</i>)
PEEK	- Poli(éter-éter-cetona)
PA	- Poliacrilato
PDMS	- Polidimetilsiloxano
pH	- Potencial Hidrogeniônico
PI	- Padrão Interno
pK _a	- Negativo do logaritmo na base 10 da constante de ionização do ácido
PPB	- Propilparabeno
PS-DVB	- Poliestireno-divinilbenzeno
PVC	- Cloreto de Polivinila

PVOH	- Álcool polivinílico
RAM	- Material de Acesso Restrito (<i>Restricted Access Material</i>)
RSD	- Desvio Padrão Relativo (<i>Relative Standard Deviation</i>)
SBSE	- Extração Sortiva em Barra de Agitação (<i>Stir Bar Sorptive extraction</i>)
SDME	- Microextração em Gota Única (<i>Single Drop Microextraction</i>)
SPE	- Extração em Fase Sólida (<i>Solid Phase Extraction</i>)
SPME	- Microextração em Fase Sólida (<i>Solid Phase Microextraction</i>)
TCS	- Triclosan
THF	- Tetraidrofurano
UHPLC	- Cromatografia Líquida de Ultra Alta Eficiência (<i>Ultra High Performance Liquid Chromatography</i>)
UV	- Ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

a - Raio da esfera

ϵ_0 - Permissividade elétrica do vácuo

ϵ_r - Constante dielétrica

ψ_d - Potencial elétrico na camada de Stern

H - Distância entre as partículas

κ - Inverso do comprimento de Debye

V_R - Energia potencial de repulsão eletrostática entre duas partículas

ζ - Potencial zeta

k - Fator de retenção

α - Fator de seletividade

R_S - Resolução

N - Número de pratos teóricos

A_S - Fator de assimetria

t_R - Tempo de retenção

t_0 - Tempo necessário para as moléculas da fase móvel percorrerem o sistema

w_b - Largura da base de pico

Q - Constante

n_{ext} - Quantidade de matéria extraída

C_i - Concentração inicial

a - Intercepto

b - Inclinação da reta

R^2 - Coeficiente de determinação

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 PARABENOS, TRICLOSAN E BISFENOL A	17
1.2 COMPOSIÇÃO DO LEITE HUMANO	20
1.3 PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS	23
1.4 MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA NO TUBO	27
1.5 GÉIS DE POLÍMEROS HIDROFÍLICOS COMO FASE EXTRATORA	35
2 OBJETIVOS	42
2.1 OBJETIVO GERAL	42
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	43
3.1 MATERIAIS	43
3.2 PREPARO DAS SOLUÇÕES DE PADRÕES	44
3.3 SELEÇÃO DAS CONDIÇÕES DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO	44
3.4 PURIFICAÇÃO DA PECTINA	46
3.5 PREPARO DAS DISPERSÕES POLIMÉRICAS	46
3.6 PREPARO DA SOLUÇÃO PIRANHA	46
3.7 PREPARO DO DISPOSITIVO DE <i>IN-TUBE</i> SPME	47
3.8 PROCEDIMENTO DE <i>IN-TUBE</i> SPME PARA AMOSTRA DE ÁGUA ULTRAPURA ENRIQUECIDA COM OS ANALITOS	50
3.9 ISOTERMAS DE SORÇÃO	51
3.10 CARACTERIZAÇÃO DO GEL DE PVOH	52
3.11 FÓRMULA INFANTIL	53
3.11.1 Precipitação de proteínas	53
3.11.2 Otimização da <i>in-tube</i> SPME	55
3.12 ENRIQUECIMENTO DAS AMOSTRAS BRANCO DE LEITE HUMANO	55
3.13 PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS EM LEITE HUMANO	56
3.14 PARÂMETROS ANALÍTICOS	57
3.14.1 Estabilidade das soluções padrão	57
3.14.2 Linearidade, LLOQ e LOD	57
3.14.3 Exatidão e precisão intra-dia e inter-dia	58
3.14.4 Efeito memória	58
3.15 APLICAÇÃO EM AMOSTRA REAL DE LEITE HUMANO	58

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
4.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO	60
4.1.1 Coluna Eclipse XDB-C18	60
4.1.2 Coluna Pursuit 3 C18	67
4.1.3 Coluna Synergi Hydro-RP	71
4.2 DISPOSITIVOS DE <i>IN-TUBE</i> SPME.....	75
4.3 CARACTERIZAÇÃO DO HIDROGEL DE PVOH	85
4.4 COMPORTAMENTO SORTIVO DOS ANALITOS NO HIDROGEL DE PVOH ...	92
4.5 FÓRMULA INFANTIL	98
4.6 OTIMIZAÇÃO DA <i>IN-TUBE</i> SPME.....	109
4.7 LEITE HUMANO	115
4.8 MÉRITO DOS PARÂMETROS ANALÍTICOS	121
4.8.1 Estabilidade das soluções padrão	121
4.8.2 Linearidade, LLOQ e LOD	122
4.8.3 Exatidão e precisão intra-dia e inter-dia	124
4.8.4 Efeito memória	125
4.9 APLICAÇÃO DO MÉTODO EM AMOSTRAS REAIS DE LEITE HUMANO	126
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	130
5.1 PERSPECTIVAS	131
REFERÊNCIAS.....	132
ANEXO 1 – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA – SETOR DE SAÚDE/UFPR	145
ANEXO 2 – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA – CHC/UFPR	150
ANEXO 3 – PRODUÇÃO CIENTÍFICA.....	154

1 INTRODUÇÃO

Interferentes endócrinos têm recebido grande atenção da comunidade científica, devido à capacidade desses compostos de interferir no funcionamento natural do sistema endócrino de humanos e animais^[1-4]. Parabenos, triclosan e bisfenol A são exemplos de interferentes endócrinos empregados extensivamente ao redor do mundo, os quais têm sido determinados em diversas matrizes biológicas, como em soro sanguíneo, urina e leite humano^[5-7] através de técnicas cromatográficas, tanto em fase gasosa quanto em fase líquida.

A alta complexidade das amostras biológicas aliada às baixas concentrações dos interferentes endócrinos presentes (ng mL^{-1}), requer o uso de técnicas de preparo de amostras eficientes para isolar e concentrar os analitos. Nesse sentido, destaca-se a microextração em fase sólida no tubo (*in-tube Solid Phase Microextraction – in-tube SPME*)^[8] devido a sua simplicidade e rapidez, o uso de nenhum ou de pequenos volumes de solventes orgânicos, a necessidade de pequenos volumes de amostra, o baixo custo e a facilidade de automação, que pode ser obtida pelo acoplamento com cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC ou simplesmente LC) ou cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS)^[9] para maiores detectabilidade e seletividade analítica.

A técnica de *in-tube* SPME emprega como dispositivo de extração um tubo capilar aberto de sílica fundida ou de material polimérico como o PEEK (poliéter-éter-cetona), cujo interior pode ser empacotado ou revestido por uma fase sorvente^[10]. Em muitos casos, pode-se utilizar na *in-tube* SPME fases extratoras comerciais, que consistem em segmentos de colunas cromatográficas de cromatografia gasosa (GC). Entretanto, essas fases podem apresentar baixa estabilidade e dificuldade para extrair compostos polares presentes em matrizes complexas, tais como as amostras biológicas. Desse modo, o desenvolvimento de novos materiais sorventes tem sido estimulado, a fim de se obter fases extratoras mais seletivas, com alta capacidade de sorção, estáveis (maior vida útil) e de baixo custo^[11].

Os hidrogéis são sistemas coloidais, cuja fase contínua é uma rede tridimensional formada por cadeias poliméricas hidrofílicas reticuladas (componente minoritário), na qual a água está dispersa (componente majoritário), por isso o nome hidrogel. Esses materiais ainda são pouco utilizados como fases extratoras, porém

esse tipo de aplicação tem se mostrado promissora, uma vez que os hidrogéis possuem capacidade para responder a estímulos externos (por exemplo, mudanças de pH e temperatura do meio), ser modulável e apresentar diversos grupos funcionais polares na sua estrutura, como grupos $-OH$, $-COOH$, $-SO_3H$ e $-NH_2$ ^[12-14]. A presença desses grupamentos polares na estrutura polimérica do gel é interessante para a extração de analitos hidrofílicos de matrizes aquosas, visto que o estabelecimento de interações do tipo dipolo-dipolo, íon-dipolo e/ou ligações de hidrogênio entre a fase extratora e esses analitos pode facilitar a extração desses compostos de amostras aquosas, o que tem sido um desafio.

Diante disso, este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de dispositivos de extração para *in-tube* SPME com fases extratoras baseadas em hidrogéis. Esses dispositivos foram estudados para a microextração no tubo de parabenos (metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno e butilparabeno), triclosan e bisfenol A presentes em leite humano, com determinação por cromatografia líquida e detecção na região do ultravioleta (LC-UV).

1.1 PARABENOS, TRICLOSAN E BISFENOL A

Os interferentes endócrinos são substâncias ou misturas de substâncias exógenas capazes de alterar alguma função do sistema endócrino causando, consequentemente, efeitos adversos à saúde de um organismo, ou de sua prole, ou de (sub)populações^[15]. Alvo de preocupação nas últimas décadas, esses interferentes endócrinos compreendem um grupo diverso de substâncias de origem natural ou sintética, como hormônios, fármacos, conservantes, agentes antimicrobianos, plastificantes, pesticidas, retardantes de chama, entre outros^[16,17]. Atualmente, são produzidas e utilizadas grandes quantidades de substâncias com potencial para alterar o funcionamento natural do sistema endócrino, como é o caso dos parabenos, do triclosan e do bisfenol A.

Segundo De Coster e van Larebeke^[18], dados epidemiológicos têm apontado um aumento na incidência de doenças associadas a essas substâncias nas últimas décadas, como câncer de mama, próstata e testículo, diabetes, obesidade e infertilidade. Acredita-se que os efeitos adversos causados pelos interferentes endócrinos, sobre os sistemas endócrino e reprodutivo, são devido à habilidade desses compostos de mimetizar ou antagonizar os efeitos dos hormônios endógenos, como estrogênios e andrógenos, ou ainda, podem ser consequência da

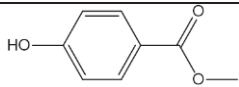
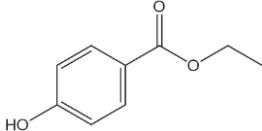
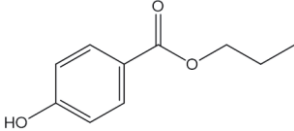
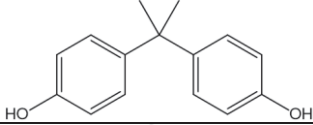
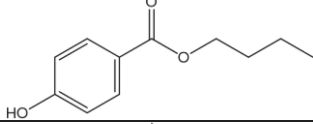
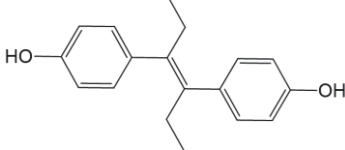
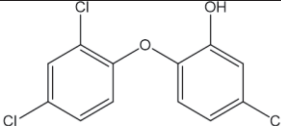
desregulação da síntese e do metabolismo de hormônios endógenos e receptores hormonais^[19–21].

Atualmente, são produzidas e utilizadas grandes quantidades de substâncias com potencial para alterar o funcionamento natural do sistema endócrino, como é o caso dos parabenos, do triclosan e do bisfenol A. Os parabenos são ésteres do ácido 4-hidroxibenzóico, que se diferem entre si pelo radical ligado ao oxigênio do grupamento éster (RCOOR'), por exemplo, metilparabeno (R' = -CH₃), etilparabeno (R' = -C₂H₅), propilparabeno (R' = -C₃H₇) e butilparabeno (R' = -C₄H₉). Esses compostos são utilizados como conservantes em produtos de cuidados pessoais, fármacos, alimentos e bebidas, em decorrência das suas propriedades antimicrobianas^[22]. O amplo espectro de ação dos parabenos, aliado à sua baixa toxicidade aguda, alta estabilidade, baixo custo e alta aceitação regulamentar ao redor do mundo levaram ao uso extensivo dessas substâncias^[23,24], que são empregadas nos produtos de forma individual ou em conjunto (dois ou mais parabenos no mesmo produto) para uma maior ação antimicrobiana^[25].

O triclosan é um agente antibacteriano sintético com amplo espectro de ação, utilizado comumente em produtos cosméticos, de higiene pessoal, e de uso doméstico^[26], como em cremes dentais e de barbear, enxaguantes bucais, desodorantes, detergentes e outros produtos de limpeza, além de ser usado na composição de utensílios de cozinha e tecidos^[27]. Já o bisfenol A é uma substância sintética amplamente empregada pela indústria na produção de resinas epóxi e policarbonato, e como um antioxidante no PVC^[28,29]. As resinas epóxi são usadas no revestimento da superfície interna de embalagens de alimentos e bebidas, enquanto os policarbonatos são utilizados na fabricação de recipientes plásticos para armazenamento de alimentos e bebidas^[28,30].

A principal via de exposição para os seres humanos aos parabenos e ao triclosan é a absorção dérmica, uma vez que esses compostos são amplamente empregados em produtos de higiene pessoal e cosméticos^[31]. Por sua vez, o bisfenol A pode lixiviar de embalagens e recipientes plásticos para materiais adjacentes, como água e alimentos, expondo assim a população em geral a esta substância por meio da dieta^[32]. A TABELA 1 apresenta a fórmula estrutural, massa molar, solubilidade em água, coeficiente de partição octanol-água (logK_{o/w}) e pKa dos compostos de interesse deste trabalho.

TABELA 1 – PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS ANALITOS^[33,34].

Abreviação	Fórmula estrutural	Massa molar / g mol ⁻¹	Solubilidade em H ₂ O a 25°C / mg L ⁻¹	log K _{ow}	pKa
MPB		152,15	2500	1,96	8,40
EPB		166,18	885	2,47	8,34
PPB		180,20	500	3,04	8,50
BPA		228,29	300	3,32	9,60
BPB		194,23	207	3,57	8,47
DES*		268,30	12	5,07	8,63
TCS		289,54	10**	4,76	7,90

MPB: metilparabeno; EPB: etilparabeno; PPB: propilparabeno; BPA: bisfenol A; BPB: butilparabeno; DES: dietilestilbestrol; TCS: triclosan. *Usado como padrão interno; **20 °C.

A população pode ser exposta aos parabenos, bisfenol A e triclosan diariamente, uma vez que esses compostos são empregados extensivamente pela indústria^[22,35,36], como descrito anteriormente. Essa exposição da população é objeto de preocupação de parte da comunidade científica, devido à existência de diversos estudos que demonstram, em ensaios *in vitro* e *in vivo*, a atividade estrogênica dos parabenos^[37–39], do triclosan^[40–43] e do bisfenol A^[18,44]. Além disso, trabalhos da literatura têm determinado parabenos, triclosan e bisfenol A em baixas concentrações (nível de ng mL⁻¹) em matrizes ambientais e biológicas, como, por exemplo, amostras de águas superficiais^[45,46], soro sanguíneo, urina e leite humano^[47–49], desse modo, a monitorização desses interferentes endócrinos se faz necessária.

Destaca-se a presença desses compostos em amostras de leite humano, uma vez que essa é a principal via de exposição à interferentes endócrinos para os lactentes^[29]. Os primeiros estágios de vida são um período crítico do desenvolvimento dos seres humanos, pois há maior suscetibilidade do cérebro e demais órgãos à compostos com atividade endócrina^[50]. Desse modo, a análise desse fluido biológico altamente complexo é de especial interesse.

Nesse contexto, o desenvolvimento de técnicas analíticas sensíveis e seletivas que permitam a determinação de parabenos, triclosan e bisfenol A em leite materno é particularmente importante. Uma vez que, a análise desse fluido biológico possibilita a monitorização e avaliação da exposição tanto da lactante quanto do lactente a esses interferentes endócrinos, com a vantagem de ser uma análise não invasiva, quando comparada às análises de matrizes como soro ou plasma humano.

1.2 COMPOSIÇÃO DO LEITE HUMANO

O leite humano é a principal fonte de energia e moléculas biologicamente ativas essenciais para o crescimento e desenvolvimento do lactente, podendo influenciar até o seu desempenho como adulto^[51]. O leite humano é um fluido biológico dinâmico e extremamente complexo, que contém milhares de substâncias em sua composição^[52,53]. Os componentes do leite têm tanto função nutritiva, por exemplo, lipídeos, proteínas, ácidos graxos, aminoácidos, minerais, vitaminas, elementos traços entre outros, quanto não nutritiva, no caso dos componentes bioativos como células, imunoglobulinas, citocinas, quimosinas, hormônios, fatores de crescimento, glicanos e mucinas^[53]. Esses componentes bioativos fornecem proteção contra processos infecciosos e inflamatórios, além de contribuir para a maturação do sistema imunológico, o desenvolvimento dos órgãos, a colonização da microbiota e para a saúde do lactente de forma em geral^[54–56].

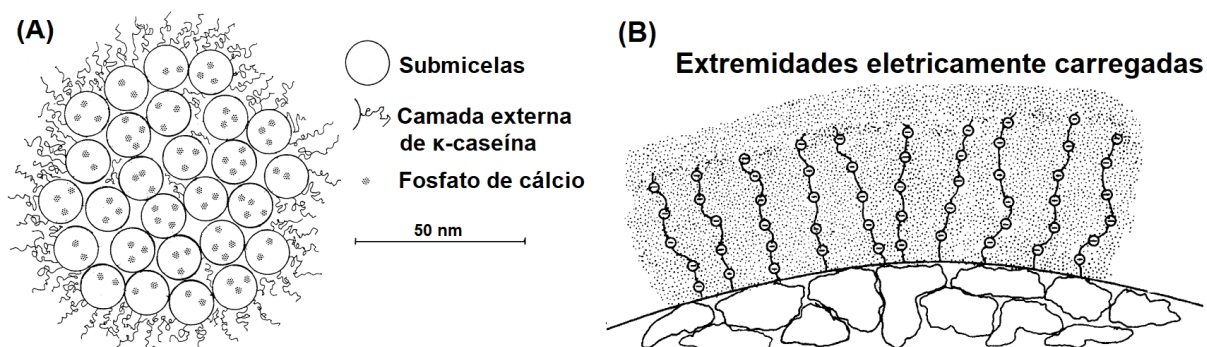
Os componentes majoritários do leite humano são água, proteínas, lipídeos e carboidratos^[57,58], cujas concentrações médias são estimadas em 0,9 a 1,2 g dL⁻¹ de proteínas, 3,2 a 3,6 g dL⁻¹ de lipídeos e 6,7 a 7,8 g dL⁻¹ de lactose^[54]. Esse fluido biológico é um sistema heterogêneo no qual os componentes se organizam nas seguintes fases: (i) minerais, carboidratos e algumas proteínas estão dissolvidos na fase aquosa como uma solução, (ii) micelas de caseína formam uma dispersão coloidal, e (iii) lipídeos dispersos em água formam uma emulsão estabilizada por fosfolipídeos e proteínas na interface óleo/água^[59].

As proteínas do leite humano são espécie-específicas apresentando diferenças em relação às proteínas presentes no leite bovino^[60]. Pode-se dividir as proteínas de acordo com a solubilidade no leite em 3 tipos: caseínas, proteínas do soro e mucinas^[61]. As proteínas do soro são solúveis na fase aquosa e estão presentes na solução, enquanto a caseína forma micelas dispersas em solução aquosa e as mucinas compõe as membranas dos glóbulos de gordura juntamente com os fosfolípidos^[52,62]. Algumas das proteínas presentes no soro são α -galactalbumina, lactoferrina, imunoglobulina A secretora (IgAS), lisozima e albumina sérica, as quais junto à caseína são as proteínas mais abundantes do leite humano^[52,54].

As micelas de caseína são responsáveis pela aparência branca característica do leite^[52], as quais são formadas por proteínas anfifílicas, majoritariamente as subunidades β -caseína e κ -caseína, em associação com agrupamentos de fosfato de cálcio^[63–65]. As κ -caseínas se concentram na superfície das micelas e apresentam caudas carregadas negativamente, que agem como uma interface entre o interior hidrofóbico da micela e o meio aquoso, desse modo a κ -caseína estabiliza essas estruturas coloidais, pois previne a agregação das micelas por meio de repulsões eletrostáticas e estéricas^[66–70].

Diversos modelos foram propostos para descrever a estrutura das micelas de caseína, todavia ainda não há uma estrutura consolidada sobre a auto-organização e estruturação das subunidades que formam a micela^[71]. A FIGURA 1 mostra representações esquemáticas das micelas de caseína sendo (A) o modelo de submicelas proposto por Walstra^[69], um dos mais aceitos até o presente, e (B) a representação das extremidades eletricamente carregadas da κ -caseína, que é a subunidade que mais contribui para a estabilidade do complexo proteico.

FIGURA 1 – REPERESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA CASEÍNA MOSTRANDO (A) O MODELO DE ORGANIZAÇÃO EM SUBMICELAS PROPOSTO POR WALSTRA E (B) UMA REPRESENTAÇÃO DAS EXTREMIDADES ELETRICAMENTE CARREGADAS DE κ -CASEÍNA.



FONTE: (A) adaptada de Walstra^[69]; (B) adaptada de De Kruif^[72].

A fração lipídica é constituída por cerca de 98 % de triacilglicerídeos, que estão presentes no leite como gotículas esféricas recobertas por uma membrana composta por fosfolipídeos, mucinas, colesterol e enzimas, essa membrana do glóbulo do gordura do leite (*milk fat globule membrane* - MFGM) evita a coalescência dos glóbulos de gordura e é responsável pela estabilização da emulsão^[52,73]. Alguns lipídeos também podem ser encontrados no interior das micelas de caseína^[59]. O leite humano pode apresentar mais de 200 tipos de ácidos graxos em sua composição, porém a maioria encontra-se em baixas concentrações, havendo a predominâncias dos ácidos oleico, linoleico e palmítico^[57]. Dentre os macronutrientes do leite, os lipídeos apresentam as maiores variações de concentração^[54], por exemplo, Mitoulas e colaboradores^[74] constatarem uma variação de cerca de 47 % no conteúdo lipídico de amostras de leite humano em um período de 24 h.

O principal carboidrato do leite é a lactose, um dissacarídeo cuja abundância no leite humano é maior do que no leite bovino, uma vez que a demanda energética do cérebro humano é maior^[57]. Outra classe de carboidratos importante presente no leite humano é a dos oligossacarídeos, com concentração aproximada de 1 g dL⁻¹^[54]. Esses carboidratos não possuem função nutritiva e são responsáveis por promover o crescimento seletivo de bactérias benéficas (Bifidobactérias intestinais) e agir como “armadilhas” (solúveis) para patógenos^[54,75]. Segundo Bode^[76] já foram identificados cerca de 200 oligossacarídeos diferentes no leite humano e a alta quantidade e diversidade desses glicanos é única para os seres humanos, enquanto no leite bovino os oligossacarídeos estão presentes em níveis traço. Como consequência, nas fórmulas infantis a base de leite bovino esses glicanos também

se encontram em níveis traço e com menor complexidade estrutural, em relação ao leite humano^[76].

A composição do leite humano depende de inúmeros fatores relacionados tanto a lactante quanto ao lactente, como por exemplo, dieta da lactante, antropometria materna, fatores sociodemográficos, condições médicas da lactante, peso ao nascer, idade e sexo do lactente, entre outros^[53]. Além disso, Samuel e colaboradores^[53] relatam que há uma hipótese de que o leite humano seja “feito sob medida” por cada lactante para suprir as necessidades nutricionais do lactente. Isso evidencia a diversidade de composição de amostras de leite humano.

Devido à complexidade e heterogeneidade do leite, este é capaz de solubilizar compostos hidrofílicos e lipofílicos, por exemplo interferentes endócrinos como parabenos, triclosan e bisfenol A. Essa complexidade da matriz aliada às baixas concentrações dos compostos de interesse faz com que a análise cromatográfica de amostras de leite humano não seja uma tarefa trivial, desse modo, uma etapa de preparo de amostra torna-se indispensável.

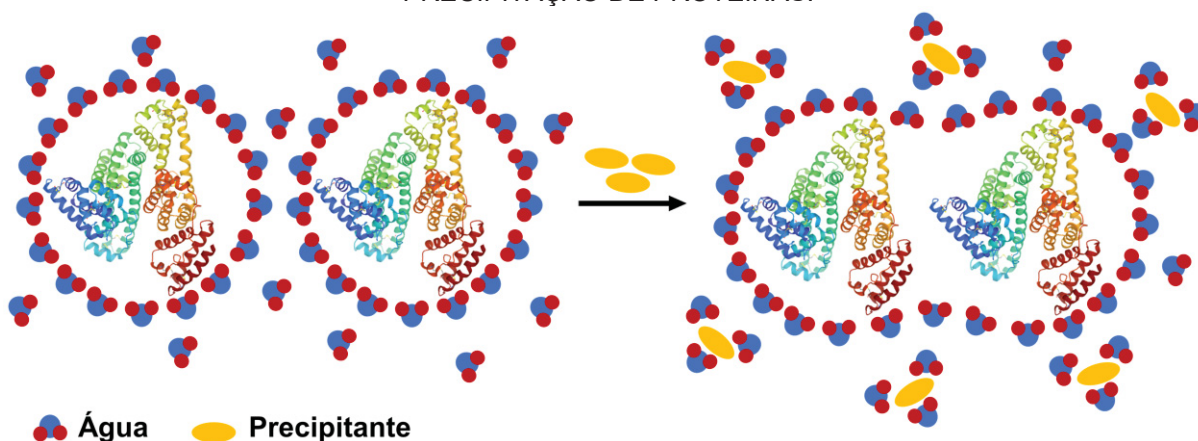
1.3 PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS

O preparo de amostras biológicas (sangue, leite etc.) para análise cromatográfica é uma etapa crítica e necessária, pois os componentes endógenos dessas matrizes podem causar danos ao sistema analítico e/ou interferir na determinação dos analitos devido ao efeito matriz. As proteínas fazem parte desse grupo e tem capacidade para se associar aos compostos de interesse^[77] e prejudicar a extração destes. Além disso, proteínas podem causar a supressão iônica dos analitos na técnica de LC-MS ou LC-MS/MS, coeluir com os analitos na separação cromatográfica e adsorver permanentemente na fase estacionária da coluna analítica^[78]. Por esses motivos, a precipitação dessas biomoléculas de amostras biológicas é altamente empregada em trabalhos que utilizam técnicas cromatográficas para a análise desse tipo de matriz^[79–82].

A precipitação de proteínas tem como objetivo desnaturar essas macromoléculas e acabar com a habilidade de se ligarem aos analitos^[77]. A precipitação pode ocorrer empregando solventes orgânicos, sais ou ácidos, cujos procedimentos são simples e rápidos, podendo ser utilizados como uma etapa prévia às técnicas de extração^[77].

A solubilidade das proteínas em solução aquosa depende da hidrofilicidade e hidrofobicidade dos resíduos de aminoácidos na sua superfície. Resíduos hidrofóbicos reduzem a solubilidade em água, enquanto resíduos polares e/ou carregados aumentam^[83]. A estabilidade das soluções ou dispersões de macromoléculas é resultado de dois fatores principais: (i) interação entre atmosferas iônicas ou duplas camadas elétricas e (ii) solvatação, então a precipitação das proteínas é realizada pelo enfraquecimento de pelo menos um dos dois fatores^[66]. A FIGURA 2 mostra uma representação esquemática do mecanismo de precipitação.

FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PRINCÍPIO BÁSICO DO MECANISMO DE PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS.



FONTE: Adaptado de Novák e Havlíček^[83]; Estrutura da albumina sérica humana de Sugio e colaboradores^[84].

O princípio básico da precipitação é a alteração da capacidade de solvatação das proteínas no solvente em questão, a partir da adição de um precipitante que promove a redução da solubilidade dessas macromoléculas^[83]. No esquema da FIGURA 2, as proteínas estão representadas com uma camada de moléculas de água solvatando-as e a adição do precipitante induz a agregação e precipitação.

Os solventes orgânicos miscíveis em água (ex.: etanol, metanol e acetonitrila) podem deslocar moléculas de água reduzindo a camada de solvatação, isso permite que regiões hidrofóbicas da proteína sejam expostas e as interações de van der Waals atuem, como consequência as proteínas agregam^[83] devido à perda de solubilidade e por efeito solvofóbico. Além disso, a adição de solventes orgânicos miscíveis diminui a constante dielétrica da solução, o que contribui para reduzir (i) a repulsão eletrostática entre as proteínas carregadas e (ii) o grau de ionização das

proteínas, o que também diminui a repulsão eletrostática, e ambos os efeitos (i e ii) induzem a aproximação das proteínas e agregação^[66]. A repulsão eletrostática entre duas partículas esféricas dispersas é dada pela Equação (1), a qual é uma simplificação das expressões derivadas por Hogg e colaboradores^[66].

$$V_R = 2\pi\epsilon_0\epsilon_r a\psi_d^2 \exp(-\kappa H) \quad (1)$$

Na Equação 1, ϵ_0 é a permissividade elétrica do vácuo ($8,854 \times 10^{-12} \text{ C}^2 \text{ J}^{-1} \text{ m}^{-1}$), ϵ_r é a constante dielétrica do meio, a é o raio da esfera, ψ_d é o potencial elétrico na camada de Stern (aproximadamente igual ao potencial zeta, ζ), κ é o inverso do comprimento de Debye e H é a distância entre as partículas.

Quando um solvente orgânico miscível é utilizado para precipitar proteínas em solução aquosa ocorre a redução da constante dielétrica do meio (ϵ_r), que é diretamente proporcional à energia de repulsão eletrostática entre duas partículas (V_R), como observado na Equação (1). Portanto, há uma redução da repulsão entre as proteínas, o que permite a aproximação das macromoléculas ao ponto das interações de van der Waals atuarem e induzirem a agregação^[66]. A força eletrostática entre duas cargas, dada pela Lei de Coulomb, é inversamente proporcional ao ϵ_r , desse modo, a redução da constante dielétrica do meio diminui a ionização dos grupos carboxila e amino presentes nos resíduos de aminoácidos. Isso leva à redução das cargas dissociadas, e como consequência à diminuição do potencial zeta, o que também induz a agregação das macromoléculas.

A adição de sal comprime a dupla camada elétrica e reduz a camada de solvatação em torno das proteínas, facilitando as interações proteína-proteína^[83]. O aumento da forma iônica do meio aumenta o valor de κ , ou seja, diminui a espessura da dupla camada elétrica (diminuição do comprimento de Debye), e contribui para a diminuição do valor de V_R , isso permite maior aproximação entre as partículas, o que promove agregação^[66]. Além disso, à medida que a concentração de sal aumenta, mais moléculas de água se associam aos íons do sal reduzindo a quantidade de moléculas de água na camada de solvatação (*salting-out*), o que expõe regiões hidrofóbicas na superfície da proteína e promove agregação e precipitação^[83]. A precipitação de proteínas de amostras de leite humano tem sido abordada de

diferentes formas pela literatura, a TABELA 2 sumariza algumas das metodologias empregadas.

TABELA 2 – MÉTODOS DE PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS EM AMOSTRAS DE LEITE HUMANO.

Analitos	Procedimento de precipitação	Referência
Parabenos, bisfenol A, triclosan, 2,4-diclorofenol, 2,5-diclorofenol, 2,4,5-triclorofenol, 2-fenilfenol e benzofenona-3	100 µL de amostra; 290 µL de metanol; Agitação em vórtex; Centrifugação a 8000 rpm por 15 min.	[5]
Bisfenol A e derivados clorados, parabenos e filtros UV	9,9 mL de amostra; 7,5 mL de acetonitrila e 7,5 mL de solução de acetato de zinco hidratado, ácido fosfotúngstico hidratado e ácido acético glacial; Agitação em vórtex por 1 min; Centrifugação a 4050 × g por 10 min.	[85]
Pesticidas	5 mL de amostra; 5 mL de acetona; Homogeneização em banho ultrassônico por 5 min.	[86]
Bisfenol A	1 mL de amostra; 3 mL de acetonitrila; Agitação em vórtex por 30 s; Centrifugação a 5500 rpm por 10 min.	[87]
Glifosato	2 mL de amostra; 3,75 mL de ácido acético 0,6 %. Agitação por 10 min a 200 rpm; Centrifugação a 4000 rpm por 5 min.	[88]
Parabenos, alquilfenóis, fenilfenóis, bisfenol A e triclosan	1 mL de amostra; 2 mL de acetonitrila; Agitação em vórtex por 2 min; Centrifugação a 4000 rpm por 10 min.	[82]
Parabenos, filtros UV e plastificantes	250 µL de amostra; 250 µL de acetona; Agitação em vórtex por 30 s; Centrifugação a 3000 rpm por 5 min.	[89]
Fluoxetina e norfluoxetina	455 µL de amostra; 40 µL de 2-propanol e 5 µL de ácido fórmico; Centrifugação a 13420 × g por 15 min.	[81]
Parabenos e filtros UV	1,25 mL de amostra; 2,5 mL de acetonitrila, 150 mg de NaCl e 150 mg de MgSO ₄ ; Agitação manual por 60 s; Centrifugação a 4000 rpm por 5 min.	[79]
Parabenos	5 mL de amostra; 200 µL de ácido trifluoracético; Agitação em vórtex por 2 min; Centrifugação a 3500 rpm por 15 min.	[90]
Parabenos	1 g de amostra; 1 mL de acetonitrila; Centrifugação.	[91]
Parabenos	5 mL de amostra; 300 µL de ácido trifluoracético e 500 mg de NaCl; Agitação; Centrifugação a 822 × g por 15 min.	[80]

A mudança de pH do meio tem consequências similares às descritas anteriormente. Quando o pH fica próximo do ponto isoelétrico das proteínas, as

cargas negativas e positivas se equilibram e a carga líquida da proteína é igual a zero ($\zeta = 0$), isso reduz as forças eletrostáticas repulsivas enquanto as forças de atração predominam (van der Waals), causando agregação e precipitação no caso de proteínas hidrofóbicas^[66,92]. Proteínas hidrofílicas podem manter a estabilidade mesmo no ponto isoelétrico, nesse caso é necessário outro método de precipitação, como a adição de sal ou solvente orgânico^[66]. Observa-se na TABELA 2 que a precipitação de proteínas com solventes orgânicos miscíveis em água (acetonitrila, acetona e metanol, por exemplo) é altamente utilizada para amostras de leite humano, seguido da adição de ácidos (acético e trifluoroacético).

Apesar desses processos de precipitação de proteínas serem rápidos e simples, a seletividade é baixa e na maioria das vezes o extrato obtido contém uma quantidade significativa de componentes solúveis que podem interferir na análise cromatográfica^[93,94]. Além disso, pode ocorrer a co-precipitação dos analitos que acarreta em baixas recuperações^[94]. Então, muitas vezes é necessário empregar técnicas de extração (ex.: SPE, LLE, SPME e DLLME) no extrato obtido na precipitação de proteínas, anteriormente à análise cromatográfica.

1.4 MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA NO TUBO

Trabalhos da literatura têm determinado parabenos, triclosan e bisfenol A em amostras de leite humano em nível (ultra)traço (ng mL^{-1}), através de técnicas como a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS ou GC-MS/MS)^[24,82,95] e a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS)^[5,9,29,89,96] ou com detecção espectrofotométrica na região do ultravioleta (LC-UV)^[80,97]. A TABELA 3 mostra os métodos utilizados pela literatura para determinação de parabenos, triclosan e bisfenol A em leite materno.

TABELA 3 – MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DE PARABENOS, TRICLOSAN E BISFENOL A EM AMOSTRAS DE LEITE MATERNO.

Analitos	Quantidade de amostra	Técnica de extração	Método	LOD/ ng mL ⁻¹	LOQ/ ng mL ⁻¹	Conc. amostra real/ ng mL ⁻¹	Referência
BPA	25 g	LLE	GC-MS	0,09*	0,21*	<LOQ – 0,70	[95]
MPB, EPB, PPB, BPB, BPA e TCS	100 µL	<i>on-line</i> SPE	LC-MS/MS	0,1 – 1,0	–	0,32 – 14,5	[98]
MPB, EPB e PPB	200 µL	MISPE	LC-UV	10 – 20	–	<LOQ	[97]
MPB, EPB, PPB BPB e BPA	10 mL	SBSE	GC-MS/MS	0,1 – 0,2	0,3 – 0,5	<LOQ – 43,5	[24]
			UHPLC-MS/MS	0,1 – 0,2	0,2 – 0,7	<LOQ – 41,2	
MPB, EPB, PPB e BPB	1 mL	SM-SLLME	UHPLC-MS/MS	0,1 – 0,2	0,4 – 0,5	<LOQ – 37,0	[29]
MPB, EPB, PPB, BPA e TCS	1 mL	<i>on-line</i> SPE	GC-MS	0,001 – 0,009	–	0,25 – 8,1	[82]
MPB, EPB e PPB	200 µL	<i>in-tube</i> SPME	UHPLC-MS/MS	–	3,0 – 10,0	<LOQ – 39,8	[9]
MPB, EPB, PPB, BPB, BPA e TCS	100 µL	<i>on-line</i> SPE	UHPLC-MS/MS	0,10 – 1,5	–	<LOQ – 2,3	[7]
MPB, EPB e PPB	200 µL	MA-MSPD-DLLME	LC-UV	25	50	51,2 – 3270,3	[99]
MPB, EPB, PPB BPB e BPA	1,75 mL	DLLME	LC-MS/MS	0,1	0,5	<LOQ – 18,6	[89]
MPB, EPB, PPB e BPB	–	LLE	LC-MS/MS	0,1	–	0,22 – 16,3	[96]
MPB, EPB, PPB e BPB	1 mL	QuEChERS	LC-MS/MS	0,1 – 0,2	0,3 – 0,5	0,4 – 21	[79]
MPB, EPB e PPB	5 mL	µSPE	LC-UV	3,0 – 5,0	10 a 15	18,2 – 156,2	[80]
MPB, EPB, PPB, BPB e BPA	1 mL	QuEChERS	LC-MS/MS	0,02 – 0,19	0,05 – 0,64	0,08 – 13,98	[47]

LLE: extração líquido-líquido; SPE: extração em fase sólida; MISPE: extração em fase sólida com polímero molecularmente impresso; SBSE: extração sortiva em barra de agitação; SM-SLLME: microextração sólido-líquido por agitação de membrana; SPME: microextração em fase sólida; MA-MSPD-DLLME: dispersão na matriz de fase sólida magneticamente assistida seguida de microextração líquido-líquido dispersiva; DLLME: microextração líquido-líquido dispersiva; GC: cromatografia gasosa; LC: cromatografia líquida; UHPLC: cromatografia líquida de ultra eficiência; MS: espectrometria de massas; UV: detector de ultravioleta. *concentração em ng g⁻¹ de amostra.

A utilização da LC é majoritária dentre os trabalhos que fazem a determinação de parabenos, triclosan e bisfenol A em leite humano, como pode ser observado na TABELA 3. A determinação de compostos fenólicos por GC requer uma etapa de derivatização dos analitos, uma vez que essas substâncias são pouco voláteis e instáveis termicamente^[100], enquanto a LC requer apenas que os analitos sejam solúveis na fase móvel. Ainda, são poucos os trabalhos que fazem a análise cromatográfica simultânea dos parabenos e do triclosan, o que pode estar relacionado à ampla faixa de $\log K_{ow}$ desses compostos.

A TABELA 3 mostra que independentemente da técnica cromatográfica empregada (GC ou LC), a etapa de preparo de amostra (com ou sem precipitação de proteínas) é indispensável para a determinação de parabenos, triclosan e bisfenol A em amostras de leite humano. O preparo de amostra é uma etapa crítica do processo analítico, pois contribui de forma significativa com o erro da análise, além de ser normalmente a etapa mais morosa do processo. Desse modo, pesquisas na área de preparo de amostra são muito relevantes para o desenvolvimento de novas técnicas ou materiais que permitam a extração de compostos orgânicos presentes em baixas concentrações em matrizes complexas, como os fluídos biológicos.

As técnicas convencionais de extração líquido-líquido (*Liquid-liquid Extraction* - LLE) e de extração em fase sólida (*Solid phase Extraction* - SPE) têm sido empregadas na extração de compostos orgânicos de amostras biológicas^[7,30,101,102]. Contudo, as inúmeras etapas requeridas por essas técnicas podem acarretar maiores erros na análise e fazer com que seus procedimentos sejam mais morosos. Além disso, essas técnicas geralmente requerem o consumo de grandes volumes de solventes orgânicos, tem risco de formação de emulsões na LLE e as fases comerciais com balanço hidrofílico-lipofílico de SPE, que permitem a extração de compostos de maior polaridade, têm alto custo e são descartáveis^[103].

Apesar da LLE e da SPE ainda serem bastante empregadas em laboratórios de pesquisa e prestação de serviços, especialmente pelas altas taxas de recuperação associadas a estas técnicas, avanços em relação às novas estratégias de preparo de amostra vêm sendo continuamente avaliados. Tal avanço é motivado pela necessidade de assegurar às técnicas de preparo de amostras: sensibilidade, seletividade e precisão analítica, juntamente com o uso de menores volumes de amostra e solventes orgânicos, em um menor número de etapas possível.

Nesse contexto, a miniaturização das técnicas de preparo de amostra tem se destacado, pois emprega volume de fase extratora expressivamente menor que o volume de amostra, o que minimiza o consumo de solventes orgânicos. Além disso, é possível integrar as etapas de extração e concentração do analito com a análise cromatográfica, resultando em menores perdas do analito e tempo de análise^[104]. As técnicas de microextração também requerem menores quantidades de amostra, o que é de especial interesse em análises de matrizes biológicas, cuja disponibilidade é mais restrita.

Inúmeras técnicas miniaturizadas de preparo de amostra, em fase líquida ou sólida, já foram desenvolvidas como microextração em gota única (*single drop microextraction* – SDME)^[105,106], microextração líquido-líquido dispersiva (*dispersive liquid-liquid microextraction* – DLLME)^[107], microextração em fase líquida com fibra oca (*hollow fiber liquid-phase microextraction* – HF-LPME)^[108], microextração em fase sólida (*solid phase microextraction* – SPME)^[109], extração sortiva em barra de agitação (*stir bar sorptive extraction* – SBSE)^[110] e microextração em sorvente empacotado (*microextraction by packed sorbent* – MEPS)^[111].

A SPME introduzida por Arthur e Pawliszyn em 1990^[109] emprega um dispositivo de extração que consiste em uma fibra de sílica fundida (comprimento de 1 a 2 cm; diâmetro interno de 110 a 160 µm) recoberta com filmes poliméricos de 7 a 100 µm de espessura ou sólidos adsorventes. Os principais polímeros disponíveis comercialmente são o polidimetilsiloxano (PDMS), o poliacrilato (PA) e o polietilenoglicol (CW), os sólidos adsorventes utilizados são o carvão ativo e a resina de poliestireno-divinilbenzeno (PS-DVB), também podem ser empregadas misturas desses materiais^[112].

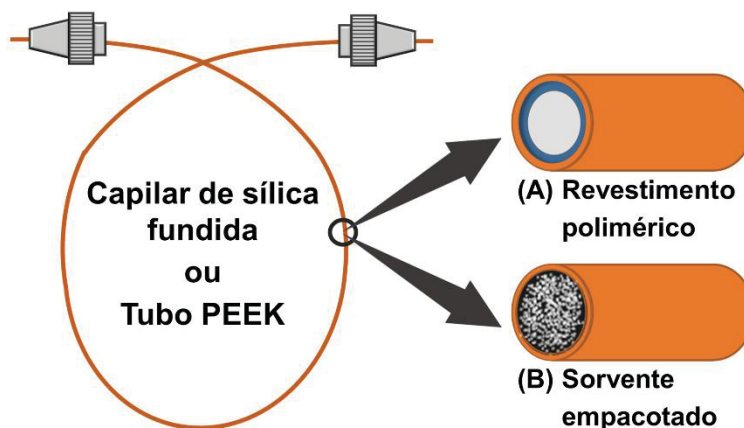
Resumidamente, o procedimento comum para a extração de compostos orgânicos por SPME pode ocorrer no modo *off-line* ou *on-line*, em ambos a fibra é exposta diretamente na amostra ou no headspace do frasco contendo a amostra até que o equilíbrio da extração seja atingido, após esse período a fibra é recolhida e encaminhada ao injetor do sistema cromatográfico, onde a fibra é exposta para que ocorra a dessorção térmica dos analitos^[113]. No modo *on-line*, o dispositivo de SPME é acoplado ao injetor automático do GC, isso minimiza a manipulação da amostra pelo analista e gera menores erros. Assim, a SPME destaca-se pela sua simplicidade e rapidez, uso de nenhum ou de pequenos volumes de solventes

orgânicos (ordem de μL), necessidade de pequenos volumes de amostra, baixo custo e fácil automação com GC^[114].

Apesar da compatibilidade da SPME com o cromatógrafo a gás, o acoplamento dessa técnica com o cromatógrafo a líquido apresenta algumas dificuldades relacionadas à interface com o instrumento, que ainda requer operação manual, ao contrário do sistema SPME-GC. Além disso, as válvulas de injeção mecânica podem danificar a fase extratora^[113]. Outras limitações da SPME incluem baixa capacidade de sorção e sangramento da fase sorvente em contato com os solventes da LC e modificadores ácidos e básicos da fase móvel aquosa^[115].

Desse modo, foi desenvolvida a microextração em fase sólida no tubo (*in-tube Solid Phase Microextraction* – ***in-tube* SPME**)^[116], que utiliza como dispositivo de extração um tubo capilar aberto de sílica fundida (ex.: segmento de coluna capilar de GC) ou um segmento de tubo polimérico (PEEK – poli(éter-éter-cetona), os quais podem ser empacotados ou revestidos internamente com uma fase extratora sólida ou polimérica. A FIGURA 3 exemplifica os dispositivos de *in-tube* SPME com revestimento polimérico (A) ou sorvente empacotado (B).

FIGURA 3 – DISPOSITIVOS PARA *in-tube* SPME EMPREGANDO CAPILARES REVESTIDOS INTERNAMENTE (A) OU EMPACOTADOS (B) COM A FASE SORVENTE.

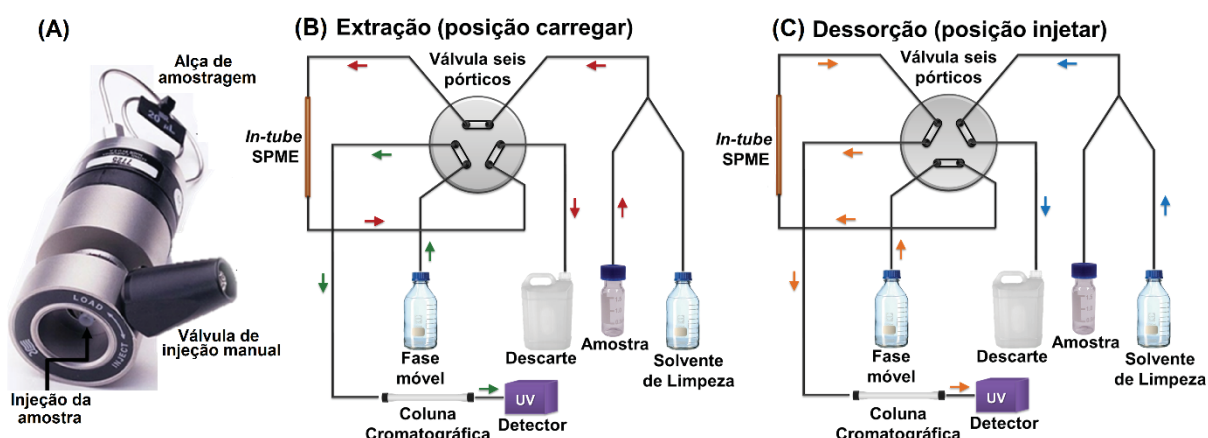


FONTE: Adaptado de Kataoka *et al.*^[114].

Na *in-tube* SPME, o dispositivo de extração apresentado na FIGURA 3 pode ser acoplado em linha ao sistema de LC, com o capilar fixado entre a alça de amostragem (“loop”) e a agulha do injetor automático do LC, ou simplesmente, substituindo a alça de amostragem do injetor manual. Isso permite a automação dos processos de extração e concentração dos analitos no interior do capilar, que são

realizados por meio de repetidos ciclos de aspirar e dispensar a amostra^[117]. A FIGURA 4 mostra uma fotografia da válvula de injeção manual (A) e a representação esquemática dos processos de extração (B) e dessorção (C) envolvidos na *in-tube* SPME.

FIGURA 4 – (A) FOTOGRAFIA DO INJETOR MANUAL (RHEODYNE) COM OS PRINCIPAIS COMPONENTES INDICADOS; REPRESENTAÇÕES ESQUEMÁTICAS DOS PROCESSOS DE (B) EXTRAÇÃO (POSIÇÃO CARREGAR) E DE (C) DESSORÇÃO (POSIÇÃO INJETAR).



FONTE: Adaptado de Kataoka e colaboradores^[118].

O processo de sorção dos analitos baseia-se no equilíbrio de partição do analito entre as fases aquosa (amostra) e extratora, o qual é atingido mais rapidamente na *in-tube* SPME, em comparação com a SPME convencional, devido ao fluxo da amostra pelo capilar^[116], como exemplificado na FIGURA 4B (posição carregar). Após a extração, os compostos de interesse são transferidos para a coluna cromatográfica pelo fluxo da fase móvel (modo dinâmico), como apresentado na FIGURA 4C (posição injetar), ou pela introdução de um pequeno volume na ordem de microlitros de solvente orgânico (modo estático)^[10].

A extração por *in-tube* SPME é regida pelo coeficiente de partição de cada analito entre a fase sorvente e a amostra, e este depende tanto da afinidade do analito pela fase sorvente quanto pela amostra, deste modo é importante favorecer a partição do analito para a fase extratora^[115]. A quantidade de soluto extraída e o tempo da extração podem ser otimizados pelo estudo dos parâmetros: volume, vazão, pH e força iônica da amostra, fase sorvente, dimensões do capilar, número de ciclos de aspirar/dispensar e modos de dessorção^[115,119].

Na *in-tube* SPME, compostos orgânicos presentes em diferentes matrizes podem ser extraídos e concentrados diretamente no sistema analítico, o que é de

especial interesse para aplicação em amostras biológicas, uma vez que permite a análise destas com o mínimo tratamento prévio, reduzindo a exposição do analista aos possíveis riscos biológicos. Para matrizes de alta complexidade, uma etapa de pré-preparo da amostra pode ser necessária a fim de evitar o entupimento do capilar, reduzir o efeito matriz e/ou aumentar a eficiência de extração. Essa etapa pode incluir ultrafiltração, diluição com solução ácida, básica ou tampão, e/ou precipitação de proteínas de fluidos biológicos^[119]. A TABELA 4 mostra alguns procedimentos empregados pela literatura no pré-preparo de diferentes amostras biológicas e exemplos de fases sorventes que têm sido desenvolvidas e aplicadas na *in-tube* SPME.

TABELA 4 – PRÉ-PREPARO DE AMOSTRA E FASES EXTRATORAS EMPREGAS PARA EXTRAÇÃO DE ANALITOS DIVERSOS DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS POR *in-tube* SPME.

Analitos	Matriz	Pré-preparo da amostra	Fase extratora	Ref.
Propranolol	Sérum humano	Diluição com ácido; e ultrafiltração	MIP	[120]
Fluoxetina e norfluoxetina	Plasma humano	Diluição com tampão	Polipirrol	[10]
Interferon α	Plasma humano	Diluição com tampão	RAM (sílica recoberta com BSA)	[117]
Aldeídos	Condensado da respiração exalada	Diluição com água	Óxido de grafeno reduzido / polianilina	[121]
Estimulantes	Urina	Diluição com água; e ajuste de pH	Polipirrol	[122]
Antidepressivos	Urina e plasma humano	Precipitação de proteínas com ACN; centrifugação; diluição com tampão; e filtração	Sílica monolítica híbrida	[123]
Amitriptilina e doxepina	Urina e plasma humano	<u>Urina</u> : centrifugação; e diluição com tampão; <u>Plasma</u> : Adição de ACN; centrifugação; diluição com tampão; e filtração.	Politiofeno / óxido de grafeno	[124]
Parabenos	Leite humano	Precipitação de proteínas com ACN; diluição com tampão	MIP-RAM	[9]
Diclofenaco e ácido mefenâmico	Urina e plasma humano	Centrifugação; e diluição com água	Polipirrol	[125]
Hidrocarbonetos poliaromáticos	Leite humano	Precipitação de proteínas por ajuste de pH	Monolito de poli(9-vinilantraceno-co-etileno dimetacrilato)	[126]
Naproxeno e indometacina	Urina e plasma humano	<u>Urina</u> : centrifugação; e diluição com água. <u>Plasma</u> : adição de acetonitrila; centrifugação; diluição com água; e filtração.	Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ @ nanopartículas de hidróxido duplo lamelar (Cu e Cr)	[127]
Endocanabinóides	Plasma humano	Precipitação de proteínas com ACN	Líquido iônico polimérico	[128]
Anti-inflamatórios	Plasma humano	Precipitação de proteínas com ACN e ácido acético; centrifugação; e diluição com tampão	Monolito de poli(solvente eutético profundo)	[129]

MIP: polímero molecularmente impresso; RAM: material de acesso restrito; ACN: acetonitrila.

Em análises alvo, as fases sorventes utilizadas em *in-tube* SPME podem ser simplesmente fases estacionárias comerciais de GC como Omegawax 250^[8], divinilbenzeno^[130], OV-1701^[131] e dimetilpolissiloxano^[132], as quais extraem os analitos via interações de van der Waals majoritariamente. Entretanto, a baixa seletividade dessas fases e a dificuldade de extrair compostos polares de matrizes complexas, impulsionaram o desenvolvimento de novos materiais sorventes. Como apresentado na TABELA 4, há diversas possibilidades de fases extratoras formadas por diferentes materiais e/ou nanomateriais como os polímeros molecularmente impressos (MIP)^[120], materiais de acesso restrito (RAM)^[117], misturas de MIP e RAM^[9], polímeros condutores^[10,122,125] e seus compósitos com óxido de grafeno^[124] ou óxido de grafeno reduzido^[121], monolitos orgânicos e/ou inorgânicos^[123,126,129], nanopartículas de óxidos, hidróxidos e suas combinações^[127], líquidos iônicos poliméricos^[128] entre outros, o que demonstra a diversidade de fases extratoras que são selecionadas de acordo com os compostos de interesse e as matrizes estudadas.

A utilização da técnica de *in-tube* SPME para a extração de parabenos ou bisfenol A ainda é pouco relatada pela literatura. Para o triclosan não foi encontrado nenhum trabalho que empregou a *in-tube* SPME no preparo de amostra. Souza e colaboradores^[9] utilizaram a técnica de *in-tube* SPME/UHPLC-MS/MS para extrair parabenos de amostras de leite humano previamente diluídas com tampão borato (50 mmol L⁻¹, pH 9), sendo que os autores empregaram uma fase sorvente de MIP-RAM e alcançaram limites de quantificação de 3 e 10 ng mL⁻¹. Asiabi e colaboradores^[133] aplicaram a *in-tube* SPME/LC-UV com fase sorvente baseada em compósito dos polímeros condutores polianilina e polipirrol para a extração de parabenos de amostras de águas (torneira, superficial e efluente), leite bovino e diferentes sucos. Os autores diluíram as amostras de leite e sucos com água ultrapura e usaram 40 mL como volume de amostra, sendo obtidos limites de quantificação de 0,07 a 0,1 ng mL⁻¹^[133]. A *in-tube* SPME/LC-UV também foi utilizada para a extração de parabenos de amostras de produtos de higiene pessoal e cosméticos por Cheng e colaboradores^[134], que empregaram etapa prévia de extração com acetonitrila e sonicação, MIP como fase sorvente e alcançaram limites de detecção de 0,2 a 0,3 ng mL⁻¹.

Mei e colaboradores^[135] determinaram bisfenol A em amostras de águas ambientais e suco de uva por *in-tube* SPME/LC-UV, com fase sorvente baseada em

monolito orgânico polimérico contendo nanopartículas magnéticas. Os autores atingiram limites de quantificação de 0,033 a 0,085 ng mL⁻¹ e 0,062 a 0,17 ng mL⁻¹ para as amostras de água e suco de uva, respectivamente. Nasrollahi e colaboradores^[136] determinaram bisfenol A lixiviado de amostras de papel térmico, copo plástico descartável e de garrafa plástica por *in-tube* SPME/LC-UV, cujo dispositivo de extração consistiu em tubo PEEK contendo uma fibra de polipropileno com nanopartículas magnéticas de Fe₃O₄ no interior dos poros da fibra. Os autores obtiveram limites de detecção e quantificação iguais a 0,01 ng mL⁻¹ e 0,033 ng mL⁻¹, respectivamente^[136]. Como demonstrado pelos trabalhos mencionados, o uso da *in-tube* SPME para a determinação de parabenos, bisfenol A e triclosan é pouco explorada e o emprego dessa técnica para a extração desses analitos de amostras biológicas é ainda menor. A extração simultânea de parabenos, bisfenol A e triclosan de qualquer tipo de matriz por *in-tube* SPME não foi relatada até o momento. Além disso, a maioria das fases extratoras utilizadas nos trabalhos citados são complexas e de alto custo. Esses aspectos evidenciam a necessidade de mais estudos tanto em relação à aplicação da técnica de *in-tube* SPME para a extração de parabenos, bisfenol A e triclosan de matrizes biológicas quanto a respeito da obtenção de novas fases sorventes.

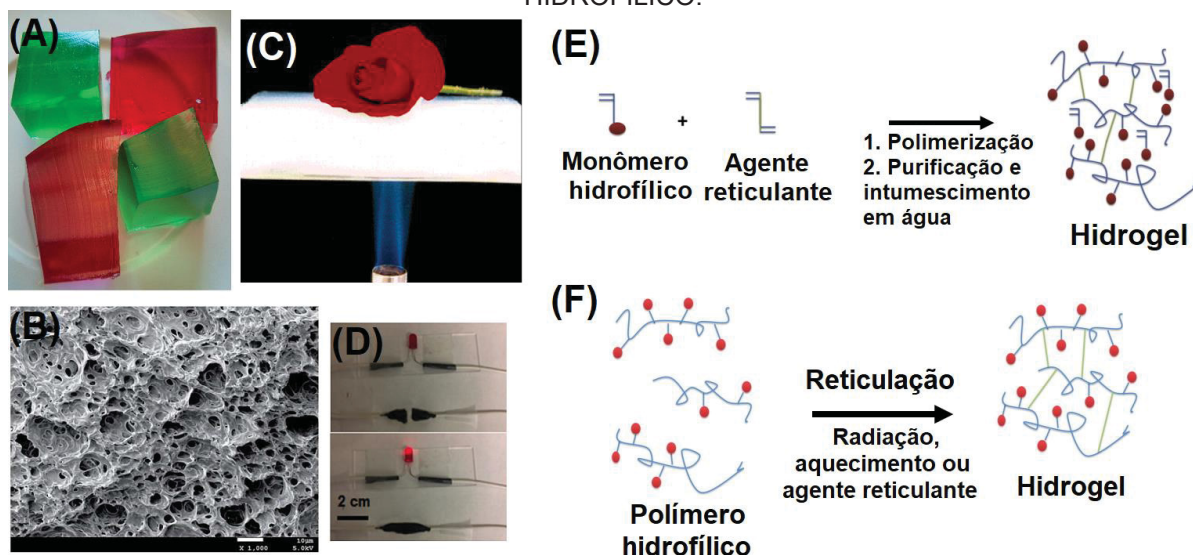
As pesquisas na área do desenvolvimento de novas fases extratoras visam a obtenção de materiais sorventes mais seletivos, com alta capacidade de sorção, estáveis (maior vida útil) e de baixo custo^[11]. Há interesse no desenvolvimento de fases sorventes para a extração de compostos polares presentes em matrizes complexas, uma vez que esses são difíceis de isolar e pré-concentrar, por causa de sua baixa afinidade com as fases extratoras que geralmente apresentam poucos ou nenhum grupamento polar. Nesse sentido, uma classe de materiais promissora para aplicação como fase sorvente são os hidrogéis, devido a sua alta hidrofiliabilidade. Esses materiais são largamente empregados nas áreas médica e farmacêutica^[137–140], todavia ainda são pouco estudados como fases extratoras, e a utilização somente de hidrogéis como fase extratora em *in-tube* SPME ainda não foi reportada na literatura.

1.5 GÉIS DE POLÍMEROS HIDROFÍLICOS COMO FASE EXTRATORA

A IUPAC define gel como um sistema coloidal não fluído ou rede tridimensional que se expande ao longo de todo o seu volume por um fluído (líquido

ou gás)^[141], em outras palavras, gel pode ser definido como um sistema coloidal cuja fase contínua é a rede tridimensional (componente minoritário) e a fase dispersa é o solvente (componente majoritário). Há vários tipos de géis, com relação à rede, esta pode ser composta por material inorgânico como óxidos, material orgânico como polímeros e biopolímeros ou materiais híbridos (orgânico-inorgânico), já o fluido pode ser líquido (aquoso ou orgânico) ou gasoso. A FIGURA 5 mostra algumas fotografias com exemplos de diferentes géis.

FIGURA 5 – (A) FOTOGRAFIA DE GELATINA; (B) IMAGEM DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE GEL DE ÁLCOOL POLIVINÍLICO; (C) AEROGEL DE SÍLICA; (D) HIDROGEL DE POLÍMERO CONDUTOR (POLIANILINA/POLI(4-ESTIRENOSULFONATO)); (E) ESQUEMA DE SÍNTESE DE HIDROGEL POR POLIMERIZAÇÃO TRIDIMENSIONAL A PARTIR DE MONÔMERO HIDROFÍLICO; (F) ESQUEMA DE SÍNTESE DE HIDROGEL A PARTIR DE POLÍMERO HIDROFÍLICO.



FONTE: (A) Imagem de Karl-Heinz Esau por Pixabay; (B) Zhang e colaboradores^[142]; (C) Hüsing e Schubert^[143]; (D) Chen e colaboradores^[144]; (E) e (F) Adaptado de Caló e Khutoryanskiy^[145].

A FIGURA 5 exemplifica a variedade de tipos de géis, que vai desde géis comestíveis como a gelatina (FIGURA 5A) até hidrogéis de polímeros condutores que são elásticos, injetáveis e tem capacidade de se regenerar^[144] (FIGURA 5D). Esses materiais também podem apresentar estrutura porosa como é observado na imagem de microscopia eletrônica de varredura de um gel de álcool polivinílico (PVOH) apresentada na FIGURA 5B. As diferentes possibilidades de composição em termos da rede e do fluido permite a obtenção de materiais com diferentes propriedades, por exemplo os aerogéis de SiO₂ são excelentes isolantes térmicos^[143] como mostrado na FIGURA 5C, o que demonstra a grande variedade e complexidade dessa classe de materiais denominada por gel.

Quando o gel é formado por uma rede polimérica e o fluído é a água, essa classe de materiais é chamada de hidrogel^[13]. Esses materiais podem ser obtidos a partir de reação de polimerização de um monômero hidrofílico na presença de um agente de reticulação bifuncional, como mostrando na FIGURA 5E, mas para algumas aplicações é necessária a remoção dos monômeros que não reagiram e podem apresentar toxicidade^[145]. Outra forma de obtenção dos hidrogéis é a reticulação das cadeias poliméricas hidrofílicas pré-polimerizadas por meio da aplicação de radiação, aquecimento ou resfriamento ou uso de agentes de reticulações, como apresentado na FIGURA 5F.

Os hidrogéis compõe uma classe de materiais amplamente aplicada no desenvolvimento de órgãos artificiais^[137], curativos^[138], lentes de contato^[146] e sistemas de liberação controlada de fármacos^[139,140], dentre outros. Recentemente, esses géis têm se destacado com relação às suas potencialidades de aplicação como fase extratora, devido à sua estrutura formada por redes poliméricas hidrofílicas reticuladas, que são capazes de absorver e reter grandes quantidades de água sem se dissolver^[147,148]. Outro fator favorável é a presença de diversos sítios hidrofílicos, como $-OH$, $-COOH$, $-SO_3H$ e $-NH_2$ ligados à cadeia polimérica do hidrogel, que permite a extração de compostos de maior polaridade, e aliada ao seu baixo custo e facilidade de síntese, os tornam potenciais materiais para uso em técnicas baseadas em sorção, em detrimento às fases extratoras comerciais.

A reticulação pode ser empregada para modificar propriedades dos polímeros, como por exemplo, estabilidade química e térmica, rigidez estrutural e permeabilidade^[149]. O grau de reticulação é um fator importante para o preparo desses géis, uma vez que tem influência direta na estrutura destes. Quanto maior o grau de reticulação menores são a porosidade da rede e a permeabilidade à água, de forma que a difusão de substâncias aprisionadas na rede polimérica também é menor^[150]. A reticulação pode ocorrer via ligações covalentes, não covalentes tipo iônica ou via interações intermoleculares como ligações de hidrogênio. As duas primeiras unem as cadeias poliméricas permanentemente, enquanto a terceira forma géis reversíveis, os quais apresentam menor estabilidade, pois são sensíveis às alterações do pH e da força iônica do meio^[151].

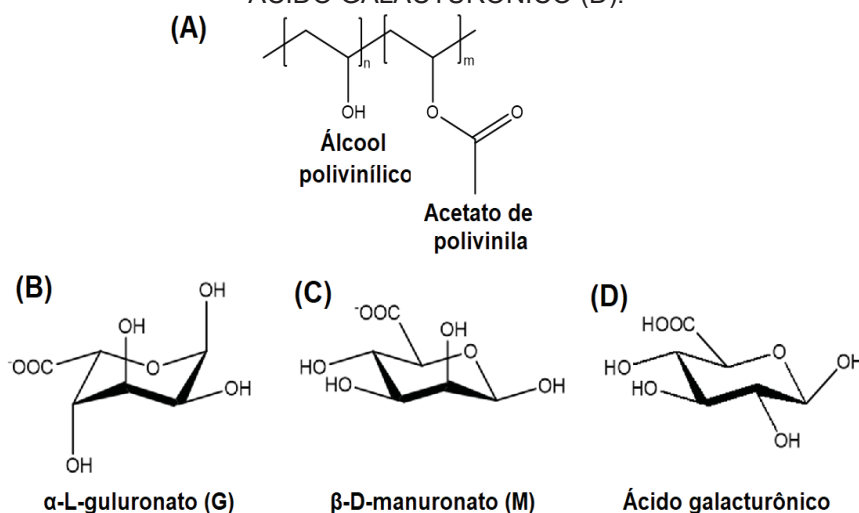
A rede tridimensional dos hidrogéis é formada geralmente através de reações de entrecruzamento, que visam unir as cadeias poliméricas^[150]. Essa reação

ocorre entre sítios reativos do polímero e/ou entre sítios reativos do polímero e o do agente de reticulação, formando ligações inter ou intramoleculares^[151].

Hidrogéis podem ser preparados a partir de polímeros de origem natural ou sintética, sendo que tanto um quanto o outro apresentam propriedades interessantes, por exemplo, a biodegradabilidade e baixa toxicidade dos géis preparados a partir de fontes naturais, e alta resistência mecânica, alta capacidade de absorver água e maior vida útil dos géis preparados com polímeros sintéticos^[152].

O álcool polivinílico (PVOH) é um polímero sintético hidrofílico semicristalino produzido pela hidrólise do acetato de polivinila, cuja reação é incompleta e resulta em polímeros com diferentes graus de hidrólise^[153]. Assim, o PVOH é encontrado comercialmente nas formas altamente hidrolisado (grau de hidrólise acima de 98,5 %) e parcialmente hidrolisado (grau de hidrólise de 80 a 98,5 %). A estrutura do PVOH, apresentada na FIGURA 6A, contém diversos grupos hidroxila, sendo este um polímero altamente hidrofílico e solúvel em água, que apresenta propriedades mecânicas excelentes, estabilidade química, e capacidade de formar filmes^[154].

FIGURA 6 – ESTRUTURA POSSÍVEL DO POLÍMERO DE PVOH (A) E DOS MONOSSACARÍDEOS QUE FORMAM O ALGINATO, β -D-MANURONATO (B) E α -L-GULURONATO (C), E A PECTINA, ÁCIDO GALACTURÔNICO (D).



*n e m: grau de polimerização.

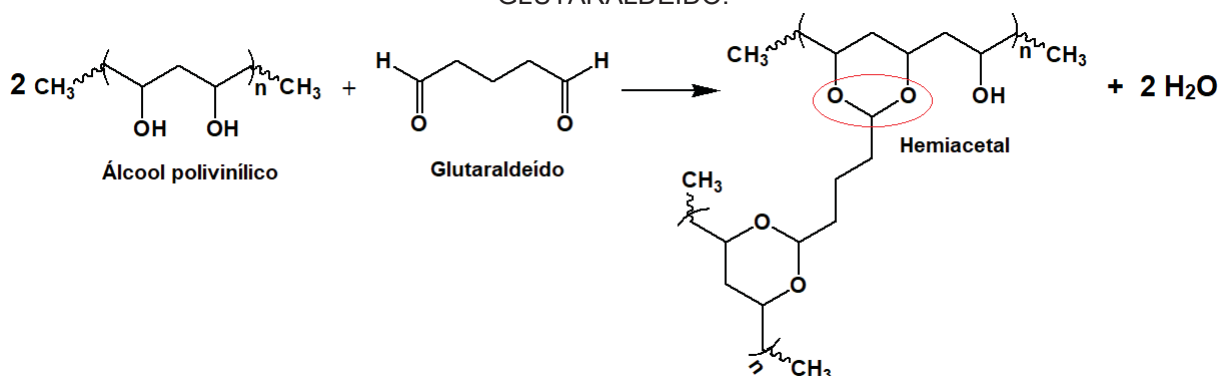
FONTE: A autora (ChemDraw Ultra 8.0).

Hidrogéis de PVOH também têm sido obtidos pela combinação desse polímero com biopolímeros como o alginato^[155–157] e a pectina^[158–160]. O alginato é um polissacarídeo extraído de algas, e estruturalmente é um heteroglicano de cadeia linear formado por unidades de α -L-guluronato (G) e β -D-manuronato (M) ligadas de forma alternada por meio de ligações glicosídicas $\alpha(1-4)$ ^[161]. A FIGURA

6(B e C) mostra as estruturas dos monossacarídeos que formam o alginato, sendo este um polieletrólito aniônico em água, devido ao grupo carboxilato em C6^[161]. Outro biopolímero hidrofílico interessante é a pectina, que é um polissacarídeo de origem vegetal constituído majoritariamente por unidades de ácido galacturônico (FIGURA 6D) ligadas por ligações do tipo $\alpha(1-4)$, podendo conter quantidades variáveis de substituintes metil-éster^[140] dependendo do seu grau de metoxilação. A pectina pode ter alto grau de metoxilação (GM > 50 %) ou baixo grau de metoxilação (GM < 50 %), o que vai depender da origem e do método usado para a sua extração e purificação^[162]. Esses biopolímeros são biodegradáveis, biocompatíveis, de baixo custo e formam hidrogéis na presença de íons metálicos di e trivalentes, quando em solução aquosa^[163,164]. A combinação do PVOH com esses polímeros possibilita a obtenção de géis com redes mais abertas e permeáveis à água, isso permitiu a aplicação desses materiais como discos de extração para SPE^[160].

O PVOH forma géis tanto por reticulação covalente pelo entrecruzamento de suas cadeias com uma infinidade de agentes de reticulação como formaldeído, glutaraldeído, ácido cítrico, maleico e bórico, dentre outros^[165], quanto por reticulação não covalente através da aplicação de ciclos sucessivos de congelamento e descongelamento^[166,167]. O glutaraldeído é um agente de reticulação do tipo covalente e eficiente para a obtenção de géis de PVOH. Esse di-aldeído é capaz de reagir relativamente rápido com os grupos hidroxilas presentes na estrutura do PVOH, podendo-se obter uma rede fortemente reticulada e com a presença de pontos de inter cruzamentos de natureza inter e/ou intramoleculares^[154]. A FIGURA 6 mostra uma representação do processo de reticulação do PVOH com glutaraldeído.

FIGURA 7 – REPRESENTAÇÃO DA REAÇÃO DE RETICULAÇÃO DO PVOH COM GLUTARALDEÍDO.



FONTE: Adaptado de Mansur e colaboradores^[153].

Como pode ser observado na FIGURA 7, a reação entre dois grupos hidroxila do PVOH com um grupo aldeído do glutaraldeído resulta na formação de hemiacetais (destacado pela elipse em vermelho). O aumento no grau de reticulação resulta em uma rede mais rígida, de forma que a capacidade de absorção de água pelo gel de PVOH diminui e, conseqüentemente, o grau de intumescimento é menor^[154,168]. A reticulação do PVOH garante maior estabilidade térmica ao gel em relação ao PVOH não modificado^[154], mas o aumento do grau de reticulação pode diminuir a cristalinidade dos géis, como reportado por Hasimi e colaboradores para PVOH reticulado com glutaraldeído^[168].

Apesar das características atrativas dos hidrogéis mencionadas anteriormente, seu emprego no desenvolvimento de novas fases extratoras é algo que teve início apenas nas duas últimas décadas e ainda é pouco explorado, considerando o grande potencial desses materiais. Trabalhos da literatura empregaram hidrogéis de polimetacrilatohidroxilado^[12] e polimetilmetacrilato^[169] para a extração de interferentes endócrinos presentes em amostras de águas superficiais, em nível de ng mL⁻¹. Bahram e colaboradores ^[170] utilizaram um hidrogel de poli(estireno-co-anidrido maleico), sensível ao pH, para a pré-concentração de corantes. Em um trabalho mais recente, González-Martín e colaboradores^[171] utilizaram um copolímero de poli(estireno-co-anidrido maleico) sensível ao pH para a microextração de hidrocarbonetos poliaromáticos (HPAs), HPAs hidroxilados e um alquilfenol de amostras de urina.

Nesse sentido, o Grupo de Cromatografia e Técnicas de Microextração (CroMe) tem estudado esses materiais, sejam puros ou quimicamente modificados, com a finalidade de compreender e avaliar o seu emprego como fases extratoras para diferentes analitos, tanto polares quanto apolares, presentes em matrizes complexas. Em dois trabalhos prévios do grupo, Castilhos e colaboradores^[172] desenvolveram um dispositivo de extração para SPME com fase extratora baseada em hidrogel de alginato e zeína. Este foi capaz de extrair 14 contaminantes de preocupação emergente de amostras de água superficial. Em um segundo trabalho, Sampaio e colaboradores^[160] desenvolveram um disco de extração para SPE a partir de um hidrogel de PVOH e pectina, o qual foi aplicado na extração de seis hormônios, classificados como interferentes endócrinos, de amostras de água

superficial. As vantagens obtidas ao empregar o hidrogel como fase extratora, incluíram fácil obtenção, baixo custo e possibilidade de reutilização.

A aplicação de hidrogéis como fase extratora na técnica de *in-tube* SPME mostra-se promissora, porém praticamente não explorada na literatura recente. O presente trabalho visa estudar a construção de dispositivos de *in-tube* SPME contendo fase extratora baseada em hidrogel de PVOH para a extração de parabenos, triclosan e bisfenol A de amostras de leite humano. Além disso, foi estudado o comportamento desse material em um ambiente confinado, bem como os comportamentos de sorção dos compostos de interesse em condições reais de análise, empregando-se inicialmente amostras de água como modelo e num segundo momento aplicando-se para fórmula infantil e leite humano.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolvimento de dispositivos a base de hidrogéis para microextração em fase sólida (*in-tube* SPME) de parabenos, triclosan e bisfenol A de amostras aquosas e análise cromatográfica com determinação espectrofotométrica (LC-UV).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Desenvolvimento do método cromatográfico (LC-UV) para a determinação dos compostos alvo deste estudo: metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno, butilparabeno, triclosan e bisfenol A.
- b) Preparação e avaliação de fases extratoras baseadas em hidrogéis para a microextração em fase sólida dos analitos.
- c) Caracterização do gel empregado como fase extratora.
- d) Otimização das variáveis envolvidas no processo de precipitação de proteínas.
- e) Otimização das variáveis envolvidas no processo *in-tube* SPME.
- f) Avaliação dos parâmetros de desempenho.
- g) Aplicação da metodologia desenvolvida para a extração de parabenos de amostras de leite humano.

3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 MATERIAIS

Foram utilizados padrões de alta pureza de: bisfenol A (99,9 %, m/m), butilparabeno (99,0 %, m/m), etilparabeno (99,0 % m/m), metilparabeno (99,0 % m/m), propilparabeno (99,0 % m/m), e triclosan (97,0 % m/m), todos adquiridos da Sigma-Aldrich®. Como padrão interno utilizou-se o dietilestilbestrol (99,0 % m/m) também adquirido da Sigma-Aldrich®. Solventes de grau cromatográfico acetonitrila (ACN, 99,9 % v/v), metanol (MeOH, 99,9 % v/v), etanol (EtOH, 99,5 % v/v), isopropanol (ISO, 99,7 % v/v), tetraidrofurano (THF, 99,8 % v/v), acetato de etila (ACE, 99,6 % v/v) e diclorometano (DCM, 99,8 % v/v) foram adquiridos da J. T. Baker®. Utilizou-se água ultrapura com resistividade controlada em 18,2 MΩ cm, purificada por sistema Millipore®-Simplicity UV (Bedford, MA, USA).

Ácido sulfúrico (98,0 % v/v), peróxido de hidrogênio (35 % v/v), hidróxido de sódio (98 % m/m), ácido clorídrico (37 % v/v) e (3-aminopropil)-triétoxissilano (APTS) (98 % v/v) foram adquiridos da Sigma-Aldrich®. Álcool polivinílico >99 % hidrolisado (MM: 89.000 - 98.000 g mol⁻¹) e alginato de sódio foram fornecidos pela Sigma-Aldrich, e pectina cítrica adquirida no Mercado Municipal da cidade de Curitiba-PR. Para a reticulação empregou-se ácido cítrico anidro (99,5 % m/m) fornecido pela Qhemis® ou glutaraldeído (25 % v/v) adquirido da Vetec®.

Foram empregados neste trabalho balança analítica digital da marca Mettler Toledo®, modelo XS205DU, com precisão de 0,01 mg e liofilizador L101 (Liobras®) para processar (i) pectina cítrica comercial purificada e (ii) amostras de géis hidratados para as análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e isoterma de N₂. As dispersões poliméricas foram preparadas em chapa de aquecimento com agitação magnética da marca IKA®, modelo C-MAG HS7 e rotação máxima de 1500 rpm.

A fórmula infantil foi adquirida em mercado local na cidade de Curitiba-PR. Utilizou-se fórmula infantil cuja composição é indicada para a alimentação de bebês com idade de 0 a 6 meses.

Para a limpeza das vidrarias utilizou-se água destilada para o enxágue, a seguir as vidrarias foram deixadas em solução de ácido nítrico (10 % v/v) por um período mínimo de 12 h, para oxidação da matéria orgânica. Após contato com

solução de ácido, as vidrarias foram enxaguadas com água destilada e ultrapura, respectivamente. A secagem foi realizada ao ar ou em estufa a 100°C.

3.2 PREPARO DAS SOLUÇÕES DE PADRÕES

Soluções estoque, de cada padrão individualmente, foram preparadas em metanol em concentração de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Para isso, pesou-se 10,00 mg de cada composto, os quais foram dissolvidos com metanol completando-se o volume de 10 mL da vidraria analítica. O armazenamento dessas soluções foi feito ao abrigo de luz e a -18°C. As soluções de trabalho, na concentração de 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, empregadas na etapa de otimização da separação cromatográfica foram preparadas diariamente a partir das soluções estoque diluídas em metanol ou na fase móvel. As soluções com concentrações intermediárias de 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dos analitos e do padrão interno, respectivamente, empregadas no enriquecimento das amostras para extração foram refeitas a cada 10 dias.

3.3 SELEÇÃO DAS CONDIÇÕES DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo a líquido da marca Varian®, modelo ProStar, equipado com injetor Rheodyne® (com loop de 20 μL), bomba ternária (modelo 9012Q) e detector ultravioleta com arranjo de diodos (modelo 320 UV-Vis)

Três colunas analíticas de octadecilsilano, com pré-coluna de fase estacionária similar, foram avaliadas para a separação dos analitos. A TABELA 5 apresenta as informações a respeito do comprimento e diâmetro interno das colunas estudadas, bem como o diâmetro das partículas da fase estacionária.

TABELA 5 – PROPRIEDADES DAS COLUNAS CROMATOGRÁFICAS EMPREGADAS NA SEPARAÇÃO DOS ANALITOS.

Fornecedor	Modelo	Comprimento/mm	Diâmetro interno/mm	Diâmetro da partícula/ μm
Agilent®	Eclipse XDB-C18	150	4,6	5
Varian®	Pursuit 3 C18	200	3,0	3
Phenomenex®	Synergi Hydro-RP	250	4,6	4

A composição da fase móvel foi avaliada em termos da proporção da componente orgânica (35 a 80 %, v/v), constituída por ACN ou MeOH em conjunto com água, solução de ácido acético 1 % (v/v) ou tampões fosfato (10 mmol L⁻¹) com

valores de pH de 3 ou 6 como a componente aquosa. Os valores de vazão da fase móvel estudados contemplaram a faixa de 0,5 a 1 mL min⁻¹.

A seleção das condições do método de separação foi baseada na análise dos parâmetros cromatográficos: fator de retenção (k), fator de seletividade (α), resolução (R_s), número de pratos teóricos (N) e fator de assimetria (A_s). As equações utilizadas para a obtenção de tais parâmetros são apresentadas no QUADRO 1.

QUADRO 1 – EQUAÇÕES DOS PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS AVALIADOS^[173].

Parâmetros cromatográficos	Equação	Variáveis da equação
Fator de retenção (k)	$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$	t_R : tempo de retenção; t_0 : tempo necessário para as moléculas da fase móvel percorrerem o sistema.
Fator de seletividade (α)	$\alpha = \frac{k_2}{k_1}$	k_1 e k_2 : fatores de retenção para dois picos adjacentes.
Número de pratos teóricos (N)	$N = 16 \left(\frac{t_R^2}{w_b^2} \right)$	t_R : tempo de retenção; w_b : largura da base do pico.
Resolução (R_s)	$R_s = 2 \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{(w_{b1} + w_{b2})}$	t_R : tempo de retenção; w_b : largura da base do pico.
Fator de assimetria (A_s)	$A_s = \frac{b}{a}$	a : largura da metade direita do pico; b : largura da metade esquerda do pico. *

*a e b são obtidos a uma distância da linha de base correspondente 10 % da altura.

O estudo da seleção das condições cromatográficas foi realizado empregando-se o comprimento de onda (λ) de 280 nm para a detecção dos analitos por espectrofotometria. Após a seleção da coluna cromatográfica, composição da fase móvel e vazão, os valores de λ utilizados para a detecção dos analitos foram avaliados com base na literatura^[29,97,174–177] e por meio da obtenção dos espectros de absorção de cada analito, na região de 180 a 450 nm.

A condição de separação selecionada empregou a coluna Synergi Hydro-RP, com fase estacionária de octadecilsilano e dimensões de 250 mm (L), 4,6 mm (d.i.) e 4 μ m de diâmetro de partículas. Gradiente de fase móvel a 1 mL min⁻¹, composta por 45 % (v/v) de água e 55 % (v/v) de ACN durante os 9 min iniciais, seguindo com aumento para 75 % (v/v) de ACN entre 9 e 11 min, e permanecendo assim até o final da análise com tempo total de 20 min. Para a detecção utilizou-se

os comprimentos de onda de 254 nm para os parabenos, 245 nm para o padrão interno e 227 nm para o bisfenol A e o triclosan.

3.4 PURIFICAÇÃO DA PECTINA

A pectina comercial foi purificada por processo de diálise, para remover a frutose e sacarose presente no produto comercial^[178]. Uma dispersão aquosa de pectina 10 % (m/v) foi acondicionada no interior de membranas de celulose regenerada, com MWCO (*Molecular weight cutoff*) de 12 a 14 kDa (Spectra/Por®). As membranas contendo a dispersão foram imersas em banho de água destilada, o qual foi trocado 4 vezes ao dia, por um período de 3 dias. Ao final do processo, a dispersão de pectina foi liofilizada e o biopolímero foi utilizado após a liofilização.

3.5 PREPARO DAS DISPERSÕES POLIMÉRICAS

Dispersões de PVOH 15 % (m/m) foram obtidas pela dissolução do polímero em água ultrapura em béquer de 50 mL, sob aquecimento (~85°C) e agitação magnética durante 4 h, mantendo-se a mistura coberta com papel alumínio durante todo o processo. As dispersões de pectina dialisada 2 % (m/m) e alginato 2 % (m/m) foram preparadas pela dissolução dos biopolímeros em água ultrapura em béquer de 50 mL, à temperatura ambiente e sob agitação magnética durante o mesmo período.

3.6 PREPARO DA SOLUÇÃO PIRANHA

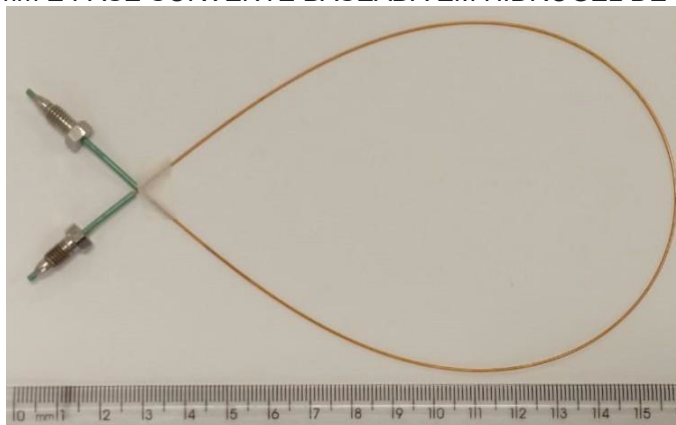
Solução piranha foi utilizada para a remoção da fase estacionária de uma coluna capilar de GC usada, pois apresenta alto poder oxidativo frente a diversos compostos orgânicos, mesmo os relativamente estáveis como os modificadores de colunas capilares de sílica fundida. A oxidação e remoção das fases estacionárias foi conduzida a partir do contato da solução piranha com o interior da coluna. Foram preparados 5 mL de solução piranha na proporção de 3:1 (v/v) de H₂SO₄:H₂O₂ (ambos concentrados), em frasco de vidro contido em banho de gelo. O H₂O₂ foi adicionado gota a gota sobre o H₂SO₄, em acordo com as recomendações de segurança. Imediatamente após o preparo da solução piranha, esta foi injetada em segmentos de coluna de GC.

3.7 PREPARO DO DISPOSITIVO DE *IN-TUBE* SPME

Os procedimentos de preparação dos dispositivos de *in-tube* SPME avaliados estão apresentados na TABELA 6 e tiveram como base trabalhos da literatura, que modificam capilares de sílica fundida ou dispositivos de vidro com diferentes materiais, incluindo polímeros condutores^[10], nanotubos de carbono^[179–181] e proteínas^[182–186], uma vez que o desenvolvimento de dispositivos de *in-tube* SPME com fase extratora baseada em hidrogel ainda não foi relatado na literatura. Os dispositivos de *in-tube* SPME foram obtidos a partir de segmentos de coluna de GC ou capilares de sílica fundida, com diferentes diâmetros internos e comprimentos. No caso dos segmentos de coluna de GC, foi necessário remover a fase estacionária com solução piranha. Os procedimentos empregaram diversas etapas, cujas condições são descritas de forma resumida na TABELA 6, como (i) ativação da sílica fundida; (ii) silanização, (iii) introdução de grupo aldeído; (iv) introdução da dispersão polimérica contendo o agente de reticulação; (v) remoção do excesso da dispersão polimérica com fluxo de N₂; e (vi) reticulação e secagem do hidrogel em estufa.

Para o acoplamento do dispositivo na válvula de injeção manual do LC, as extremidades dos capilares foram envolvidas com aproximadamente 2 cm de tubo PEEK (d.i.: 0,76 mm, Supelco®), a fim de dar suporte às conexões de aço inox (d.i.: 1,6 mm, Supelco®), como mostra a fotografia da FIGURA 8.

FIGURA 8 – FOTOGRAFIA DE DISPOSITIVO DE EXTRAÇÃO PREPARADO A PARTIR DE CAPILAR DE SÍLICA FUNDIDA COM COMPRIMENTO DE 40 cm, DIÂMETRO INTERNO DE 0,53 mm E FASE SORVENTE BASEADA EM HIDROGEL DE PVOH.



FONTE: A autora.

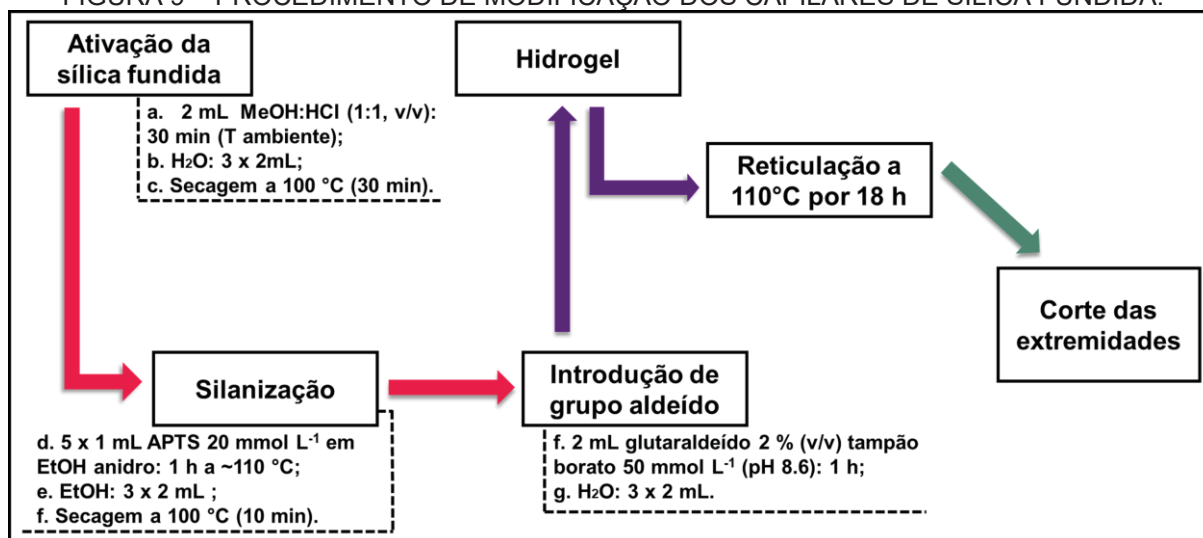
TABELA 6 – PROCEDIMENTOS AVALIADOS PARA A OBTENÇÃO DOS DISPOSITIVOS DE *in-tube* SPME.

Método	Capilar	Dimensões / mm	Remoção da FE	Ativação da sílica	Silanização	Introdução de grupo aldeído	Hidrogel (agente de reticulação)	N ₂	Estufa
1	Coluna de GC OV-624	L: 300 d.i.:0,25	-	-	-	-	PVOH com pectina (ác. cítrico 10 % (m/m))	-	70°C 48 h
2	Coluna de GC CP-SIL 8 CB	L: 300 d.i.:0,32	Solução piranha	NaOH 1 mol L ⁻¹	-	-	PVOH (glutaraldeído 10 % (m/m))	-	70°C 48 h
3	Coluna de GC CP-SIL 8 CB	L: 300 d.i.:0,32	Solução piranha	NaOH 1 mol L ⁻¹	-	-	PVOH com pectina (ác. cítrico 10 % (m/m))	-	70°C 48 h
4	Sílica fundida	L: 250 d.i.:0,075	-	NaOH 1 mol L ⁻¹	APTS 2 % (v/v) em acetona (15 min, T _{amb})	Glutaraldeído 2,5 % (v/v) em tampão borato 50 mmol L ⁻¹ , pH 9 (1 h)	PVOH (glutaraldeído 10 % (m/m))	✓	70°C 48 h
5	Sílica fundida	L: 250 d.i.:0,075	-	NaOH 1 mol L ⁻¹	APTS 2 % (v/v) em acetona (15 min, T _{amb})	Glutaraldeído 2,5 % (v/v) em tampão borato 50 mmol L ⁻¹ , pH 9 (1 h)	PVOH com pectina (ác. cítrico 10 % (m/m))	✓	70°C 48 h
6	Sílica fundida	L: 250 d.i.:0,075	-	NaOH 1 mol L ⁻¹	-	Glutaraldeído 2,5 % (v/v) em tampão borato 50 mmol L ⁻¹ , pH 9 (1 h)	PVOH (glutaraldeído 10 % (m/m))	✓	70°C 48 h
7	Sílica fundida	L: 250 d.i.:0,53	-	MeOH:HCl (1:1, v/v)	APTS 20 mmol L ⁻¹ em EtOH anidro (1 h, 110°C)	Glutaraldeído 2,5 % (v/v) em tampão borato 50 mmol L ⁻¹ , pH 8,6 (1 h)	PVOH (glutaraldeído 10 % (m/m))	✓	70°C 96 h
8	Sílica fundida	L: 250 d.i.:0,53	-	MeOH:HCl (1:1, v/v)	APTS 20 mmol L ⁻¹ em EtOH anidro (1 h, 110°C)	Glutaraldeído 2,5 % (v/v) em tampão borato 50 mmol L ⁻¹ , pH 8,6 (1 h)	PVOH com pectina (ác. cítrico 10 % (m/m))	✓	70°C 96 h
9	Sílica fundida	L: 250 d.i.:0,53	-	MeOH:HCl (1:1, v/v)	APTS 20 mmol L ⁻¹ em EtOH anidro (1 h, 110°C)	Glutaraldeído 2,5 % (v/v) em tampão borato 50 mmol L ⁻¹ , pH 8,6 (1 h)	PVOH com pectina (ác. cítrico 10 % (m/m))	-	70°C 96 h
10	Sílica fundida	L: 400 d.i.:0,53	-	MeOH:HCl (1:1, v/v)	APTS 20 mmol L ⁻¹ em EtOH anidro (1 h, 110°C)	Glutaraldeído 2,5 % (v/v) em tampão borato 50 mmol L ⁻¹ , pH 8,6 (1 h)	PVOH (glutaraldeído 7,5 % (m/m))	-	110°C 18 h
11	Sílica fundida	L: 400 d.i.:0,53	-	MeOH:HCl (1:1, v/v)	APTS 20 mmol L ⁻¹ em EtOH anidro (1 h, 110°C)	Glutaraldeído 2,5 % (v/v) em tampão borato 50 mmol L ⁻¹ , pH 8,6 (1 h)	PVOH com pectina (ác. cítrico 10 % (m/m))	-	110°C 18 h
12	Sílica fundida	L: 400 d.i.:0,53	-	MeOH:HCl (1:1, v/v)	APTS 20 mmol L ⁻¹ em EtOH anidro (1 h, 110°C)	Glutaraldeído 2,5 % (v/v) em tampão borato 50 mmol L ⁻¹ , pH 8,6 (1 h)	PVOH com alginato (ác. cítrico 10 % (m/m))	-	110°C 18 h

FE: fase estacionária; OV-624: 6 % cianopropil-fenil e 94 % dimetil polisiloxano (Ohio Valley); CP-SIL 8 CB: 5% fenil e 95% dimetil polisiloxano (Agilent J&W);

A partir dos procedimentos descritos na TABELA 6, foram obtidos 18 dispositivos para *in-tube* SPME, dos quais 7 se mostraram funcionais frente à utilização no sistema cromatográfico. Os 3 dispositivos com melhor desempenho (métodos 10 a 12) foram preparados a partir de segmentos de 40 cm de capilar de sílica fundida com diâmetro interno de 0,53 mm. A FIGURA 9 apresenta o fluxograma do procedimento empregado para esses dispositivos com melhor desempenho.

FIGURA 9 – PROCEDIMENTO DE MODIFICAÇÃO DOS CAPILARES DE SÍLICA FUNDIDA.



Para a modificação da superfície interna dos capilares, primeiramente foi realizada a ativação da sílica fundida, de um capilar com 46 cm de comprimento, com uma solução de metanol e ácido clorídrico (1:1, v/v), que permaneceu em contato com a superfície interna do capilar por 30 min, em temperatura ambiente (~25°C). Em seguida, o capilar foi lavado com água ultrapura e seco em estufa à 100°C por 30 min. Na segunda etapa, a silanização foi promovida por meio do contato da solução de APTS 2 % (v/v) em etanol anidro (seco com peneira molecular) com o capilar por 1 h e a 110°C. O excesso de APTS foi removido permeando-se etanol anidro através do capilar, após a reação. A introdução do grupo aldeído ocorreu na terceira etapa, a partir do contato de solução de glutaraldeído 2 % (v/v) em tampão borato 50 mmol L⁻¹ (pH 8,6) por 1 h, em temperatura ambiente. Após a reação com glutaraldeído, os capilares foram lavados internamente com água ultrapura, sendo essa a etapa imediatamente anterior à percolação das dispersões poliméricas.

Avaliou-se a modificação dos capilares funcionalizados com três hidrogéis como fase extratora: PVOH reticulado com glutaraldeído, PVOH com alginato reticulado com ácido cítrico, e PVOH com pectina reticulado com ácido cítrico. O preparo dessas fases teve como base trabalhos da literatura^[153,156,160].

O hidrogel de PVOH foi obtido a partir de uma dispersão de PVOH 15 % (m/m) em água ultrapura, a qual foi diluída com o mesmo solvente para obter concentração final de 7,5 % (m/m). A dispersão foi agitada por 30 min a ~35°C, após esse período, adicionou-se um volume de glutaraldeído equivalente a 7,5 % (m/m) da massa total do polímero à solução polimérica diluída (7,5 %, m/m) sob agitação magnética por 30 min e sem aquecimento. Por fim, a mistura de PVOH 7,5 % (m/m) e glutaraldeído foi injetada nos capilares de sílica fundida com o auxílio de uma seringa e um segmento de mangueira de silicone. A reticulação e secagem do hidrogel de PVOH foi realizada em estufa a 110°C por 18 h. Por fim, as extremidades dos capilares foram cortadas para o comprimento final de 40 cm.

Os hidrogéis de PVOH com biopolímero (alginato ou pectina) foram preparados de forma semelhante à descrita anteriormente: primeiramente, preparou-se uma dispersão de PVOH com um dos biopolímeros, na proporção de 1:1 (m/m), a partir das dispersões de PVOH 15 % (m/m) e pectina 2 % (m/m) ou alginato 2 % (m/m) em água ultrapura, sob agitação magnética por 30 min a ~35°C. Após esse período, adicionou-se uma quantidade de ácido cítrico, correspondente a 10 % (m/m) da massa total dos polímeros, a qual foi solubilizada sob agitação por mais 30 min sem aquecimento. Após essa solubilização, a dispersão resultante foi injetada nos capilares de sílica fundida. Para a reticulação e secagem dos géis de PVOH com biopolímero, os dispositivos foram deixados em estufa a 110°C por 18 h com as extremidades abertas. Após esse período, cortou-se as extremidades dos capilares (3 cm de cada lado) e o comprimento foi ajustado para 40 cm.

3.8 PROCEDIMENTO DE *IN-TUBE* SPME PARA AMOSTRA DE ÁGUA ULTRAPURA ENRIQUECIDA COM OS ANALITOS

Para a extração das amostras de água ultrapura enriquecida com o analitos por *in-tube* SPME, primeiramente, os dispositivos de extração (capilares não modificados ou modificados) foram alocados no injetor manual (Rheodyne), substituindo a alça de amostragem (*loop*). Antes da extração, a fase sorvente foi condicionada com a fase móvel (55 % ACN e 45 % água, v/v) por 60 min. Para as

amostras de água ultrapura enriquecidas com os analitos e o padrão interno, injetou-se manualmente 10 alíquotas de 250 μL de amostra, na válvula de injeção manual (válvula de seis pórticos) na posição carregar (*load*), com auxílio de microseringa de mesmo volume. Na décima injeção, a amostra permaneceu em contato com a fase extratora por 5 min. Na etapa de limpeza, injetou-se manualmente 250 μL de água ultrapura, previamente à etapa de dessorção dos analitos, que consistiu na mudança da posição da válvula de injeção de carregar (*load*) para injetar (*inject*). Assim, os analitos extraídos pela fase sorvente de hidrogel foram encaminhados para a etapa de separação cromatográfica em coluna analítica e detecção espectrofotométrica, com o auxílio do fluxo da fase móvel.

3.9 ISOTERMAS DE SORÇÃO

Foram obtidas isotermas de sorção *in situ* e *in operando* a partir do contato entre soluções de cada analito e o dispositivo de extração da *in-tube* SPME. Isso foi realizado para avaliar as diferentes afinidades e capacidades de extração para cada composto estudado. Inicialmente, foram obtidas curvas analíticas ($n = 3$) pela injeção de 20 μL (volume da alça de amostragem) de amostras de água ultrapura enriquecidas com os analitos, no intervalo de concentração de 20 a 4000 ng mL^{-1} , e análise cromatográfica com detecção espectrofotométrica, que permitiram a quantificação dos compostos sorvidos.

As isotermas de sorção foram obtidas ($n = 3$) a partir da extração de amostras de água ultrapura enriquecidas com cada analito individualmente na faixa de concentração de 100 a 4000 ng mL^{-1} . As extrações foram realizadas em temperatura constante de 25°C, empregando-se a injeção de uma alíquota de 120 μL da amostra (solução aquosa), a qual permaneceu em contato com a fase sorvente por 2,5 min. Após esse período, realizou-se a etapa de limpeza com 120 μL de água ultrapura, seguida pela dessorção do analito com a fase móvel (55 %ACN e 45 % água, v/v) pela mudança da posição da válvula de injeção manual de carregar para injetar. A quantidade de matéria adsorvida (n_{ads}) na fase sorvente foi determinada a partir da concentração obtida pela equação da reta (curva analítica) e do volume de amostra.

3.10 CARACTERIZAÇÃO DO GEL DE PVOH

Para a caracterização das amostras, preparou-se hidrogéis de PVOH a partir de dispersões de PVOH 15 % (m/m) diluída com água ultrapura para concentração final de 7,5 % (m/m). Os géis foram reticulados com glutaraldeído 7,5 % (m/m), em relação à massa de PVOH, e obtidos em formato de disco utilizando-se béqueres de 10 mL como molde. Para a reticulação e secagem, as misturas foram tratadas termicamente em estufa a 60°C por 14 h.

Para a análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV), o hidrogel de PVOH foi deixado em água ultrapura por 1 h para intumescer, em seguida foi congelado com nitrogênio líquido, fraturado e liofilizado. Todas as amostras foram metalizadas com ouro por 20 s e corrente de 40 mA, em metalizador da marca Bal-Tec, modelo SCD 050. As imagens de MEV foram adquiridas em um microscópio da Tescan, modelo MIRA3 FEG-SEM, operando com voltagem de 10 ou 20 kV e distância de trabalho de 15 a 18 mm. As imagens foram obtidas por detector de elétrons secundários (SE).

A isoterma de fisissorção de N₂ foi obtida em equipamento Quantachrome, modelo NOVA 2000e, à -196,15°C (77 K). O gel de PVOH liofilizado foi degasado a 40°C, durante 6 h, e a isoterma foi obtida com pressão relativa de N₂ de 0 a 1.

Determinou-se o grau de intumescimento (GI%) (n = 3) do gel de PVOH em água ultrapura e em fase móvel (55 % ACN e 45% água, v/v). Os géis na forma de discos foram imersos em 30 mL de solvente (água ultrapura ou fase móvel) e durante 300 min as massas dos géis intumescidos foram mensuradas. Os intervalos de tempo empregados entre cada pesagem foram de 10 min (de 0 a 90 min) e 30 min (de 90 a 300 min). Antes de cada pesagem, secou-se os géis superficialmente com papel absorvente para a remoção do excesso de solvente.

Os ensaios de perda de solvente (n = 3) foram conduzidos em temperatura ambiente (20°C). Os hidrogéis de PVOH foram hidratados em 30 mL de água ultrapura ou fase móvel (55 % ACN e 45% água, v/v) por 60 min e secos superficialmente com papel absorvente, para a remoção do excesso de solvente. A massa dos géis foi medida durante 300 min com intervalos de 10 min (de 0 a 90 min) e 30 min (de 90 a 300 min).

O grau de intumescimento e a perda de solvente foram determinados de acordo com a Equação (2) mostrada a seguir:

$$\text{GI ou Perda de solvente (\%)} = (M_t - M_0) / M_0 \quad (2)$$

Na Equação (2), M_t corresponde a massa do hidrogel intumescido em um tempo t e M_0 refere-se a massa do hidrogel seco.

As análises de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foram realizadas em um espectrômetro Agilent, modelo Cary 630 FTIR, no modo de ATR (*Attenuated total reflectance*). Os brancos de transmitância foram feitos com ar atmosférico. Os espectros foram coletados entre 400 e 4000 cm^{-1} , com 64 scans por amostra e resolução de 4 cm^{-1} . PVOH puro foi analisado na forma de pó e o gel de PVOH reticulado com glutaraldeído foi analisado na forma de disco, ambos posicionados diretamente na janela do equipamento.

3.11 FÓRMULA INFANTIL

As amostras de fórmula infantil foram preparadas de acordo com as informações da embalagem, pela dissolução de 4,6 g do sólido em 30 g de água ultrapura. Para o enriquecimento das amostras, volumes apropriados das soluções de trabalho dos analitos (20 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e do padrão interno (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) foram transferidos para um balão volumétrico e o metanol foi evaporado com fluxo de ar. A solução da fórmula infantil foi adicionada ao balão volumétrico contendo os analitos e o padrão interno, resultando em concentração final de 100 ng mL^{-1} . Os analitos permaneceram em contato com a fórmula infantil por no mínimo 10 min, antes da extração.

3.11.1 Precipitação de proteínas

Avaliou-se a precipitação das proteínas presentes na fórmula infantil pelo ajuste de pH ou pela adição de solvente orgânico. Para a precipitação por meio da alteração do pH, este foi ajustado para o ponto isoelétrico da caseína (pH igual a 4,6^[70,71,187]), a partir da adição de algumas gotas de ácido clorídrico 1 mol L^{-1} , em uma alíquota da fórmula infantil enriquecida com os analitos em concentração de 100 ng mL^{-1} . Em seguida, a amostra foi centrifugada a 4400 rpm por 20 min, o sobrenadante foi removido e injetado 10 vezes no dispositivo de extração, de acordo com o item 3.8.

Ainda com relação ao pH da amostra, estudou-se a possibilidade de diminuir as interações dos analitos com as proteínas e os lipídeos e aumentar a sua solubilidade na fase aquosa por meio da desprotonação dos compostos de interesse. Foi avaliado o ajuste de pH da amostra para 10, 11, 12, 13 ou 14 pela adição de NaOH 1 mol L⁻¹ em alíquotas de 3 mL da fórmula infantil. Após o ajuste do pH, as amostras foram centrifugadas a 13400 rpm por 15 min, havendo a formação de três fases, sendo uma fase líquida entre duas fases sólidas (uma no fundo do eppendorf e a outra na interface líquido-gás). A fase líquida foi separada e teve o pH ajustado para 6,5 com HCl 1 mol L⁻¹ previamente a injeção no dispositivo de extração, de acordo com o item 3.8.

Na precipitação por adição de solvente orgânico, foram estudados acetonitrila (ACN), metanol (MeOH), etanol (EtOH), isopropanol (ISO), tetraidrofurano (THF), acetato de etila (ACE) e diclorometano (DCM), nas proporções de 1:1 e 1:2 (leite:solvente, v/v). Também foram avaliadas três misturas de solventes, ACN:THF (1:1, v/v), THF:ACE (1:1, v/v) e THF:DCM (1:1, v/v), na proporção 1:2 (leite:solvente, v/v). Nesses experimentos, após a adição do solvente orgânico à 3 mL de amostra, as misturas foram homogeneizadas em vórtex por 2 min e centrifugadas a 4400 rpm por 20 min. Além disso, para algumas amostras foram empregadas etapas de filtração, com filtro seringa de politetrafluoroetileno (PTFE) de 0,22 µm, e/ou evaporação do solvente orgânico a 60°C. As amostras evaporadas foram reconstituídas para 3 mL com água ultrapura.

Com a seleção do solvente orgânico para a precipitação de proteínas, empregou-se um planejamento fatorial 2³, com triplicata do ponto central, para determinar as condições do procedimento de precipitação de proteínas a ser empregado. Os parâmetros avaliados no planejamento foram a proporção de leite:ACN (v/v), a concentração de NaCl adicionada no extrato e o tempo de agitação em vórtex, cujos níveis são descritos na TABELA 7.

TABELA 7 – CONDIÇÕES AVALIADAS NO PLANEJAMENTO 2³ COM PONTO CENTRAL.

Variável	Níveis		
	-1	0	+1
Proporção de leite:ACN (v/v)	1:1	1:1,5	1:2
Concentração de NaCl / %	0	5	10
Tempo de agitação / s	30	75	120

O procedimento selecionado empregou 3 mL de amostra de leite humano aos quais foi adicionado ACN na proporção 1:1 (leite:ACN, v/v), em tubo Falcon. A mistura foi agitada em vórtex por 30 s, seguido de centrifugação a 4400 rpm por 5 min. O sobrenadante foi separado e evaporado até aproximadamente 1,5 mL com fluxo de N₂. Então, o extrato foi avolumado para 2 mL, em balão volumétrico, com água ultrapura, e encaminhado para extração por *in-tube* SPME com determinação por LC-UV

3.11.2 Otimização da *in-tube* SPME

Os parâmetros volume de amostra injetado, número de injeções da amostra no capilar, solvente e tempo de dessorção foram estudados de forma univariada. Para o volume de amostra injetado, avaliou-se as quantidades de 150 µL e 250 µL. Foram estudadas 6, 8 e 10 injeções de 150 µL de amostra no dispositivo de *in-tube* SPME. Os solventes de dessorção avaliados foram água ultrapura, ACN, fase móvel (55 % ACN e 45% água, v/v) e MeOH, sendo que para cada solvente empregou-se os tempos de dessorção de 0, 2,5 e 5 min.

Com as condições selecionadas, o método de *in-tube* SPME estabelecido consistiu na injeção de 10 alíquotas de 150 µL de amostra com a válvula de injeção na posição carregar (*load*), seguido da injeção de 250 µL de água ultrapura, a qual permaneceu em contato com a fase extratora por 5 min. Após, mudou-se a posição da válvula de injeção da posição carregar (*load*) para a posição injetar (*inject*), e os analitos dessorvidos foram encaminhados para a separação cromatográfica seguida de detecção espectrofotométrica na região do UV.

3.12 ENRIQUECIMENTO DAS AMOSTRAS BRANCO DE LEITE HUMANO

Para o enriquecimento das amostras branco de leite humano, volumes apropriados das soluções de trabalho dos analitos (20 µg mL⁻¹) e do padrão interno (50 µg mL⁻¹) foram transferidos para tubos Falcon e o metanol foi evaporado a 60°C por 10 min. Aos tubos contendo os analitos e o padrão interno foram adicionados 3 mL da amostra branco de leite humano. Os analitos permaneceram em contato com a amostra branco por no mínimo 10 min^[81], antes da extração.

3.13 PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS EM LEITE HUMANO

O procedimento de precipitação de proteínas descrito no item 3.11.1 precisou ser alterado para o leite humano, devido à presença de maior efeito matriz em relação à fórmula infantil. Avaliou-se a proporção de ACN:Leite (1:1, 2:1, v/v), a adição ou não de sais (150 mg de NaCl + 150 mg MgSO₄) e etapa de remoção dos lipídeos com hexano com base em trabalhos da literatura^[79,87]. As condições estudadas são descritas na TABELA 8.

TABELA 8 – CONDIÇÕES AVALIADAS PARA PRECIPITAÇÃO E PROTEÍNAS E REMOÇÃO DE LIPÍDEOS DE AMOSTRAS DE LEITE HUMANO

Ensaio	Proporção ACN:Leite/ v/v	Adição de 150 mg de NaCl + 150 mg MgSO ₄	Etapa de remoção de lipídeos com hexano
1	2:1	-	-
2	1:1	✓	-
3	2:1	✓	-
4	1:1	-	✓
5	2:1	-	✓

O procedimento do ensaio 1 empregou 3 mL de amostra de leite humano aos quais foi adicionado ACN na proporção 2:1 (ACN:leite, v/v), em tubo Falcon, essa mistura foi agitada em vórtex por 30 s. A mistura foi centrifugada a 4400 rpm por 10 min, seguido de agitação manual por 3 s (para a desestabilização do gel formado), e novamente foi centrifugada a 4400 rpm por 10 min. O sobrenadante foi separado e completamente evaporado com fluxo de N₂. Reconstituiu-se o extrato com 2 mL de água ultrapura, o qual foi encaminhado para extração por *in-tube* SPME e determinação por LC-UV, de acordo com o método descrito no item 3.11.2.

Os ensaios 2 e 3 foram conduzidos de forma similar ao ensaio 1, distinguindo-se apenas na etapa inicial, na qual além da adição de ACN (proporções 1:1 ou 1:2, v/v) foram adicionados 150 mg de NaCl e 150 mg de MgSO₄. As etapas seguintes foram exatamente iguais às do ensaio 1. No caso dos ensaios 4 e 5, foi adicionada uma etapa para a remoção de lipídeos com hexano. Para isso, após a adição da ACN (proporções 1:1 ou 1:2, v/v), foi adicionado um volume de hexano igual à soma dos volumes da amostra e de ACN, ou seja, adicionou-se 6 e 9 mL de hexano para as proporções de 1:1 e 2:1 (ACN:leite, v/v), respectivamente. Essa mistura foi agitada em vórtex por 30 s e centrifugada a 4400 rpm por 10 min. A fase menos densa foi descartada e repetiu-se a etapa de limpeza com hexano, novamente a fase menos densa foi descartada. Por fim, evaporou-se completamente

a fase mais densa com fluxo de N₂ e o extrato foi reconstituído com 2 mL de água ultrapura e encaminhado para a *in-tube* SPME e análise por LC-UV.

O procedimento de precipitação de proteínas utilizado no ensaio 2 foi o selecionado para a continuação dos estudos, que incluem a avaliação dos parâmetros analíticos e a aplicação do método para amostras reais de leite humano.

3.14 PARÂMETROS ANALÍTICOS

Os parâmetros analíticos estabilidade dos padrões analíticos, linearidade, limite inferior de quantificação (LLOQ – *Lower Limit of Quantification*), limite de detecção (LOD – *Limit of Detection*), exatidão e precisão intra-dia e inter-dia e efeito memória, foram estudados com base no Guia de Validação de Métodos Bioanalíticos da Agência Europeia de Medicina^[188]. Para a determinação dos parâmetros analíticos, empregou-se amostra branco de leite humano enriquecida com os parabenos e o padrão interno.

3.14.1 Estabilidade das soluções padrão

A estabilidade das soluções padrão foi avaliada a partir da análise cromatográfica, nas condições de compromisso, de soluções diluídas na fase móvel (55 % ACN e 45 % H₂O, v/v) com concentração final de 1 µg mL⁻¹. Essas diluições foram obtidas partindo-se de uma solução estoque de concentração intermediária de 20 µg mL⁻¹ em metanol, cujo solvente foi evaporado e os compostos de interesse reconstituídos com a fase móvel. A estabilidade dos padrões foi avaliada durante um período de nove meses.

3.14.2 Linearidade, LLOQ e LOD

Curvas analíticas para cada parabeno foram obtidas em quintuplicata (n = 5), para isso, amostras branco foram enriquecidas com 8 níveis de concentração, com intervalo de 10 a 300 ng mL⁻¹. As amostras enriquecidas foram agitadas em vórtex por 10 s e deixadas em repouso por 10 min antes do início do processamento da amostra^[81], que contemplou as etapas de precipitação de proteínas, extração por *in-tube* SPME e separação cromatográfica com detecção espectrofotométrica na região do UV. Os valores das áreas dos picos cromatográficos de cada analito foram utilizados em conjunto com seus respectivos valores de concentração para obter a regressão linear.

O LLOQ foi determinado como a menor concentração do analito na amostra quantificável com desvio-padrão relativo (RSD – *relative standard deviation*) de até 20 % e exatidão entre 80 % e 120 %. O LOD foi obtido pela equação $LOD = (s_a \times 3) / b$, na qual s_a é o desvio padrão do intercepto da curva analítica e b é a inclinação da reta^[189].

3.14.3 Exatidão e precisão intra-dia e inter-dia

As exatidões e a precisões intra-dia e inter-dia foram obtidas pela análise ($n = 5$) de amostras branco de leite humano enriquecidas com 3 níveis de concentração: 45, 150 e 220 ng mL⁻¹. Para os ensaios intra-dia, as amostras foram processadas desde a etapa de precipitação de proteínas até a detecção em um mesmo dia. Os ensaios inter-dia foram divididos em 3 dias, sendo que as amostras foram processadas desde a etapa de precipitação de proteínas até a detecção em um mesmo dia.

3.14.4 Efeito memória

A existência de efeito memória na fase extratora foi avaliado por meio do processamento de 4 amostras branco de leite humano enriquecidas com 300 ng mL⁻¹, o nível de maior concentração da curva analítica. Após a extração e separação cromatográfica de cada amostra enriquecida com 300 ng mL⁻¹, realizou-se o mesmo procedimento para uma amostra branco de leite humano, processada previamente, a fim de avaliar a presença de efeito memória.

3.15 APLICAÇÃO EM AMOSTRA REAL DE LEITE HUMANO

As amostras reais de leite humano ($n = 6$) foram obtidas por meio do Banco de Leite Humano (BLH) do Complexo Hospital de Clínicas (CHC) da Universidade Federal do Paraná (UFPR), localizado em Curitiba-PR. Este projeto foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisas do Setor de Saúde da UFPR e do CHC/UFPR, cujos pareceres são apresentados nos ANEXOS 1 e 2.

Primeiramente, o BLH fez uma pré-seleção das doadoras com base na constância de doação, a seguir as doadoras foram contactadas por telefone pelos pesquisadores deste trabalho para esclarecer o objetivo da pesquisa e convidar as doadoras a doar 15 mL de leite humano para a pesquisa. Devido à pandemia de Covid-19, as amostras necessitaram ser extraídas pelas doadoras nas suas

residências, sem a presença dos pesquisadores ou das enfermeiras do BLH. Dessa forma, o BLH levou às residências das doadoras o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE acompanhado do frasco e instruções para a coleta. Após 7 dias da entrega do material, o BLH voltou à residência das doadoras para buscar as amostras e o TCLE assinado pelas doadoras.

Para a coleta das amostras, as doadoras foram instruídas a seguir as recomendações do BLH. Resumidamente, a ordenha do leite pôde ser realizada de forma manual ou com bomba de extração. Solicitou-se que as doadoras utilizassem os cabelos presos, de preferência com touca, e máscara ou lenço cobrindo o nariz e a boca, bem como fizessem a higienização das mãos com água e sabão e das mamas somente com água corrente. As primeiras gotas ou jatos de leite foram descartados, enquanto o leite coletado foi armazenado em frasco de vidro previamente descontaminado (fornecido pelos pesquisadores). As amostras foram armazenadas em congelador doméstico (-18°C) por 10 dias, até o momento da análise.

Para a determinação de parabenos nas amostras de leite humano, as amostras foram descongeladas em temperatura ambiente e homogeneizadas por agitação manual. As amostras foram analisadas de duas formas: sem enriquecimento e com enriquecimento de 25 ng mL^{-1} de parabenos, em ambas o padrão interno foi adicionado em concentração de 100 ng mL^{-1} , antes do processamento das amostras.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO

A separação cromatográfica dos compostos de interesse, metilparabeno (MPB), etilparabeno (EPB), propilparabeno (PPB), butilparabeno (BPB), triclosan (TCS) e bisfenol A (BPA), foi estudada empregando-se três colunas analíticas distintas, todas com fase estacionária de octadecilsilano (C18), sob diferentes condições cromatográficas (composição da fase móvel, vazão e modo de eluição). Os resultados a respeito da seleção das fases móvel e estacionária serão apresentados para o comprimento de onda de 280 nm, valor no qual todos os analitos apresentam absorção considerável.

Os cromatogramas obtidos foram avaliados em termos de fator de retenção (k), fator de seletividade (α), resolução (R_s), número de pratos teóricos (N) e fator de assimetria (A_s), com a finalidade de selecionar o método de separação com melhor desempenho cromatográfico. Os valores das larguras das bases dos picos (w_b) foram obtidos traçando-se tangentes aos pontos de inflexão e medindo-se a distância entre os pontos em que as tangentes cortam a linha de base. Foram estudados mais de 30 métodos cromatográficos, entretanto serão apresentados os resultados mais relevantes.

4.1.1 Coluna Eclipse XDB-C18

A primeira coluna estudada foi a Eclipse XDB-C18, que tem cobertura densa de ligantes organosilanos e duplo capeamento (*endcapping*), o que, segundo o fabricante, elimina a existência de interações indesejáveis entre compostos polares e a superfície da sílica, além de resultar em alta eficiência, tanto em pH intermediário quanto em pH baixo (próximo a 3,0). Quanto às condições cromatográficas, estudou-se a composição da fase móvel com acetonitrila (ACN) ou metanol (MeOH) como solvente orgânico, e água ultrapura ou acidificada com 1 % (v/v) de ácido acético glacial para corrigir a força da fase móvel.

A TABELA 9 apresenta os valores de cada parâmetro avaliado de acordo com o método cromatográfico empregado, para eluição com fase móvel composta por água e acetonitrila nos modos isocrático ou gradiente. Os valores de α e R_s são calculados para dois picos adjacentes, então para esses parâmetros, os valores de cada linha da tabela foram obtidos para os analitos das linhas correspondente e

subsequente. Por exemplo, o valor de α disposto na primeira linha do método 1, refere-se ao fator de separação para os picos do metilparabeno e do etilparabeno.

TABELA 9 – PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS OBTIDOS PARA ELUIÇÃO NOS MODOS ISOCRÁTICO (1 A 3) E GRADIENTE (4 A 6) COM FASE MÓVEL COMPOSTA POR ÁGUA E ACN.

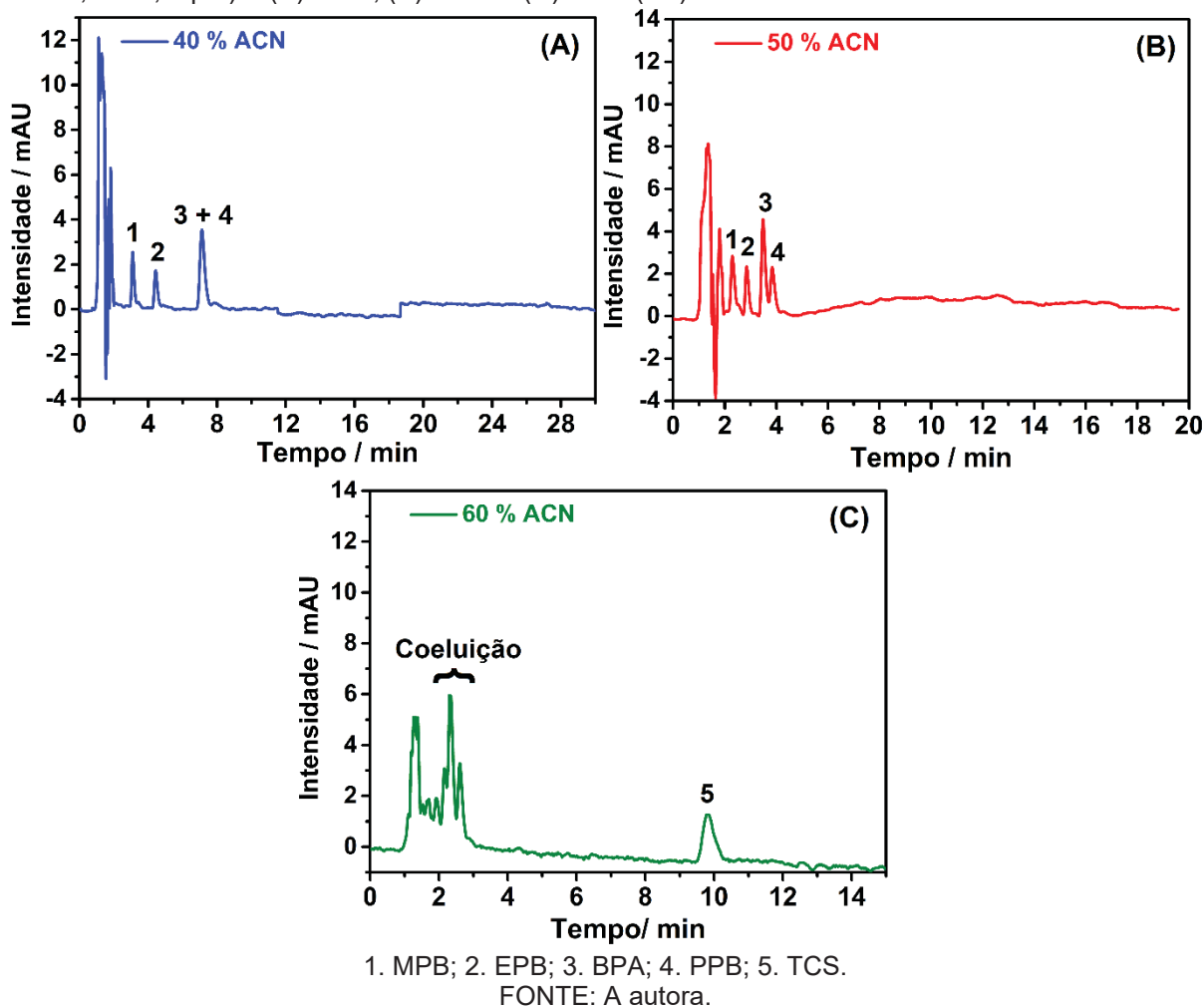
Analito	t_R /min	w_b /min	k	α	N	R_s	A_s
1. Isocrático: 40 % (v/v) ACN; 1 mL min⁻¹							
MPB	3,09	0,347	1,80	1,67	1274	3,23	1,71
EPB	4,43	0,480	3,00	1,81	1361	4,12	1,72
BPA	7,12	0,827	5,43	1,00	1187	0	-
PPB	7,12	0,827	5,43	-	1187	-	-
TCS	-	-	-	-	-	-	-
2. Isocrático: 50 % (v/v) ACN; 1 mL min⁻¹							
MPB	2,29	0,347	0,703	1,59	700,2	1,59	1,69
EPB	2,85	0,360	1,12	1,42	1005	1,71	1,82
BPA	3,48	0,373	1,58	1,17	1390	0,900	-
PPB	3,84	0,427	1,85	-	1296	-	-
TCS	-	-	-	-	-	-	-
3. Isocrático: 60 % (v/v) ACN; 1 mL min⁻¹							
MPB	1,92	0,200	0,426	1,42	1474	1,27	-
EPB	2,16	0,173	0,604	1,21	2484	0,765	-
BPA	2,33	0,280	0,733	1,28	1111	0,979	-
PPB	2,61	0,293	0,941	6,68	1270	13,7	-
TCS	9,81	0,760	6,29	-	2668	-	1,64
4. Gradiente: 40 % (v/v) ACN (0 – 5 min), 50 % (v/v) ACN (7 min), 60 % (v/v) ACN (10 – 20 min); 1 mL min⁻¹							
MPB	3,00	0,413	1,56	1,71	842,9	2,99	1,98
EPB	4,29	0,453	2,66	1,82	1435	4,15	1,96
BPA	6,84	0,773	4,83	1,00	1252	0	-
PPB	6,84	0,773	4,83	3,00	1252	14,1	-
TCS	18,2	0,827	14,5	-	7710	-	1,28
5. Gradiente: 35 % (v/v) ACN (0 – 1 min), 50 % (v/v) ACN (1 - 6 min), 70 % (v/v) ACN (7 – 15 min); 1 mL min⁻¹							
MPB	3,15	0,320	1,57	1,35	1547	2,17	2,12
EPB	3,83	0,307	2,12	1,32	2491	2,60	2,43
BPA	4,67	0,293	2,80	1,07	4049	0,731	-
PPB	4,92	0,400	3,01	2,89	2421	16,1	-
TCS	11,9	0,467	8,71	-	10416	-	2,00
6. Gradiente: 35 % (v/v) ACN (0 – 7 min), 65 % (v/v) ACN (8 – 20 min); 0,8 mL min⁻¹ (0 – 7 min), 1 mL min⁻¹ (8 – 20 min)							
MPB	3,63	0,400	2,09	1,83	1315	4,61	2,12
EPB	5,65	0,480	3,82	1,99	2219	8,05	1,89
PPB	10,1	0,627	7,61	1,08	4162	0,945	1,62
BPA	10,8	0,840	8,20	1,79	2645	12,0	1,71
TCS	18,4	0,427	14,7	-	29800	-	1,91

MPB: metilparabeno; EPB: etilparabeno; BPA: bisfenol A; PPB: propilparabeno; e TCS: triclosan.

Os métodos cromatográficos de 1 a 3 foram conduzidos com eluição isocrática, diferenciando-se um do outro na proporção de acetonitrila presente na

fase móvel, a qual variou de 40 a 60 % (v/v). Ao observar a TABELA 9, verifica-se uma diminuição na retenção dos analitos (menores t_R e k) e da largura dos picos (menores w_b), em função do aumento da proporção de acetonitrila. Para colunas de fase reversa, quanto maior a quantidade de solvente orgânico na fase móvel, maior a capacidade da fase móvel para eluir o analitos da fase estacionária (força de eluição). Portanto, maiores proporções de acetonitrila levam à menor retenção dos analitos pela fase estacionária, e isso contribui para uma menor dispersão da banda cromatográfica. A FIGURA 10 mostra os cromatogramas obtidos no modo isocrático para (A) 40 %, (B) 50 % e (C) 60 % (v/v) de ACN.

FIGURA 10 – CROMATOGRAMAS OBTIDOS PARA OS ANALITOS (MPB, EPB, BPA, PPB E TCS - $1 \mu\text{g mL}^{-1}$) APÓS SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA EM COLUNA ECLIPSE XDB-C18 ($150 \times 4,6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$) E (A) 40 %, (B) 50 % E (C) 60 % (v/v) DE ACN COM VAZÃO DE 1 mL min^{-1} .



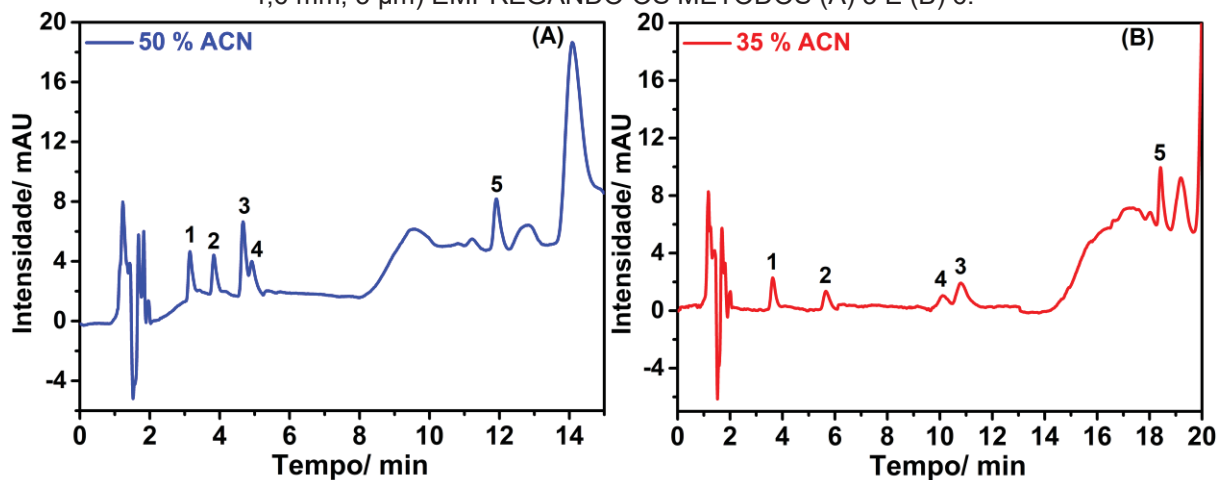
Pode-se observar na FIGURA 10A (40 % (v/v) de ACN) a total sobreposição dos picos do BPA e do PPB, que leva a valores de α e R_s iguais a 1,00 e 0, respectivamente. Com 50 % (v/v) de ACN (FIGURA 10B), ocorre o início da

separação desses dois analitos, gerando valores maiores de α (1,17) e R_s (0,90), mas ainda insuficientes para a completa separação dos picos, tanto para fins qualitativos quanto quantitativos. Além disso, as condições de 40 e 50 % (v/v) de acetonitrila não foram capazes de promover a eluição do triclosan, que possui o maior coeficiente de partição octanol/água (4,76^[33]) dentre os analitos e, por consequência, grande afinidade pela fase estacionária apolar. Somente ao empregar 60 % (v/v) de acetonitrila (FIGURA 10C) ocorre a eluição do TCS da coluna em um tempo adequado (menor que 20 min), no entanto, nessa condição há coeluição dos parabenos e do bisfenol A, havendo necessidade de utilizar a eluição por gradiente.

Ao contrapor os resultados dos métodos 4 e 5 (TABELA 9), é possível observar a importância da largura dos picos cromatográficos sobre o número de pratos teóricos. Por exemplo, o triclosan teve um aumento de 35 % no valor de N para o método 5 devido ao valor de w_b cair quase pela metade em relação ao método 4, mesmo havendo uma redução de mais de 6 minutos no seu t_R . A largura dos picos também tem influência sobre a resolução, como no método 5 foi utilizada uma proporção de acetonitrila maior para a separação do BPA e do PPB, houve menor dispersão da banda cromatográfica desses analitos, o que resultou em maior R_s , em relação ao método 4. Ainda, a maior força cromatográfica empregada no método 5 diminuiu a retenção do BPA (k), contribuindo para o aumento de R_s .

O uso de 35 % de ACN por um período maior no método 6 resultou em maior resolução (TABELA 9), em relação ao método 5. Isso é consequência do aumento da retenção (k) dos parabenos e do BPA, uma vez que α permaneceu praticamente constante e N apresenta menor peso sobre a R_s . Além disso, houve inversão na ordem de eluição do BPA e do PPB, como é visto na FIGURA 11, que traz os cromatogramas obtidos ao empregar (A) 50 % (v/v) de ACN (método 5) ou (B) 35 % (v/v) de ACN (método 6).

FIGURA 11 – CROMATOGRAMAS OBTIDOS PARA OS ANALITOS (MPB, EPB, BPA, PPB E TCS - $1 \mu\text{g mL}^{-1}$) APÓS SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA EM COLUNA ECLIPSE XDB-C18 ($150 \times 4,6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$) EMPREGANDO OS MÉTODOS (A) 5 E (B) 6.



1. MPB; 2. EPB; 3. BPA; 4. PPB; 5. TCS. (A) GRADIENTE: 35 % (v/v) ACN (0 – 1 min), 50 % (v/v) ACN (1 - 6 min), 70 % (v/v) ACN (7 – 15 min); (B) GRADIENTE: 35 % (v/v) ACN (0 – 7 min), 65 % (v/v) ACN (8 – 20 min).

FONTE: A autora.

Nota-se na FIGURA 11, que a redução da quantidade de acetonitrila (de 50 % para 35 % (v/v)), e consequentemente da força cromatográfica da fase móvel, levou à redução da intensidade dos picos do PPB e do BPA. Desta forma, o ganho de resolução, mencionado anteriormente, não compensou a perda de detectabilidade acarretada pelo alargamento dos picos. Portanto, o ajuste da força da fase móvel não foi suficiente para separar o BPA e o PPB, deste modo, outros parâmetros precisaram ser avaliados como a seletividade das fases estacionária e móvel e a simetria dos picos.

Para os métodos de 1 a 6, os fatores de assimetria (TABELA 9) apresentaram valores superiores a 1,5 para a maioria dos picos. Segundo Neto^[190], em testes com soluções padrões em condições controladas, o valor de A_s deve ficar entre 0,9 e 1,1, sendo aceito até 1,2 para colunas novas. Todavia, em condições de trabalho, valores de até 1,5 ainda são admitidos. A presença de espécies neutras e ionizadas na amostra pode gerar picos assimétricos, devido a essas espécies terem interação maior ou menor com a fase estacionária, respectivamente^[191]. Portanto, a fim de reduzir a assimetria dos picos e, assim, contribuir para o aumento da resolução entre os picos do BPA e do PPB, avaliou-se a substituição da água em pH próximo a 6 por água acidificada com 1 % (v/v) de ácido acético para favorecer a forma neutra dos analitos. Os resultados obtidos são apresentados na TABELA 10.

TABELA 10 – PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS OBTIDOS AOS EMPREGAR FASE MÓVEL COMPOSTA POR ÁGUA E ACN (MÉTODO 7) OU ÁGUA ACIDIFICADA E ACN (MÉTODO 8).

Analito	t_R/min	w_b/min	k	α	N	R_s	A_s
7. Gradiente: 35 % (v/v) ACN (0 – 1 min), 52 % (v/v) ACN (1 – 6 min), 75 % (v/v) ACN (7 – 20 min); 0,8 mL min ⁻¹ (0 – 5 min), 0,9 mL min ⁻¹ (6 – 8 min), 1 mL min ⁻¹ (9 – 20 min)							
MPB	3,85	0,400	1,45	1,33	1485	1,81	3,07
EPB	4,60	0,427	1,92	1,27	1860	2,18	2,51
BPA	5,41	0,320	2,44	1,08	4579	0,863	-
PPB	5,71	0,360	2,63	2,42	4020	15,1	-
TCS	11,6	0,413	6,35		12514		2,05
8. Gradiente: 35 % (v/v) ACN (0 – 1 min), 52 % (v/v) ACN (1 – 6 min), 75 % (v/v) ACN (7 – 20 min); 0,8 mL min ⁻¹ (0 – 5 min), 0,9 mL min ⁻¹ (6 – 8 min), 1 mL min ⁻¹ (9 – 20 min)							
MPB	3,92	0,160	1,30	1,34	9604	3,50	0,515
EPB	4,67	0,267	1,73	1,28	4900	2,84	1,25
PPB	5,48	0,307	2,21	1,08	5109	1,10	-
BPA	5,77	0,227	2,38	2,43	10380	23,0	-
TCS	11,6	0,280	5,80		27461		1,71

MPB: metilparabeno; EPB: etilparabeno; BPA: bisfenol A; PPB: propilparabeno; e TCS: triclosan.

Na TABELA 10 é observado uma redução nos valores de A_s ao empregar água acidificada ao invés de água em pH próximo a 6. A comparação entre os dois métodos mostra que houve, efetivamente, melhora na simetria dos picos, com destaque para o EPB. Além disso, os valores de w_b foram menores para a água acidificada, resultando no aumento da resolução. Para os picos do BPA e do PPB a R_s obtida foi igual 1,10, a qual permite a identificação dos compostos de interesse, porém não é suficiente para a quantificação, que requer valores de $R_s \geq 1,5$ ^[192].

O metanol foi estudado como alternativa à acetonitrila na tentativa de resolver os picos do BPA e do PPB. A TABELA 11 traz os parâmetros cromatográficos obtidos para eluição isocrática ou por gradiente com fase móvel de água e metanol.

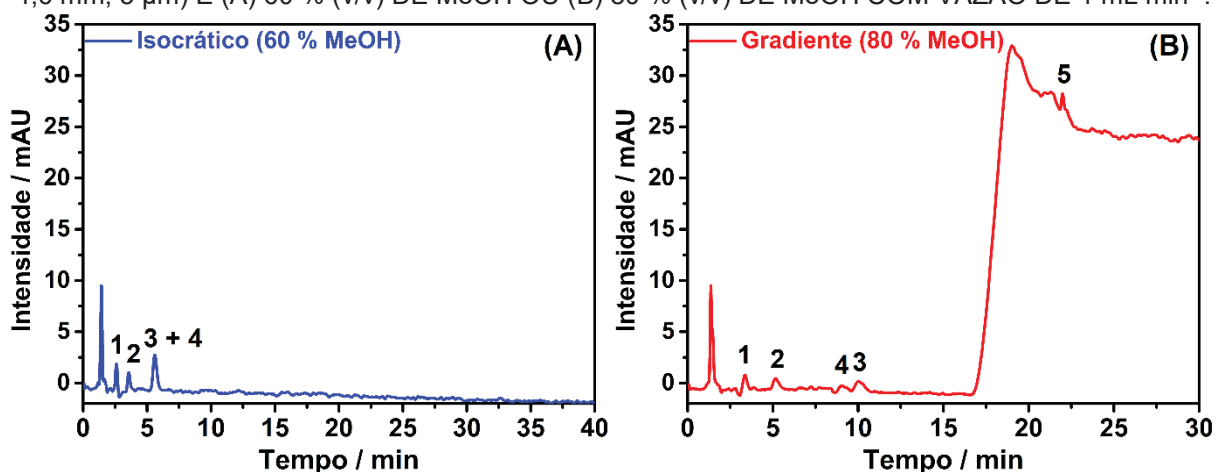
TABELA 11 – PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS OBTIDOS PARA FASE MÓVEL COMPOSTA POR ÁGUA E METANOL NOS MODOS ISOCRÁTICO (MÉTODO 9) E GRADIENTE (MÉTODO 10).

Analito	t_R/min	w_b/min	k	α	N	R_s	A_s
9. Isocrático: 60 % (v/v) MeOH; 1 mL min ⁻¹							
MPB	2,60	0,453	0,822	1,82	526,3	1,69	0,763
EPB	3,56	0,680	1,50	1,96	438,5	2,49	2,41
BPA	5,60	0,960	2,92	1,00	544,4	0	-
PPB	5,60	0,960	2,92	-	544,4	-	-
TCS	-	-	-				-
10. Gradiente: 53 % (v/v) MeOH (0 – 13 min), 80 % (v/v) MeOH (16 – 25 min); 1 mL min ⁻¹							
MPB	3,47	0,773	1,55	1,94	321,5	2,81	1,87
EPB	5,45	0,640	3,01	1,96	1162	5,53	1,23
BPA	9,40	0,787	5,91	1,15	2284	1,24	2,15
PPB	10,6	1,12	6,78	2,10	1429,56	14,0	2,72
TCS	20,8	0,333	14,2		61982		1,74

MPB: metilparabeno; EPB: etilparabeno; BPA: bisfenol A; PPB: propilparabeno; e TCS: triclosan.

A TABELA 11 mostra um alargamento significativo dos picos ao empregar o metanol. Por exemplo, no modo isocrático com 60 % de fase orgânica, os valores de w_b obtidos para o metanol são 2 ou 3 vezes maiores que os obtidos para a acetonitrila (TABELA 9), nas mesmas condições cromatográficas. A menor força de eluição do metanol é responsável por esse alargamento, que resultou em perda de detectabilidade (em termos de redução da altura de pico), com relação à acetonitrila. Os cromatogramas obtidos na separação dos analitos pelos métodos descritos na TABELA 11 são mostrados na FIGURA 12

FIGURA 12 – CROMATOGRAMAS OBTIDOS PARA OS ANALITOS (MPB, EPB, BPA, PPB E TCS - $1 \mu\text{g mL}^{-1}$) APÓS SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA EM COLUNA ECLIPSE XDB-C18 ($150 \times 4,6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$) E (A) 60 % (v/v) DE MeOH OU (B) 80 % (v/v) DE MeOH COM VAZÃO DE 1 mL min^{-1} .



1. MPB; 2. EPB; 3. BPA; 4. PPB; 5. TCS. (A) ISOCRÁTICO: 60 % (v/v) MeOH; (B) GRADIENTE: 53 % (v/v) MeOH (0 – 13 min), 80 % (v/v) MeOH (16 – 25 min)
FONTE: A autora.

Além da perda de detectabilidade, é possível observar na FIGURA 12 que proporções de metanol inferiores a 70 % (v/v) não foram capazes de promover a eluição do triclosan, que é o composto mais retido. A FIGURA 12B mostra o perfil do cromatograma obtido ao utilizar eluição por gradiente com metanol, onde destacam-se a baixa intensidade dos picos cromatográficos e a alta elevação da linha de base, que podem comprometer a identificação do pico do TCS.

Na FIGURA 12B observa-se a inversão na ordem do BPA e PPB quando eluídos com 52 % (v/v) de metanol (na maioria das condições estudadas o BPA apresentou t_R menor que o PPB), fenômeno também observado ao empregar 35 % de acetonitrila (FIGURA 11). Para a acetonitrila, com 40 % de fase orgânica esses dois compostos coeluem completamente, acima desse valor o BPA elui da coluna antes do PPB, enquanto abaixo de 40 % (v/v) o BPA elui após o PPB. No caso do

metanol, o BPA e PPB coeluem completamente utilizando 60 % (v/v) de fase orgânica (FIGURA 12A), da mesma forma, acima desse valor o BPA elui da coluna antes do PPB, enquanto abaixo de 60 % (v/v) o BPA elui após o PPB.

O coeficiente de partição octanol/água ($\log K_{o/w}$) do BPA é maior que o do PPB, de forma que se a retenção do soluto fosse dependente apenas da sua hidrofobicidade, o BPA deveria de fato eluir após o PPB. No entanto, quando são empregadas proporções maiores de solventes orgânicos (> 40 % (v/v) para a acetonitrila; > 60 % (v/v) para o metanol), o BPA elui antes do PPB. Esse fato demonstra uma menor seletividade da fase estacionária, de caráter apolar, pelo BPA, mesmo este composto possuindo $\log K_{o/w}$ maior que o PPB.

A coluna Eclipse XDB-C18 não foi capaz de resolver os picos do BPA e do PPB. Além disso, nos cromatogramas obtidos foi observado a presença de interferentes no final da corrida, os quais não puderam ser removidos mesmo sob proporções altas de solvente orgânico na fase móvel. Desta forma, outras colunas cromatográficas foram avaliadas.

4.1.2 Coluna Pursuit 3 C18

A segunda coluna estudada foi a Pursuit 3, que também possui alta densidade de fase ligada e capeamento. Para essa coluna, apenas a acetonitrila foi estudada como solvente orgânico, enquanto o ajuste da força da fase móvel foi realizado com água ou tampões fosfato (10 mmol L^{-1}) em pH 6 ou 3. As condições experimentais avaliadas englobaram: modo de eluição (isocrático ou gradiente), vazão e composição da fase móvel. A TABELA 12 traz os valores dos parâmetros cromatográficos obtidos após a separação dos analitos empregando fase móvel de água e acetonitrila, eluição por gradiente ou isocrática e diferentes vazões (constante ou gradiente de vazão).

TABELA 12 – PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS PARA OS MÉTODOS 11 A 16 COM FASE MÓVEL COMPOSTA POR ÁGUA E ACN, ELUIÇÃO POR GRADIENTE OU ISOCRÁTICA E DIFERENTES VAZÕES.

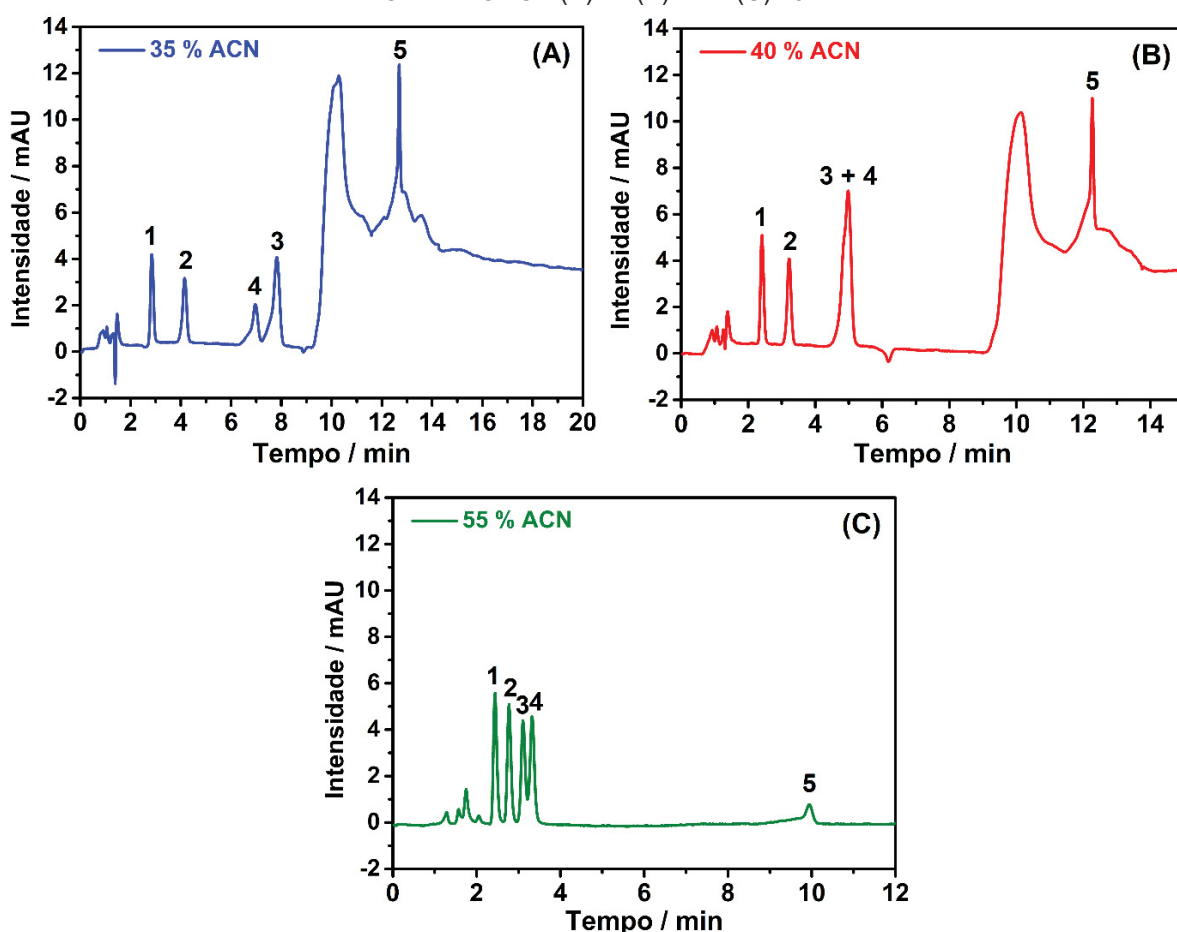
Analito	t_R /min	w_b /min	k	α	N	R_s	A_s
11. Gradiente: 35 % (v/v) ACN (0 – 7 min), 65 % (v/v) ACN (8 – 20 min); 0,8 mL min⁻¹ (0 – 7 min), 1 mL min⁻¹ (8 – 20 min)							
MPB	2,84	0,440	1,70	1,73	666,6	2,69	1,34
EPB	4,15	0,533	2,94	1,91	967,2	4,14	0,871
PPB	6,96	0,827	5,61	1,14	1134	1,00	0,505
BPA	7,81	0,880	6,42	1,72	1261	6,48	0,467
TCS	12,7	0,627	11,1		6564		1,30
12. Gradiente: 40 % (v/v) ACN (0 – 7 min), 65 % (v/v) ACN (8 – 20 min); 0,8 mL min⁻¹ (0 – 7 min), 1 mL min⁻¹ (8 – 20 min)							
MPB	2,41	0,307	1,62	1,54	990,9	2,26	1,26
EPB	3,21	0,400	2,49	1,77	1032	2,92	1,14
BPA	4,99	0,813	4,42	1,00	601,4	0	-
PPB	4,99	0,813	4,42	2,79	601,4	10,1	-
TCS	12,3	0,627	12,3		6130		0,309
13. Isocrático: 55 % (v/v) ACN; 0,6 mL min⁻¹ (0 – 4 min), 0,9 mL min⁻¹ (5 – 12 min)							
MPB	2,44	0,307	0,906	1,29	1013	1,09	1,25
EPB	2,77	0,307	1,17	1,22	1309	1,19	1,20
BPA	3,11	0,253	1,43	1,12	2406	0,744	-
PPB	3,32	0,320	1,59	4,25	1722	9,65	-
TCS	9,95	1,05	6,77		1427		-
14. Isocrático: 60 % (v/v) ACN; 1 mL min⁻¹							
MPB	1,36	0,147	0,924	1,22	1376	1,16	-
EPB	1,51	0,107	1,13	1,15	3192	1,00	-
PPB	1,63	0,133	1,30	1,13	2382	0,818	-
BPA	1,75	0,160	1,48	4,27	1907	7,34	-
TCS	5,15	0,767	6,28		721,1		-
15. Isocrático: 60 % (v/v) ACN; 0,8 mL min⁻¹							
MPB	1,72	0,173	0,720	1,26	1576	1,17	-
EPB	1,91	0,147	0,907	1,16	2704	1,05	-
BPA	2,05	0,133	1,05	1,14	3795	0,880	-
PPB	2,20	0,200	1,20	4,58	1936	8,94	-
TCS	6,49	0,760	5,49		1168		-
16. Isocrático: 60 % (v/v) ACN; 0,6 mL min⁻¹ (0 – 4 min), 1 mL min⁻¹ (5 – 12 min)							
MPB	2,31	0,240	0,713	1,26	1478	1,15	-
EPB	2,56	0,200	0,901	1,15	2621	0,967	-
PPB	2,75	0,187	1,04	1,14	3464	0,857	-
BPA	2,95	0,280	1,19	3,66	1772	9,81	-
TCS	7,20	0,587	4,35		2410		-

MPB: metilparabeno; EPB: etilparabeno; BPA: bisfenol A; PPB: propilparabeno; e TCS: triclosan.

A coluna Pursuit 3 C18 apresentou menor seletividade para os compostos estudados, em comparação com a primeira coluna avaliada, uma vez que houve menor retenção dos analitos (menores t_R e k). Isso é evidenciado, por exemplo, nos resultados do TCS, que apresentou t_R de 9,95 min, para 55 % (v/v) de acetonitrila e gradiente de vazão de 0,6 a 0,9 mL min⁻¹, na coluna Pursuit 3 C18. Enquanto na coluna Eclipse XDB-C18, o TCS possui t_R de 9,81 min para 60 (v/v) % de acetonitrila

e vazão de 1 mL min^{-1} . A separação dos compostos BPA e PPB na coluna Pursuit 3 C18 também apresentou dificuldades, como pode ser observado na TABELA 12, o maior valor de R_s encontrado para o BPA e o PPB foi igual a 1,00, para 35 % (v/v) de acetonitrila. Como mencionado anteriormente, uma R_s de 1,0 é suficiente para a identificação dos analitos, porém insuficiente para a quantificação. A FIGURA 13 traz os diferentes perfis cromatográficos obtidos ao empregar (A) 35 %, (B) 40 % e (C) 55 % (v/v) de acetonitrila, para separar o BPA e o PPB.

FIGURA 13 – CROMATOGRAMAS OBTIDOS PARA OS ANALITOS (MPB, EPB, BPA, PPB E TCS – $1 \mu\text{g mL}^{-1}$) APÓS SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA EM COLUNA PURSUIT 3 ($200 \times 3,0 \text{ mm}$, $3 \mu\text{m}$) PARA OS MÉTODOS (A) 11 (B) 12 E (C) 13.



1. MPB; 2. EPB; 3. BPA; 4. PPB; 5. TCS. (A) GRADIENTE: 35 % (v/v) ACN (0 – 7 min), 65 % (v/v) ACN (8 – 20 min); (B) GRADIENTE: 40 % (v/v) ACN (0 – 7 min), 65 % (v/v) ACN (8 – 20 min); (C) ISOCRÁTICO: 55 % (v/v) ACN. FONTE: A autora.

Na FIGURA 13 é observado uma mudança na ordem de eluição do BPA e do PPB, dependendo da proporção inicial de acetonitrila, como ocorreu na coluna Eclipse XDB-C18. Para 35 % (v/v) de acetonitrila, obteve-se a maior separação dos picos do BPA e do PPB, todavia, nessa condição houve alargamento pronunciado dos picos desses compostos, o que pode acarretar perda de detectabilidade. Ainda,

na FIGURA 13 destaca-se a assimetria obtida para o pico do TCS, seja em eluição por gradiente ou isocrática. O pico do TCS apresentou um *fronting* pronunciado, que foi agravado pelo uso de menores quantidades de acetonitrila na fase móvel.

O efeito da vazão sobre a separação cromatográfica foi avaliado através dos métodos 14 a 16. A vazão teve influência tanto no tempo de retenção dos compostos quanto na largura da base dos picos. O valor de w_b aumentou com a redução da vazão, uma vez que os solutos permanecem por um tempo maior em contato com a fase estacionária. Todavia, o uso de diferentes vazões não alterou o fator de seletividade ou aumentou a resolução. Para os métodos de 14 a 16 não foi calculado o fator de assimetria para nenhum analito, uma vez que os parabenos e o bisfenol A coeluíram parcialmente, enquanto o triclosan continuou apresentando um *fronting* pronunciado. A TABELA 13 traz os parâmetros cromatográficos obtidos para eluição por gradiente com fase móvel constituída por acetonitrila e água ou tampão fosfato 10 mmol L⁻¹ em pH 6 e pH 3.

A substituição da água da fase móvel por tampão fosfato teve como finalidade avaliar o efeito do tamponamento do sistema. Como os compostos estudados apresentam valores de pK_a entre 7,90 e 9,60^[33], tanto em água quanto nos tampões de pH 6 e 3, a forma neutra dos analitos deve prevalecer. Na TABELA 13, pode-se observar que o uso das soluções tampão (métodos 18 e 19) promoveu uma melhora na simetria dos picos. Entretanto, o tamponamento do sistema não teve influência sobre os demais parâmetros e os picos do BPA e do PPB não foram totalmente resolvidos, o que foi um desafio para as colunas avaliadas, até o momento. Portanto, a coluna Pursuit 3 C18 também não foi capaz de separar os compostos de interesse.

TABELA 13 – PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS OBTIDOS PARA ELUIÇÃO POR GRADIENTE COM FASE MÓVEL COMPOSTA POR ACETONITRILA E ÁGUA (MÉTODO 17) OU TAMPÃO FOSFATO 10 mmol L⁻¹ EM pH 6 (MÉTODO 18) E pH 3 (MÉTODO 19).

Analito	t _R /min	w _b /min	k	α	N	R _s	A _s
17. Gradiente: 56 % ACN (0 – 3,5 min), 70 % ACN (4,5 – 10 min); 0,5 mL min ⁻¹ (0 – 3,5 min), 0,9 mL min ⁻¹ (4,5 – 10 min)							
MPB	2,88	0,320	0,946	1,27	1296	1,17	1,54
EPB	3,25	0,320	1,20	1,20	1654	1,16	1,46
BPA	3,60	0,280	1,43	1,12	2645	0,826	-
PPB	3,85	0,333	1,60	2,51	2138	8,93	-
TCS	7,43	0,467	4,02		4052		0,256
18. Gradiente: 56 % ACN (0 – 3,5 min), 70 % ACN (4,5 – 10 min); 0,5 mL min ⁻¹ (0 – 3,5 min), 0,9 mL min ⁻¹ (4,5 – 10 min)							
MPB	2,91	0,307	0,627	1,34	1437	1,21	1,51
EPB	3,29	0,333	0,843	1,23	1562	1,13	1,17
BPA	3,64	0,280	1,07	1,14	2704	0,826	-
PPB	3,89	0,333	1,18	2,71	2183	9,31	-
TCS	7,49	0,440	3,19		4641		0,324
19. Gradiente: 56 % ACN (0 – 3,5 min), 70 % ACN (4,5 – 10 min); 0,5 mL min ⁻¹ (0 – 3,5 min), 0,9 mL min ⁻¹ (4,5 – 10 min)							
MPB	2,95	0,333	0,444	1,41	1250	1,14	1,29
EPB	3,32	0,320	0,627	1,28	1722	1,23	1,28
BPA	3,68	0,267	0,804	1,15	3047	0,818	-
PPB	3,92	0,320	0,927	3,11	2401	10,8	-
TCS	7,88	0,413	2,86		5815		0,367

MPB: metilparabeno; EPB: etilparabeno; BPA: bisfenol A; PPB: propilparabeno; e TCS: triclosan.

4.1.3 Coluna Synergi Hydro-RP

A última coluna estudada foi a Synergi Hydro-RP, que possui cobertura densa de ligantes e capeamento com grupamentos polares, aumentando assim a seletividade da fase estacionária para compostos polares. Além disso, a coluna Synergi Hydro-RP possui alto teor de carbono (19 %) em comparação com as colunas Zorbax Eclipse XDB (10 %) e Pursuit 3 C18 (12,9 %), o que resulta em maior retenção pelo processo em fase reversa.

Apenas a proporção de acetonitrila na fase móvel necessitou ser avaliada, uma vez que foi possível separar todos os analitos no modo de eluição por gradiente e ainda incluir o butilparabeno (BPB) como composto de interesse. Selecionou-se o dietilestilbestrol (DES) como padrão interno, o qual é um hormônio esteroideal sintético. A TABELA 14 traz os parâmetros cromatográficos obtidos para a condição selecionada.

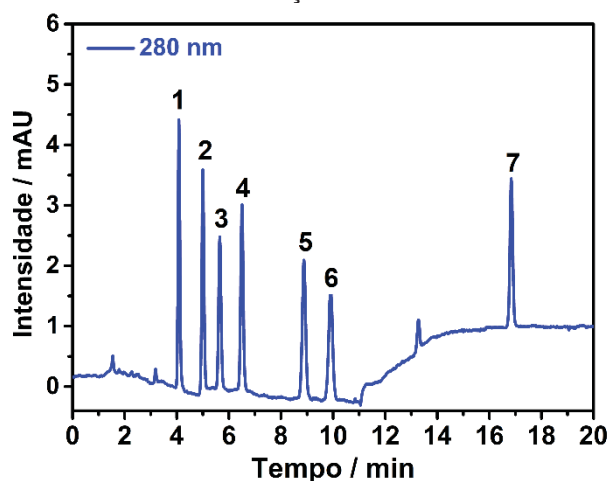
TABELA 14 – PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO SELECIONADO.

Analito	t_R /min	w_b /min	k	α	N	R_s	A_s
20. Gradiente: 55 % ACN (0 – 9 min), 75 % ACN (11 – 20 min); 1 mL min ⁻¹							
MPB	4,08	0,347	1,64	1,35	2216	2,76	1,42
EPB	5,00	0,320	2,20	1,19	3906	2,00	1,21
BPA	5,65	0,333	2,62	1,21	4602	2,56	1,09
PPB	6,51	0,333	3,17	1,48	6097	6,03	0,954
BPB	8,88	0,453	4,69	1,14	6139	2,23	1,01
DES	9,91	0,467	5,35	1,83	7210	16,5	0,959
TCS	16,8	0,373	9,80		32555		1,05

MPB: metilparabeno; EPB: etilparabeno; BPA: bisfenol A; PPB: propilparabeno; e TCS: triclosan.

Na condição de 55 % (v/v) de acetonitrila, o menor valor obtido para a R_s foi igual a 2,00 entre o EPB e o BPA (TABELA 14), enquanto para o BPA e PPB, cuja completa separação ainda não havia sido alcançada, esse valor foi de 2,56. Para proporções iniciais de acetonitrila de 60 ou 65 % (v/v), os picos do BPA e do PPB também são completamente resolvidos, entretanto acima de 60% o pico do EPB começa a coeluir com o BPA. Desta forma, foi necessário iniciar a separação cromatográfica com fase móvel de menor força cromatográfica, neste caso com 55 % (v/v) de acetonitrila. O triclosan demorou quase 20 min para eluir da coluna com 60 % (v/v) de acetonitrila, além disso, nessa proporção há alargamento do pico desse analito. Por esses motivos o uso da eluição por gradiente com proporção final de acetonitrila de 75 % (v/v) foi necessária. A FIGURA 14 mostra o cromatograma obtido para a condição selecionada.

FIGURA 14 – CROMATOGRAMA OBTIDO PARA OS ANALITOS (MPB, EPB, BPA, PPB, BPB, TCS - 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$; E DES - 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) APÓS SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA EM COLUNA SYNERGI HYDRO-RP NA CONDIÇÃO DE COMPROMISSO.



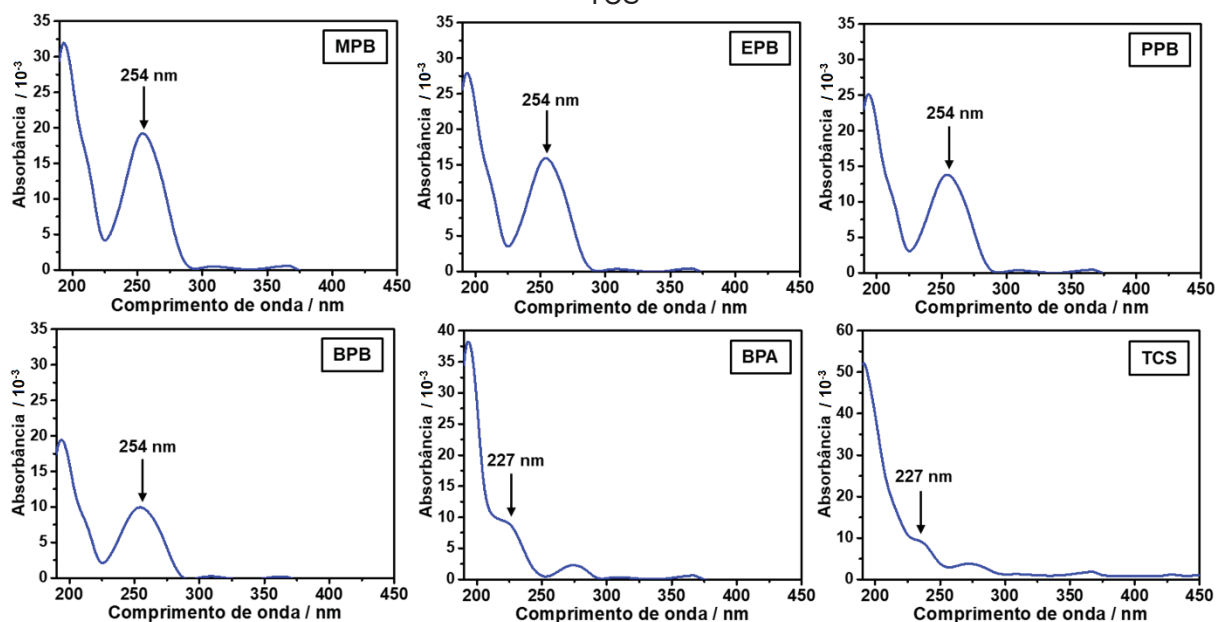
GRADIENTE: 55 % (v/v) DE ACN (9 min); 55 A 75 % (v/v) DE ACN (9 A 11 min); 75 % (v/v) DE ACN (20 min); VAZÃO: 1 mL min⁻¹ E COMPRIMENTO DE ONDA DE 280 nm. 1. MPB; 2. EPB; 3. BPA; 4. PPB; 5. BPB; 6. DES; 7. TCS.

FONTE: A autora.

Como pode ser observado na FIGURA 14, o uso da coluna Synergi Hydro-RP permitiu a separação dos sete compostos (MPB, EPB, BPA, PPB, BPB, DES e TCS), resultando em picos estreitos, simétricos e resolvidos com tempo total de análise de 20 min. A proporção de 55 % (v/v) de acetonitrila aliada ao uso da coluna Synergi Hydro-RP permitiu a separação do BPA e PPB utilizando a técnica de LC-UV, que é uma técnica mais simples e de menor custo em comparação com o que é empregado pela literatura. Em trabalhos similares, para separar o BPA do PPB a literatura tem utilizado estratégias como a espectrometria de massas sequencial^[5,98] e/ou a cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC)^[6,24], sendo ambas técnicas de alto custo. Contudo, o uso de fases estacionárias com alto teor de carbono (> 17 %) foi uma característica em comum com os trabalhos da literatura que alcançaram a separação completa desses dois analitos^[6,24,193,194].

Os espectros de absorção de cada analito foram obtidos a fim de se determinar o comprimento de onda em que os compostos apresentam maior absorbância. A FIGURA 15 mostra os espectros de absorção na região do ultravioleta de cada analito.

FIGURA 15 – ESPECTROS DE ABSORÇÃO NO UV DOS ANALITOS MPB, EPB, PPB, BPB, BPA E TCS

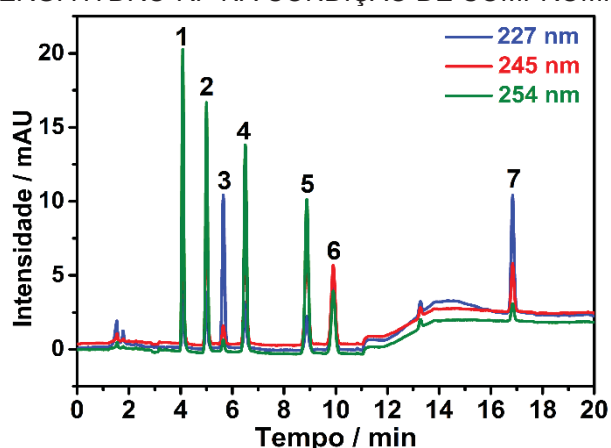


FONTE: A autora.

Para os quatros parabenos estudados, o máximo de absorbância foi observado no comprimento de onda de 254 nm, enquanto para o bisfenol A e o triclosan esse valor foi de 227 nm, como pode ser visto na FIGURA 15. O padrão

interno (dietilestilbestrol) apresentou maior absorbância para o comprimento de onda de 245 nm. Os trabalhos da literatura^[29,97,174–177] geralmente empregam valores de λ iguais a 226, 230, 250, 254 ou 280 nm para detecção dos analitos. A FIGURA 16 mostra os cromatogramas obtidos após separação cromatográfica na condição de compromisso, utilizando-se os comprimentos de onda de 227, 245 e 254 nm para a determinação dos analitos ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) e padrão interno ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) solubilizados na fase móvel (ACN 55 %, v/v).

FIGURA 16 – CROMATOGRAMAS OBTIDOS PARA OS ANALITOS (MPB, EPB, BPA, PPB, BPB, TCS - $1 \mu\text{g mL}^{-1}$; E DES - $10 \mu\text{g mL}^{-1}$) APÓS SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA EM COLUNA SYNERGI HYDRO-RP NA CONDIÇÃO DE COMPROMISSO.



GRADIENTE: 55 % (v/v) DE ACN (9 min); 55 A 75 % (v/v) DE ACN (9 A 11 min); 75 % (v/v) DE ACN (20 min); VAZÃO: 1 mL min^{-1} EM COMPRIMENTOS DE ONDA DE 227 nm, 245 nm e 254 nm.

1. MPB; 2. EPB; 3. BPA; 4. PPB; 5. BPB; 6. DES; 7. TCS.

FONTE: A autora.

A variação das respostas geradas por esses três valores de λ para cada analito é observada nos cromatogramas sobrepostos mostrados na FIGURA 16. Nota-se que os parabenos apresentam as melhores respostas dentre os analitos, enquanto o TCS possui a menor resposta (menor pico cromatográfico), devido ao alargamento do pico, causado por sua maior retenção na fase estacionária, e à baixa absorção na região do UV.

O método cromatográfico utilizado nas etapas seguintes deste trabalho empregou a coluna Synergi Hydro-RP (250 mm x 4,5 mm; $4 \mu\text{m}$) e gradiente de eluição com fase móvel a 1 mL min^{-1} , composta por 45 % (v/v) de água e 55 % (v/v) de acetonitrila durante os 9 min iniciais, seguindo com aumento para 75 % (v/v) de acetonitrila entre 9 e 11 min, e assim, permanecendo até o final da análise com tempo total de 20 min. Para a detecção dos analitos foram utilizados os

comprimentos de onda de 254 nm para os parabenos, 227 nm para o bisfenol A e o triclosan e 245 nm para o padrão interno.

4.2 DISPOSITIVOS DE *in-tube* SPME

Após o desenvolvimento do método cromatográfico para a análise dos parabenos, TCS e BPA, este trabalho foi pautado na obtenção de capilares de sílica fundida modificados com hidrogéis. Esses dispositivos foram empregados na extração dos compostos de interesse de água ultrapura, fórmula infantil e leite humano, cujos resultados serão discutidos nos próximos itens. Para o preparo dos dispositivos de *in-tube* SPME, foram estudadas as características e dimensões dos capilares, as etapas envolvidas na modificação da superfície interna dos capilares e a composição dos hidrogéis.

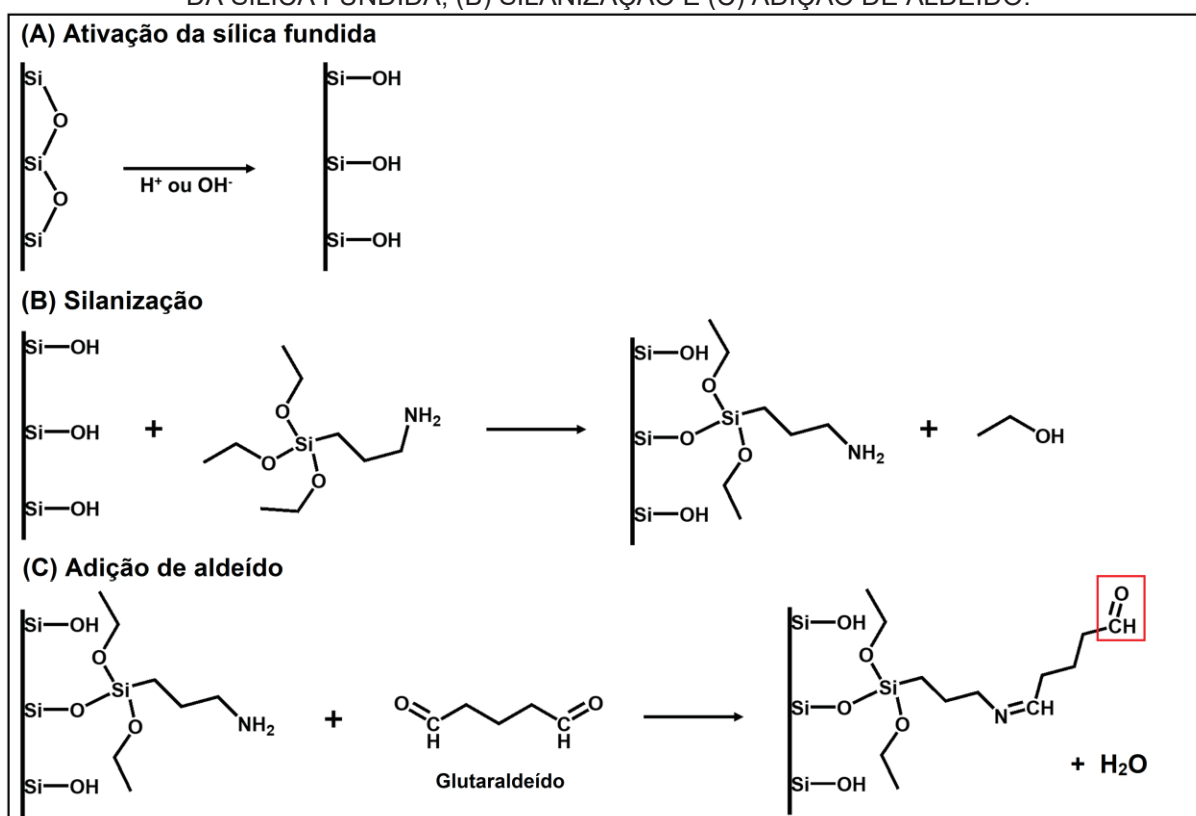
Primeiramente, avaliou-se a possibilidade de recobrir a superfície interna dos capilares sem a formação de ligação covalente entre os géis e a superfície, empregando colunas com ou sem fase estacionária (métodos 1 a 3, TABELA 6, item 3.7). Essa abordagem teve como base um trabalho anterior^[160], no qual discos de hidrogéis de PVOH ou PVOH com biopolímero (pectina ou alginato) foram obtidos a partir da formação de filmes de PVOH sobre uma superfície de vidro e empregados em SPE. Entretanto, os capilares contendo filmes de hidrogéis recobrimo a parede interna de colunas, com e sem fase estacionária, sem a formação de ligações covalentes, apresentaram expulsão da fase sorvente (géis) quando acoplados ao LC, devido à elevada pressão do sistema (~250 bar).

Desse modo, foi necessário acrescentar etapas de ativação da superfície interna de sílica fundida, silanização e adição de grupo aldeído, a fim de ligar covalentemente os géis ao capilar. Na FIGURA 17 é mostrada uma representação esquemática das etapas envolvidas na modificação da superfície interna do capilar para ligação com o hidrogel. A sílica fundida é composta, basicamente, por dióxido de silício (SiO_2) não cristalino com grupos siloxanos e silanóis na superfície^[195]. A etapa de ativação teve o intuito de aumentar a quantidade de grupos silanóis na superfície interna do capilar, os quais são mais reativos que os siloxanos em reações de silanização^[195]. Essa ativação (FIGURA 17A) é realizada pela hidrólise dos grupos siloxanos em meio ácido ou básico^[195].

Na silanização (FIGURA 17B), os grupos silanóis reagem com o agente silanizante, o qual forma ligação covalente com a superfície da sílica. Neste trabalho

foi utilizado o agente 3-aminopropil-trietoxissilano (APTS), que introduz um grupo funcional amino na extremidade (amina primária). Na terceira etapa, a superfície silanizada do capilar é modificada com glutaraldeído, que é um dialdeído. Um dos grupos aldeído do glutaraldeído reage covalentemente com o grupo amino do agente silanizante formando uma imina. O segundo grupo aldeído permanece livre como ponto de ancoragem para o hidrogel (FIGURA 17C), que ocorre a partir da formação de ligações covalentes com os grupos álcoois do gel formando grupos hemiacetais. Essa estratégia é amplamente empregada pela literatura para ligar covalentemente aminoácidos e/ou proteínas às superfícies de sílica fundida ou vidro, por exemplo, em aplicações que envolvem o desenvolvimento de fases extratoras mais seletivas^[182,183] e de biossensores^[185].

FIGURA 17 – REPRESENTAÇÃO DAS REAÇÕES ENVOLVIDAS NAS ETAPAS DE (A) ATIVAÇÃO DA SÍLICA FUNDIDA, (B) SILANIZAÇÃO E (C) ADIÇÃO DE ALDEÍDO.

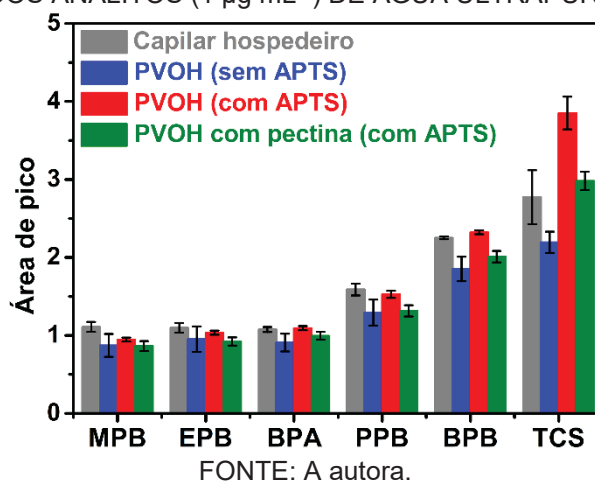


FONTE: A autora.

Em um primeiro momento, a ativação e modificação superficial foram conduzidas de acordo com alguns trabalhos de literatura^[180,181,183,196]. Avaliou-se a ativação dos capilares de sílica fundida com solução de NaOH 1 mol L⁻¹, silanização com APTS 2% (v/v) em acetona por 15 min em temperatura ambiente e reação com

glutaraldeído 2,5 % (v/v) em tampão borato (50 mmol L⁻¹, pH 9) (métodos 4 e 5, TABELA 6, item 473.7). Além disso, estudou-se a possibilidade de ligar o glutaraldeído à superfície do capilar sem a etapa prévia de silanização, segundo o trabalho de Higashiyama e colaboradores^[197] (método 6, TABELA 6, item 3.7). A partir dos procedimentos descritos anteriormente (métodos 4 a 6), foram preparados três dispositivos de extração com segmentos de capilares de sílica fundida de 25 cm e diâmetro interno de 0,075 mm. Os três capilares modificados e um capilar não modificado (contendo apenas SiO₂), denominado de capilar hospedeiro, foram utilizados para a extração de amostras de água ultrapura enriquecidas com 1 µg mL⁻¹ de cada analito. A FIGURA 18 traz os resultados obtidos após extração com cada capilar estudado, em termos de área média de pico (n = 3).

FIGURA 18 – GRÁFICO DAS ÁREAS DE PICOS (n = 3) EM FUNÇÃO DE CADA ANALITO OBTIDAS PARA OS CAPILARES HOSPEDEIRO E MODIFICADOS COM PVOH (MÉTODO 4), PVOH COM PECTINA (MÉTODO 5) E PVOH (SEM ETAPA DE SILANIZAÇÃO; MÉTODO 6) APÓS EXTRAÇÃO DOS ANALITOS (1 µg mL⁻¹) DE ÁGUA ULTRAPURA.



Pode-se observar na FIGURA 18 que os quatro capilares avaliados apresentaram comportamento semelhante, no sentido do favorecimento da extração dos compostos com maiores valores de coeficiente de partição octanol/água (BPB e TCS). Além disso, nota-se que a modificação dos capilares não acarretou ganho em termos de área de pico em relação ao capilar hospedeiro, com exceção do TCS.

O fato de o capilar hospedeiro apresentar eficiências de extração próximas às obtidas pelos capilares modificados com hidrogéis, pode ser um indicativo de baixa modificação da superfície do capilar. Desse modo, as etapas empregadas na modificação da superfície dos capilares foram ajustadas, a fim de favorecer as reações envolvidas e verificar se alterações no procedimento de modificação

favorecem a extração dos analitos. A primeira etapa envolve a limpeza e ativação dos grupos silanóis e é crítica para obter uma monocamada uniforme e reprodutível de silanos na etapa seguinte de silanização^[198]. Cras e colaboradores^[185] avaliaram diferentes métodos de limpeza e ativação de lâminas de vidro. Segundo os autores, dentre os procedimentos estudados, o tratamento com NaOH 1 mol L⁻¹ apresentou menor silanização em comparação com os outros métodos^[185]. No trabalho de Cras e colaboradores^[185], um dos métodos mais eficientes para a limpeza e ativação do vidro emprega uma mistura de metanol e ácido clorídrico concentrado na proporção de 1:1 (v/v). Com base nesse trabalho, substituiu-se a solução de NaOH 1 mol L⁻¹ por mistura de metanol:HCl 1:1 (v/v) para a limpeza e ativação dos capilares de sílica. O NaOH contribui para lixiviar sílicas, vidros e algumas cerâmicas^[185], isso ocorre porque o hidróxido reage com o silício da sílica. Tanto o hidróxido quanto o fluoreto reagem com sílica porque ambos os ânions são bases duras de Pearson e o silício na sílica é um ácido duro (NOX +4)^[199]. Por sua vez, ácidos contribuem para ativar a sílica via hidrólises dos siloxanos, mas sem lixiviar.

Empregou-se maior tempo de contato (1 h) e maior temperatura (110 °C) na etapa de silanização com APTS. O aumento da temperatura contribui para acelerar a reação e facilita a saída de metanol formado pela reação do grupo metóxi do APTS com o silanol. Além disso, a liberação do metanol para o meio (etanol) contribui para um aumento de entropia global. Na temperatura empregada, o metanol produzido passa para o estado gasoso, cuja entropia é maior do que moléculas no estado líquido^[200]. Para cada mol de APTS que modifica a superfície, podem ser liberados até três mol de metanol, o que também contribui para o aumento de entropia. Reações que são favorecidas por aumento de entropia tendem a serem favorecidas em maiores temperaturas, de acordo com a relação da energia livre de Gibbs ($\Delta G = \Delta H - T\Delta S$)^[200].

Devido ao diâmetro reduzido do capilar (0,075 mm), a obtenção dos capilares modificados e o seu acoplamento ao sistema cromatográfico apresentou dificuldades operacionais. Quando os dispositivos foram acoplados ao LC, a pressão do sistema dobrou de valor, atingindo 200 bar. Por esse motivo, os capilares com diâmetro interno de 0,075 mm foram substituídos por capilares com diâmetro interno de 0,53 mm, o que sanou o problema de elevação acentuada da pressão e proporcionou aumento da quantidade de fase extratora.

Todas as alterações descritas anteriormente foram realizadas (método 8, TABELA 6, item 3.7) e resultaram em maior eficiência de extração para o capilar modificado, em relação ao capilar hospedeiro. Ao comparar-se as áreas dos picos obtidos após a extração com os dispositivos hospedeiro e modificados, o capilar modificado apresentou aumento de cerca de 20 % na área dos picos dos analitos MPB, EPB e BPA, 30 % para o PPB e 25 % para o BPB.

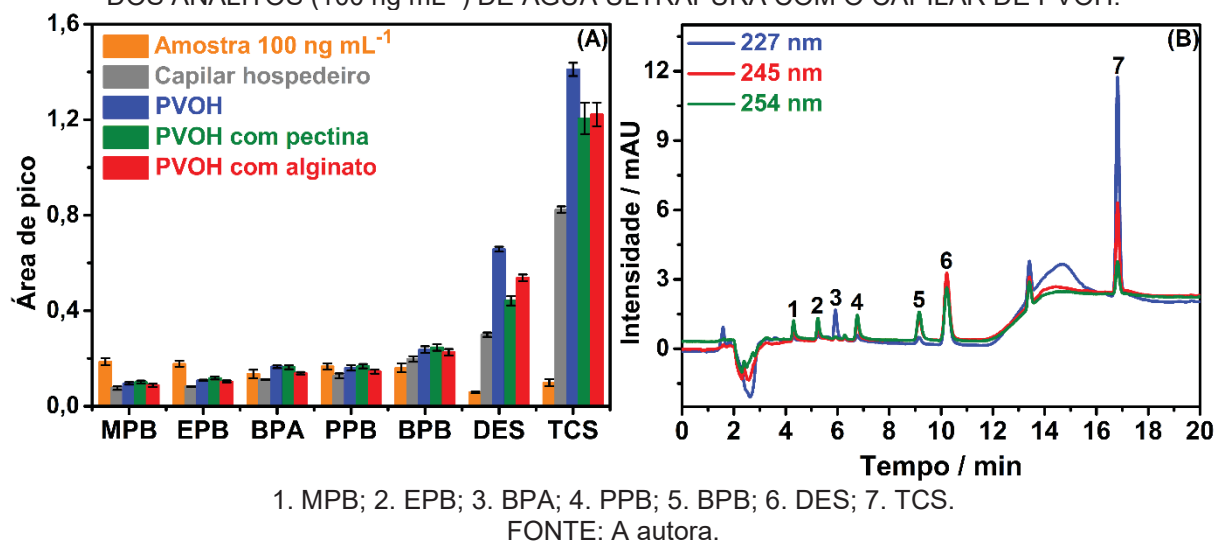
Problemas de entupimento dos dispositivos de extração pela fase sorvente foram frequentes, atingindo cerca de 70 % dos capilares modificados (inclusive o capilar preparado pelo método 7). A causa desses entupimentos pode ser atribuída ao acúmulo das dispersões poliméricas nas extremidades dos capilares que ocorre como consequência do aquecimento, este reduz a viscosidade e/ou causa expansão volumétrica da dispersão. Como resultado, na maior parte do comprimento do capilar é formado um filme de hidrogel recobrando a parede interna, mas as extremidades ficam obstruídas. Uma vez identificada a causa dos entupimentos, passou-se a cortar as extremidades dos capilares ao final da reticulação (~2 cm de cada lado). Isso praticamente eliminou os problemas de entupimento, além de permitir a exclusão da etapa de aplicação de fluxo de N₂, cujo intuito era remover o excesso de dispersão e evitar entupimento, mas mostrou-se uma etapa ineficaz.

Com as alterações no procedimento de modificação dos capilares, foi possível obter dispositivos funcionais de *in-tube* SPME com fases extratoras baseadas em hidrogéis de PVOH, PVOH com pectina e PVOH com alginato recobrando a superfície interna (métodos 9 a 12, TABELA 6, item 3.7). Os dispositivos preparados segundo os métodos 10, 11 e 12 foram obtidos com comprimento de 40 cm ao invés de 25 cm como o método 9, a fim de reduzir o tensionamento mecânico do capilar quando acoplado à válvula de injeção. Capilares de 25 cm apresentaram quebras devido a esse tensionamento, desse modo adotou-se os métodos 10 a 12 para a continuidade do estudo.

A eficiência desses dispositivos de *in-tube* SPME foi avaliada por meio da microextração e análise cromatográfica de amostras de água ultrapura (n = 5) enriquecidas com os analitos e o padrão interno na concentração de 100 ng mL⁻¹. Além dos dispositivos desenvolvidos, avaliou-se a eficiência de extração do capilar hospedeiro. A FIGURA 19 mostra: (A) gráfico de barras com as áreas de picos obtidas para cada analito após injeção no sistema cromatográfico (amostra) e extração com os diferentes dispositivos; e (B) cromatogramas obtidos após a

extração dos compostos de interesse (100 ng mL^{-1}) de água ultrapura utilizando o capilar de PVOH.

FIGURA 19 – (A) ÁREAS DE PICO ($n = 5$) OBTIDAS APÓS EXTRAÇÃO COM OS CAPILARES HOSPEDEIRO, DE PVOH (MÉTODO 10), PVOH COM PECTINA (MÉTODO 11) E PVOH COM ALGINATO (MÉTODO 12); (B) CROMATOGRAMA MÉDIO ($n = 5$) OBTIDO APÓS A EXTRAÇÃO DOS ANALITOS (100 ng mL^{-1}) DE ÁGUA ULTRAPURA COM O CAPILAR DE PVOH.



Antes da substituição da alça de amostragem pelos dispositivos de extração, foi realizada a análise cromatográfica ($n = 3$) da amostra empregada nas extrações, sem qualquer procedimento de enriquecimento/extração (denominada na FIGURA 19 por “amostra”). Observando-se a FIGURA 19A, pode-se destacar uma tendência exponencial de maior sorção dos analitos nas fases extratoras conforme o coeficiente de partição octanol/água aumenta, tanto para o dispositivo não modificado quanto para os modificados. Isso é evidenciado pelas áreas de picos do MPB e do EPB por exemplo, que apresentam os maiores valores de solubilidade em água iguais a 2500 mg L^{-1} e 885 mg L^{-1} e os menores valores de $\log K_{o/w}$, 1,96 e 2,47^[33], respectivamente, em relação às áreas de picos do DES e TCS, que apresentam os menores valores de solubilidade em água iguais a 12 mg L^{-1} e 10 mg L^{-1} e maiores valores de $\log K_{o/w}$, 5,07 e 4,76^[33], respectivamente.

A FIGURA 19A mostra que foram obtidas menores áreas de picos quando se emprega o capilar hospedeiro para extração, em relação aos capilares modificados. Ainda, observa-se diferenças entre os dispositivos modificados, principalmente nas áreas obtidas para o DES e o TCS, demonstrando que a modificação dos capilares de sílica fundida foi alcançada. Para todos os compostos, houve aumento da área de pico ao empregar os dispositivos modificados, o qual

variou de 20 % (BPB) a 120 % (DES) para o PVOH, 25 % (BPB) a 47 % (DES) para o PVOH com pectina e de 14 % (PPB) a 80 % (DES) para o PVOH com alginato. Os analitos cuja eficiência de extração sofreu maior influência da modificação dos capilares foram o DES seguido pelo TCS e o BPA.

Os hidrogéis estudados apresentam diversos grupos hidroxila em suas estruturas, desse modo seria esperado que as interações deste material por compostos de maior polaridade fossem predominantes em termos da quantidade sorvida. No entanto, foi observada uma maior afinidade das fases sorventes pelos compostos de menor polaridade, especialmente no caso do TCS, onde a extração com o capilar de PVOH propiciou um aumento na área de pico de 14 vezes em relação à injeção direta da amostra no sistema cromatográfico, como mostra a FIGURA 19B. Comparando-se a extração do MPB com a do TCS, que são os extremos em termos de $\log K_{o/w}$ dentre os analitos, o primeiro apresenta a menor eficiência de extração, com ~50 % da área da amostra, enquanto o TCS apresenta a maior, com ~1330 % de acréscimo de área em relação a amostra, para o capilar com PVOH.

Os hidrogéis foram utilizados como fases sorventes devido à presença de diversos grupos hidroxilas na estrutura, o que poderia favorecer a interação desses sorventes com analitos de maior polaridade, como mencionado. Os três géis estudados foram capazes de extrair os parabenos mais polares, no entanto a alta eficiência de extração para os analitos mais apolares mostrou-se mais pronunciada. Apesar de não intuitivo, a interação do PVOH com analitos apolares está de acordo com o estudo reportado por Baptista e colaboradores^[201]. Os autores demonstraram que a sinvastatina (molécula pouco polar) tem maior interação com as cadeias carbônicas do PVOH, de modo que os grupos hidroxilas tendem a se afastar das moléculas do soluto e interagir com o meio aquoso, o que sugere que o PVOH apresenta comportamento anfifílico.

Se a extração for pensada apenas em termos da interação analito-fase sorvente seria esperado extrações mais eficiências para os compostos mais polares. Neste sentido, a extração de um composto orgânico de determinada matriz depende da sua afinidade pela fase sorvente, que pode ser regida por diferentes tipos de interações como van der Waals, ligações de hidrogênio e até mesmo interações eletrostáticas. Contudo, outro fator importante são as interações do analito com a matriz, que o faz ser mais ou menos solúvel na amostra. Quando a matriz é aquosa,

os compostos mais polares têm maior afinidade pela matriz, dificultando a sua extração principalmente por fases sorventes de caráter mais apolar. A alta eficiência de extração para o TCS pode ser uma consequência do efeito solvofóbico (comum em cromatografia de fase reversa), ou seja, o TCS mesmo não apresentando uma expressiva afinidade pelos géis estudados, possui afinidade ainda menor pela água, fazendo com que o TCS tenha preferência pela fase sorvente ao invés da amostra.

A TABELA 15 mostra os valores médios ($n = 5$) das áreas de pico, a estimativa do desvio padrão, o RSD, os valores de F calculado (F_{calc}) por meio da análise de variância (ANOVA) de fator único (95 % de confiança), e a diferença mínima significativa (DMS) do teste t-student para cada analito de acordo com o dispositivo de extração empregado.

TABELA 15 – MÉDIA ARITMÉTICA, ESTIMATIVA DO DESVIO PADRÃO, DESVIO PADRÃO RELATIVO, F_{calc} E DIFERENÇA MÍNIMA SIGNIFICATIVA PARA AS ÁREAS DE PICOS DOS ANALITOS (100 ng mL⁻¹) APÓS EXTRAÇÃO.

Composto	Capilar	Média ¹ / 10 ⁻²	Desvio Padrão ² / 10 ⁻²	RSD / %	F _{calc} (ANOVA) ³	DMS
MPB	Hospedeiro	7,6	0,7	9,7	14,44	0,0086
	PVOH	9,6	0,6	5,9		
	PVOH com pectina	10,1	0,6	6,1		
	PVOH com alginato	8,8	0,6	7,4		
EPB	Hospedeiro	8,2	0,2	2,9	65,50	0,0055
	PVOH	11,8	0,6	5,2		
	PVOH com pectina	10,8	0,3	2,6		
	PVOH com alginato	10,4	0,4	3,9		
BPA	Hospedeiro	11,2	0,2	1,7	98,82	0,0076
	PVOH	16,6	0,6	3,5		
	PVOH com pectina	16,3	0,8	4,9		
	PVOH com alginato	13,8	0,5	3,7		
PPB	Hospedeiro	12,7	1,0	8,0	16,22	0,013
	PVOH	16,1	1,2	7,5		
	PVOH com pectina	16,7	0,9	5,3		
	PVOH com alginato	14,5	0,9	6,0		
BPB	Hospedeiro	19,7	1,2	6,0	12,63	0,018
	PVOH	23,7	1,4	5,9		
	PVOH com pectina	24,6	1,4	5,7		
	PVOH com alginato	22,6	1,3	5,9		
DES	Hospedeiro	29,9	0,9	3,1	612,4	0,018
	PVOH	65,8	1,1	1,6		
	PVOH com pectina	44,1	1,9	4,3		
	PVOH com alginato	53,8	1,4	2,5		
TCS	Hospedeiro	82,4	1,3	1,6	157,3	0,059
	PVOH	141,0	2,7	1,9		
	PVOH com pectina	120,5	6,6	5,5		
	PVOH com alginato	122,2	4,9	4,0		

1. Média aritmética das áreas de pico ($n = 5$); 2. Estimativa do desvio padrão; 3. Valor de F calculado pela análise de variância de fator único (ANOVA).

A análise de variância de fator único foi utilizada para identificar diferenças significativas entre as eficiências de extração (em termos de área de pico) de cada dispositivo de *in-tube* SPME. Considerando um intervalo de confiança de 95 % e os graus de liberdade 3 e 16, o valor de $F_{\text{crítico}}$ é igual a 3,24, portanto para todos os compostos houve diferença significativa entre os dispositivos de extração, uma vez que foram obtidos valores de F_{calc} superiores ao $F_{\text{crítico}}$. Devido a maior diferença entre os resultados do capilar hospedeiro e dos capilares modificados, aplicou-se a ANOVA retirando-se as médias do capilar hospedeiro, com intervalo de confiança de 95 % e os graus de liberdade 2 e 12 o valor de $F_{\text{crítico}}$ é igual a 3,89, uma vez que para todos os analitos o valor de F_{calc} obtido foi superior ao $F_{\text{crítico}}$, MPB (5,89), EPB (13,1), BPA (27,9), PPB (6,91), DES (264,5), TCS (25,9), com exceção do BPB (2,55), há diferença significativa entre a eficiência de extração dos capilares modificados para a maioria dos analitos.

Para identificar quais capilares diferem em relação à eficiência de extração (avaliada em termos de área de pico), aplicou-se o teste t-student para as médias dos capilares hospedeiro e modificados. Nesse teste calcula-se a diferença mínima significativa (DMS), a qual é comparada à diferença obtida entre duas médias, se esta é superior à DMS, as duas médias diferem entre si. Os dados da TABELA 15 mostram que de forma geral, os dispositivos não modificado e modificado com PVOH e alginato apresentaram eficiências de extração distintas das obtidas pelos capilares contendo PVOH ou PVOH com pectina. Todavia, o capilar contendo apenas PVOH e àquele contendo PVOH com pectina são significativamente iguais entre si para a maioria dos compostos, com exceção do DES e do TCS cujas eficiências de extração foram maiores empregando-se o dispositivo de PVOH sem biopolímero. Para o MPB e o BPB também não houve diferença significativa entre as fases de PVOH com pectina e PVOH com alginato. A fase de PVOH com alginato apresentou menor eficiência de extração para os parabenos e o BPA, em relação aos capilares modificados com PVOH e PVOH com pectina. Para o DES e o TCS, o uso de PVOH puro acarretou num acréscimo de áreas de 49 % e 17 %, respectivamente, em relação ao PVOH com pectina.

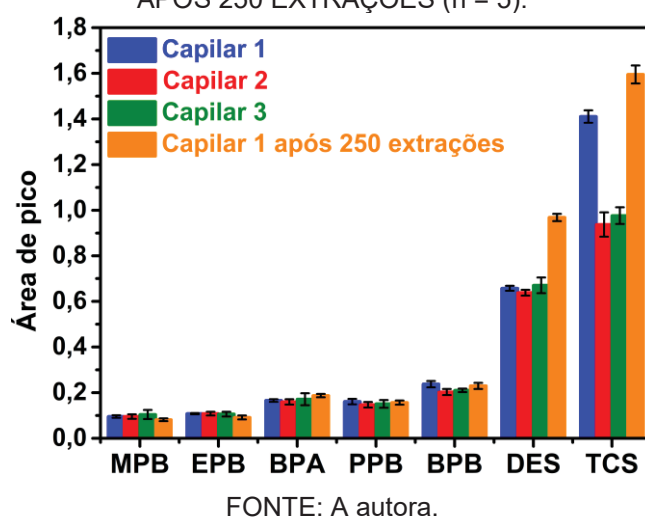
Em estudo prévio do grupo^[160], empregou-se discos de hidrogéis de PVOH com pectina ou alginato para a extração de hormônios esteroidais de amostras de águas superficiais. A adição desses biopolímeros foi essencial, pois os discos de PVOH puro não permitiram a percolação de água, característica essencial para a

SPE. Além disso, esses hidrogéis apresentaram comportamento interessante para a extração dos hormônios esteroidais, que são compostos de média a baixa polaridade. Por esses motivos, foram avaliados dispositivos de PVOH puro e PVOH com biopolímero (alginato ou pectina) para a extração dos parabenos, BPA e TCS de amostras de água ultrapura.

Todavia, no presente estudo a adição de mais um componente (pectina ou alginato) não proporcionou aumento significativo da sorção dos parabenos e BPA nos capilares de *in-tube* SPME. Além disso, o dispositivo com PVOH puro apresentou maior eficiência de extração para o DES e o TCS. Desse modo, o capilar modificado com PVOH puro foi selecionado para a continuação do estudo.

Com o capilar de PVOH selecionado (método 12), avaliou-se a repetibilidade do processo de modificação, para isso outros dois capilares de mesma composição foram preparados em dias diferentes. Os três capilares de PVOH foram utilizados na extração ($n = 5$) de amostras de água ultrapura enriquecidas com 100 ng mL^{-1} de cada analito. Comparou-se também o desempenho dos três capilares quando novos com o desempenho de um capilar após 250 extrações. Os resultados obtidos, em termos de área de pico, são apresentados na FIGURA 20.

FIGURA 20 – REPETIBILIDADE DO DISPOSITIVO DE IN-TUBE SPME E COMPORTAMENTO APÓS 250 EXTRAÇÕES ($n = 5$).



Na FIGURA 20, observa-se que não há diferença entre as áreas dos analitos obtidas após extração com os três capilares de PVOH avaliados, com exceção do TCS. Este apresentou maior área de pico para a extração com o capilar 1, em relação aos capilares 2 e 3, todavia, entre estes dois capilares não há diferença na

área de pico do TCS. Portanto, pode-se considerar que o procedimento de modificação dos capilares com hidrogel de PVOH tem repetibilidade.

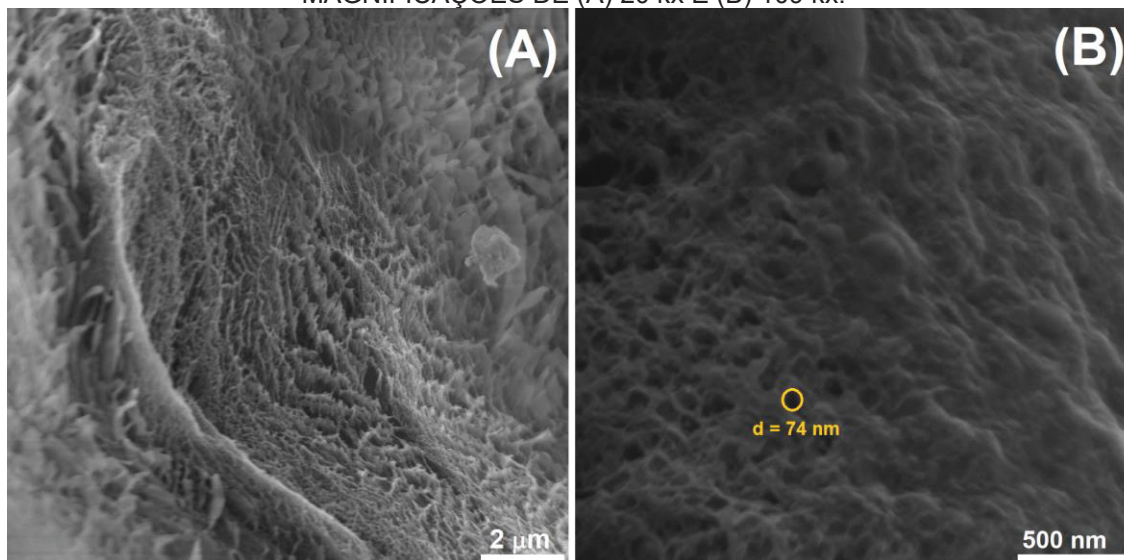
Outro resultado importante apresentado na FIGURA 20, refere-se à capacidade de reutilização do dispositivo de *in-tube* SPME com fase sorvente baseada em PVOH. Somente após 250 extrações com o mesmo capilar foi observada diferença na resposta dos analitos. Nota-se na FIGURA 20, que após 250 extrações há uma redução nas áreas dos picos dos compostos mais polares (MPB e EPB), enquanto para os compostos menos polares (DES e TCS) ocorre um aumento nas áreas dos picos. Esse aumento não foi devido à presença de efeito memória, verificada a partir da análise de amostras branco. Os resultados obtidos podem ser um indicativo que após 250 extrações a fase sorvente começa a perder grupos hidroxilas, aumentando assim seu caráter apolar.

Como o capilar de PVOH apresentou um desempenho interessante para ser aplicado como dispositivo de extração para *in-tube* SPME, o gel de PVOH e o dispositivo modificado foram caracterizados em mais detalhes e os resultados serão apresentados e discutidos na próxima seção.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DO HIDROGEL DE PVOH

O estudo de caracterização foi realizado utilizando discos de hidrogel de PVOH como modelo, uma vez que a maioria das técnicas de caracterização necessita de grande quantidade de material e/ou não permitem a análise do conteúdo do interior do tubo capilar. Deve-se destacar que os discos de hidrogel são uma tentativa de simular o gel contido no interior do capilar, no entanto pode haver diferenças entre os dois materiais. De qualquer modo, essa aproximação é válida porque a preparação de ambos é similar e a composição é idêntica, além de ser bastante útil, pois permite explorar diferentes técnicas de caracterização. A FIGURA 21 mostra imagens de MEV em diferentes magnificações do gel de PVOH após liofilização obtidas por detecção de elétrons secundários.

FIGURA 21 – IMAGENS DE MEV DA SUPERFÍCIE DO HIDROGEL DE PVOH LIOFILIZADO COM MAGNIFICAÇÕES DE (A) 20 kx E (B) 109 kx.

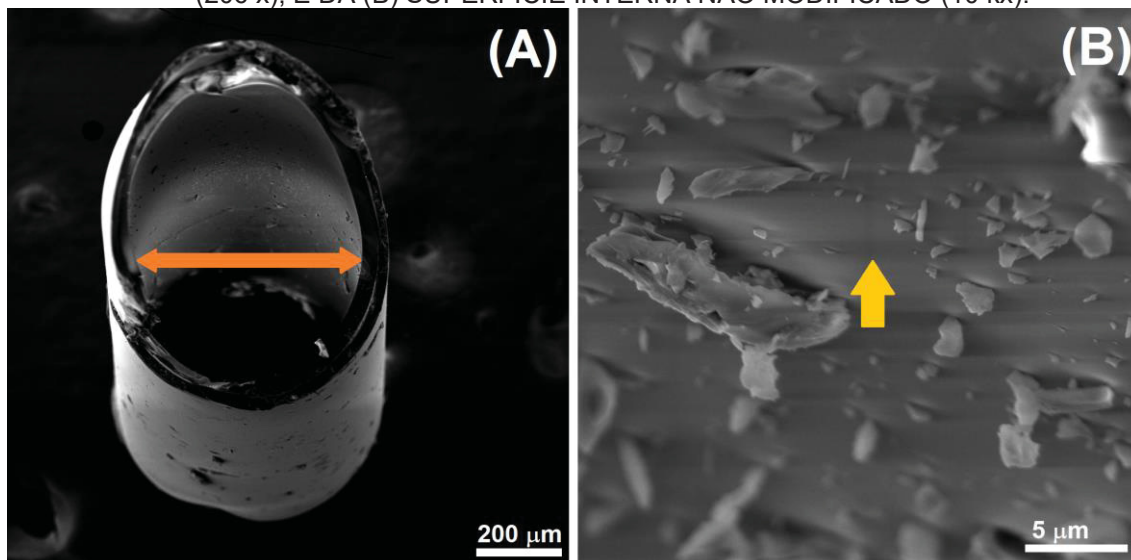


FONTE: A autora.

A imagem (A) apresenta uma seção de fratura do material, na qual observa-se morfologia rugosa produzida provavelmente pela própria fratura. Nota-se também a tridimensionalidade dessa seção da amostra, evidenciada por uma parte da imagem estar focada (centro) e as outras partes desfocadas. Na imagem (B) que foi coletada de outra região do gel, pode-se observar que o material apresenta superfície arredondada, característica de materiais poliméricos. A maior magnificação da imagem (B) permite observar a existência de poros na estrutura do material que apresentam tamanhos de dezenas a centenas de nanômetros. Um dos menores poros observáveis foi destacado em amarelo e apresenta diâmetro aproximado de 74 nm, como indicado na imagem. Essa ordem de grandeza de tamanho de poros é típica de materiais macroporosos (> 50 nm).

Para fins comparativos, imagens de MEV foram coletadas dos capilares de sílica fundida sem e com modificação, as quais são mostradas na FIGURA 22 e FIGURA 23, respectivamente. A FIGURA 22 mostra imagens obtidas da seção transversal do capilar não modificado com magnificação de 206 vezes (A) e da parede interna do capilar com magnificação de 10 k vezes (B).

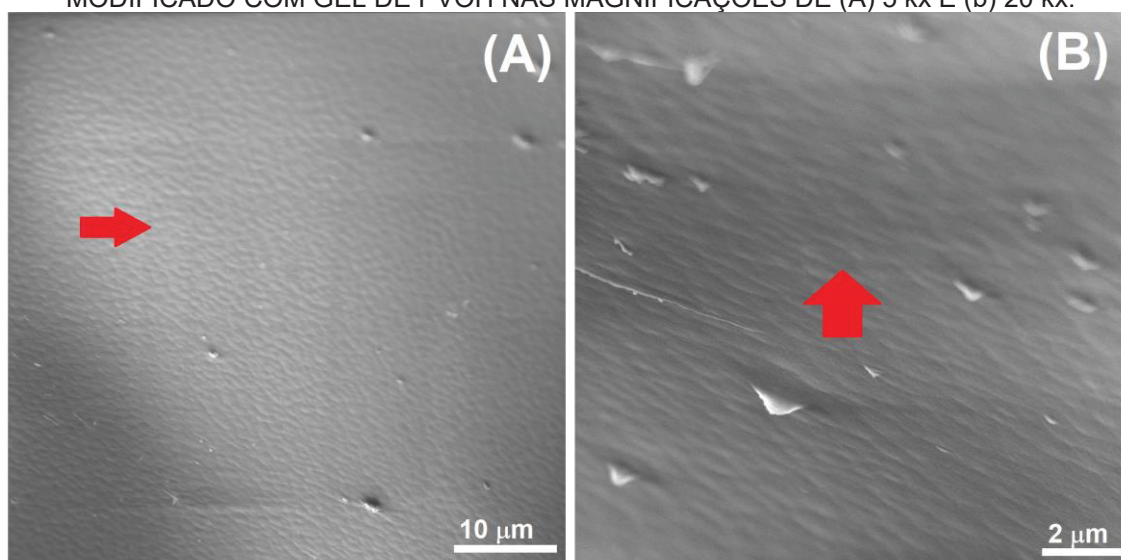
FIGURA 22 – IMAGENS DE MEV DO (A) CAPILAR DE SÍLICA FUNDIDA NÃO MODIFICADO (206 x); E DA (B) SUPERFÍCIE INTERNA NÃO MODIFICADO (10 kx).



FONTE: A autora.

A imagem (A) de baixa magnificação permite estimar o diâmetro interno do capilar de sílica fundida que está marcado pela dupla seta em laranja e apresenta valor de aproximadamente 0,524 mm, que é compatível com o valor nominal (0,53 mm). Na imagem (B) observa-se que o capilar apresenta uma superfície lisa indicada pela seta amarela. Nota-se a presença de estilhaços aderidos à superfície do capilar, provavelmente provenientes do processo de corte. A FIGURA 23 apresenta imagens de MEV da superfície interna do capilar modificado com PVOH obtidas com magnificações de (A) 5 k vezes e (B) 20 k vezes.

FIGURA 23 – IMAGENS DE MEV DA SUPERFÍCIE INTERNA DO CAPILAR DE SÍLICA FUNDIDA MODIFICADO COM GEL DE PVOH NAS MAGNIFICAÇÕES DE (A) 5 kx E (b) 20 kx.

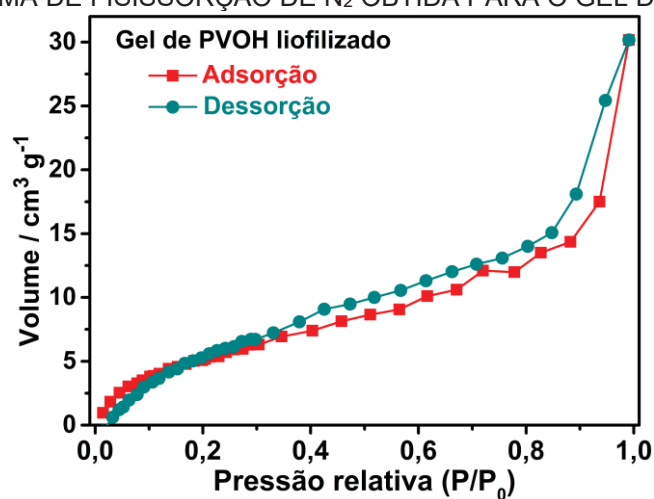


FONTE: A autora.

Nas imagens da FIGURA 23 observa-se que a superfície do capilar modificado apresenta morfologia diferente da superfície interna lisa do capilar não modificado (FIGURA 22B), o que é um primeiro indício de recobrimento de todo o capilar. As setas em vermelho mostram morfologia arredondada similar à imagem do gel mostrada na FIGURA 21B, indicando que a modificação do capilar com gel de PVOH foi bem-sucedida. Devido à menor magnificação, não é possível ver poros na FIGURA 23B, mas maiores magnificações resultaram em acúmulo de carga e degradação da amostra devido ao caráter isolante, juntamente com maior dificuldade para dissipação da carga quando o feixe é focado dentro do capilar.

Outro modo de caracterizar a estrutura porosa do material é por meio da análise de fisissorção de N_2 . A isoterma de adsorção de N_2 foi obtida para o gel de PVOH na forma de disco e está apresentada na FIGURA 24, sendo esse o sistema modelo para análises que não podem ser realizadas com o material no capilar.

FIGURA 24 – ISOTERMA DE FISISSORÇÃO DE N_2 OBTIDA PARA O GEL DE PVOH LIOFILIZADO.



FONTE: A autora.

A FIGURA 24 mostra as curvas de adsorção de N_2 em vermelho e dessorção de N_2 em verde, como indica a legenda interna do gráfico. O formato obtido para a isoterma de adsorção permite classificá-la como Tipo II segundo a classificação da IUPAC, o que é característico de adsorção em multicamadas em materiais não porosos ou macroporosos^[66]. Esse comportamento corrobora os resultados de MEV mostrados anteriormente. Em pressão relativa de aproximadamente 0,15, observa-se um ponto de inflexão que indica a saturação da monocamada. A segunda inflexão em pressão relativa próxima de 0,85 indica a

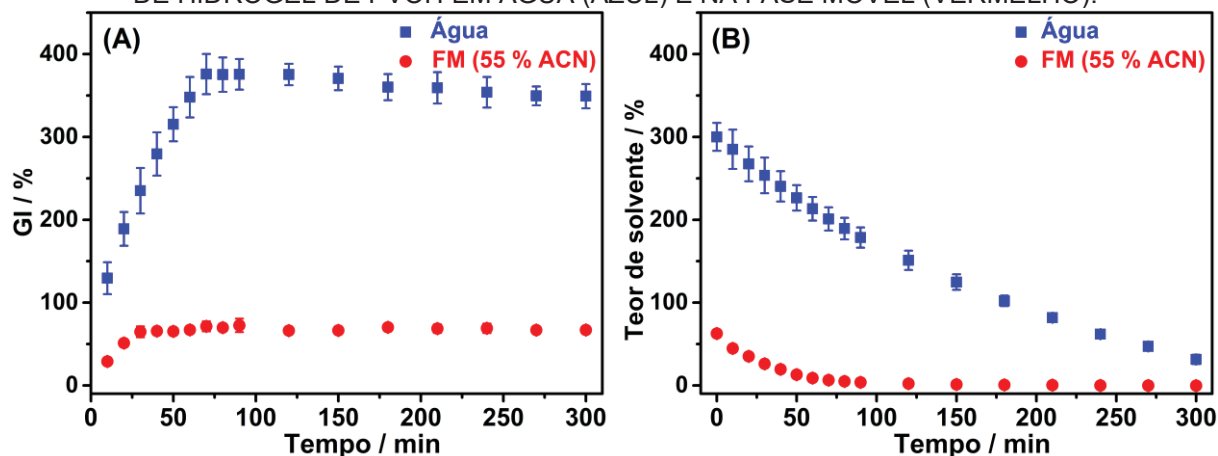
formação de multicamadas de N₂, o alto valor de pressão relativa necessário para a formação de multicamadas é característico de sólidos macroporosos ou não porosos.

Apesar das curvas de adsorção e dessorção não se sobreporem, não é possível afirmar que há histerese, uma vez que os volumes apresentam valores próximos. Essa não coincidência entre as curvas de adsorção e dessorção também é observada no início da curva, o que pode ser devido ao processo de preparo da amostra de PVOH. Para a análise de fisissorção de N₂, o gel de PVOH foi previamente intumescido com água por 60 min, congelado com N₂ líquido e liofilizado, então pode haver água remanescente adsorvida no gel que contribui para essa diferença entre as curvas da FIGURA 24. Todavia é importante ressaltar que esse preparo de amostra não causa o colapso das estruturas porosas do gel, uma vez que os resultados da isoterma de fisissorção estão de acordo com os resultados obtidos por MEV.

A área superficial do material foi estimada em aproximadamente 22 m² g⁻¹ por meio do método BET, utilizando-se os dados de adsorção para as pressões relativas de 0 a 0,3. Esse valor é aproximado uma vez que o método BET é específico para materiais mesoporosos (poros entre 2 e 50 nm), contudo a literatura em geral tem utilizado esse método para estimativas de áreas de materiais macroporosos e não porosos.

Apesar da área superficial estimada ser pequena, o gel de PVOH apresentou capacidade de absorção de água de aproximadamente 4,5 vezes a sua massa inicial, verificada no ensaio de grau de intumescimento apresentado a seguir. A FIGURA 25 mostra os resultados obtidos nos ensaios (n = 3) de (A) grau de intumescimento (GI) e (B) perda de solvente (20°C). Ambos os ensaios foram conduzidos com os discos de hidrogel de PVOH e como solvente foram estudados água e fase móvel (55% de acetonitrila e 45 % de água, (v/v)).

FIGURA 25 – (A) GRAU DE INTUMESCIMENTO E (B) PERDA DE SOLVENTE (20°C) DO DISCO DE HIDROGEL DE PVOH EM ÁGUA (AZUL) E NA FASE MÓVEL (VERMELHO).



FONTE: A autora.

A FIGURA 25A mostra o intumescimento do hidrogel de PVOH quando imerso em água ou fase móvel, ao longo de 300 min. Como pode ser visto no gráfico, o gel de PVOH atinge o equilíbrio de intumescimento em água após aproximadamente 60 min, enquanto em fase móvel esse tempo é de 40 min. O valor médio do grau de intumescimento do gel de PVOH em água foi de 362,9 %, já em fase móvel há uma menor absorção de solvente pelo gel, de forma que o valor médio do grau de intumescimento foi igual a 68,1 %. O grau de intumescimento de hidrogéis hidrofílicos como o PVOH em contato com misturas de água-solvente orgânico diminui conforme a quantidade de solvente orgânico aumenta, quando esta atinge 100 % pode ocorrer o colapso da estrutura^[202]. Isso deve-se às cadeias poliméricas do gel hidrofílico ter afinidade maior por água, devido à presença de grupos polares em sua estrutura. Em solventes orgânicos as cadeias poliméricas preferem interagir entre si ao invés de interagir com o solvente, o que pode promover o colapso da estrutura porosa. Essa maior interação com água em relação à solventes ou misturas de solventes com água é evidenciada pelos valores das curvas de intumescimento no início de cada experimento. Observa-se que nos primeiros minutos do experimento conduzido em água, o gel de PVOH sofre aumento de massa de 100 %, o qual chega a mais de 300 % ao longo do tempo, enquanto o aumento total em mistura de ACN e água foi de apenas 68,1 %.

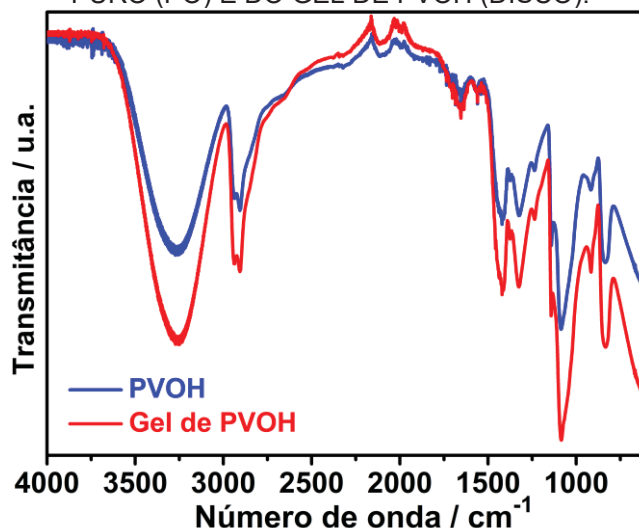
Na FIGURA 25B é apresentado a perda de solvente quando o gel intumescido em água ou fase móvel fica exposto ao ar em temperatura de 20°C, isso foi avaliado por um período de 300 min. No gráfico é possível observar um perfil exponencial da diminuição do teor de solvente no material, o qual atinge 30 % para a

água ao final dos 300 min em relação à massa de polímero seco, enquanto o gel intumescido com fase móvel perde todo o solvente absorvido, após o mesmo período. Observa-se ainda que o início das curvas de perda de solvente coincide com o final das curvas de intumescimento, porque as medidas de perda de solvente foram conduzidas após o material atingir o equilíbrio de intumescimento em cada solventes.

Para ambos os experimentos, o gel volta a intumescer se for imerso no solvente novamente, então a perda de solvente é um processo reversível, o que indica que essa proporção de acetonitrila não é suficiente para colapsar a estrutura do material. Além disso, a permanência de 30 % de água no gel após 300 min, em relação à massa seca, indica alta afinidade por água como discutido anteriormente. Essa afinidade corrobora a presença de água remanescente no gel que foi atribuída como causa da diferença entre as curvas da FIGURA 24.

A alta afinidade por água é em grande parte atribuída à alta concentração de grupos OH na estrutura do gel de PVOH, que foi verificada por espectroscopia de infravermelho. A FIGURA 26 apresenta os espectros de infravermelho adquiridos no modo ATR para o polímero de PVOH na forma de pó e para o gel de PVOH reticulado com glutaraldeído na forma de disco.

FIGURA 26 – ESPECTROS DE INFRAVERMELHO ADQUIRIDOS NO MODO ATR PARA O PVOH PURO (PÓ) E DO GEL DE PVOH (DISCO).



FONTE: A autora.

O PVOH apresenta uma banda larga em 3270 cm^{-1} referente ao estiramento O–H. As outras bandas principais apresentam máximos próximos de 2920, 1427,

1140 e 1085 cm^{-1} e são referentes ao estiramento C–H dos grupos alquila, deformação do CH_2 , estiramento C–O e estiramento C–O–C, respectivamente^[153], o que confirma a estrutura do polímero de acordo com a literatura. O espectro do gel de PVOH não apresentou diferenças relevantes em relação ao polímero puro. Segundo Mansur e colaboradores^[153], o estiramento C–H de aldeídos resulta em duas bandas entre 2830 e 2695 cm^{-1} , e no estiramento da carbonila próximo de 1750 cm^{-1} . Nenhuma dessas bandas foram observadas para o gel, o que indica que a maioria das moléculas de glutaraldeído reagiram com o PVOH pelos dois grupos aldeído. Apesar dessa reação resultar em grupos C–O–C de hemiacetal, que apresentam estiramentos próximos de 1085 cm^{-1} , esses grupos não são perceptíveis no espectro pois já existem sinais nessa região referentes ao estiramento C–O–C de grupos acetatos residuais provenientes da hidrólise incompleta do acetato de polivinila.

Os espectros de infravermelho não evidenciaram mudanças entre o polímero puro e o gel obtido por reticulação com glutaraldeído, provavelmente devido à baixa concentração do agente de reticulação. Contudo, essa baixa concentração é suficiente para promover a reticulação do gel verificada indiretamente pela estrutura porosa demonstrada por isotermas de N_2 e imagens de MEV, e diretamente pelo ensaio de grau de intumescimento mostrados anteriormente. O gel formado por essa rede porosa e por grande quantidade de solvente tem sido utilizado em poucos trabalhos para a extração de compostos orgânicos de matrizes aquosas, havendo também pouca informação disponível acerca do comportamento sortivo para diferentes analitos. No item a seguir serão mostrados diferentes ensaios realizados para a compreensão do comportamento sortivo no hidrogel de PVOH empregando amostra aquosa enriquecida com os compostos de interesse (parabenos, bisfenol A e triclosan).

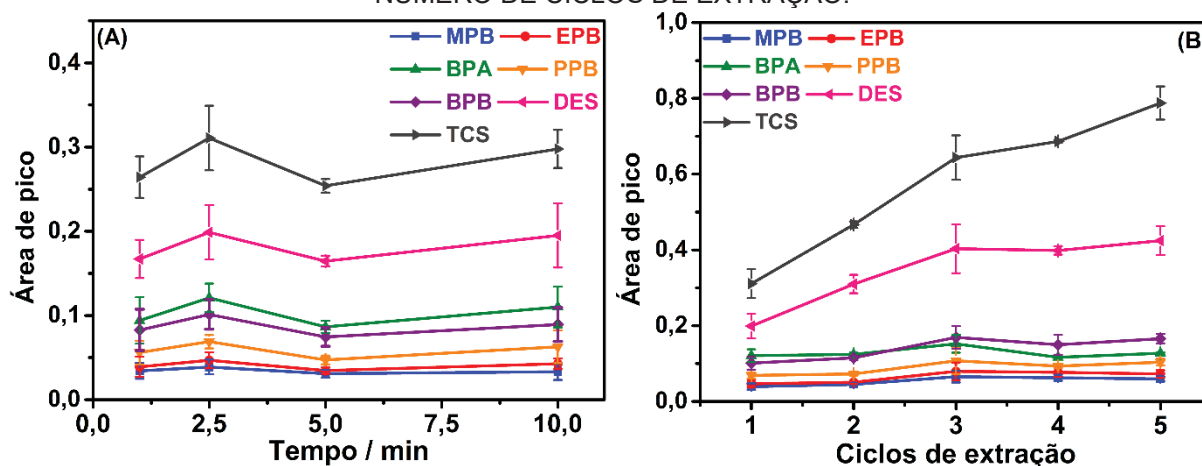
4.4 COMPORTAMENTO SORTIVO DOS ANALITOS NO HIDROGEL DE PVOH

Os estudos seguintes foram pautados na elucidação comportamento sortivo dos compostos de interesse no gel de PVOH. Uma evidência da alta hidrofiliidade do PVOH são as altas concentrações em massa usadas nas dispersões desse polímero (para os dispositivos é utilizado 15 % (m/m), mas concentrações de até 30 % (m/m) já foram preparadas), as quais são possíveis apenas para polímeros liofílicos, ou hidrofílicos quando o solvente é água. Em contrapartida, polímeros

hidrofóbicos como a polianilina podem ser dispersos em água apenas em concentrações máximas da ordem de 1 % (m/m)^[203]. O melhor entendimento do comportamento de sorção faz-se necessário porque até o momento as maiores eficiências de extração foram obtidas para os compostos mais apolares, o que aparentemente contradiz a expectativa, mas pode ser relacionada ao efeito solvofóbico.

Foi realizado um estudo preliminar a respeito do tempo de contato da amostra com a fase sorvente, para determinar o tempo de extração a ser empregado nos experimentos de isotermas de sorção. Desse modo, foram avaliados os tempos de 1, 2,5, 5 e 10 min, empregando-se apenas uma injeção da amostra (anteriormente, foram empregadas 10 injeções). Para a avaliação dos ciclos de extração utilizou-se de 1 a 5 injeções da amostra, fixando-se o tempo de extração em 2,5 min. A FIGURA 27 apresenta os perfis de extração em função do (A) tempo de extração e do (B) número de ciclos de extração para experimentos realizadas com amostras de água ultrapura enriquecidas com os analitos e o padrão interno em concentração igual 100 ng mL⁻¹.

FIGURA 27 – PERFIS DE EXTRAÇÃO EM FUNÇÃO DO (A) TEMPO DE EXTRAÇÃO; E DO (B) NÚMERO DE CICLOS DE EXTRAÇÃO.



FONTE: A autora.

A FIGURA 27A mostra que maiores tempos de contato da amostra com a fase sorvente não acarretam ganho em termos de área de pico, sendo que o tempo de 2,5 min apresentou maior eficiência de extração para todos os compostos estudados. De fato, todos os analitos apresentaram um mesmo perfil de comportamento para o experimento de variação do tempo de extração, com uma tendência inicialmente crescente de 1 min para 2,5 min, seguida por um decréscimo

nas áreas de pico para 5 min, voltando a aumentar, de forma menos pronunciada com tempo de contato de 10 min. O tempo de 2,5 min foi utilizado nas etapas posteriores, uma vez que não se observou aumento da área de pico para os tempos maiores.

A utilização de 1 ciclo de extração levou a valores maiores de RSD comparando-se os experimentos anteriores que empregaram 10 ciclos (TABELA 15), para 1 ciclo de extração os valores de RSD atingiram quase 30 % em alguns casos. O gráfico da FIGURA 27B mostra uma redução da variância a partir do uso de 2 ciclos de extração, sendo que para a maioria dos casos o RSD foi inferior a 10 %. Para os parabenos, os dados mostram que após 3 ciclos de extração a quantidade de analito extraída torna-se constante, uma vez que não há variação entre as áreas dos picos para 3, 4 e 5 ciclos. Além disso, há um incremento nas áreas de pico dos parabenos conforme o tamanho da cadeia lateral aumenta, o qual torna-se mais pronunciado com a diminuição da hidrofiliidade dos compostos e pode ser observado comparando-se os resultados para 2 e 3 ciclos (FIGURA 27B). Isso reforça os resultados obtidos previamente, que indicaram uma maior afinidade dos compostos menos solúveis em água pela fase sorvente, mesmo essa apresentando diversos sítios hidrofílicos em sua estrutura.

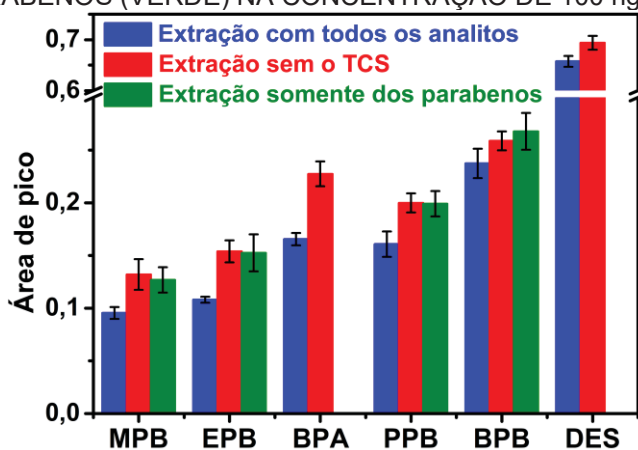
A maior afinidade dos compostos DES e TCS pela fase sorvente, em comparação com a matriz aquosa é observada com o uso de 1 injeção (FIGURA 27A e 27B), uma vez que a área de pico obtida após a extração tem um acréscimo de aproximadamente 100 % para o DES e 240 % para o TCS, no tempo de 2,5 min, em comparação à área resultante somente da análise cromatográfica. Para o TCS nota-se no gráfico da FIGURA 27B que 5 ciclos de extração não são suficientes para se alcançar o equilíbrio, o que pode estar relacionado a uma maior constante de partição do analito entre a fase sorvente e a matriz, o que permite maior sorção do analito (FIGURA 27A) e acarreta maior tempo para atingir o equilíbrio^[204].

Com base nos valores de áreas de pico (FIGURA 27B), os compostos estudados parecem apresentar valores crescentes para a constante de equilíbrio de sorção, e essa tendência é inversamente proporcional à solubilidade do composto em água (compostos com menores $\log K_{o/w}$). Todavia, o BPA apresentou um comportamento distinto dos demais, primeiramente, com 1 ciclo de extração esse composto obteve áreas de pico maiores que o BPB que possui menor solubilidade em água (maior $\log K_{o/w}$), mas a partir de 2 ciclos a área de pico do BPA começa a

decair, igualando-se ao BPB e por fim tornando-se menor. O gráfico da FIGURA 27B, indica que o uso de mais de 3 ciclos de extração com tempo de contato de 2,5 min não acarreta aumento da sorção dos analitos (exceto para o TCS). Porém, quando foram utilizadas 10 injeções seguidas (com tempo mínimo de contato), como mostra a TABELA 15, obteve-se áreas de pico maiores. Esses resultados indicam que um maior tempo de contato (1 a 10 min) dos analitos com a amostra pode causar a dessorção dos compostos.

Os resultados anteriores confirmam a maior afinidade de compostos menos polares e menos solúveis em água pela fase extratora de PVOH, além de demonstrarem um possível equilíbrio de sorção e dessorção dos analitos entre a fase extratora e a matriz. As afinidades dos diferentes compostos pelo gel de PVOH e a existência de competição entre os analitos pelos sítios ativos foi estudada realizando extrações de amostras (i) com todos os analitos, (ii) com todos os analitos exceto o TCS, e (iii) somente com os quatro parabenos, os resultados são mostrados na FIGURA 28. As extrações foram realizadas empregando 10 injeções seguidas, pois esta condição resultou nas maiores áreas obtidas até o momento. Considerando que a capacidade sortiva do material não foi alterada (exemplificado na FIGURA 19A; mantendo-se o capilar), era esperado um aumento da sorção dos compostos para as condições (ii) e (iii).

FIGURA 28 – ÁREAS DE PICOS MÉDIAS ($n = 5$) OBTIDAS APÓS EXTRAÇÃO DE TODOS OS ANALITOS (AZUL), DE TODOS OS ANALITOS SEM O TCS (VERMELHO) E SOMENTE DOS PARABENOS (VERDE) NA CONCENTRAÇÃO DE 100 ng mL^{-1} .



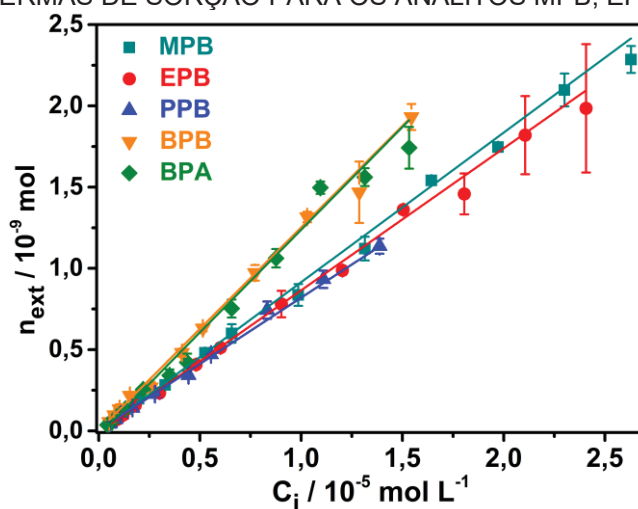
FONTE: A autora.

No gráfico da FIGURA 28, observa-se um aumento de aproximadamente 40 % nas áreas de picos dos analitos MPB, EPB e BPA (38, 43 e 37 %, respectivamente).

respectivamente), quando o TCS não está presente na amostra. Para o PPB esse aumento é de 24 %, enquanto praticamente não há diferença para o BPB e o DES (9 e 6 %, respectivamente). Quando é realizada a extração da amostra contendo apenas os parabenos, ou seja, quando se exclui o BPA e o DES, as áreas dos picos dos parabenos não se diferenciam das áreas obtidas para o ensaio sem o TCS. Esses resultados mostram que o composto com menor solubilidade em água (TCS) interfere na extração dos compostos com maior solubilidade em água, o que não é trivial. Curiosamente, a ausência do TCS não promoveu maior sorção do BPA, BPB e do DES em termos relativos, em especial para o DES cuja estrutura e propriedades se assemelham mais com as do TCS e supostamente ambos apresentariam comportamento sortivo semelhante.

O comportamento de sorção dos analitos e suas afinidades pelo gel de PVOH foram investigados também por isothermas de sorção, que permitem elucidar algumas características do processo sortivo. Foram obtidas isothermas de sorção para o MPB e EPB na faixa de concentração de 100 a 4000 ng mL⁻¹, enquanto para o PPB, o BPB e o BPA utilizaram-se faixas de 100 a 2500, 3000 ou 3500 ng mL⁻¹, respectivamente. Essa diferença nas faixas de concentração deve-se às curvas analíticas obtidas para cada analito, que apresentaram faixa linear menor para o PPB, BPB e BPA. A FIGURA 29 apresenta as isothermas de sorção para os parabenos e o BPA obtidas a 25 °C e mostra a quantidade de matéria extraída (n_{ext}) em função da concentração inicial (C_i).

FIGURA 29 – ISOTERMAS DE SORÇÃO PARA OS ANALITOS MPB, EPB, PPB, BPB E BPA.



FONTE: A autora.

Na FIGURA 29 são observados comportamentos lineares para a quantidade de matéria extraída em função da concentração inicial para cada analito, o que está de acordo com a teoria da *in-tube* SPME^[8,109,205]. O coeficiente angular das isotermas de sorção é equivalente a uma constante Q ($n_{\text{ext}} = Q \times C_i$) que leva em conta o coeficiente de partição do soluto na amostra e na fase sorvente e os volumes da fase extratora do capilar e da amostra.

Considerando duas concentrações adicionadas, $0,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ por exemplo, as quantidades de matéria extraídas para a extração de 100 % dos analitos seriam de $0,6 \times 10^{-9} \text{ mol}$ e $1,2 \times 10^{-9} \text{ mol}$, respectivamente. Para os analitos BPB e BPA foram observados valores de quantidade de matéria extraída próximos ao valor de 100 %, demonstrando um comportamento de extração exaustiva, o que não é comum na técnica de SPME. Já para MPB, EPB e PPB, a quantidade de analito extraída foi de aproximadamente 77, 72 e 68 %, respectivamente.

As isotermas de sorção mostram duas tendências distintas. Os analitos BPB e BPA apresentaram comportamento similar entre si e aparentam ter maior afinidade pela fase sorvente, demonstrado pelos maiores coeficientes angulares das respectivas retas. Isso corrobora os resultados anteriores que indicaram maior afinidade dos compostos menos polares pela fase sorvente. Por sua vez, os analitos MPB, EPB e PPB apresentaram menores afinidades pela fase em relação ao BPB e o BPA. Os coeficientes angulares desses três analitos decrescem ($\text{MPB} > \text{EPB} > \text{PPB}$) com o aumento do $\log K_{o/w}$, o que indica diminuição progressiva da afinidade com a fase extratora.

O hidrogel é um material formado por uma rede polimérica tridimensional reticulada que contém grandes quantidades de solvente entre as suas cadeias. Os resultados obtidos para a série homóloga dos quatro parabenos indicam que o processo sortivo não é regido somente por um único equilíbrio de partição do soluto. No processo de extração aparentemente ocorrem dois equilíbrios (i) interação dos analitos com as cadeias poliméricas e (ii) interação dos analitos com o solvente contido no interior da rede (partição). Analitos mais polares são favorecidos em um dos equilíbrios, enquanto os analitos menos polares são favorecidos pelo outro processo. Por exemplo, esperava-se que o BPB seguisse a tendência da série homóloga e apresentasse menor valor de coeficiente angular do que o PPB, contudo ocorreu uma inversão e o BPB apresentou maior coeficiente angular do que todos os

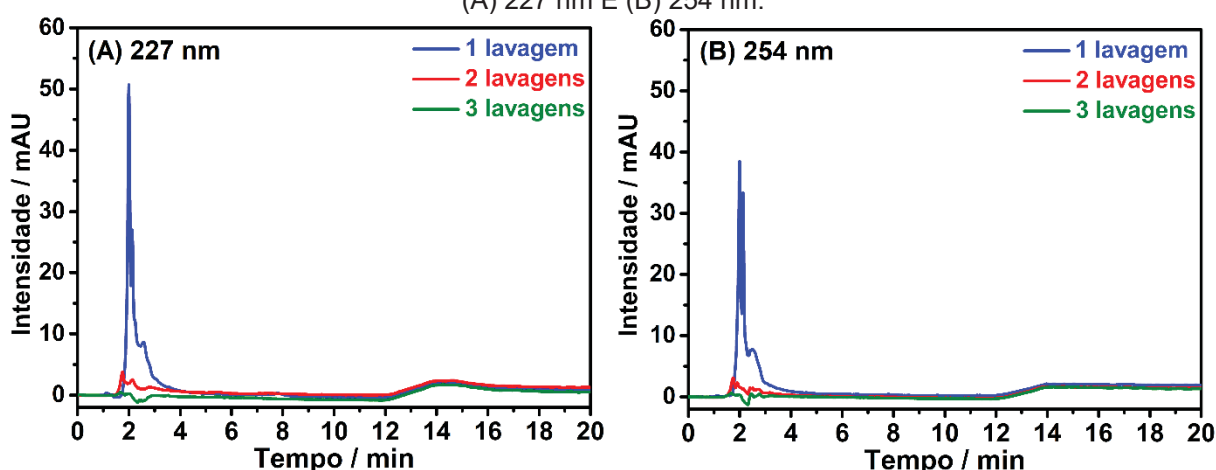
outros parabenos e se assemelhou ao BPA. Essa inversão do BPB corrobora a existência de mais de um processo de extração para fases sorventes baseadas em hidrogéis, o que ainda não foi reportado na literatura. Seguindo esse raciocínio, o MPB, o EPB e o PPB são extraídos pelo equilíbrio contrário ao do BPB, mas dentre os três primeiros há uma variação de afinidades pela fase.

Verificados os comportamentos sortivos dos analitos em água, as próximas etapas do trabalho foram pautadas no emprego do dispositivo de *in-tube* SPME com fase extratora baseada em hidrogel de PVOH para a extração dos compostos de interesse de amostras de fórmula infantil e leite humano.

4.5 FÓRMULA INFANTIL

A otimização do processo de extração foi realizada empregando-se a fórmula infantil como amostra branco. Primeiramente, investigou-se a interferência de compostos endógenos da fórmula infantil nos processos de extração e separação cromatográfica. Para isso, a amostra foi injetada 10 vezes no capilar de PVOH e a etapa de lavagem do capilar com água ultrapura foi avaliada (1, 2 ou 3 lavagens). Os cromatogramas obtidos após análise da amostra branco (fórmula infantil) com diferentes números de lavagens são apresentados na FIGURA 30.

FIGURA 30 – CROMATOGRAMAS OBTIDOS PARA 10 INJEÇÕES DA FÓRMULA INFANTIL COM APLICAÇÃO DE DIFERENTES NÚMEROS DE LAVAGENS COM ÁGUA E DETECÇÃO FEITA EM (A) 227 nm E (B) 254 nm.



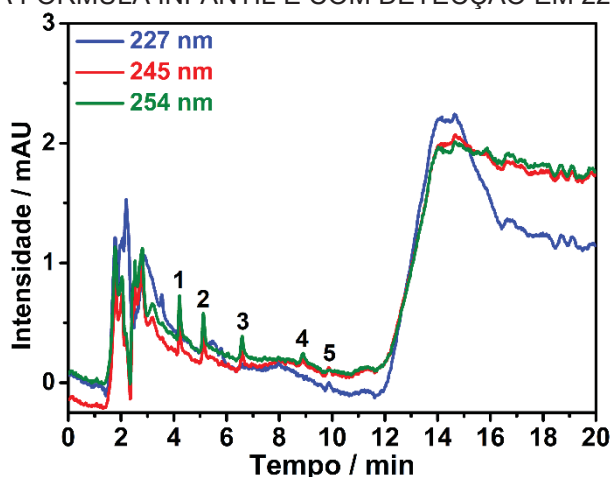
FONTE: A autora.

Os cromatogramas da FIGURA 30 mostram um pico intenso em 2 min quando emprega-se 1 lavagem com água ultrapura (em azul), sendo que esse pico está relacionado aos compostos endógenos da fórmula infantil, como as proteínas.

Quando foram empregadas 2 lavagens com água ultrapura, houve uma redução de quase 95 % na intensidade do pico associado aos compostos endógenos, e para 3 lavagens essa redução foi ainda maior. Esse resultado pode ser um indicativo de que o gel de PVOH tem comportamento similar ao de materiais de acesso restrito (RAM), que são capazes de excluir os componentes de alta massa molecular presentes na matriz e ainda reter as moléculas pequenas^[204]. Essa característica é muito interessante, pois poderia permitir a injeção direta da amostra no sistema cromatográfico com o mínimo processamento, mesmo para amostras complexas e altamente heterogêneas tal como o leite humano.

A FIGURA 31 mostra os cromatogramas obtidos após a extração da fórmula infantil enriquecida com os analitos em concentração de 100 ng mL^{-1} , empregando-se 10 injeções da amostra e 2 limpezas com água ultrapura.

FIGURA 31 – CROMATOGRAMAS OBTIDOS A PARTIR DA EXTRAÇÃO DOS ANALITOS (100 ng mL^{-1}) DA FÓRMULA INFANTIL E COM DETECÇÃO EM 227, 245 E 254 nm.



1. MPB; 2. EPB; 3. PPB; 4. BPB; 5. DES.

FONTE: A autora.

Os cromatogramas da FIGURA 31 mostram que a sorção dos analitos pelo hidrogel de PVOH é dificultada conforme a hidrofobicidade dos compostos aumenta, quando se emprega fórmula infantil. Ao comparar-se os picos de 1 a 4, que correspondem aos parabenos em ordem crescente de $\log K_{ow}$, é notável a redução da sorção dos compostos mais apolares pelo gel. Isso é ainda mais evidente para o DES e o TCS, com o pico do último não detectado no cromatograma, o que é uma tendência contrária aos resultados anteriores. Esse comportamento é o oposto do observado para água, na qual a extração dos compostos mais hidrofóbicos é

favorecida, como visto anteriormente, os resultados que mostraram maior afinidade e extração dos compostos mais apolares em amostras de água.

Como descrito na seção de Introdução, o leite humano apresenta em sua composição cerca de 0,9 a 1,2 g dL⁻¹ de proteínas e 3,2 a 3,6 g dL⁻¹ de lipídeos^[54], que são componentes capazes de ligarem-se ou solubilizarem os compostos mais hidrofóbicos, respectivamente. Com relação ao conteúdo proteico, destaca-se a caseína com aproximadamente 0,4 g dL⁻¹ no leite humano^[68]. Essa proteína forma micelas com interior hidrofóbico, no qual compostos apolares podem se associar^[206,207] e permanecer solubilizados e/ou fortemente ligados. Roach et al.^[64] realizaram estudo de encapsulação do TCS empregando micelas de caseína, e observaram a associação de mais 80 % do TCS às micelas de caseína, em solução de água e etanol (1:1, v/v), sendo essa associação ainda maior quando os autores aplicaram pressão (300 MPa) no sistema, causando a formação de uma rede, por interações não covalentes, com as proteínas do soro.

Mesmo utilizando a fase sorvente de PVOH, que foi capaz de excluir as proteínas durante o processo de extração e apresenta alta eficiência de sorção do TCS quando este está dissolvido em água, não foi possível realizar a extração dos analitos da fórmula infantil sem uma etapa de pré-preparo da amostra, pois os analitos com maior logK_{o/w} são excluídos junto com as proteínas, devido a essas fortes interações. Portanto, essa etapa de pré-preparo da amostra teve por finalidade desnaturar e precipitar as proteínas, dificultando assim sua ligação com os analitos mais hidrofóbicos e a permanência deles no interior das micelas, que inviabiliza a extração desses compostos pela fase de PVOH.

A precipitação das proteínas pode ser realizada através da (i) adição de solventes orgânicos, (ii) ajuste do pH para o ponto isoelétrico, (iii) adição de sais e (iv) mistura desses fatores anteriores^[204]. Foram avaliados a adição de solventes orgânicos e o ajuste do pH para o ponto isoelétrico da caseína (pH próximo a 4,6^[70,71,187]). O pH de 6,6 da fórmula infantil dissolvida em água, previamente medido, foi ajustado pela adição de ácido clorídrico 1 mol L⁻¹ até atingir o valor de 4,6, correspondente ao ponto isoelétrico da caseína, ou seja, para o valor de pH no qual o potencial zeta (ζ) é próximo a zero. Como a caseína apresenta baixa hidrofobicidade, ou fraca solvatação em água, quando o pH do meio está próximo ao ponto isoelétrico ocorre precipitação, devido à perda da estabilização eletrostática^[66,208,209]. As principais vantagens do uso de ajuste do pH são a baixa

diluição da amostra e não prejuízo à extração dos compostos pelo aumento da sua solubilidade na presença de solventes orgânicos.

A amostra cujo pH foi ajustado para 4,6 apresentou sólido floculado que permaneceu na interface líquido-ar, todavia o cromatograma obtido após extração foi semelhante ao cromatograma mostrado na FIGURA 31, que não empregou a etapa de precipitação das proteínas. Esse resultado indica que não foi possível evitar as interações dos analitos mais hidrofóbicos com os componentes da matriz pelo ajuste de pH. Quando se aumenta a concentração de H^+ do meio, as cargas negativas das cadeias da κ -caseína são neutralizadas, o que deve provocar compactação das cadeias e dificultar ainda mais a liberação dos compostos mais hidrofóbicos já alocados no interior das micelas.

Ainda com relação ao pH da amostra, como o aumento do pH do meio reduz a lipofilicidade dos compostos de interesse, estudou-se a possibilidade de diminuir as interações dos analitos com os lipídeos e proteínas e aumentar a sua solubilidade na fase aquosa por meio da desprotonação dos compostos através da alcalinização da amostra de fórmula infantil. Avaliou-se o ajuste do pH da amostra para 10, 11, 12, 13 ou 14, e em seguida a mistura foi centrifugada por 15 min a 13400 rpm para a remoção dos lipídeos e proteínas. A ionização dos analitos aumenta a sua solubilidade em água, o que dificulta a sorção na fase extratora, então o pH da amostra foi ajustado para 6 após a remoção dos lipídeos e proteínas. Para o pH 10, os resultados obtidos foram semelhantes à extração dos analitos da fórmula infantil sem a etapa de pré-preparo (FIGURA 31), enquanto para os pH 11 a 14 as áreas de pico dos analitos foram menores que as áreas obtidas para o pH 10. O pior desempenho observado para $pH > 10$ pode ser devido à hidrólise dos parabenos em altos pH.

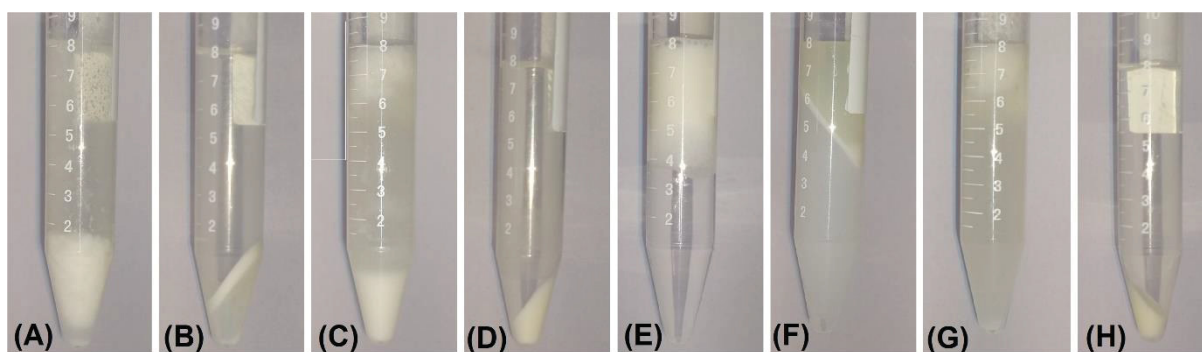
Desse modo, a etapa de ajuste de pH não foi considerada para o procedimento final. Avaliou-se em seguida o efeito da adição de solventes orgânicos na amostra, que pode promover mais de um fenômeno, como (i) a quebra das micelas pela separação das subunidades de caseína, (ii) remoção dos analitos das gotículas da emulsão pelo aumento de solubilidade na fase líquida, e (iii) intumescimento das cadeias poliméricas, que também pode contribuir para a liberação dos compostos para o meio.

Foram avaliados 7 solventes puros dentre os quais: acetonitrila, metanol, etanol, isopropanol, tetraidrofurano, acetato de etila e diclorometano, além de 3

misturas de solventes ACN:THF (1:1, v/v), THF:ACE (1:1, v/v) e THF:DCM (1:1, v/v). O metanol foi adicionado à amostra em proporção de 1:1 (v/v), centrifugado e teve o sobrenadante submetido ao processo de extração. Devido ao aumento da solubilidade dos analitos na amostra pela adição do metanol, a fase sorvente não foi capaz de extrair os compostos, bem como não foi possível identificar se a interação dos analitos mais hidrofóbicos com os componentes da matriz foi quebrada. Esse fenômeno também foi observado para os solventes ACN, etanol, isopropanol e THF, quando esses não foram completamente evaporados da amostra, mesmo empregando-se adição de sal no extrato.

Então, uma etapa de evaporação do solvente a 60 °C foi incluída, juntamente com a filtração do sobrenadante com filtro seringa PTFE (0,22 µm) para evitar o entupimento do dispositivo de extração. Além dos solventes puros, ACN, THF, isopropanol, acetato de etila e DCM, foram empregadas as misturas de solventes citadas acima. A FIGURA 32 traz fotografias que representam os diferentes comportamentos obtidos na etapa de precipitação (antes e após centrifugação) das proteínas empregando-se solventes puros ou misturas.

FIGURA 32 – FOTOGRAFIAS DA PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS ANTES (A, C, E, G) E APÓS A CENTRIFUGAÇÃO (B, D, F, H) EMPREGANDOS OS SOLVENTES: (A-B) ACN; (C-D) ISOPROPANOL; (E-F) DCM; (G-H) ACN:THF (1:1, v/v).

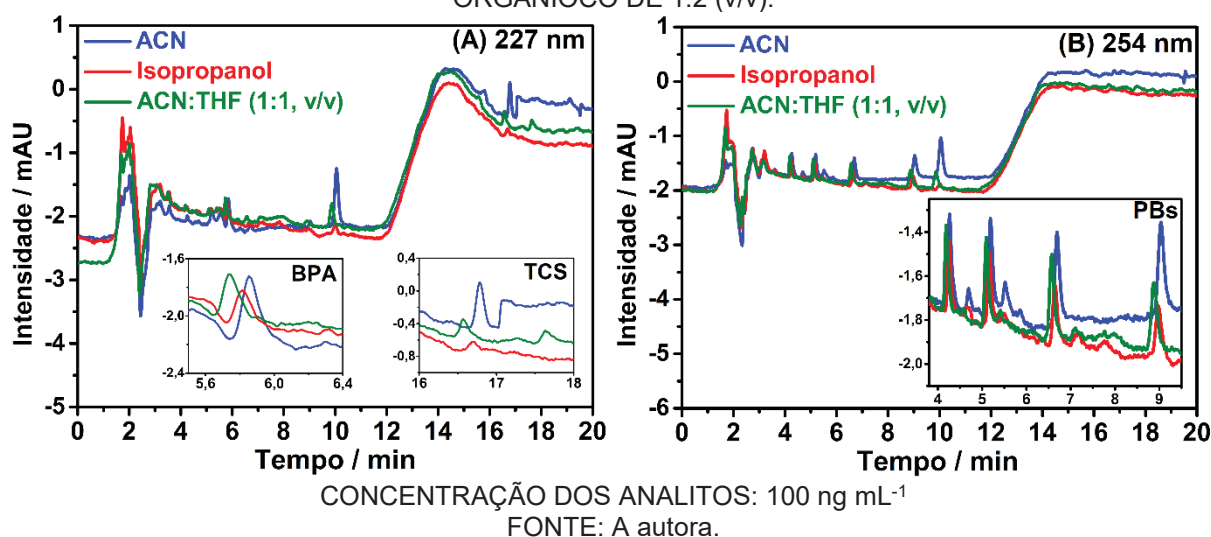


FONTE: A autora.

As fotografias (E) e (F) da FIGURA 32 correspondem ao uso do DCM, cujo comportamento foi o mesmo para o acetato de etila e as misturas desses solventes com o THF. O DCM e o acetato de etila, que são solventes mais apolares, foram utilizados na expectativa de proporcionar maior solubilização da fração lipídica do leite. Entretanto, após a etapa de centrifugação, observou-se a formação de duas fases líquidas, uma faixa branca, entre as duas fases líquidas, e um gel, o qual dificultou a remoção das fases líquidas para posterior evaporação.

O THF puro não promoveu melhora na eficiência de extração dos compostos hidrofóbicos e o pico do TCS não foi observado. Todavia, a mistura de ACN:THF (1:1, v/v), na proporção de leite para solvente igual a 1:2 (v/v), promoveu um aumento de área de pico para os compostos de maior $\log K_{ow}$, inclusive para o TCS, cujo pico não tinha sido observado nos resultados anteriores. Além da mistura ACN:THF (1:1, v/v), a ACN e o isopropanol puros também foram capazes de reduzir a interação dos analitos mais hidrofóbicos com os componentes da amostra. A FIGURA 33 mostra os cromatogramas obtidos após extração empregando precipitação das proteínas com ACN, isopropanol ou mistura de ACN:THF (1:1, v/v) com proporção de leite:solvente orgânico de 1:2 (v/v).

FIGURA 33 – CROMATOGRAMAS OBTIDOS APÓS PRECIPITAÇÃO DAS PROTEÍNAS COM ACN, ISOPROPRANOL E MISTURA DE ACN:THF (1:1, v/v) COM PROPORÇÃO DE LEITE:SOLVENTE ORGÂNICO DE 1:2 (v/v).



O solvente que resultou nos maiores picos cromatográficos para todos os analitos foi a ACN, como pode ser observado na FIGURA 33, seguido pela mistura de ACN:THF (1:1, v/v) e o isopropanol, respectivamente. A presença de solvente orgânico na amostra aumentou a solubilidade tanto dos analitos mais hidrofílicos quanto dos mais hidrofóbicos, portanto, a etapa de evaporação de solvente foi essencial para permitir a sorção dos analitos pelo hidrogel de PVOH em quantidades detectáveis.

Sem a precipitação das proteínas da fórmula infantil, o perfil crescente de tamanho de pico em função da hidrofobicidade dos parabenos obtido para a água ultrapura se inverte, com o MPB e EPB apresentando as maiores eficiências de extração (em termos de área de pico). Quando a precipitação é realizada com ACN,

o processo de extração torna-se mais eficiente conforme a solubilidade dos compostos em água diminui, exceto para o TCS. As áreas de pico obtidas para a fórmula infantil foram inferiores às alcançadas em água ultrapura, o que era esperado devido à diferença de complexidade das matrizes. Os analitos cujos resultados para a fórmula infantil estão mais próximos aos obtidos em água ultrapura foram o BPA, o MPB e o EPB, com 83, 75 e 68 %, respectivamente, das áreas alcançadas em água ultrapura. Para o PPB, BPB, DES e TCS, esses valores foram iguais 57, 44, 33 e 5 %, respectivamente.

A etapa de limpeza do capilar com 2 injeções de 250 μ L de água ultrapura foi reavaliada, pois observou-se a dessorção dos analitos pela água ao empregar 2 lavagens, o que resultou em menores áreas de pico em relação ao uso de 1 lavagem. Essa dessorção foi maior para os analitos de menor $\log K_{o/w}$, uma vez que possuem maior afinidade pela água. O uso de 2 lavagens causou reduções de área de pico iguais a: 65 % para o BPA, 50 % para o MPB e EPB, 36 % para o BPB, 20 % para o PPB, 19 % para o DES e 17 % para o TCS.

Ainda com relação a lavagem do capilar, avaliou-se o uso de solução salina (NaCl 5 %, m/v) na segunda limpeza ao invés de água, com o intuito de diminuir a solubilidade dos analitos pelo aumento da força iônica do meio e, conseqüentemente, reduzir a dessorção dos compostos de interesse da fase sorvente. Todavia, essa abordagem acarretou a diminuição da solubilidade dos componentes endógenos da matriz, os quais foram mais retidos pela fase sorvente e acabaram sendo carregados para a coluna analítica, o que resultou em um aumento de 4 a 10 vezes (dependendo do λ) na intensidade do pico desses componentes, em relação ao uso de 1 lavagem. Além disso, as áreas de pico obtidas para os analitos com o uso da solução salina foram iguais às áreas referentes ao uso da água na segunda lavagem. Portanto, com base nos resultados apresentados anteriormente e no fato de não ter havido elevação da pressão do sistema de LC ao longo do seu uso e/ou dano à separação cromatográfica devido à injeção de maiores quantidades de proteínas, optou-se por empregar apenas uma etapa de lavagem do capilar para garantir maior detectabilidade aos compostos com menor $\log K_{o/w}$.

Então, em suma, as melhores condições obtidas nos estudos preliminares de precipitação de proteínas e lavagem do capilar foram: precipitação com acetonitrila na proporção 1:2 (leite:ACN, v/v), centrifugação por 10 min a 4400 rpm, evaporação do solvente e 1 lavagem do capilar com água ultrapura. A partir dessas

condições prévias, montou-se um planejamento fatorial 2^3 com triplicata do ponto central, no qual foram estudados os parâmetros: proporção de leite:ACN ((-) 1:1 e (+) 1:2, v/v), adição de sal no extrato ((-) 0 % e (+) 10 %, m/v) e tempo de agitação ((-) 30 s e (+) 120 s). A TABELA 16 mostra as condições empregadas em cada ensaio juntamente com as respostas obtidas em termos de área de pico.

TABELA 16 – RESPOSTAS OBTIDAS NO PLANEJAMENTO FATORIAL 2^3 COM PONTO CENTRAL PARA O PRÉ PREPARO DA AMOSTRA DE FÓRMULA INFANTIL.

Ensaio	ACN ¹	NaCl ²	t ³	Área do pico cromatográfico						
				MPB	EPB	BPA	PPB	BPB	DES	TCS
1	-	-	-	0,19	0,18	0,21	0,19	0,22	0,15	0,17
2	+	-	-	0,091	0,098	0,083	0,12	0,086	0,055	0,027
3	-	+	-	0,14	0,16	0,17	0,21	0,17	0,084	0,09
4	+	+	-	0,13	0,12	0,064	0,15	0,089	0,053	0,025
5	-	-	+	0,084	0,10	0,15	0,18	0,18	0,13	0,13
6	+	-	+	0,080	0,084	0,069	0,11	0,065	0,029	0,012
7	-	+	+	0,15	0,16	0,20	0,22	0,22	0,089	0,090
8	+	+	+	0,13	0,12	0,083	0,12	0,065	0,043	-
Média do PC				0,098	0,079	0,043	0,058	0,031	0,025	-
Estimativa do desvio padrão do PC				0,002	0,003	0,009	0,004	0,001	0,004	-

1. Proporção de leite:acetonitrila (v/v); 2. Concentração de NaCl; 3. Tempo de agitação. PC: ponto central.

FONTE: A autora.

A seleção dos níveis da proporção de leite:acetonitrila foi baseada em trabalhos da literatura^[82,97] e em experimentos prévios, que avaliaram as proporções de 1:0,5, 1:0,75, 1:1, 1:1,5, 1:2 e 1:3. Essa faixa de valores foi estudada com a finalidade de obter o menor volume de solvente orgânico capaz de proporcionar a maior resposta em termos de área de pico. As proporções de leite:acetonitrila de 1:0,5 e 1:0,75 não foram capazes de precipitar as proteínas adequadamente, resultando em material sólido no sobrenadante mesmo após a centrifugação, essas amostras não foram injetadas no sistema cromatográfico. O aumento no volume de acetonitrila na proporção 1:3 (leite:acetonitrila) não acarretou maiores áreas de pico, em relação à 1:2. Portanto, as proporções de 1:1 e 1:2 foram selecionadas como os níveis inferior e superior, respectivamente, e 1:1,5 como ponto central. A adição de NaCl no extrato reconstituído teve o propósito de diminuir a solubilidade dos analitos na amostra e favorecer a sua sorção na fase de PVOH, por meio do processo de

salting out. O tempo de agitação com vórtex foi estudado para se obter maior frequência analítica pela redução do tempo empregado nessa etapa.

Como pode ser observado na TABELA 16, as maiores áreas de pico foram obtidas no ensaio 1, que empregou proporção de 1:1 (leite:acetonitrila, v/v), agitação em vórtex por 30 s e não foi feita a adição de NaCl. A exceção é o PPB, que apresentou maior área de pico para o ensaio 7, no qual foi utilizada proporção de 1:1 (leite:acetonitrila, v/v), agitação em vórtex por 120 s e adição de 10 % (m/v) de NaCl, entretanto, esse valor de área foi próximo ao obtido no ensaio 1. O ponto central apresentou as menores áreas de pico para os analitos de maior $\log K_{o/w}$, sendo que o pico do TCS não foi observado nos cromatogramas gerados para essa condição, conforme observado na TABELA 16. A proporção de 1:1,5 empregada no ponto central gerou um precipitado menos compactado, isso dificultou a separação das fases e a presença de material floculado foi observada no extrato, mas esse material foi redisperso após agitação em vórtex. Como os analitos mais apolares e em especial o TCS apresentam alta interação com as proteínas do leite, a maior quantidade de material floculado rico em proteínas no extrato do ponto central (proporção 1:1,5) pode ter dificultado a extração desses compostos.

Os efeitos principais e de interação foram calculados e comparados com a estimativa do desvio padrão do ponto central associada ao valor t de student para 95 % de confiança e 2 graus de liberdade ($t_{95\%, v=2} = 4,303$). A TABELA 17 mostra os valores obtidos para os efeitos principais e de interação, com os efeitos estatisticamente significativos destacados em negrito.

TABELA 17 – EFEITOS PRINCIPAIS E DE INTERAÇÃO DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2^3 COM PONTO CENTRAL.

Analitos	s x t	Efeitos / 10^{-2}						
		Principais			Interação			
		ACN	NaCl	t	ACNxNaCl	ACNxxt	NaClxt	ACNxNaClxt
MPB	1,1	-3,32	2,82	-2,70	1,62	2,25	2,97	-2,35
EPB	1,7	-4,37	2,87	-2,20	0,462	1,42	2,18	-1,49
BPA	4,1	-10,9	0,232	-0,521	-0,522	0,779	3,31	-1,66
PPB	1,9	-7,78	2,32	-1,11	-0,609	-1,05	0,321	-0,806
BPB	0,48	-12,1	-0,0215	-0,521	0,215	-1,44	2,16	-2,32
DES	1,7	-6,77	-2,32	-1,11	2,92	-0,683	0,914	-0,0868
TCS	-	-10,4	-3,39	-1,89	2,69	-0,0800	0,612	-1,14

s x t: estimativa do desvio padrão do ponto central associada ao valor t de student. $t_{95\%, v=2} = 4,303$.

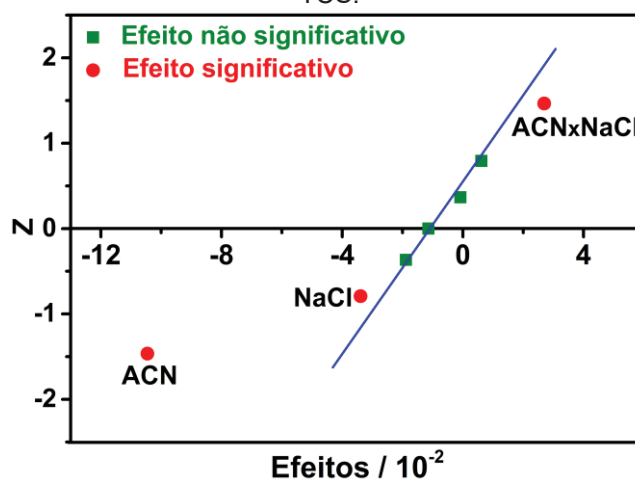
Os efeitos significativos com nível de confiança de 95 % estão destacados em negrito.

FONTE: A autora.

De acordo com os resultados mostrados na TABELA 17, os analitos MPB e BPB apresentaram efeitos estatisticamente significativos de interação terciária e secundária, enquanto para o DES apenas o efeito de interação secundário entre a proporção de leite:acetonitrila e adição de NaCl foi estatisticamente significativo. Desse modo, para os analitos que apresentaram efeitos de interação, o estudo das variáveis proporção de leite:acetonitrila, adição de NaCl e tempo de agitação não deve ser realizado de forma univariada. Para os analitos EPB, BPA e PPB somente os efeitos principais foram estatisticamente significativos. O efeito da proporção leite:acetonitrila contribuiu para a redução das áreas de pico com o aumento da proporção de 1:1 (-) para 1:2 (+), além disso, o efeito dessa variável apresentou maior peso em relação aos demais efeitos, como pode ser visto na TABELA 17.

A condição empregada no ponto central não permitiu a extração do TCS, desse modo não foi possível obter a estimativa do desvio padrão para esse analito. Então, para o TCS utilizou-se o gráfico de distribuição normal padronizado para determinar se os efeitos obtidos para o TCS foram estatisticamente significativos. A FIGURA 34 mostra o gráfico de distribuição normal padronizado para os efeitos do TCS, onde são mostrados os valores padronizados de Z em função dos efeitos.

FIGURA 34 – GRÁFICO DE DISTRIBUIÇÃO NORMAL DOS EFEITOS PADRONIZADOS PARA O TCS.

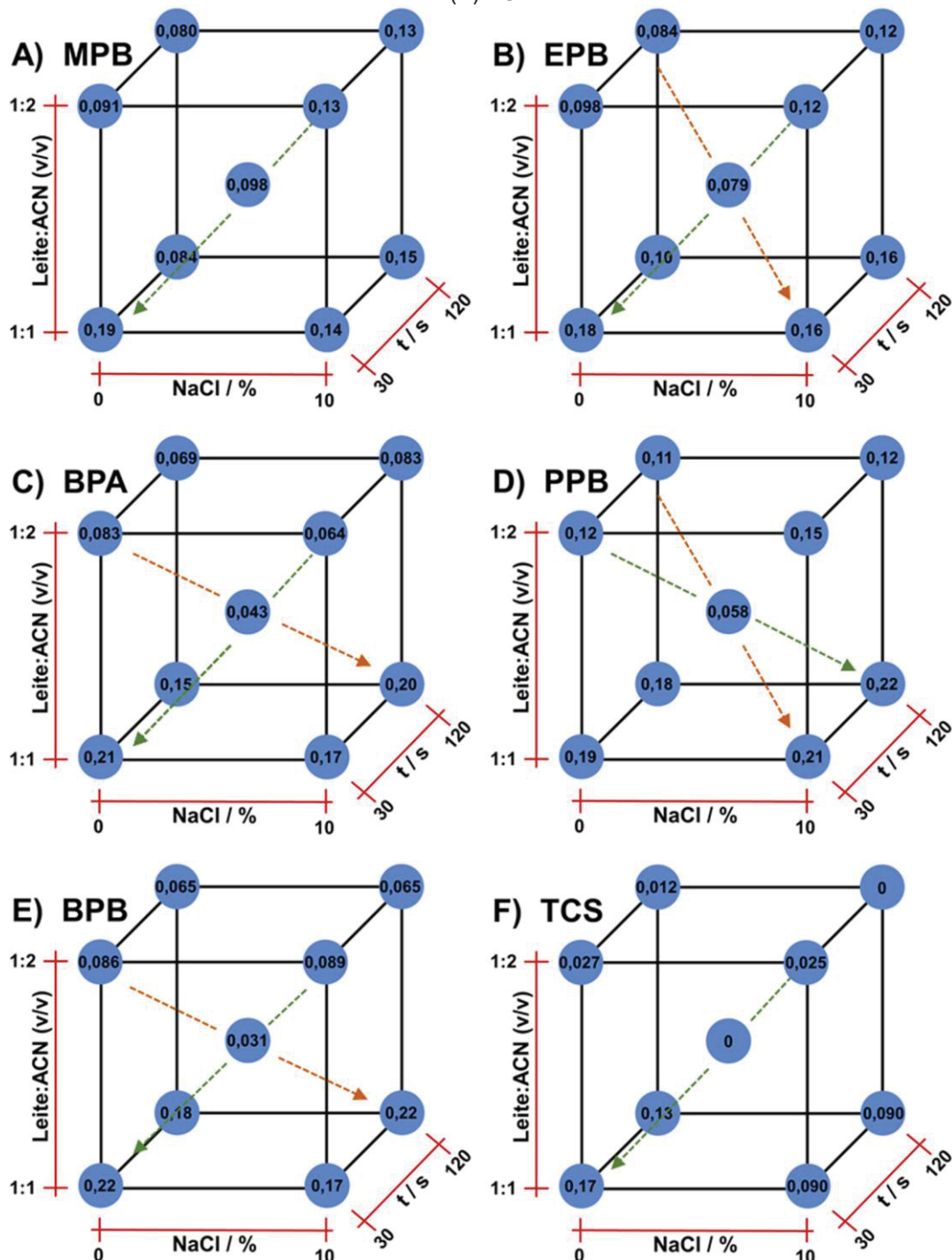


FONTE: A autora.

No gráfico da FIGURA 34, a reta em azul destaca a tendência dos efeitos, desse modo os efeitos representados em verde no gráfico não são considerados estatisticamente significativos, uma vez que seguem uma distribuição normal de erros aleatórios. Os valores dos efeitos de proporção de leite:acetonitrila (ACN), adição de sal (NaCl) e da interação entre proporção de leite:acetonitrila e adição de

sal (ACN:NaCl) apresentam variações maiores em relação à tendência observada, desse modo, assume-se que esses efeitos destacados em vermelho no gráfico da FIGURA 34 são estatisticamente significativos para o TCS. A FIGURA 35 mostra as representações geométricas dos efeitos obtidas para cada analito.

FIGURA 35 – REPRESENTAÇÃO GEOMÉTRICA DOS EFEITOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2^3 COM PONTO CENTRAL PARA OS ANALITOS (A) MPB, (B) EPB, (C) BPA, (D) PPB, (E) BPB E (F) TCS.



FONTE: A autora.

Como pode ser observado na FIGURA 35, a condição do ensaio 1 (1:1 leite:ACN; 0 % de NaCl; 30 s) apresenta uma tendência de maiores áreas de pico para todos os analitos, exceto o PPB que obteve maiores áreas de pico para os ensaios 3 e 7 que empregaram a adição de sal no extrato. Para os analitos EPB, BPA, PPB e BPB, a adição de sal tendeu a favorecer a extração desses compostos, como pode ser observado pelas setas laranjas nas representações geométricas da FIGURA 35. O aumento do tempo de agitação foi benéfico para o BPB em associação com a adição de NaCl, no entanto o valor de área de pico obtido foi igual à condição do ensaio 1, que emprega menor tempo e não utiliza o sal. Para todos os analitos, as menores áreas de picos foram obtidas para os ensaios que empregaram maiores quantidades de acetonitrila (proporções 1:1,5 e 1:2, leite:ACN v/v). O padrão interno (DES) apresentou comportamento semelhante aos demais analitos, com o favorecimento da extração empregando-se menores quantidades de acetonitrila e menores tempos.

Com base nesses resultados, o método de precipitação de proteínas empregado para a fórmula infantil nas etapas seguintes deste trabalho consistiu na adição de acetonitrila na proporção 1:1 (leite:ACN, v/v) à 3 mL de amostra, agitação em vórtex por 30 s, seguida de centrifugação por 10 min a 4400 rpm, o sobrenadante foi removido e seco com fluxo de N₂ até aproximadamente 1,5 mL. O extrato foi avolumado para 3 mL com água ultrapura, agitado em vórtex por 10 s e encaminhado para extração por *in-tube* SPME.

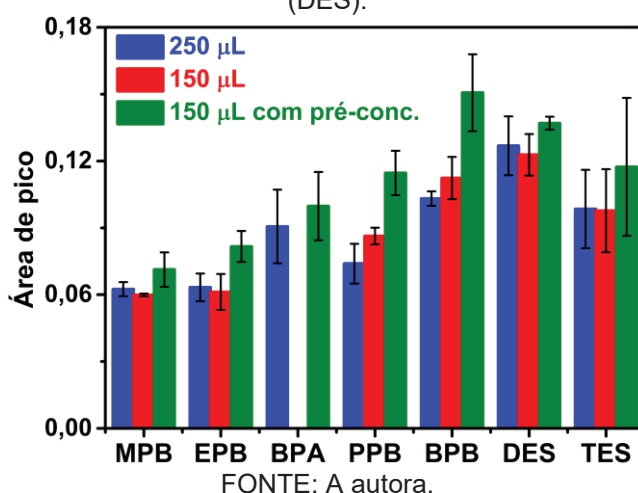
4.6 OTIMIZAÇÃO DA *IN-TUBE* SPME

Após a seleção das condições da etapa de precipitação de proteínas, estudou-se as condições empregadas na *in-tube* SPME de forma univariada, com o intuito de obter um procedimento que garantisse eficiência de extração com menor tempo de análise e baixo consumo de amostra e solventes orgânicos. As variáveis avaliadas foram: volume de amostra injetado no capilar, número de injeções, solvente e tempo de dessorção dos analitos. Todos os ensaios foram realizados com amostras de fórmula infantil enriquecidas com os analitos com concentração final de 100 ng mL⁻¹.

O volume interno do dispositivo de extração de 0,53 mm de diâmetro interno e 40 cm de comprimento é aproximadamente 88 µL, desconsiderando o volume ocupado pelo filme de PVOH. Como o volume de amostra injetado (250 µL) nos

ensaios discutidos anteriormente corresponde a quase três vezes o volume nominal do capilar, avaliou-se a possibilidade de redução do volume injetado. Foi avaliado o volume injetado de 150 μL , que foi comparado com o anterior de 250 μL . Também foi estudada a pré-concentração da amostra pela reconstituição do extrato para 2 mL ao invés de 3 mL, mantendo-se o volume inicial da amostra (3 mL) e injetando-se 150 μL . Todos esses ensaios foram conduzidos empregando-se 10 injeções do extrato no capilar e os resultados obtidos são apresentados no gráfico da FIGURA 36.

FIGURA 36– EFEITO DO VOLUME DE AMOSTRA E DA PRÉ-CONCENTRAÇÃO ($n = 3$) SOBRE AS ÁREAS DE PICOS DOS ANALITOS MPB, EPB, BPA, PPB, BPB E TCS E DO PADRÃO INTERNO (DES).

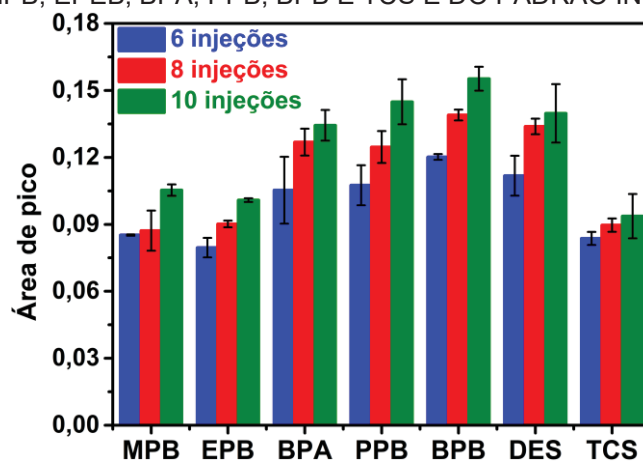


Observa-se no gráfico da FIGURA 36 que a redução do volume de 250 μL para 150 μL não acarretou diminuição das áreas de picos dos analitos. Para o BPA nota-se a ausência do valor da área de pico na condição de 150 μL , isso deve-se à presença de um interferente da amostra que coeluiu com o BPA impossibilitando a integração correta do pico desse analito. Ainda na FIGURA 36, observa-se que a pré-concentração da amostra resultou no aumento das áreas de pico para a maioria dos analitos. Portanto a condição que empregou volume injetado de 150 μL com pré-concentração do extrato (reconstituição para 2 mL) foi adotada para a continuação dos experimentos.

Com a seleção do volume injetado, estudou-se o número de injeções do extrato no capilar, uma vez que segundo a literatura esse parâmetro está linearmente relacionado a quantidade de matéria extraída do analito^[210]. As

condições avaliadas foram 6, 8 e 10 injeções de 150 μL e os resultados obtidos são apresentados na FIGURA 37.

FIGURA 37 – EFEITO DO NÚMERO DE INJEÇÕES ($n = 3$) SOBRE AS ÁREAS DE PICOS DOS ANALITOS MPB, EPB, BPA, PPB, BPB E TCS E DO PADRÃO INTERNO (DES).



FONTE: A autora.

Observa-se na FIGURA 37 que o uso de 10 injeções resultou em maiores áreas de picos, principalmente para os parabenos, analitos MPB, EPB, PPB e BPB. Para os compostos BPA, DES e TCS, as áreas de picos obtidas para 8 e 10 injeções praticamente não apresentam diferença e os valores estão dentro da mesma faixa de erro, o que pode indicar que a sorção desses compostos na fase de PVOH atingiu o equilíbrio. Os dados da FIGURA 37 indicam que no caso dos parabenos o equilíbrio não foi atingido com 10 injeções.

Conforme os resultados obtidos para as isotermas de sorção dos analitos em água (FIGURA 29), os parabenos (MPB, EPB e PPB) apresentam constantes de sorção menores, o que indica menor afinidade pela fase extratora e menor tempo para se atingir o equilíbrio. Por sua vez, o BPB e o BPA apresentam maiores constantes de sorção e, consequentemente, maior interação pela fase sorvente ou maior efeito solvofóbico, isso resulta em maior tempo para se atingir o equilíbrio. Apesar dessa tendência esperada, os resultados para a extração dos analitos da fórmula infantil mostram uma aparente inversão do comportamento sortivo, com os compostos menos polares atingindo o equilíbrio antes. Essa inversão pode estar relacionada com as menores concentrações disponíveis dos analitos menos polares, considerando a sua interação com os compostos endógenos, ou também com a característica mais apolar da matriz em relação à água.

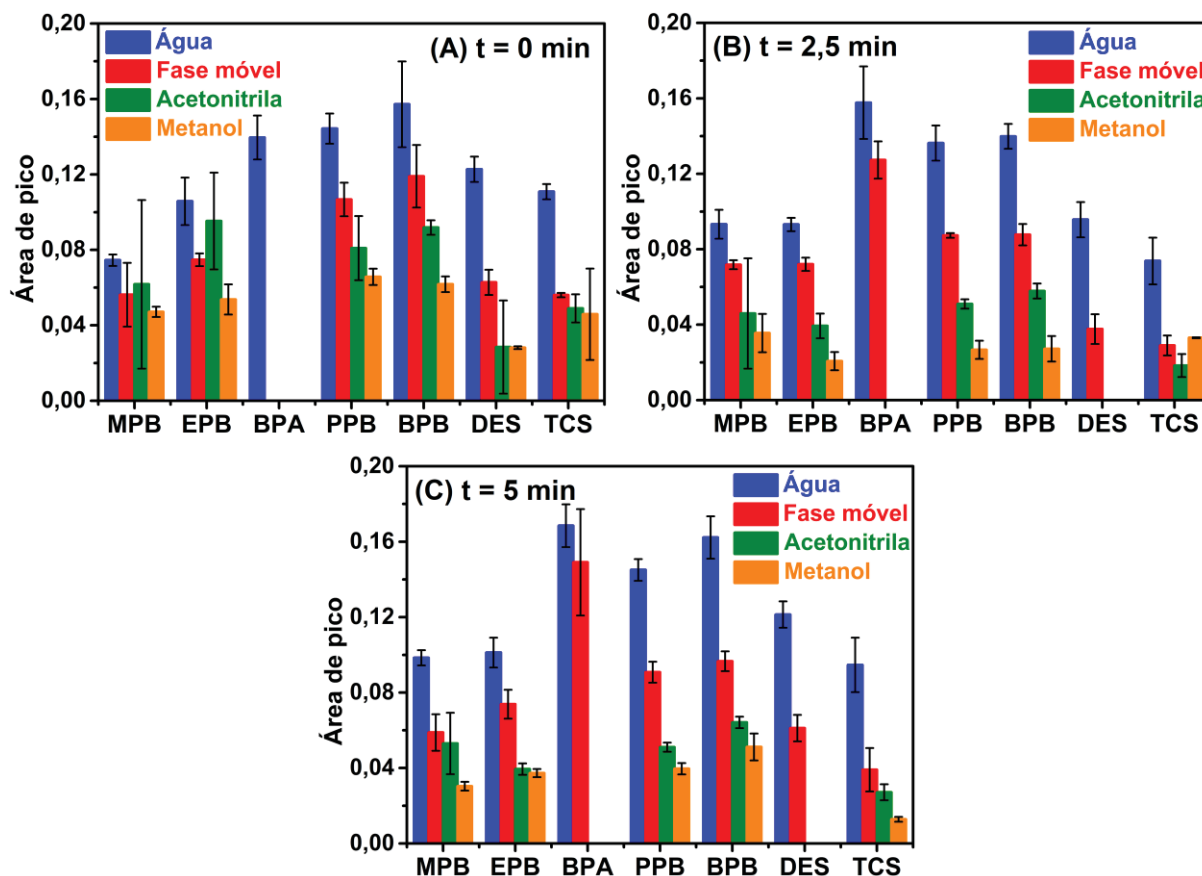
O uso de 10 injeções não foi suficiente para os parabenos atingirem o equilíbrio, no entanto a extração desses analitos foi eficiente e apresentou precisão adequada, com valores de RSD variando entre 0,8 e 3,4 %. Desse modo, a condição de 10 injeções foi selecionada para os estudos seguintes.

A etapa de lavagem do capilar (remoção do excesso de amostra) e dessorção dos analitos é realizada em uma única etapa, uma vez que se utiliza 250 µL de solvente, dos quais 162 µL removem a amostra remanescente no capilar e são descartados, enquanto 88 µL de solvente restantes dessorvem os analitos e são transportados pelo fluxo da fase móvel para a coluna analítica. Desse modo, o estudo do processo de dessorção dos analitos da fase sorvente foi realizado com intuito de garantir a completa dessorção dos compostos e minimizar perdas durante a lavagem do capilar. Para isso, avaliou-se como solvente de dessorção água, fase móvel (55% acetonitrila e 45 % água, v/v), acetonitrila e metanol, também foram estudados os tempos de dessorção de 0, 2,5 e 5 min. As áreas de pico obtidas para cada analito de acordo com o solvente de dessorção para os tempos (A) 0 min, (B) 2,5 min e (C) 5 min são apresentadas nos gráficos da FIGURA 38.

Ao observar a FIGURA 38, nota-se que as maiores áreas de pico foram obtidas para a dessorção dos analitos com água, independentemente do tempo empregado. O uso da fase móvel como solvente de dessorção apresentou o segundo melhor desempenho, em termos de área de pico, enquanto o uso de acetonitrila e o metanol resultaram nas menores áreas de picos. Com relação ao tempo de contato do solvente de dessorção com a fase extratora, a dessorção com água foi favorecida conforme o tempo de contato com a fase de PVOH aumentou (2,5 min e 5 min), enquanto para a acetonitrila e o metanol houve redução das áreas de pico para os tempos de 2,5 e 5 min, em relação ao tempo 0 min.

No tempo 0 min, as menores áreas de pico foram obtidas na dessorção com metanol ou acetonitrila em relação aos demais solventes, isso pode ser resultado de maior dessorção dos analitos na etapa de lavagem do capilar devido à maior força de eluição desses solventes, em relação a fase móvel e a água. Nesse sentido, a água apresenta menor força de eluição dentre os solventes estudados e a perda dos analitos é menor durante a lavagem do capilar, todavia essa menor força de eluição faz com que os analitos dessorvam mais lentamente causando o alargamento da banda de eluição, e como consequência são obtidos picos mais largos e com caudas.

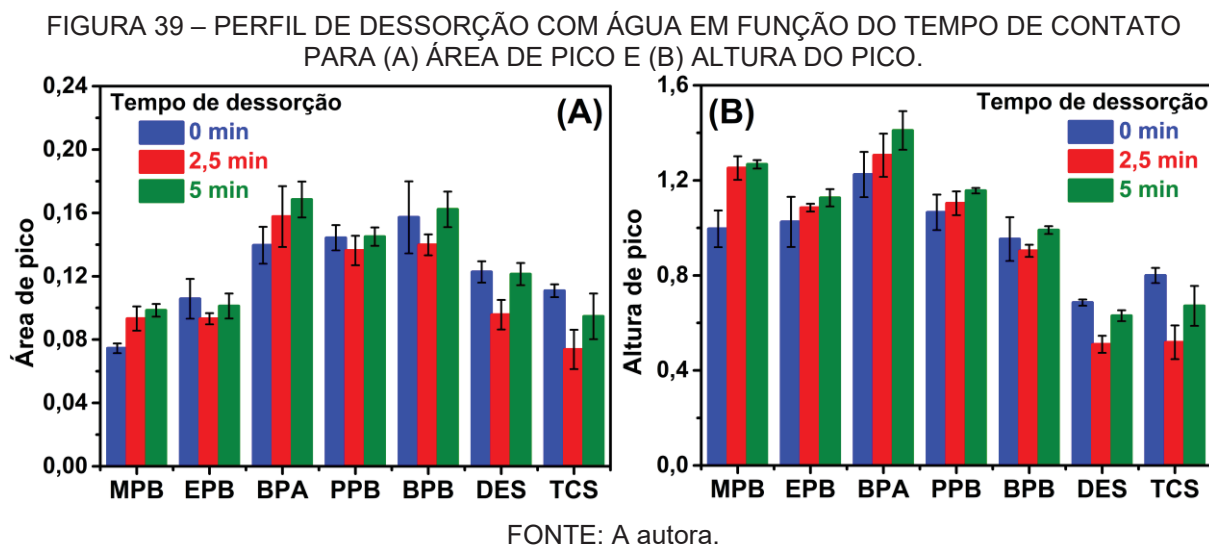
FIGURA 38 – PERFIL DE DESSORÇÃO EM FUNÇÃO DO SOLVENTE E TEMPO DE CONTATO (n = 3) SOBRE AS ÁREAS DE PICOS DOS ANALITOS MPB, EPB, BPA, PPB, BPB E TCS E DO PADRÃO INTERNO (DES).



FONTE: A autora.

Para os três tempos de dessorção a etapa de lavagem do capilar é a mesma, no entanto para o metanol e a acetonitrila há uma redução nos valores de área de pico. Esse fato pode estar relacionado ao intumescimento da fase sorvente, uma vez que a quantidade de solvente absorvida pela rede do hidrogel diminui com o aumento do teor de solvente orgânico, podendo causar o colapso da rede quando se atinge 100 % de solvente orgânico, como discutido no item 3.10. Desse modo, maiores tempos de contato da fase de PVOH com o metanol ou a acetonitrila podem ter provocado o fechamento da rede do hidrogel, e como consequência os analitos foram aprisionados no interior da rede, dificultando o processo de dessorção. Como mencionado na Introdução, os hidrogéis são amplamente utilizados em sistemas de liberação controlada de fármacos, justamente devido a capacidade de prender e liberar solutos da sua rede.

Uma vez que o uso da água resultou nas maiores áreas de pico para todos os compostos, esse foi o solvente selecionado para a dessorção dos analitos da fase sorvente. Para a seleção do tempo de dessorção, foram avaliadas a altura e a presença de caudas nos picos, além dos valores de áreas. A FIGURA 39 mostra os resultados obtidos em termos de (A) área e (B) altura de pico para a dessorção dos analitos com água em diferentes tempos.



Observa-se na FIGURA 39A que as áreas de pico dos analitos EPB, PPB, BPB e DES praticamente não se diferem para os tempos de 0 min e 5 min, enquanto para 2,5 min os valores de área tendem a ser menores. Para o MPB e o BPA, há uma tendência de aumento da área de pico com o aumento do tempo de dessorção, em contrapartida a dessorção do TCS aparenta ser beneficiada pelo menor tempo de contato (0 min). Analisando-se os valores de altura de pico mostrados na FIGURA 39B, nota-se que para os analitos MPB, EPB, BPA e PPB, o aumento do tempo de contato da água com a fase sorvente tende a gerar picos mais intensos, o que pode ser devido ao estreitamento da banda de eluição. Para o BPB, o DES e o TCS, maiores tempos de contato (2,5 min e 5 min) não promoveram aumento da altura dos picos.

As caudas presentes nos picos dos parabenos, especialmente do MPB e EPB, foram reduzidas ao empregar maiores tempos de dessorção, o que facilita a integração do pico e diminuiu o erro. Esse fato é de especial interesse para a determinação dos parabenos em concentrações menores, uma vez que a presença de caudas pode diminuir a detectabilidade desses compostos. Considerando a

melhora da simetria dos picos e consequentemente o aumento da altura, a condição de 5 min foi selecionada como tempo de dessorção, uma vez que na prática esse processo se inicia ao final da análise anterior, de forma que não há acréscimo no tempo total da análise. O processo de extração por *in-tube* SPME e análise cromatográfica leva 23 min, dos quais 20 min correspondem à separação cromatográfica e detecção espectrofotométrica, e 3 min são utilizados para o reequilíbrio do sistema de LC, portanto, independentemente do número de amostras a serem analisadas, o tempo gasto para a *in-tube* SPME é de aproximadamente 5 min, que corresponde ao tempo de extração da primeira amostra.

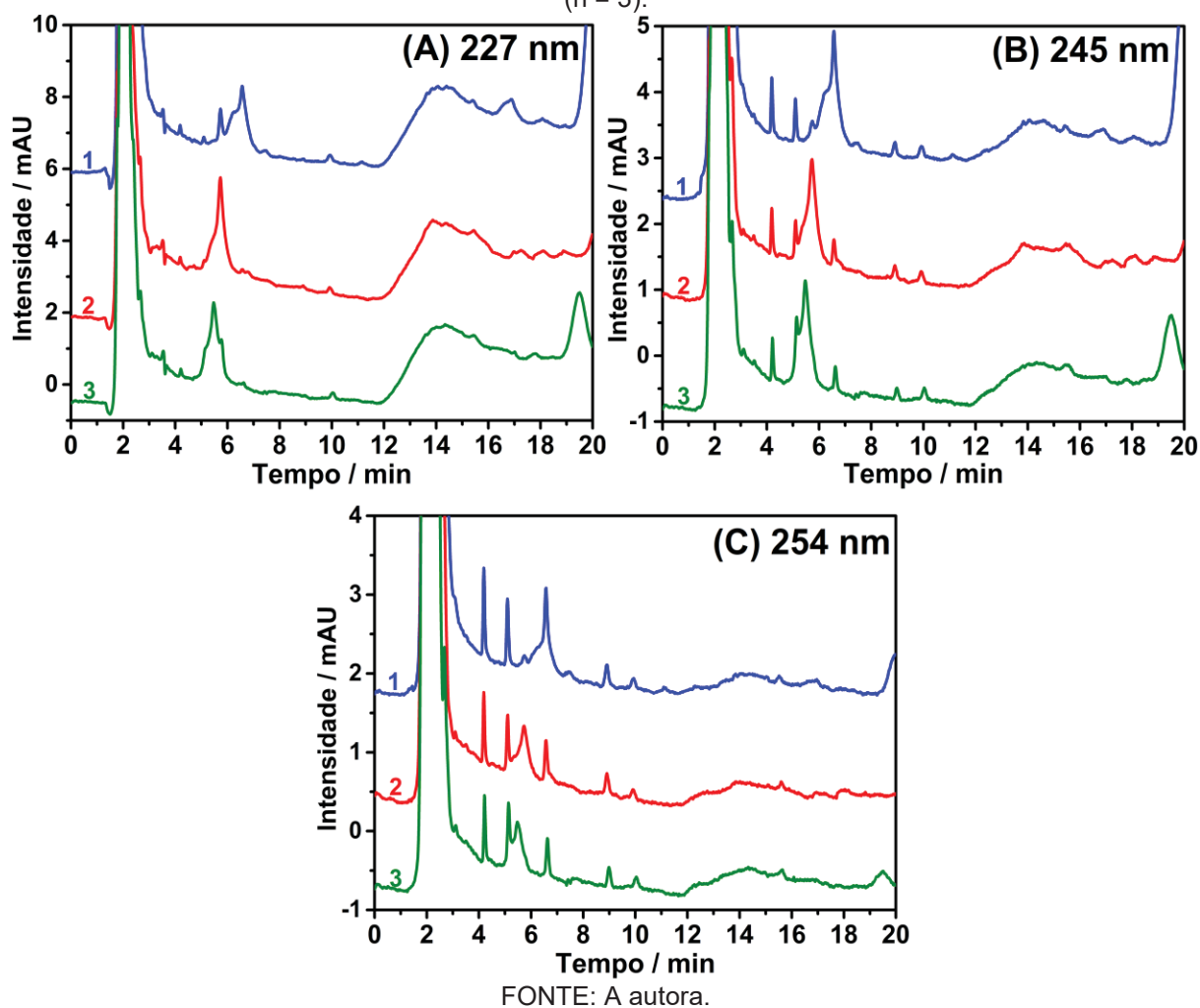
Com base nos resultados discutidos anteriormente, o procedimento otimizado para a *in-tube* SPME consistiu na injeção de 10 alíquotas de 150 μL do extrato pré-concentrado (reconstituição para 2 mL), seguido da injeção de 250 μL de água ultrapura, que permaneceu em contato com a fase sorvente por 5 min, e mudança da posição da válvula do injetor manual de carregar para injetar. As condições selecionadas foram utilizadas para a extração de amostras de leite humano enriquecidas com os analitos, cujos resultados são apresentados no item a seguir.

4.7 LEITE HUMANO

Amostras branco de leite humano foram enriquecidas com 100 ng mL^{-1} dos analitos e a precipitação de proteínas foi realizada conforme a condição ótima descrita no final do item 4.5, seguida pela extração por *in-tube* SPME com fase sorvente baseada em hidrogel de PVOH e analisadas por LC-UV, segundo a melhor condição, descrita no final do item 4.6. Os cromatogramas obtidos em diferentes comprimentos de onda ($n = 3$) são apresentados na FIGURA 41.

Na FIGURA 40 são mostrados os cromatogramas obtidos após análise em triplicata de uma mesma amostra branco de leite humano enriquecida com os analitos, nota-se nesses cromatogramas a presença de alguns interferentes da amostra, entre 5 e 7 min e após 13 min. Com as condições empregadas na etapa de pré-preparo da amostra selecionadas anteriormente para a fórmula infantil não foi possível eliminar os interferentes eluídos entre 5 e 7 min, cujo tempo de retenção apresentou variações entre uma análise e outra, como pode ser visto nos cromatogramas da FIGURA 40.

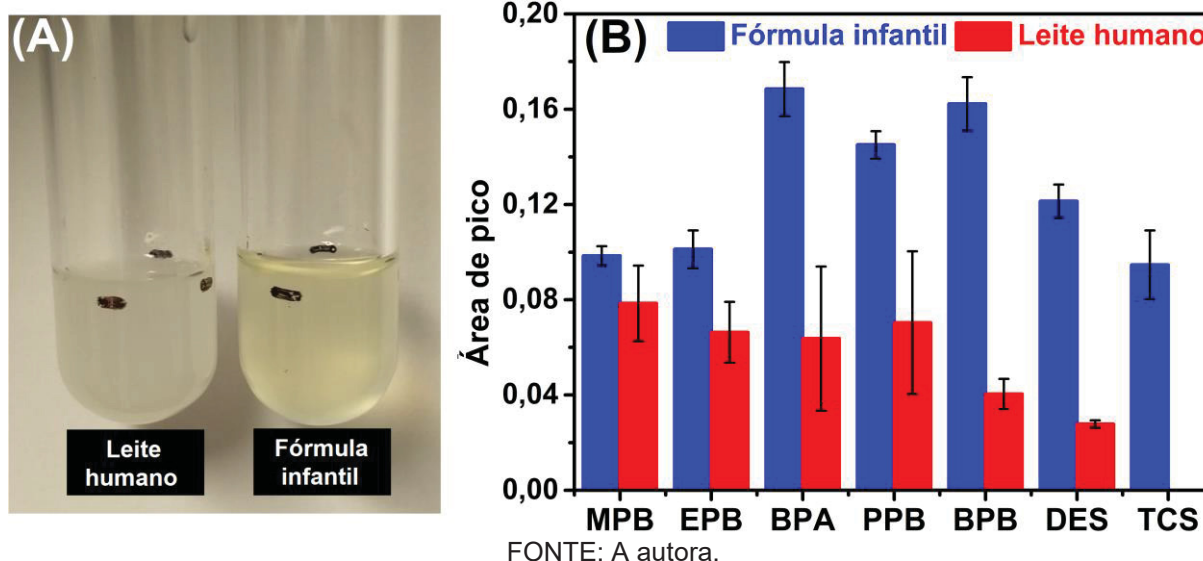
FIGURA 40 – CROMATOGRAMAS OBTIDOS APÓS A EXTRAÇÃO DE AMOSTRA DE LEITE HUMANO BRANCO ENRIQUECIDA COM OS ANALITOS EM CONCENTRAÇÃO DE 100 ng mL^{-1} ($n = 3$).



FONTE: A autora.

A variação no tempo de retenção desses interferentes ocasionou a sua coeluição com os analitos EPB, BPA e/ou PPB, impossibilitando a integração do pico de um ou mais de um desses analitos em cada uma das três análises. Além da presença de interferentes, a eficiência da extração para o leite humano diminuiu com o aumento do $\log K_{o/w}$ dos analitos, em relação à fórmula infantil, sendo que o pico do TCS não pôde ser identificado nos cromatogramas. A FIGURA 41 mostra (A) fotografia dos extratos obtidos para leite humano e fórmula infantil e (B) áreas de pico obtidas após extração dos analitos de fórmula infantil (azul) e de leite humano (vermelho).

FIGURA 41 – (A) EXTRATOS RECONSTITUÍDOS; (B) ÁREAS DE PICO PÓS EXTRAÇÃO PARA FÓRMULA INFANTIL E LEITE HUMANO.



Na FIGURA 41A, observa-se a diferença entre os extratos obtidos para o leite humano e a fórmula infantil, o primeiro com coloração esbranquiçada enquanto o segundo possui coloração amarelada, indicando qualitativamente diferenças de composição, mesmo após todos os processos de preparo de amostra. Ambos os extratos espalham luz visível (apresentam turbidez) indicando a formação de sistemas coloidais. Ao final da evaporação da amostra de leite humano na etapa de precipitação de proteínas foi observada a presença de um líquido oleoso (na forma de uma gota) que não evaporou, o qual suspeita-se ser constituído majoritariamente por lipídeos. Com a adição de água a esse líquido oleoso e agitação em vórtex forma-se uma emulsão, cuja característica macroscópica é a presença de turbidez, a qual também pode ser decorrente da presença de proteínas dispersas no extrato.

No gráfico da FIGURA 41B são comparadas as áreas de pico obtidas após a extração dos analitos da fórmula infantil e do leite humano. Nota-se que para as amostras de leite humano houve uma redução dos valores de área de pico, a qual torna-se mais pronunciada conforme o $\log K_{o/w}$ dos analitos aumenta. Além disso, observa-se um aumento do erro, quando se extrai os analitos do leite humano em comparação com a fórmula infantil. O leite humano apresentou maior efeito matriz do que a fórmula infantil, provavelmente devido a maior complexidade do leite humano cuja composição depende de fatores ligados à mãe (alimentação, genética, entre outros) e às necessidades do bebê. Todas essas diferenças observadas entre a fórmula infantil e o leite humano reforçam a complexidade das amostras e

necessidade de revisão dos procedimentos, descritos anteriormente para a fórmula infantil, para permitir a extração dos compostos do leite humano.

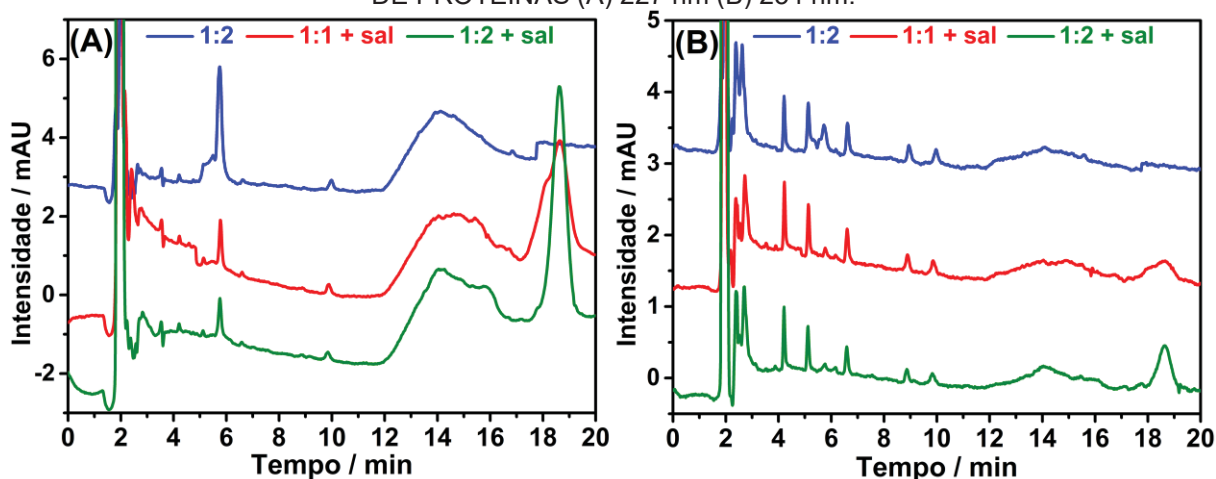
Como discutido anteriormente, o maior efeito matriz para os compostos mais apolares tem relação com a presença de proteínas e lipídeos na amostra. A metodologia de precipitação de proteínas empregada para a fórmula infantil não foi suficiente para minimizar o efeito matriz do leite humano. Além disso, acredita-se que a maior concentração de lipídeos no extrato final também contribuiu para a menor eficiência de extração dos analitos mais apolares. Assim, foram avaliadas algumas modificações no pré-preparo da amostra, como aumento da proporção de leite:acetonitrila para 1:2, adição de sais (NaCl e MgSO_4) na etapa de precipitação de proteínas^[79] e a remoção de lipídeos com hexano^[87], com base em trabalhos similares da literatura.

Para a remoção dos lipídeos apolares da amostra foi utilizada uma etapa de limpeza com hexano baseada nos trabalhos de Kang e Kondo^[211] e Zimmers e colaboradores^[87]. Para isso, adicionou-se hexano à mistura de leite e acetonitrila, sendo o volume adicionado igual à soma dos volumes do leite e de acetonitrila para evitar que uma das fases fosse majoritária, o que possivelmente levaria à formação de emulsão com a fase minoritária dispersa. Essa etapa de limpeza foi realizada para as proporções de 1:1 e 1:2 (leite:acetonitrila, v/v). A etapa de remoção de lipídeos com hexano não promoveu aumento das áreas de picos dos analitos, no caso da proporção 1:1 (leite:acetonitrila, v/v) houve redução nas áreas de pico de cerca de 40 % para o MPB, EPB e PPB, em relação ao procedimento otimizado para a fórmula infantil. Para a proporção 1:2 (leite:acetonitrila, v/v) a redução nas áreas de pico foi maior, chegando a quase 75 % para o MPB e o EPB, os demais analitos apresentaram reduções nas áreas de pico de 4 a 60 %. Desse modo, a remoção dos lipídeos com hexano não foi incluída na etapa de pré-preparo da amostra.

Vela-Soria e colaboradores^[79] utilizaram a técnica de QuEChERS para extrair parabenos e filtros ultravioleta de amostras de leite humano, neste trabalho os autores realizaram um estudo de otimização da proporção de leite:acetonitrila e adição de sal (NaCl e MgSO_4) por meio de um planejamento fatorial 2^3 . Vela-Soria e colaboradores^[79] observaram que o aumento do volume de acetonitrila acarretava em maiores rendimentos para a extração, enquanto a quantidade de sal adicionada não teve efeito sobre o rendimento. Com base nesse trabalho, avaliou-se o uso da proporção 1:2 leite:acetonitrila (1:2) e a adição de 150 mg de NaCl e 150 mg de

MgSO₄ (proporção de sal otimizada no trabalho de Vela-Soria e colaboradores^[79]) para a precipitação de proteínas do leite humano. Na FIGURA 42 são apresentados os cromatogramas obtidos para as condições: 1:2 leite:acetonitrila (azul); 1:1 leite:acetonitrila com adição de 150 mg de NaCl e 150 mg de MgSO₄ (vermelho); e 1:2 leite:acetonitrila com adição de 150 mg de NaCl e 150 mg de MgSO₄ (verde).

FIGURA 42 – CROMATOGRAMAS OBTIDOS PARA O AJUSTE DO MÉTODO DE PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS (A) 227 nm (B) 254 nm.



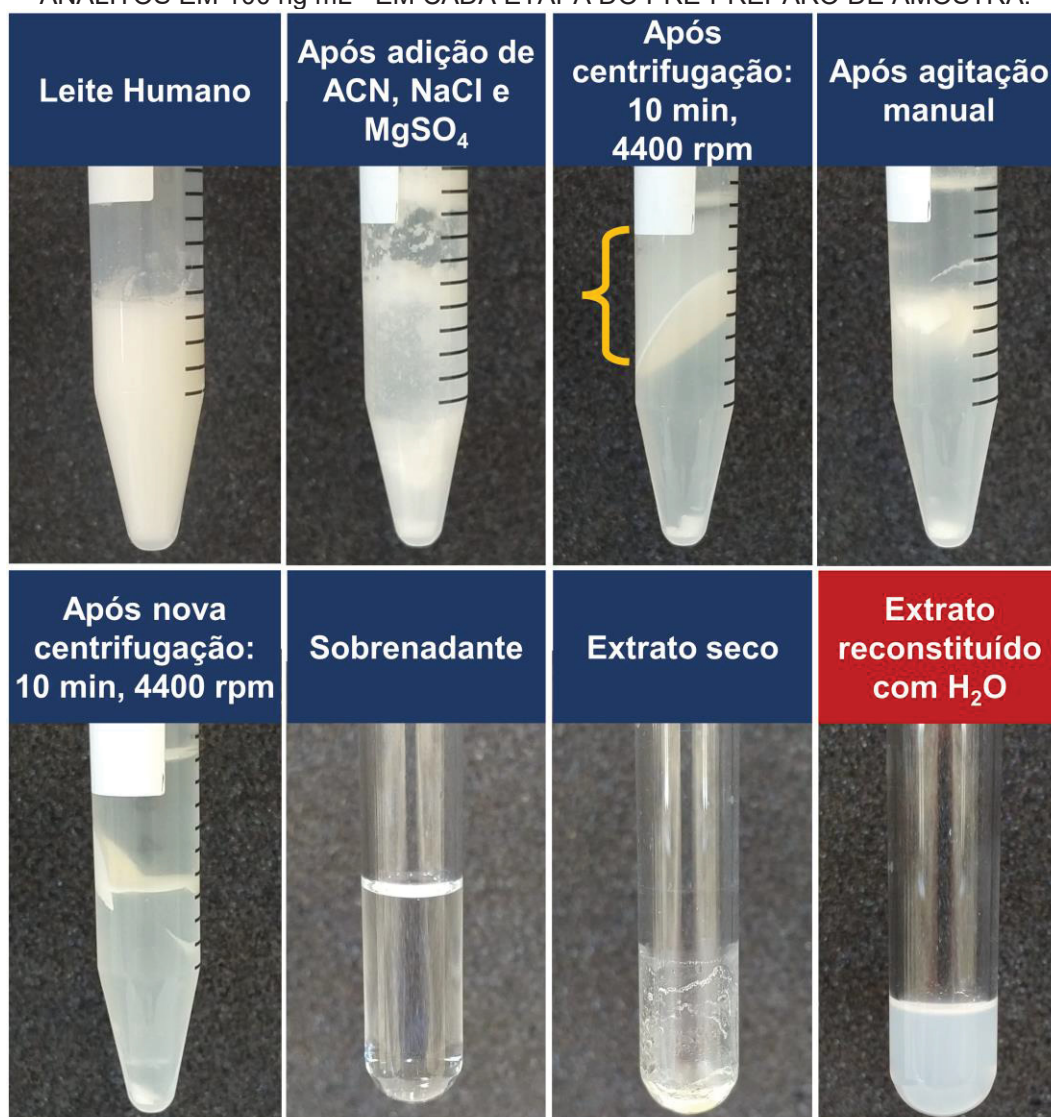
FONTE: A autora.

Observa-se na FIGURA 42 que os cromatogramas obtidos para as diferentes condições são similares em termos de tamanho de pico dos analitos, havendo diferenças quanto a presença de interferentes em aproximadamente 6 min e após 13 min. As três condições avaliadas apresentaram áreas de picos semelhantes entre si e não resultaram em maior eficiência de extração com relação ao procedimento otimizado com a fórmula infantil. No entanto, o interferente presente nos cromatogramas da FIGURA 40 com tempo de retenção variável entre 5 e 7 min foi eliminado. O pico em 5,8 min presente nos três cromatogramas da FIGURA 42 é de um interferente da matriz coelundo completamente com o BPA, esse interferente não pode ser completamente removido por nenhum dos procedimentos avaliados.

A adição de sal na mistura composta por leite e acetonitrila foi utilizada com o intuito de promover a extração líquido-líquido assistida por sal (Salting-out assisted liquid-liquid extraction – SALLE), que gera extratos mais limpos do que a precipitação apenas com solvente orgânico^[212]. A função do sal é promover a separação de fases pelo efeito de *salting-out*, uma vez que a acetonitrila é miscível

em matrizes aquosas. Assim, são formadas uma fase mais densa, aquosa e rica em interferentes e outra fase menos densa enriquecida em acetonitrila contendo os analitos extraídos, mistura bifásica líquida que separa fases induzida pelos sais adicionados. Apesar dessa abordagem não ter promovido o aumento das áreas de pico dos analitos, houve uma melhora do perfil cromatográfico pela redução de interferentes, além disso o volume de solvente a ser evaporado diminuiu, reduzindo-se assim o tempo gasto nessa etapa. Com base nesses resultados, adotou-se o uso de NaCl e MgSO_4 na etapa de precipitação de proteínas nas proporções descritas anteriormente. A FIGURA 43 mostra fotografias de uma amostra de leite humano enriquecida com os analitos (100 ng mL^{-1}) em cada etapa do procedimento de pré-preparo da amostra.

FIGURA 43 – FOTOGRAFIAS DE AMOSTRA DE LEITE HUMANO ENRIQUECIDA COM OS ANALITOS EM 100 ng mL^{-1} EM CADA ETAPA DO PRÉ-PREPARO DE AMOSTRA.



FONTE: A autora.

Como pode ser visto nas fotografias da FIGURA 43, foi necessário empregar duas etapas de centrifugação a 4400 rpm por 10 min, intercaladas por uma etapa de agitação manual de 3 s, devido à formação de uma fase gel após a primeira centrifugação (destacada por uma chave em amarelo na FIGURA 43). Apenas com a utilização desta etapa rápida de agitação manual, foi possível obter a separação adequada das fases. Após a segunda centrifugação, foi obtido um sobrenadante translúcido e sem a presença de sólidos, o qual depois de evaporado apresenta material sólido esbranquiçado na parede do tubo e uma fase líquida oleosa no fundo do tubo (cerca de uma gota), como mostrado na FIGURA 43. Após a reconstituição do extrato com água forma-se um sistema coloidal pela presença da fase oleosa e provavelmente de proteínas, como evidenciada pela turbidez da amostra da última fotografia.

Mesmo com todas as etapas otimizadas descritas anteriormente, não foi possível extrair o TCS das amostras de leite humano, por causa da sua alta afinidade pelas proteínas e lipídeos presentes na matriz. Os trabalhos da literatura que extraem o TCS de leite humano por μ SPE^[7,82] utilizam como fase extratora o octadecilsilano (C18), a qual é uma fase comercial apolar. Devido às dificuldades apresentadas para a extração do BPA e TCS, o estudo dos parâmetros analíticos e a aplicação do método para amostras reais foram realizados apenas para os parabenos e o padrão interno. Mesmo com as limitações derivadas da complexidade da amostra de leite, o capilar de PVOH preparado nesse trabalho mostra-se bastante interessante para a extração de compostos polares em outras matrizes complexas e aquosas, além do leite.

4.8 MÉRITO DOS PARÂMETROS ANALÍTICOS

4.8.1 Estabilidade das soluções padrão

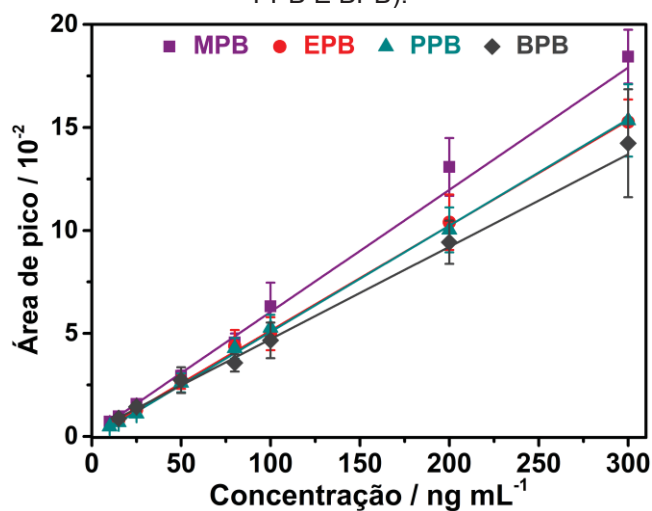
Foi realizado um estudo a respeito da estabilidade das soluções padrão de concentração intermediária, armazenadas ao abrigo de luz a -18°C , empregadas no preparo das soluções de trabalho, durante 9 meses. As soluções de trabalho foram preparadas a partir da diluição das soluções intermediárias dos analitos e do padrão interno na fase móvel, com concentração final de $1\ \mu\text{g mL}^{-1}$ e $10\ \mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente. A estabilidade dos padrões foi determinada comparando-se as áreas de pico obtidas para cada analito mês a mês.

Houve uma redução nas áreas de pico dos compostos MPB e EPB após aproximadamente 7 meses de armazenamento, sendo que para o MPB essa redução foi de aproximadamente 50 % para o 9º mês avaliado. Os compostos PPB, BPB e BPA apresentaram estabilidade no período avaliado, com valores de desvio padrão relativo (RSD) para as áreas dos picos inferiores a 5,0 %. Para o triclosan foi obtida maior variância para os dados, com o valor de RSD atingindo 21,0 %. O DES (PI) apresentou valor de RSD igual a 8,1 %, mostrando-se estável no período estudado, nas condições de armazenamento descritas anteriormente. Com base nesses resultados, o período máximo de armazenamento das soluções de concentração intermediária foi estabelecido como 6 meses.

4.8.2 Linearidade, LLOQ e LOD

A linearidade do método foi determinada a partir de curvas analíticas extraídas, as quais foram obtidas pela extração de amostras branco de leite humano enriquecidas com os analitos em diferentes concentrações. Cada amostra foi submetida às etapas de precipitação de proteínas, extração por *in-tube* SPME, separação cromatográfica e detecção espectrofotométrica na região do UV. As curvas analíticas foram obtidas empregando-se a concentração como variável independente (x) e a área de pico de cada analito como variável dependente (y). A razão entre a área de pico do analito e a área de pico do padrão interno (A_A/A_{PI}) resultou em menor linearidade em comparação com o uso da área de pico do analito somente, por esse motivo a razão A_A/A_{PI} não foi empregada como variável dependente. A FIGURA 44 mostra as curvas analíticas obtidas para cada parabeno.

FIGURA 44 – CURVAS ANALÍTICAS EXTRAÍDAS OBTIDAS PARA OS PARABENOS (MPB, EPB, PPB E BPB).



FONTE: A autora.

Observa-se na FIGURA 44 que a inclinação da reta obtida pela regressão linear seguiu um padrão decrescente com o aumento do $\log K_{ow}$, com os dados do EPB e PPB praticamente sobrepostos. Esse resultado confirma o que foi discutido anteriormente, que se refere ao maior efeito matriz para os compostos mais apolares, em decorrência da composição da matriz que inclui lipídeos e proteínas. A TABELA 18 mostra os resultados para a faixa linear, os valores do intercepto (a) e da inclinação da reta (b) obtida pela regressão linear, o coeficiente de determinação (r^2), os valores de LLOQ e a confirmação do LLOQ.

TABELA 18 – FAIXA LINEAR, PARÂMETROS DA REGRESSÃO LINEAR E LLOQ.

Analito	Faixa linear / ng mL ⁻¹	Intercepto (a)	Inclinação (b)	r^2	LLOQ (n = 5)		
					Conc. / ng mL ⁻¹	RSD / %	Confirmação do LLOQ / %
MPB	10 – 300	0,00114	0,000593	0,9955	10,0	6,71	102,0
EPB	15 – 300	0,000287	0,000510	0,9991	15,0	1,18	100,2
PPB	10 – 300	-0,000862	0,000516	0,9948	10,0	18,0	108,9
BPB	15 – 300	0,00236	0,000449	0,9928	15,0	18,3	94,9

FONTE: A autora.

Os analitos MPB e PPB apresentaram linearidade na faixa de concentração de 10 a 300 ng mL⁻¹, enquanto para o EPB e o BPB a faixa linear foi de 15 a 300 ng mL⁻¹. Todas as curvas analíticas obtiveram linearidade adequada, uma vez que os coeficientes de determinação alcançaram valores superiores a 0,99, como preconiza o Guia de Validação de Métodos Bioanalíticos da Agência Europeia de Medicina^[188]. As regressões lineares foram significativas para todos os parabenos,

pois os valores de F calculado (MQ_R/MQ_r) pela análise de variância (ANOVA) foram superiores ao F tabelado com nível de confiança de 95%, e a distribuição dos resíduos foi aleatória.

Com relação ao LLOQ, foram atingidos valores de $10,0 \text{ ng mL}^{-1}$ para o MPB e PPB, enquanto o LLOQ obtido para o EPB e o BPB foi de $15,0 \text{ ng mL}^{-1}$. O RSD e a exatidão do LLOQ variaram de 1,18 a 18,3 % e 94,9 a 108,9 %, respectivamente. Os valores calculados de LOD para o MPB, EPB, PPB e BPB foram, respectivamente, iguais a $1,58 \text{ ng mL}^{-1}$, $0,590 \text{ ng mL}^{-1}$, $1,64 \text{ ng mL}^{-1}$ e $4,38 \text{ ng mL}^{-1}$.

A literatura relata valores de LLOQ iguais a 10 e 15 ng mL^{-1} para $\mu\text{SPE-LC-UV}$ ^[80], 50 ng mL^{-1} para LC-UV com extração por MA-MSPD seguida por DLLME^[99], 3 a 10 ng mL^{-1} para *in-tube* SPME-UHPLC-MS/MS^[9], 5 ng mL^{-1} para DLLME-UHPLC-MS/MS^[91], 0,2 a 1 ng mL^{-1} para UHPLC-MS/MS e 0,3 a 5 ng mL^{-1} para GC-MS/MS empregando a técnica de SBSE^[24]. Os resultados de LLOQ obtidos neste trabalho estão de acordo com os valores obtidos pela literatura, destacando-se a proximidade dos valores encontrados com obtidos empregando-se técnicas mais sensíveis como a UHPLC-MS/MS, o que demonstra como o uso do dispositivo de *in-tube* SPME com gel de PVOH é promissor.

4.8.3 Exatidão e precisão intra-dia e inter-dia

Os ensaios de exatidão e precisão intra-dia e inter-dia ($n = 5$) foram realizados com amostras branco de leite humano enriquecidas com os parabenos em três concentrações: 45 ng mL^{-1} , 150 ng mL^{-1} e 220 ng mL^{-1} . Os ensaios intra-dia foram realizados em um mesmo dia, enquanto os ensaios inter-dia foram distribuídos em 3 dias. A TABELA 19 mostra os resultados obtidos para cada analito em função da concentração.

TABELA 19 – RESULTADOS DOS ENSAIOS DE PRECISÃO E EXATIDÃO INTRA-DIA E INTER-DIA (n = 5).

Analito	Conc. / ng mL ⁻¹	Intra-dia		Inter-dia	
		RSD (n = 5) / %	Exatidão (n = 5) / %	RSD (n = 5) / %	Exatidão (n = 5) / %
MPB	45	10,8	92,4	13,2	128,6
	150	11,0	114,4	9,3	114,6
	220	5,6	109,8	7,6	110,4
EPB	45	8,1	94,2	16,5	124,3
	150	13,6	101,8	9,3	99,3
	220	12,0	101,6	11,7	103,9
PPB	45	13,1	95,8	14,1	116,3
	150	12,8	93,8	13,4	103,9
	220	10,3	101,9	14,8	110,9
BPB	45	11,9	93,2	11,5	97,4
	150	5,6	74,5	7,8	81,1
	220	8,0	77,3	14,3	86,0

FONTE: A autora.

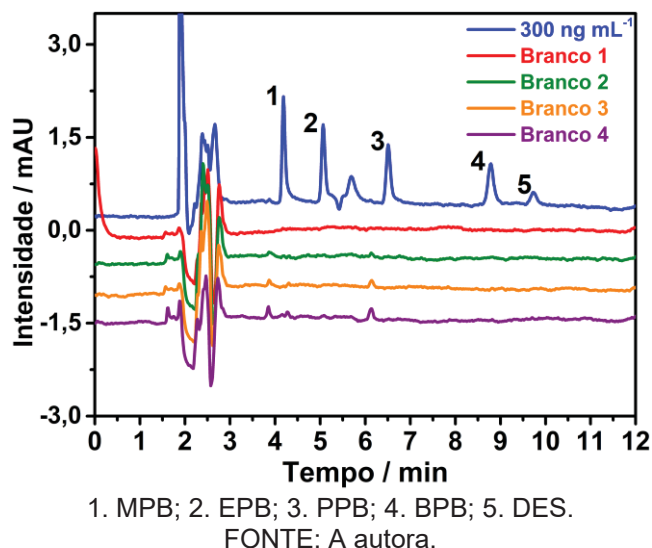
O Guia de Validação de Métodos Bioanalíticos da Agência Europeia de Medicina^[188] preconiza que os valores de RSD para os ensaios intra e inter-dia não devem ser superiores que 15 %, enquanto a exatidão pode variar de 85 a 115 %. Como mostrado na TABELA 19, os valores de RSD não ultrapassaram 15 %, com exceção para a concentração de 45 ng mL⁻¹ de EPB no ensaio inter-dia. Todavia, no caso da exatidão, houve mais de um valor fora do que é preconizado, em especial para o BPB, que obteve valores de exatidão inferiores a 85 % nos ensaios intra (150 e 220 ng mL⁻¹) e inter-dia (150 ng mL⁻¹). O MPB e o EPB apresentaram exatidão superior a 115% para a concentração de 45 ng mL⁻¹ no ensaio inter-dia. O efeito matriz mais pronunciado para os analitos de menor polaridade pode ser a causa dessa menor exatidão observada nos dados do BPB.

4.8.4 Efeito memória

Para investigar a existência de efeito memória, amostra branco de leite humanos foram enriquecidas com os parabenos com concentração de 300 ng mL⁻¹ (nível de maior concentração da curva), as quais foram analisadas por *in-tube* SPME LC-UV (n = 4). Após a injeção de cada amostra com concentração de 300 ng mL⁻¹, foi feita a injeção de uma amostra branco de leite humano pré-preparada (precipitação de proteínas). A FIGURA 45 mostra os cromatogramas obtidos para a

extração das amostras branco FIGURA 3e de uma amostra enriquecida com 300 ng mL⁻¹ de parabenos.

FIGURA 45 – CROMATOGRAMAS OBTIDOS APÓS EXTRAÇÃO DE AMOSTRA DE LEITE HUMANO ENRIQUECIDA COM 300 ng mL⁻¹ E DE AMOSTRAS BRANCO DE LEITE HUMANO.



Como pode ser observado na FIGURA 45, os cromatogramas obtidos para as amostras branco não apresentam picos cromatográficos referentes aos analitos, MPB, EPB, PPB e BPB. Alguns picos pequenos presentes nos cromatogramas das amostras branco 1, 2 e 3 são provenientes de compostos da matriz e não apresentam os mesmos tempos de retenção dos analitos. Portanto, a fase extratora de PVOH não possui efeito memória.

4.9 APLICAÇÃO DO MÉTODO EM AMOSTRAS REAIS DE LEITE HUMANO

O método de *in-tube* SPME-LC-UV foi aplicado para a determinação de parabenos em seis amostras de doadoras do Banco de Leite Humano do CHC/UFPR. As amostras foram analisadas sem e com enriquecimento de parabenos em concentração de 25 ng mL⁻¹. A TABELA 20 mostra os resultados obtidos para cada amostra.

TABELA 20 – RESULTADOS OBTIDOS APÓS A ANÁLISE DE AMOSTRAS REAIS DE LEITE HUMANO POR IN-TUBE SPME LC-UV.

Analitos	Amostras					
	1	2	3	4	5	6
MPB						
Conc. amostra / ng mL ⁻¹	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Conc. adicionada / ng mL ⁻¹	25	25	25	25	25	25
Conc. encontrada (n = 3) / ng mL ⁻¹	31,4	31,6	22,7	32,7	30,2	28,3
RSD (n = 3) / %	2,8	3,2	4,7	11,4	7,4	13,3
Recuperação / %	125,7	126,3	91,0	130,8	120,9	113,3
EPB						
Conc. amostra / ng mL ⁻¹	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Conc. adicionada / ng mL ⁻¹	25	25	25	25	25	25
Conc. encontrada (n = 3) / ng mL ⁻¹	28,0	40,0	22,2	37,0	33,4	28,8
RSD (n = 3) / %	9,8	4,9	9,6	6,0	10,5	1,1
Recuperação / %	112,1	159,9	89,0	148,2	133,8	115,3
PPB						
Conc. amostra / ng mL ⁻¹	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Conc. adicionada / ng mL ⁻¹	25	25	25	25	25	25
Conc. encontrada (n = 3) / ng mL ⁻¹	24,6	28,3	19,1	46,3	27,4	26,8
RSD (n = 3) / %	1,1	13,9	8,3	2,8	13,8	7,5
Recuperação / %	98,4	113,1	76,5	185,4	109,5	107,4
BPB						
Conc. amostra / ng mL ⁻¹	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Conc. adicionada / ng mL ⁻¹	25	25	25	25	25	25
Conc. encontrada (n = 3) / ng mL ⁻¹	12,5	19,4	7,1	29,5	21,6	20,0
RSD (n = 3) / %	11,4	2,5	6,1	2,3	7,0	11,4
Recuperação / %	49,9	77,8	28,2	117,9	86,4	80,2

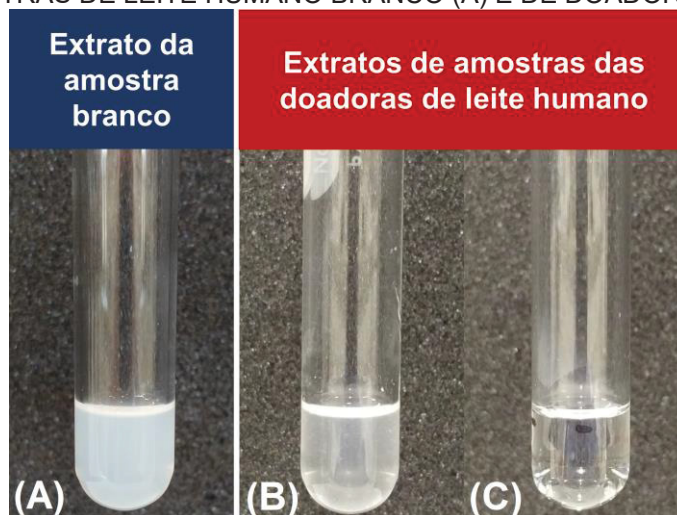
LOD: 1,58 ng mL⁻¹ (MPB); 0,590 ng mL⁻¹ (PPB); 1,64 ng mL⁻¹ (PPB); 4,38 ng mL⁻¹ (BPB).

FONTE: A autora.

Como pode ser visto na TABELA 20, os parabenos não foram detectados em nenhuma das seis amostras analisadas. Devido à ausência dos analitos nas amostras de leite humano, estas foram enriquecidas com 25 ng mL⁻¹ dos analitos e 100 ng mL⁻¹ do padrão interno e analisadas (n = 3). Na TABELA 20 são apresentadas as concentrações determinadas pela curva analítica, o RSD e a recuperação. Para todas as amostras foram obtidos valores de RSD inferiores a 15 %, demonstrando que o método apresenta precisão adequada. Todavia, 58 % dos valores obtidos para a recuperação foram abaixo de 85 % ou acima de 115 %. Essa baixa exatidão do método, observada pelos valores de recuperação, pode ser decorrente de um efeito matriz pronunciado. A FIGURA 46 mostra fotografias de

extratos obtidos após a etapa de precipitação de proteínas da amostra branco de leite humano utilizada na obtenção da curva analítica (A) e amostras de leite humano de doadoras do BLH (B e C).

FIGURA 46 – FOTOGRAFIAS DE EXTRATOS OBTIDOS APÓS A PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS DE AMOSTRAS DE LEITE HUMANO BRANCO (A) E DE DOADORAS (B E C).



FONTE: A autora.

Na FIGURA 46 pode ser observado uma diferença de turbidez nos extratos obtidos após a etapa de precipitação de proteínas. Como discutido anteriormente, essa turbidez é pode ser causada pela formação de emulsão quando o extrato é reconstituído com água, uma vez que os lipídeos não são removidos na etapa de precipitação de proteínas. Quanto maior a turbidez do extrato, maior a quantidade gotículas de lipídeos dispersas em água, então de forma indireta pode-se afirmar que os extratos mais turvos contêm mais lipídeos. Observando os extratos apresentados na FIGURA 46, é constatado que o leite humano empregado para a obtenção da curva analítica provavelmente possui maior teor de lipídeos que as amostras de leite humano das doadoras, uma vez que a fotografia (B) representa o máximo de turbidez obtido para as amostras reais. Essa variação do conteúdo lipídico é apenas um exemplo da heterogeneidade das amostras de leite humano, que possui composição complexa e muito variável, pois é dependente das condições fisiológicas da mãe e das necessidades do bebê.

Portanto, as recuperações obtidas são consequência da variabilidade das amostras, uma vez que o curva analítica foi obtida empregando uma amostra com composição distinta das amostras doadas, que também apresentam variações de composição entre si. Desse modo, o método de adição de padrão é mais

recomendável para a quantificação dos parabenos em amostras de leite humano, uma vez que esse método possibilita eliminar ou minimizar a interferência causada pela matriz.

O método de *in-tube* SPME-LC-UV com fase extratora de hidrogel de PVOH exibiu desempenho interessante em termos de precisão e exatidão para a determinação de parabenos em uma mesma amostra de leite humano, como demonstrado nos itens 4.8.2 e 4.8.3. No entanto o dispositivo de extração com hidrogel de PVOH não foi capaz de sobrepujar o efeito matriz decorrente da alta complexidade e diversidade do leite humano, que resultou em inexatidões para algumas amostras.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A separação eficiente dos compostos estudados (MPB, EPB, BPA, PPB, BPB, DES e TCS) foi obtida após investigação detalhada a respeito das condições cromatográficas, como composição da fase móvel, vazão, modo de eluição e fase estacionária. O gradiente de eluição com fase estacionária composta por água e ACN foi imprescindível para permitir a separação dos analitos, devido à ampla faixa de coeficientes de partição dos compostos de interesse.

Os dispositivos de *in-tube* SPME modificados com hidrogéis de PVOH, PVOH com pectina e PVOH com alginato foram capazes de extrair os analitos estudados de amostras de água ultrapura, com eficiência de extração superior à do capilar de sílica fundida não modificado, sendo que o gel de PVOH obteve a maior eficiência de extração dentre todos os dispositivos estudados. O processo de obtenção dos dispositivos de *in-tube* SPME com fase extratora baseada em hidrogel de PVOH foi estudado em detalhes e foi determinada a melhor condição de preparação do dispositivo, a partir da silanização do capilar e modificação covalente com o polímero. Esse processo apresentou repetibilidade e o dispositivo pôde ser utilizado por até 250 extrações para amostras de água, sem haver perda de eficiência.

Dentre os compostos estudados, os analitos mais hidrofóbicos apresentaram maior afinidade pelo gel de PVOH quando presentes em amostras de água, o que não era o esperado porque o PVOH é um polímero altamente hidrofílico. Esse resultado pode ser um indicativo da existência de efeito solvofóbico atuando na extração dos analitos com maior $\log K_{o/w}$. Particularmente para o TCS, observou-se alta eficiência de extração para amostras de água. Entretanto, para a fórmula infantil e o leite humano houve um pronunciado efeito matriz que dificultou a extração do TCS pelo hidrogel de PVOH.

As amostras de fórmula infantil e leite humano apresentaram efeito matriz pronunciado para os analitos com maior $\log K_{o/w}$, devido aos altos teores de lipídeos e proteínas nessas amostras. Uma etapa de pré-preparo de amostra para precipitar as proteínas com acetonitrila precisou ser incluída para a fórmula infantil. Para o leite humano o efeito matriz foi maior em relação à fórmula infantil, e além da acetonitrila foi necessário o uso de sais para favorecer a precipitação das proteínas e a separação das fases.

Para a extração dos analitos da fórmula infantil e do leite humano por *in-tube* SPME, foi possível utilizar água como solvente de dessorção, reduzindo o consumo de solventes orgânicos. O dispositivo de *in-tube* SPME com fase extratora de hidrogel de PVOH foi utilizado para a extração de parabenos de amostras de leite humano, cujo método obtido apresentou precisão e exatidão adequadas. Foram alcançados limites de quantificação de 10 a 15 ng mL⁻¹, os quais estão próximos aos valores encontrados em trabalhos da literatura que empregaram a técnica de LC-MS.

A utilização de hidrogel de PVOH na *in-tube* SPME para a extração de compostos orgânicos em matrizes aquosas mostrou-se bastante promissor, apesar de algumas limitações decorrentes do efeito matriz das amostras de leite humano. O capilar contendo quantidade diminuta de hidrogel de PVOH foi capaz de extrair grandes quantidades de compostos orgânicos, apresenta baixo custo de obtenção e é reutilizável.

5.1 PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que a aplicação do dispositivo de *in-tube* SPME para a determinação de TCS em amostras de água ambientais é promissora, devido à alta afinidade que este analito apresentou pelo hidrogel de PVOH e ao fato dessas amostras não conterem altas concentrações de lipídeos e proteínas como o leite humano. O dispositivo de *in-tube* SPME poderá também ser utilizado na determinação de BPA em fórmula infantil, uma vez que foi obtida alta eficiência na extração do BPA nessa matriz. Mais estudos a respeito do comportamento sortivo dos hidrogéis mostram-se promissores, uma vez que ainda há pouca informação na literatura acerca desses materiais como fase extratora bem como sobre os mecanismos de extração de compostos distintos. O dispositivo de *in-tube* SPME com hidrogel de PVOH também aparenta ser altamente promissor para a utilização com matrizes menos complexas que o leite e que não necessitam de etapa prévia de precipitação de proteínas, como urina, pois para essas amostras o dispositivo eliminaria o uso de solventes orgânicos em todo o preparo da amostra.

REFERÊNCIAS

- [1] Thomas Zoeller, R.; Brown, T.R.; et al. Endocrine-disrupting chemicals and public health protection: A statement of principles from the Endocrine Society. **Endocrinology**, v. 153, p. 4097–4110, 2012.
- [2] Ho, V.; Pelland-St-Pierre, L.; et al. Endocrine disruptors: Challenges and future directions in epidemiologic research. **Environmental Research**, v. 204, p. 1–11, 2022.
- [3] Kalofiri, P.; Balias, G.; et al. The EU endocrine disruptors' regulation and the glyphosate controversy. **Toxicology Reports**, v. 8, p. 1193–1199, 2021.
- [4] Goralczyk, K. A Review of the Impact of Selected Anthropogenic Chemicals from the Group of Endocrine Disruptors on Human Health. **Toxics**, v. 146, p. 1–16, 2021.
- [5] Ye, X.; Bishop, A.M.; et al. Automated on-line column-switching HPLC-MS/MS method with peak focusing for measuring parabens, triclosan, and other environmental phenols in human milk. **Analytica Chimica Acta**, v. 622, p. 150–156, 2008.
- [6] Vela-Soria, F.; Ballesteros, O.; et al. UHPLC – MS/MS method for the determination of bisphenol A and its chlorinated derivatives, bisphenol S, parabens, and benzophenones in human urine samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, p. 3773–3785, 2014.
- [7] Hines, E.P.; Mendola, P.; et al. Concentrations of environmental phenols and parabens in milk, urine and serum of lactating North Carolina women. **Reproductive Toxicology**, v. 54, p. 120–128, 2015.
- [8] Eisert, R.; Pawliszyn, J. Automated In-Tube Solid-Phase Microextraction Coupled to High-Performance Liquid Chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 69, p. 3140–3147, 1997.
- [9] Souza, I.D.; Melo, L.P.; et al. Selective molecularly imprinted polymer combined with restricted access material for in-tube SPME/UHPLC-MS/MS of parabens in breast milk samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 932, p. 49–59, 2016.
- [10] Silva, B.J.G.; Lanças, F.M.; et al. Determination of fluoxetine and norfluoxetine enantiomers in human plasma by polypyrrole-coated capillary in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 8590–8597, 2009.
- [11] Augusto, F.; Carasek, E.; et al. New sorbents for extraction and microextraction techniques. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 2533–2542, 2010.
- [12] Basheer, C.; Parthiban, A.; et al. Determination of alkylphenols and bisphenol-A: A comparative investigation of functional polymer-coated membrane microextraction and solid-phase microextraction techniques. **Journal of Chromatography A**, v. 1087, p. 274–282, 2005.
- [13] Bahram, M.; Keshvari, F.; et al. Development of cloud point extraction using pH-sensitive hydrogel for preconcentration and determination of malachite green. **Talanta**, v. 85, n. 2, p. 891–896, 2011.
- [14] Castilhos, N.D.B.; Sampaio, N.M.F.M.; et al. Physical-chemical characteristics and potential use of a novel alginate/zein hydrogel as the sorption phase for polar organic compounds. **Carbohydrate Polymers**, v. 174, p. 507–516, 2017.
- [15] Damstra, T., Barlow, S., Bergman, A., Kavlock, R., & Kraak, G. Van Der (2002). Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors. *World Health Organization*, 180.

- [16] Miège, C.; Gabet, V.; et al. Evaluation of estrogenic disrupting potency in aquatic environments and urban wastewaters by combining chemical and biological analysis. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, p. 186–195, 2009.
- [17] Azzouz, A.; Ballesteros, E. Trace analysis of endocrine disrupting compounds in environmental water samples by use of solid-phase extraction and gas chromatography with mass spectrometry detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1360, p. 248–257, 2014.
- [18] Coster, S. De; Larebeke, N. Van Endocrine-disrupting chemicals: Associated disorders and mechanisms of action. **Journal of Environmental and Public Health**, p. 1–52, 2012.
- [19] Sonnenschein, C.; Soto, A.M. An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 65, n. 1–6, p. 143–150, 1998.
- [20] Almeida, C.; Nogueira, J.M.F. Determination of steroid sex hormones in water and urine matrices by stir bar sorptive extraction and liquid chromatography with diode array detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, p. 1303–1311, 2006.
- [21] Chen, B.; Huang, Y.; et al. Hollow fiber liquid-liquid-liquid microextraction combined with high performance liquid chromatography-ultraviolet detection for the determination of various environmental estrogens in environmental and biological samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1305, p. 17–26, 2013.
- [22] Dorota, B.; Gromadzi, J.; et al. Parabens . From environmental studies to human health. **Environment International**, v. 67, p. 27–42, 2014.
- [23] Soni, M.G.; Carabin, I.G.; et al. Safety assessment of esters of p -hydroxybenzoic acid (parabens). **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 985–1015, 2005.
- [24] Rodríguez-Gómez, R.; Zafra-Gómez, A.; et al. Gas chromatography and ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry methods for the determination of selected endocrine disrupting chemicals in human breast milk after stir-bar sorptive extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1349, p. 69–79, 2014.
- [25] Lokhnauth, J.K.; Snow, N.H. Determination of Parabens in Pharmaceutical Formulations by Solid-Phase Microextraction-Ion Mobility Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 77, p. 5938–5946, 2005.
- [26] Moss, T.; Howes, D.; et al. Percutaneous Penetration and Dermal Metabolism of Triclosan (2,2,4'-Trichloro-2'-hydroxydiphenyl Ether). **Food and Chemical Toxicology**, v. 38, p. 361–370, 2000.
- [27] Wang, H.; Zhang, J.; et al. Simultaneous analysis of synthetic musks and triclosan in human breast milk by gas chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 879, p. 1861–1869, 2011.
- [28] Ferrer, E.; Santoni, E.; et al. Simultaneous determination of bisphenol A , octylphenol , and nonylphenol by pressurised liquid extraction and liquid chromatography – tandem mass spectrometry in powdered milk and infant formulas. **Food Chemistry**, v. 126, p. 360–367, 2011.
- [29] Rodríguez-gómez, R.; Roldán-pijuán, M.; et al. Stir-membrane solid – liquid – liquid microextraction for the determination of parabens in human breast milk samples by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1354, p. 26–33, 2014.
- [30] Asimakopoulos, A.G.; Thomaidis, N.S.; et al. Widespread occurrence of bisphenol A diglycidyl ethers , p -hydroxybenzoic acid esters (parabens), benzophenone type-UV filters , triclosan , and triclocarban in human urine from

- Athens , Greece. **Science of The Total Environment**, v. 470–471, p. 1243–1249, 2014.
- [31] Regueiro, J.; Becerril, E.; et al. Trace analysis of parabens, triclosan and related chlorophenols in water by headspace solid-phase microextraction with in situ derivatization and gas chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 4693–4702, 2009.
- [32] Canada, H. Health Risk Assessment of Bisphenol A from Food Packaging Applications. p. 1–13, 2008.
- [33] Hansch, C.; Leo, A.; et al. **Exploring QSAR - Hydrophobic, Electronic, and Steric Constants**. Washington, USA: American Chemical Society, 1995.
- [34] Yalkowsky, S.H.; He, Y.; et al. **Handbook of Aqueous Solubility Data**. Boca Raton, USA: CRC Press, 2016.
- [35] Lee, J.D.; Lee, J.Y.; et al. Risk Assessment of Triclosan , a Cosmetic Preservative. **Toxicological Research**, v. 35, p. 137–154, 2019.
- [36] Bao, W.; Liu, B.; et al. Association Between Bisphenol A Exposure and Risk of All-Cause and Cause-Specific Mortality in US Adults. **JAMA Network Open**, v. 3, p. 1–10, 2020.
- [37] Byford, J.R.; Shaw, L.E.; et al. Oestrogenic activity of parabens in MCF7 human breast cancer cells. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 80, p. 49–60, 2002.
- [38] Meeuwen, J.A. van; Son, O. van; et al. Aromatase inhibiting and combined estrogenic effects of parabens and estrogenic effects of other additives in cosmetics. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 230, p. 372–382, 2008.
- [39] Boberg, J.; Taxvig, C.; et al. Possible endocrine disrupting effects of parabens and their metabolites. **Reproductive Toxicology**, v. 30, p. 301–312, 2010.
- [40] Veldhoen, N.; Skirrow, R.C.; et al. The bactericidal agent triclosan modulates thyroid hormone-associated gene expression and disrupts postembryonic anuran development. **Aquatic Toxicology**, v. 80, p. 217–227, 2006.
- [41] Crofton, K.M.; Paul, K.B.; et al. Short-term in vivo exposure to the water contaminant triclosan: Evidence for disruption of thyroxine. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 24, p. 194–197, 2007.
- [42] Gee, R.H.; Charles, A.; et al. Oestrogenic and androgenic activity of triclosan in breast cancer cells. **Journal of Applied Toxicology**, p. 78–91, 2008.
- [43] Yoon, K.S.; Kwack, S.J. In vitro and in vivo estrogenic activity of triclosan. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 84, p. 800–809, 2021.
- [44] Ashley-martin, J.; Dodds, L.; et al. A birth cohort study to investigate the association between prenatal phthalate and bisphenol A exposures and fetal markers of metabolic dysfunction. **Environmental Health**, v. 13, p. 1–14, 2014.
- [45] Azzouz, A.; Ballesteros, E. Trace analysis of endocrine disrupting compounds in environmental water samples by use of solid-phase extraction and gas chromatography with mass spectrometry detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1360, p. 248–257, 2014.
- [46] Nascimento, S.; Cass, Q. An Online Solid Phase Extraction-Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Method for the Analysis of Parabens in Urban Waters. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 32, p. 978–988, 2021.
- [47] Czarczynska-Goslinska, B.; Grzeskowiak, T.; et al. Determination of bisphenols and parabens in breast milk and dietary risk assessment for Polish breastfed infants sli n. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 98, p. 1–10, 2021.
- [48] Karzi, V.; Tzatzarakis, M.N.; et al. Determination of prenatal exposure to

parabens and triclosan and estimation of maternal and fetal burden. **Toxicology Reports**, v. 8, p. 808–815, 2021.

[49] Zhang, Q.; Zhi, Y.; et al. Determination of six parabens in biological samples by magnetic solid-phase extraction with magnetic mesoporous carbon adsorbent and UHPLC-MS / MS. **Journal of Chromatography B**, v. 1179, p. 1–6, 2021.

[50] Vandenberg, L.N.; Maffini, M. V.; et al. Bisphenol-a and the great divide: A review of controversies in the field of endocrine disruption. **Endocrine Reviews**, v. 30, n. 1, p. 75–95, 2009.

[51] Lopez, C.; Ménard, O. Human milk fat globules : Polar lipid composition and in situ structural investigations revealing the heterogeneous distribution of proteins and the lateral segregation of sphingomyelin in the biological membrane. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 83, p. 29–41, 2011.

[52] Jensen, R.G. **Handbook of Milk Composition**. San Diego, USA: Academic Press, 1995.

[53] Samuel, T.M.; Zhou, Q.; et al. Nutritional and Non-nutritional Composition of Human Milk Is Modulated by Maternal, Infant, and Methodological Factors. **Frontiers in Nutrition**, v. 7, p. 1–20, 2020.

[54] Ballard, O.; Morrow, A.L. Human Milk Composition: Nutrients and Bioactive Factors. **Pediatric Clinics of North America**, v. 60, p. 49–74, 2013.

[55] Turfkruyer, M.; Verhasselt, V. Breast milk and its impact on maturation of the neonatal immune system. p. 199–206, 2015.

[56] Dror, D.K.; Allen, L.H. Overview of Nutrients in Human Milk. n. 23, 2018.

[57] Andreas, N.J.; Kampmann, B.; et al. Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. **Early Human Development**, v. 91, p. 629–635, 2015.

[58] Mosca, F.; Gianni, M.L. Human milk: composition and health benefits. **La Pediatria Medica e Chirurgica**, v. 39, p. 47–52, 2017.

[59] Jensen, R.G.; Ferris, A.M.; et al. The Composition of Milk Fat. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 3228–3243, 1991.

[60] Lonnerdal, B. Human Milk Proteins. In: SRJ Pickering L.K., Morrow A.L., Ruiz-Palacios G.M. (Ed.); **Protecting Infants Through Human Milk: Advances in Experimental Medicine and Biology**. Boston: Springer, 2004,

[61] Lönnerdal, B. Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 77, p. 1537S–1543S, 2003.

[62] B. Lönnerdal Human Milk Proteins. In: L.K. Pickering, AL Morrow, et al. (Ed.); **Protecting Infants Through Human Milk: Advancing the Scientific Evidence**. Springer, 2004,

[63] Silva, D.F. da; Ahrné, L.; et al. Casein-Based Powders: Characteristics and Rehydration Properties. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 17, p. 240–254, 2018.

[64] Roach, A.L. The casein micelle as an encapsulation system for triclosan : Methods of micelle dissociation , encapsulation , release , and in vitro delivery. 2009.

[65] Liao, Y.; Alvarado, R.; et al. Proteomic Characterization of Specific Minor Proteins in the Human Milk Casein Fraction. p. 5409–5415, 2011.

[66] Shaw, D.J. **Introduction to Colloid and Surface Chemistry**. Oxford, UK, UK: Butterworth-Heinemann, 1992.

[67] Kruif, C.G. De Casein micelle interactions. **International Dairy Journal**, v. 9, n. 3–6, p. 183–188, 1999.

[68] Kruif, C.G. De, Holt, C. Casein micelle structure, functions and interactions. In: **Advanced Dairy Chemistry—1 Proteins**. New York: Springer, 2003, p. 233–276.

[69] Walstra, P. Casein sub-micelles: Do they exist? **International Dairy Journal**, v.

9, p. 189–192, 1999.

[70] Haratifar, S.; Guri, A. **5 - Nanocapsule formation by caseins**. Elsevier Inc., 2017.

[71] Rehan, F.; Ahemad, N.; et al. Casein nanomicelle as an emerging biomaterial — A comprehensive review. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 179, p. 280–292, 2019.

[72] Kruif, C.G. De Skim milk acidification. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 185, n. 1, p. 19–25, 1997.

[73] Ferris, A.M.; Jensen, R.G. Lipids in Human Milk: A Review. 1: Sampling, Determination, and Content. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 3, p. 108–122, 1984.

[74] Mitoulas, L.R.; Kent, J.C.; et al. Variation in fat, lactose and protein in human milk over 24 h and throughout the first year of lactation. **British Journal of Nutrition**, v. 88, p. 29–37, 2002.

[75] Zivkovic, A.M.; German, J.B.; et al. Human milk glycobioime and its impact on the infant gastrointestinal microbiota. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, p. 4653–4658, 2011.

[76] Bode, L. Human milk oligosaccharides: prebiotics and beyond. **Nutrition Reviews**, v. 67, p. 183–191, 2009.

[77] Polson, C.; Sarkar, P.; et al. Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography – tandem mass spectrometry. v. 785, p. 263–275, 2003.

[78] Roldão, M. V; Melo, L.P.; et al. Development of Molecularly Imprinted Polymers for Solid Phase Extraction of Parabens in Plasma Samples and Analysis by UHPLC-MS/MS. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, p. 257–265, 2017.

[79] Vela-Soria, F.; Iribarne-Durán, L.M.; et al. QuEChERS and ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the determination of parabens and ultraviolet filters in human milk samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1546, p. 1–9, 2018.

[80] Manouchehri, M.; Seidi, S.; et al. Micro solid phase extraction of parabens from breast milk samples using Mg-Al layered double hydroxide functionalized partially reduced graphene oxide nanocomposite. **Food Chemistry**, v. 314, p. 1–9, 2020.

[81] Lopes, B.R.; Cassiano, N.M.; et al. Simultaneous quantification of fluoxetine and norfluoxetine in colostrum and mature human milk using a 2-dimensional liquid chromatography–tandem mass spectrometry system. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 150, p. 362–367, 2018.

[82] Azzouz, A.; Rascón, A.J.; et al. Simultaneous determination of parabens, alkylphenols, phenylphenols, bisphenol A and triclosan in human urine, blood and breast milk by continuous solid-phase extraction and gas chromatography – mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 119, p. 16–26, 2016.

[83] Novák, P.; Havlíček, V. Protein extraction and precipitation. In: **Proteomic Profiling and Analytical Chemistry**. Elsevier B.V, 2016, p. 51–62.

[84] Sugio, S.; Kashima, A.; et al. Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution. **Protein Engineering**, v. 12, p. 439–446, 1999.

[85] Rodríguez-Gómez, R.; Jiménez-Díaz, I.; et al. A multiresidue method for the determination of selected endocrine disrupting chemicals in human breast milk based on a simple extraction procedure. **Talanta**, v. 130, p. 561–570, 2014.

[86] Palma, D.C.A.; Lourencetti, C.; et al. Simultaneous Determination of Different Classes of Pesticides in Breast Milk by Solid-Phase Dispersion and GC/ECD.

Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 25, p. 1419–1430, 2014.

[87] Zimmers, S.M.; Browne, E.P.; et al. Determination of free Bisphenol A (BPA) concentrations in breast milk of U. S. women using a sensitive LC/MS/MS method. **Chemosphere**, v. 104, p. 237–243, 2014.

[88] Steinborn, A.; Alder, L.; et al. Determination of Glyphosate Levels in Breast Milk Samples from Germany by LC-MS/MS and GC-MS/MS. 2016.

[89] Vela-Soria, F.; Jiménez-Díaz, I.; et al. Determination of endocrine-disrupting chemicals in human milk by dispersive liquid – liquid microextraction. **Bioanalysis**, v. 8, p. 1777–1791, 2016.

[90] Seidi, S.; Sadat Karimi, E.; et al. Synthesis and characterization of polyamide-graphene oxide-polypyrrole electrospun nanofibers for spin-column micro solid phase extraction of parabens in milk samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1599, p. 25–34, 2019.

[91] Grecco, C.F.; Souza, I.D.; et al. Determination of Parabens in Breast Milk Samples by Dispersive Liquid-Liquid Microextraction (DLLME) and Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, p. 48–59, 2019.

[92] Martins, I. Precipitação de proteínas e hidrólise de conjugados. In: **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro, Brazil: LTC, 2015, p. 15–18.

[93] Zhang, J.; Xiong, X. Salting - out Assisted Liquid – Liquid Extraction (SALLE) in LC - MS Bioanalysis. In: **Sample Preparation in LC-MS Bioanalysis**. John Wiley & Sons, 2019, p. 68–75.

[94] Nováková, L.; Vlček, H. Analytica Chimica Acta A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation. v. 656, p. 8–35, 2009.

[95] Otaka, H.; Yasuhara, A.; et al. Determination of Bisphenol A and 4-Nonylphenol in Human Milk Using Alkaline Digestion and Cleanup by Solid-Phase Extraction. **Analytical Sciences**, v. 19, p. 1663–1666, 2003.

[96] Fisher, M.; MacPherson, S.; et al. Paraben Concentrations in Maternal Urine and Breast Milk and Its Association with Personal Care Product Use. **Environmental Science & Technology**, v. 51, p. 4009–4017, 2017.

[97] Melo, L.P.; Queiroz, M.E.C. A molecularly imprinted polymer for microdisc solid-phase extraction of parabens from human milk samples. **Analytical Methods**, v. 5, p. 3538–3545, 2013.

[98] Ye, X.; Tao, L.J.; et al. Automated on-line column-switching HPLC – MS / MS method for measuring environmental phenols and parabens in serum. **Talanta**, v. 76, p. 865–871, 2008.

[99] Fotouhi, M.; Seidi, S.; et al. Magnetically assisted matrix solid phase dispersion for extraction of parabens from breast milks. **Journal of Chromatography A**, v. 1504, p. 17–26, 2017.

[100] Tomšíková, H.; Aufartová, J.; et al. High-sensitivity analysis of female-steroid hormones in environmental samples. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 34, p. 35–57, 2012.

[101] Antignac, J.; Cariou, R.; et al. Exposure assessment of French women and their newborn to brominated flame retardants: Determination of tri- to decapolybromodiphenylethers (PBDE) in maternal adipose tissue , serum , breast milk and cord serum. **Environmental Pollution**, v. 157, p. 164–173, 2009.

[102] Toms, L.L.; Allmyr, M.; et al. Triclosan in individual human milk samples from Australia. **Chemosphere**, v. 85, p. 1682–1686, 2011.

- [103] Ramos, L. Critical overview of selected contemporary sample preparation techniques. **Journal of Chromatography A**, v. 1221, p. 84–98, 2012.
- [104] Aufartová, J.; Mahugo-Santana, C.; et al. Determination of steroid hormones in biological and environmental samples using green microextraction techniques: An overview. **Analytica Chimica Acta**, v. 704, n. 1–2, p. 33–46, 2011.
- [105] Jeannot, M.A.; Cantwell, F.F. Solvent Microextraction into a Single Drop. v. 68, n. 13, p. 2236–2240, 1996.
- [106] Jeannot, M.A.; Cantwell, F.F. Mass Transfer Characteristics of Solvent Extraction into a Single Drop at the Tip of a Syringe Needle. v. 69, p. 235–239, 1997.
- [107] Rezaee, M.; Assadi, Y.; et al. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid–liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1116, p. 1–9, 2006.
- [108] Pedersen-Bjergaard, S.; Rasmussen, K.E. Liquid - Liquid - Liquid Microextraction for Sample Preparation of Biological Fluids Prior to Capillary Electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 71, n. 14, p. 2650–2656, 1999.
- [109] Catherine L. Arthur, J.P. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. **Analytical Chemistry**, v. 62, n. 19, p. 2145–2148, 1990.
- [110] Baltussen, E.; Sandra, P.; et al. Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: Theory and principles. **Journal of Microcolumn Separations**, v. 11, p. 737–747, 1999.
- [111] Abdel-Rehim, M.; Altun, Z.; et al. Microextraction in packed syringe (MEPS) for liquid and gas chromatographic applications . Part II — Determination of ropivacaine and its metabolites in human plasma samples using MEPS with liquid chromatography / tandem mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 39, p. 1488–1493, 2004.
- [112] Mester, Z.; Sturgeon, R.; et al. Solid phase microextraction as a tool for trace element speciation. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 56, p. 233–260, 2001.
- [113] Reilly, J.O.; Wang, Q.; et al. Automation of solid-phase microextraction. **Journal of Separation Science**, p. 2010–2022, 2010.
- [114] Kataoka, H.; Saito, K. Recent advances in SPME techniques in biomedical analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 54, p. 926–950, 2011.
- [115] Kataoka, H.; Ishizaki, A.; et al. Developments and Applications of Capillary Microextraction Techniques : A Review. **Analytica Chimica Acta**, v. 655, p. 8–29, 2009.
- [116] Eisert, R.; Pawliszyn, J. Automated In-Tube Solid-Phase Microextraction Coupled to High-Performance Liquid Chromatography. v. 2700, n. 6, p. 3140–3147, 1997.
- [117] Chaves, A.R.; Silva, B.J.G.; et al. Biocompatible in-tube solid phase microextraction coupled with liquid chromatography-fluorescence detection for determination of interferon α in plasma samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 3376–3381, 2011.
- [118] Kataoka, H.; Ishizaki, A.; et al. Developments and applications of capillary microextraction techniques: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 655, p. 8–29, 2009.
- [119] Donizeti, I.; Souza, D.; et al. Current advances and applications of in-tube solid-phase microextraction. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 111, p. 262–278, 2019.
- [120] Mullett, W.M.; Martin, P.; et al. In-Tube Molecularly Imprinted Polymer Solid-

Phase Microextraction for the Selective Determination of Propranolol. **Analytical Chemistry**, v. 73, p. 2383–2389, 2001.

[121] Li, Y.; Xu, H. Development of a novel graphene / polyaniline electrodeposited coating for on-line in-tube solid phase microextraction of aldehydes in human exhaled breath condensate. v. 1395, p. 23–31, 2015.

[122] Wu, J.; Lord, H.; et al. Determination of stimulants in human urine and hair samples by polypyrrole coated capillary in-tube solid phase microextraction coupled with liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. **Talanta**, v. 54, p. 655–672, 2001.

[123] Zheng, M.; Wang, S.; et al. In-tube solid-phase microextraction based on hybrid silica monolith coupled to liquid chromatography – mass spectrometry for automated analysis of ten antidepressants in human urine and plasma. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 7493–7501, 2010.

[124] Shamsayei, M.; Yamini, Y.; et al. Polythiophene/graphene oxide nanostructured electrodeposited coating for on-line electrochemically controlled in-tube solid-phase microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1475, p. 8–17, 2016.

[125] Asiabi, H.; Yamini, Y.; et al. Development of electrochemically controlled packed-in-tube solid phase microextraction method for sensitive analysis of acidic drugs in biological samples. **Talanta**, v. 185, p. 80–88, 2018.

[126] Pang, J.; Yuan, D.; et al. On-line combining monolith-based in-tube solid phase microextraction and high-performance liquid chromatography- fluorescence detection for the sensitive monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons in complex samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1571, p. 29–37, 2018.

[127] Shamsayei, M.; Yamini, Y.; et al. On-line packed magnetic in-tube solid phase microextraction of acidic drugs such as naproxen and indomethacin by using Fe₃O₄@SiO₂@layered double hydroxide nanoparticles with high anion exchange capacity. **Microchimica Acta**, v. 185, p. 1–10, 2018.

[128] Souza, I.D.; Hantao, L.W.; et al. Polymeric ionic liquid open tubular capillary column for on-line in-tube SPME coupled with UHPLC-MS/MS to determine endocannabinoids in plasma samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 1045, p. 108–116, 2019.

[129] Wang, R.; Li, W.; et al. 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.

[130] Mitani, K.; Fujioka, M.; et al. Fully automated analysis of estrogens in environmental waters by in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 1081, p. 218–224, 2005.

[131] Caris, J.A.; Silva, B.J.G.; et al. Automated analysis of lidocaine and its metabolite in plasma by in-tube solid-phase microextraction coupled with LC-UV for pharmacokinetic study. **Journal of Separation Science**, v. 35, p. 734–741, 2012.

[132] Moliner-martínez, Y.; Serra-mora, P.; et al. Analysis of polar triazines and degradation products in waters by in-tube solid-phase microextraction and capillary chromatography: an environmentally friendly method. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, p. 1485–1497, 2015.

[133] Asiabi, H.; Yamini, Y.; 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.

[134] Cheng, L.; Huang, K.; et al. Coiled molecularly imprinted polymer layer open-

tubular capillary tube for detection of parabens in personal care and cosmetic products. **Science of the Total Environment**, v. 706, p. 135961, 2020.

[135] Mei, M.; Pang, J.; et al. Development of a sensitive method for the determination of parabens in complex samples by online coupling of magnetism-enhanced monolith-based in-tube solid phase microextraction with high performance liquid chromatography. **Analytical Methods**, v. 10, p. 1977–1985, 2018.

[136] Nasrollahi, S.S.; Yamini, Y.; et al. Synthesis of an organic-inorganic hybrid absorbent for in-tube solid-phase microextraction of bisphenol A. **Journal of Separation Science**, v. 44, p. 1122–1129, 2021.

[137] Lee, C.-T.; Kung, P.-H.; et al. Preparation of poly(vinyl alcohol)-chondroitin sulfate hydrogel as matrices in tissue engineering. **Carbohydrate Polymers**, v. 61, p. 348–354, 2005.

[138] Sikareepaisan, P.; Ruktanonchai, U.; et al. Preparation and characterization of asiaticoside-loaded alginate films and their potential for use as effectual wound dressings. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 4, p. 1457–1469, 2011.

[139] Tang, Y.; Du, Y.; et al. Rheological characterisation of a novel thermosensitive chitosan / poly (vinyl alcohol) blend hydrogel. v. 67, p. 491–499, 2007.

[140] Moreira, H.R.; Munarin, F.; et al. Injectable pectin hydrogels produced by internal gelation: PH dependence of gelling and rheological properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 103, p. 339–347, 2014.

[141] Alemán, J. V.; Chadwick, A. V; et al. Definitions of terms relating to the structure and processing of sols, gels, networks, and inorganic-organic hybrid materials (IUPAC Recommendations 2007). **Pure and Applied Chemistry**, v. 79, n. 10, p. 1801–1829, 2007.

[142] Zhang, Y.; Hui, B.; et al. Reactive toughening of polyvinyl alcohol hydrogel and its wastewater treatment performance by immobilization of microorganisms. **RSC Advances**, v. 5, p. 91414–91422, 2015.

[143] Hüsing, N.; Schubert, U. Aerogels - Airy Materials: Chemistry, Structure, and Properties. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 37, n. 1–2, p. 22–45, 1998.

[144] Chen, J.; Peng, Q.; et al. Stretchable, Injectable, and Self-Healing Conductive Hydrogel Enabled by Multiple Hydrogen Bonding toward Wearable Electronics. **Chemistry of Materials**, v. 31, n. 12, p. 4553–4563, 2019.

[145] Caló, E.; Khutoryanskiy, V. V. Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. **European Polymer Journal**, v. 65, p. 252–267, 2015.

[146] Childs, A.; Li, H.; et al. Fabricating customized hydrogel contact lens. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–9, 2016.

[147] Hoffman, A.S. Hydrogels for biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 18–23, 2002.

[148] Brito, C.W.; Rodrigues, F.H.A.; et al. Síntese e caracterização de hidrogéis compósitos a partir de copolímeros acrilamida-acrilato e caulim: efeito da constituição de diferentes caulins do nordeste brasileiro. **Química Nova**, v. 36, p. 40–45, 2013.

[149] Neto, C.G.T.; Dantas, T.N.C.; et al. Permeability studies in chitosan membranes . Effects of crosslinking and poly (ethylene oxide) addition. **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 2630–2636, 2005.

[150] Berger, J.; Reist, M.; et al. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 57, p. 19–34, 2004.

- [151] Gonsalves, A.D.A.; Araújo, C.R.M.; et al. Diferentes estratégias para a reticulação de quitosana. **Química Nova**, v. 34, p. 1215–1223, 2011.
- [152] Ahmed, E.M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. **Journal of Advanced Research**, v. 6, p. 105–121, 2015.
- [153] Mansur, H.S.; Sadahira, C.M.; et al. FTIR spectroscopy characterization of poly (vinyl alcohol) hydrogel with different hydrolysis degree and chemically crosslinked with glutaraldehyde. **Materials Science and Engineering C**, v. 28, p. 539–548, 2008.
- [154] Park, J.; Park, J.; et al. On the Viscoelastic Properties of Poly (vinyl alcohol) and Chemically Crosslinked Poly (vinyl alcohol). p. 1816–1823, 2001.
- [155] Hua, S.; Ma, H.; et al. pH-sensitive sodium alginate /poly (vinyl alcohol) hydrogel beads prepared by combined Ca²⁺ crosslinking and freeze-thawing cycles for controlled release of diclofenac sodium. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 46, p. 517–523, 2010.
- [156] Stone, S.A.; Gosavi, P.; et al. In situ citric acid crosslinking of alginate/polyvinyl alcohol electrospun nano fi bers. **Materials Letters**, v. 112, p. 32–35, 2013.
- [157] Kamoun, E.A.; Kenawy, E.S.; et al. Poly (vinyl alcohol) -alginate physically crosslinked hydrogel membranes for wound dressing applications : Characterization and bio-evaluation. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 8, p. 38–47, 2015.
- [158] Martinez, Y.N.; Piñuel, L.; et al. Polyvinyl Alcohol – Pectin Cryogel Films for Controlled Release of Enrofloxacin. **Appl Biochemistry and Biotechnology**, v. 167, p. 1421–1429, 2012.
- [159] Martínez, Y.N.; Cavello, I.; et al. Bioresource Technology Immobilized keratinase and enrofloxacin loaded on pectin PVA cryogel patches for antimicrobial treatment. v. 145, p. 280–284, 2013.
- [160] Sampaio, N.M.F.M.; Castilhos, N.D.B.; et al. Evaluation of Polyvinyl Alcohol/Pectin-Based Hydrogel Disks as Extraction Phase for Determination of Steroidal Hormones in Aqueous Samples by GC-MS/MS. **Molecules**, v. 24, p. 1–13, 2019.
- [161] PAINTER, T.J. 4 - Algal Polysaccharides. In: **The Polysaccharides**. Toronto, Canada: Elsevier, 1983, p. 195–285.
- [162] Espitia, P.J.P.; Du, W.; et al. Food Hydrocolloids Edible fi lms from pectin : Physical-mechanical and antimicrobial properties - A review. **Food hydrocolloids**, v. 35, p. 287–296, 2014.
- [163] Menakbi, C.; Quignarg, F.; et al. Complexation of Trivalent Metal Cations to Mannuronate Type Alginate Models from a Density Functional Study. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 120, p. 3615–3623, 2016.
- [164] Agulhon, P.; Markova, V.; et al. Structure of Alginate Gels: Interaction of Diuronate Units with Divalent Cations from Density Functional Calculations. **Biomacromolecules**, v. 13, p. 1899–1907, 2012.
- [165] Bolto, B.; Tran, T.; et al. Crosslinked poly(vinyl alcohol) membranes. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 34, p. 969–981, 2009.
- [166] Hassan, C.M.; Peppas, N.A. Structure and Morphology of Freeze/Thawed PVA Hydrogels. v. 33, p. 2472–2479, 2000.
- [167] Kenawy, E.; Al-deyab, S.S. Controlled release of atenolol from freeze / thawed poly (vinyl alcohol) hydrogel. **JSCS**, v. 14, n. 2, p. 237–240, 2010.
- [168] Hasimi, A.; Stavropoulou, A.; et al. Transport of water in polyvinyl alcohol films : Effect of thermal treatment and chemical crosslinking. **European Polymer Journal**, v. 44, n. 12, p. 4114–4123, 2008.
- [169] Basheer, C.; Jayaraman, A.; et al. Polymer-coated hollow-fiber microextraction

- of estrogens in water samples with analysis by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1100, p. 137–143, 2005.
- [170] Bahram, M.; Keshvari, F.; et al. A novel hydrogel based microextraction of analytes. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 20, p. S624–S631, 2016.
- [171] González-martín, R.; Pacheco-fernández, I.; et al. Use of a pH-sensitive polymer in a microextraction and preconcentration method directly combined with high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1619, p. 1–10, 2020.
- [172] Castilhos, N.D.; Sampaio, N.M.; et al. Physical-chemical characteristics and potential use of a novel alginate/zein hydrogel as the sorption phase for polar organic compounds. **Carbohydrate Polymers**, v. 174, p. 507–516, 2017.
- [173] Collins, C.H.; Braga, G.L.; et al. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas, SP: Editora da UNICAMP, 2006.
- [174] Rezaee, M.; Yamini, Y.; et al. Dispersive liquid-liquid microextraction combined with high-performance liquid chromatography-UV detection as a very simple, rapid and sensitive method for the determination of bisphenol A in water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 1511–1514, 2009.
- [175] Watabe, Y.; Kondo, T.; et al. Determination of bisphenol A in environmental water at ultra-low level by high-performance liquid chromatography with an effective on-line pretreatment device. **Journal of Chromatography A**, v. 1032, p. 45–49, 2004.
- [176] Reyes-Gallardo, E.M.; Lucena, R.; et al. Dispersive micro-solid phase extraction of bisphenol A from milk using magnetic nylon 6 composite and its final determination by HPLC-UV. **Microchemical Journal**, v. 124, p. 751–756, 2016.
- [177] Zheng, C.; Zhao, J.; et al. Dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic droplet followed by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection and liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of triclosa. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 3830–3836, 2011.
- [178] Lopes, L.C.; Simas-tosin, F.F.; et al. Effect of low and high methoxyl citrus pectin on the properties of polypyrrole based electroactive hydrogels. **Carbohydrate Polymers**, v. 155, p. 11–18, 2017.
- [179] Suárez, B.; Simonet, B.M.; et al. Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in urine by combining an immobilized carboxylated carbon nanotubes minicolumn for solid-phase extraction with capillary electrophoresis-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1159, p. 203–207, 2007.
- [180] Sombra, L.; Moliner-Martínez, Y.; et al. Carboxylic multi-walled carbon nanotubes as immobilized stationary phase in capillary electrochromatography. **Electrophoresis**, v. 29, p. 3850–3857, 2008.
- [181] González-Fuenzalida, R.A.; López-García, E.; et al. Adsorbent phases with nanomaterials for in-tube solid-phase microextraction coupled on-line to liquid nanochromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1432, p. 17–25, 2016.
- [182] Eugê, M.; Queiroz, C.; et al. Immunoaffinity in-tube solid phase microextraction coupled with liquid chromatography – mass spectrometry for analysis of fluoxetine in serum samples. v. 1174, p. 72–77, 2007.
- [183] Kitagawa, F.; Inoue, K.; et al. Chiral separation of acidic drug components by open tubular electrochromatography using avidin immobilized capillaries. v. 1130, p. 219–226, 2006.
- [184] Walt, D.R.; Agayn, V.I. The chemistry of enzyme and protein immobilization with glutaraldehyde. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 13, p. 425–430,

1994.

- [185] Cras, J.J.; Rowe-Taitt, C.A.; et al. Comparison of chemical cleaning methods of glass in preparation for silanization. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 14, p. 683–688, 1999.
- [186] Monsan, P. Optimization of glutaraldehyde activation of a support for enzyme immobilization. **Journal of Molecular Catalysis**, v. 3, p. 371–384, 1978.
- [187] Phadungath, C. Casein micelle structure : a concise review. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 27, n. May 2004, p. 201–212, 2005.
- [188] European Medicines Agency (2011). Guideline on bioanalytical method validation. 1–23.
- [189] Sanitária, A.-A.N. de V. (2003). Resolução RE nº899 - Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. 1–15.
- [190] Neto, Á.J. dos S. Problemas com o formato dos picos em cromatografia líquida. **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 3, p. 69–77, 2009.
- [191] Neto, Á.J. dos S. Problemas com o formato dos picos em cromatografia líquida - parte 4. **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 3, p. 69–77, 2009.
- [192] Heftmann, E. **Chromatography**. Elsevier B.V., 2004.
- [193] Trenholm, R. a.; Vanderford, B.J.; et al. Determination of household chemicals using gas chromatography and liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1190, p. 253–262, 2008.
- [194] Pradhan, R.; Hejmady, S.; et al. Simultaneous estimation of parabens and bisphenol a in ready-to-eat foodstuffs by using QbD-driven high-pressure liquid chromatography method. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, p. 1–16, 2020.
- [195] Iler, R.K. **The Chemistry of Silica: Solubility, Polymerization, Colloid and Surface Properties, and Biochemistry**. United States: John Wiley & Sons, 1979.
- [196] Slentz, B.E.; Penner, N.A. Nanoliter capillary electrochromatography columns based on collocated monolithic support structures molded in poly (dimethyl siloxane). p. 3736–3743, 2001.
- [197] Higashiyama, S.; Noda, M.; et al. Mixed-ligand modification of polyamidoamine dendrimers to develop an effective scaffold for maintenance of hepatocyte spheroids. **Journal of biomedical materials research**, v. 64A, p. 1–6, 2003.
- [198] Voort, P. Van Der; Vansant, E.F. Silylation of the Silica Surface A Review. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 19, p. 2723–2752, 1996.
- [199] Huheey, J.H.; Keiter, E.A.; et al. **Inorganic Chemistry: Principles of Structure and Reactivity**. New York, USA: HarperCollins College Publishers, 1993.
- [200] McQuarrie, D.A.; Simon, J.D. **Physical Chemistry: A Molecular Approach**. United States: University Science Books, 1997.
- [201] Baptista, J.G.C.; Rodrigues, S.P.J.; et al. Does poly(vinyl alcohol) act as an amphiphilic polymer? An interaction study with simvastatin. **Journal of Molecular Liquids**, v. 222, p. 287–294, 2016.
- [202] Orakdogan, N.; Okay, O. Reentrant conformation transition in poly(N,N-dimethylacrylamide) hydrogels in water-organic solvent mixtures. **Polymer**, v. 47, n. 2, p. 561–568, 2006.
- [203] Li, D.; Kaner, R.B. Processable stabilizer-free polyaniline nanofiber aqueous colloids. **Chemical Communications**, p. 3286–3288, 2005.
- [204] Org.: Borges, K.B.; Figueiredo, E.C. de; et al. **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro, Brazil: LTC, 2015.
- [205] Górecki, T.; Yu, X.; et al. Theory of analyte extraction by selected porous

polymer SPME fibres†. **The Analyst**, v. 124, p. 643–649, 1999.

[206] Cheema, M.; Mohan, M.S.; et al. The association of low-molecular-weight hydrophobic compounds with native casein micelles in bovine milk. **Journal of Dairy Science**, v. 98, p. 5155–5163, 2015.

[207] Cheema, M.; Smith, P.B.; et al. The association of lipophilic phospholipids with native bovine casein micelles in skim milk: Effect of lactation stage and casein micelle size. **The Lancet**, v. 101, p. 1–16, 2018.

[208] Tuinier, R.; Kruif, C.G. De Stability of casein micelles in milk. **Journal of Chemical Physics**, v. 117, p. 1290–1295, 2002.

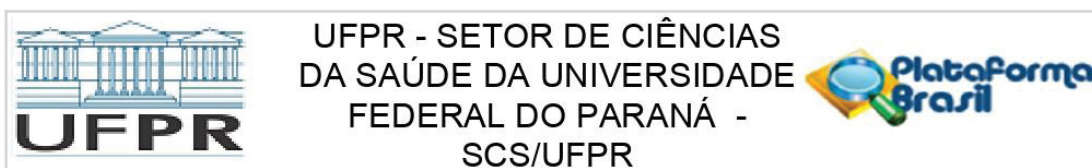
[209] Tholstrup Sejersen, M.; Salomonsen, T.; et al. Zeta potential of pectin-stabilised casein aggregates in acidified milk drinks. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 302–307, 2007.

[210] Gou, Y.; Eisert, R.; et al. Automated in-tube solid-phase microextraction-high-performance liquid chromatography for carbamate pesticide analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 873, p. 137–147, 2000.

[211] Kang, J.H.; Kondo, F. Determination of bisphenol A in milk and dairy products by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Food Protection**, v. 66, p. 1439–1443, 2003.

[212] Tang, Y.Q.; Weng, N. Salting-out assisted liquid-liquid extraction for bioanalysis. **Bioanalysis**, v. 5, p. 1583–1598, 2013.

ANEXO 1 – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA – SETOR DE SAÚDE/UFPR



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Desenvolvimento de microcolunas baseadas em hidrogel para extração de parabenos, triclosan e bisfenol A de leite humano e determinação por LC-UV

Pesquisador: BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 39014920.3.0000.0102

Instituição Proponente: Programa de pós graduação em química

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.495.893

Apresentação do Projeto:

O trabalho é coordenado pelo prof. Bruno Jose Goncalves da Silva (professor do departamento de química), com a colaboração de Naiara Mariana Fiori Monteiro Sampaio (aluna de mestrado) e Izabel C. Riegel-Vidotti (professora do departamento de química). O Complexo Hospital de Clínicas de Universidade Federal do Paraná (Banco de Leite Humano) é instituição co-participante.

Trata-se de uma pesquisa a fim de desenvolver uma metodologia com microcolunas baseadas em hidrogel para detectar a presença de seis interferentes endócrinos em leite humano (metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno, butilparabeno, triclosan e bisfenol A).

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Geral

Avaliação de fases extratoras baseadas em hidrogeis para microextração em fase sólida (in-tube SPME) e análise cromatográfica (LC-UV) de parabenos, triclosan e bisfenol A em leite materno.

Objetivos Específicos

a) Desenvolvimento de um método cromatográfico (LC-UV) para a determinação dos compostos alvo deste estudo: metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno, triclosan e bisfenol A.

b) Desenvolvimento e avaliação de fases extratoras baseadas em hidrogeis para a microextração em fase gel dos analitos.

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - 1º andar

Bairro: Alto da Glória

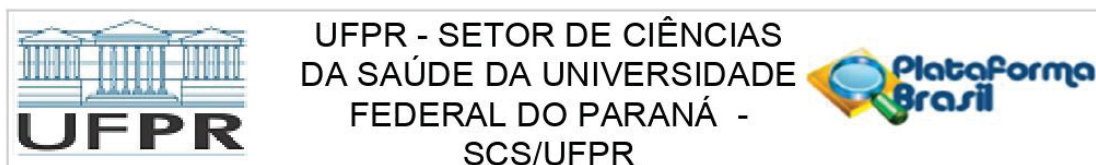
UF: PR

Município: CURITIBA

CEP: 80.060-240

Telefone: (41)3360-7259

E-mail: cometica.saude@ufpr.br



Continuação do Parecer: 4.495.893

- c) Otimização das variáveis envolvidas no processo in-tube SPME.
- d) Avaliação dos parâmetros analíticos de mérito.
- e) Aplicação da metodologia desenvolvida em amostras de leite materno.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo os pesquisadores:

Quais os benefícios, diretos ou indiretos, para a população estudada e a sociedade?

O desenvolvimento e validação do método analítico proposto disponibilizará uma ferramenta que poderá ser aplicada na obtenção de dados a respeito da exposição dos seres humanos aos interferentes endócrinos por meio do uso de produtos presentes no cotidiano da população, como cosméticos, produtos de higiene pessoal e recipientes plásticos.

Quais os riscos inerentes ou decorrentes da pesquisa?

Os riscos envolvidos na pesquisa são referentes à manipulação do leite humano, que é um fluido biológico e, portanto, existe risco de contaminação do analista, se este não empregar as medidas de segurança adequadas como uso de luvas e máscaras descartáveis, bem como a higienização adequada do ambiente onde as amostras serão manipuladas. Quanto às doadoras de leite humano, o processo de ordenha não apresenta penalizações à mãe ou reduz a secreção láctea.

Qual a possibilidade de ocorrência?

A possibilidade de ocorrência dos riscos é mínima, quando tomadas as medidas de prevenção necessárias.

Quais as medidas para sua minimização e proteção do participante da pesquisa?

Para minimizar os riscos de contaminação do analista, será empregado o uso de luvas e máscaras descartáveis, bem como a higienização adequada dos materiais e do ambiente de manipulação. Quanto às doadoras de leite humano, serão providas as instruções do Banco de Leite Humano do CHC/UFPR a respeito dos cuidados e procedimentos adequados para a doação do leite humano, de forma a garantir a segurança da doadora e integridade da amostra.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma pesquisa de tema bastante relevante para a sociedade.

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - 1º andar

Bairro: Alto da Glória

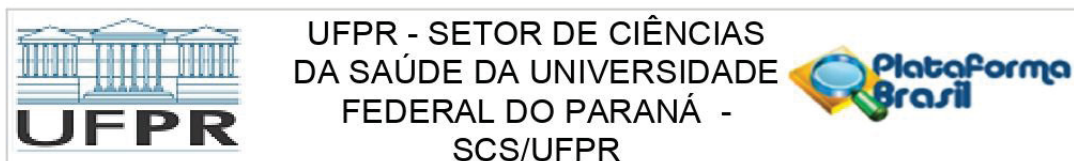
UF: PR

Telefone: (41)3360-7259

Município: CURITIBA

CEP: 80.060-240

E-mail: cometica.saude@ufpr.br



Continuação do Parecer: 4.495.893

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O termos foram apresentados.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências apontadas no parecer anterior foram corrigidas. Sou favorável à aprovação do projeto.

Favor inserir em seu TCLE e TALE o número do CAAE e o número do Parecer de aprovação, para que possa aplicar aos participantes de sua pesquisa, conforme decisão da Coordenação do CEP/SD de 13 de julho de 2020.

Após o isolamento, retornaremos à obrigatoriedade do carimbo e assinatura nos termos dos novos projetos.

Qualquer dúvida, retornar e-mail ou pelo WhatsApp 41-3360-7259.

Considerações Finais a critério do CEP:

Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais e final, sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos, através da Plataforma Brasil - no modo: NOTIFICAÇÃO. Demais alterações e prorrogação de prazo devem ser enviadas no modo EMENDA. Lembrando que o cronograma de execução da pesquisa deve ser atualizado no sistema Plataforma Brasil antes de enviar solicitação de prorrogação de prazo.

Emenda – ver modelo de carta em nossa página: www.cometica.ufpr.br (obrigatório envio)

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P	10/12/2020		Aceito

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - 1º andar

Bairro: Alto da Glória

CEP: 80.060-240

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-7259

E-mail: cometica.saude@ufpr.br



**UFPR - SETOR DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO PARANÁ -
SCS/UFPR**



Continuação do Parecer: 4.495.893

Básicas do Projeto	ETO_1643169.pdf	09:36:53		Aceito
Outros	Projeto_NaiaraSampaio_CORRIGIDO.docx	10/12/2020 09:35:38	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	TCLE_ADULTO_CORRIGIDO.docx	23/11/2020 16:31:49	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	CARTA_ENCAMINHAMENTO_PESQUISADOR_AO_CEP_CORRIGIDO.pdf	23/11/2020 16:31:16	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	Resposta_pendencias.docx	23/11/2020 16:29:41	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_detalhado.doc	07/10/2020 11:04:46	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	TERMO_GUARDA_MATERIAL_BIOLOGICO.pdf	07/10/2020 10:58:14	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	CheckList.pdf	07/10/2020 10:55:10	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	CONCORDANCIA_DOS_SERVICOS_ENVOLVIDOS_BLH.pdf	07/10/2020 10:54:01	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	DECLARACAO_COPARTICIPANTE.pdf	05/10/2020 13:09:54	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	ANALISE_MERITO.pdf	05/10/2020 13:09:08	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	DECLARACAO_SERVICOS_ENVOLVIDOS_PPGQ.pdf	05/10/2020 13:08:15	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	Concordancia_Unidades_DQUI.pdf	05/10/2020 13:07:53	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	CONCORDANCIA_DOS_SERVICOS_ENVOLVIDOS_TOCOGINECOLOGIA.pdf	05/10/2020 13:07:18	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DECLARACOES_COMPROMISSO_EQUIPE_PESQUISA.pdf	05/10/2020 13:03:50	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto.pdf	05/10/2020 13:03:07	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	CARTA_ENCAMINHAMENTO_PESQUISADOR_AO_CEP.pdf	05/10/2020	BRUNO JOSE	Aceito

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - 1º andar

Bairro: Alto da Glória

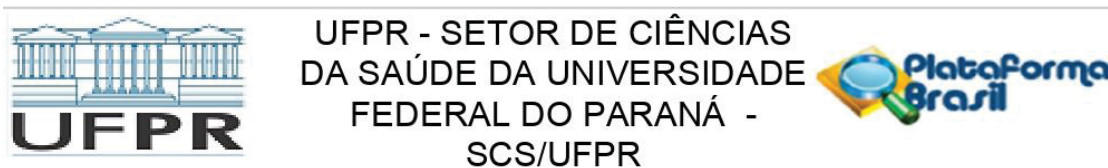
CEP: 80.060-240

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-7259

E-mail: cometica.saude@ufpr.br



Continuação do Parecer: 4.495.893

Outros	ADOR_AO_CEP.pdf	11:52:48	GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	DECLARACAO_AUSENCIA_CUSTOS.pdf	05/10/2020 11:50:42	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	Extrato_Atta_PPGQ.pdf	05/10/2020 11:45:55	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_ADULTO.docx	05/10/2020 11:33:48	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CURITIBA, 12 de Janeiro de 2021

Assinado por:
IDA CRISTINA GUBERT
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - 1º andar

Bairro: Alto da Glória

UF: PR

Município: CURITIBA

CEP: 80.060-240

Telefone: (41)3360-7259

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

ANEXO 2 – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA – CHC/UFPR



HOSPITAL DE CLÍNICAS DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ - HCUFPR



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Desenvolvimento de microcolunas baseadas em hidrogel para extração de parabenos, triclosan e bisfenol A de leite humano e determinação por LC-UV

Pesquisador: BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 39014920.3.3001.0096

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.520.993

Apresentação do Projeto:

Projeto de pesquisa do departamento de Química da UFPR, com orientação de aluna de doutorado, tendo como co-participante o Hospital de Clínicas. Trata-se de pesquisa que pretende desenvolver uma metodologia de microcolunas baseadas em hidrogel para detectar a presença de interferentes endócrinos em leite humano.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo geral: - Avaliação de fases extratoras baseadas em hidrogeis para microextração em fase sólida (in-tube SPME) e análise cromatográfica (LC-UV) de parabenos, triclosan e bisfenol A em leite materno. **Objetivos específicos:** Desenvolvimento de um método cromatográfico (LC-UV) para a determinação dos compostos alvo deste estudo: metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno, triclosan e bisfenol A.- Desenvolvimento e avaliação de fases extratoras baseadas em hidrogeis para a microextração em fase gel dos analitos. - Otimização das variáveis envolvidas no processo in-tube SPME. - Avaliação dos parâmetros analíticos de mérito. - Aplicação da metodologia desenvolvida em amostras de leite materno.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos envolvidos na pesquisa são referentes à manipulação do leite humano, que é um fluido biológico e, portanto, existe risco de contaminação do analista, se este não empregar as medidas de segurança adequadas como uso de luvas e máscaras descartáveis, bem como a higienização

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181

Bairro: Alto da Glória

CEP: 80.060-900

UF: PR **Município:** CURITIBA

Telefone: (41)3360-1041

Fax: (41)3360-1041

E-mail: cep@hc.ufpr.br



HOSPITAL DE CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - HCUFPR



Continuação do Parecer: 4.520.993

adequada do ambiente onde as amostras serão manipuladas. Quanto às doadoras de leite humano, o processo de ordenha não apresenta penalizações à mãe ou reduz a secreção lática. Com relação aos benefícios, O desenvolvimento e validação do método analítico disponibilizará uma ferramenta que poderá ser aplicada na obtenção de dados a respeito da exposição dos seres humanos aos interferentes endócrinos por meio do uso de produtos presentes no cotidiano da população, como cosméticos, produtos de higiene pessoal e recipientes plásticos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de pesquisa com relevância na medida em que desenvolve técnicas de preparo com o objetivo de isolar e concentrar interferentes endócrinos. Além disso, no desenvolvimento de novos materiais sorventes com o intuito de obter fases extratoras mais seletivas, com alta capacidade de sorção, estáveis e de baixo custo.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram apresentados conforme obrigatoriedade.

Recomendações:

É obrigatório trazer ao CEP/HC uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido que foi aprovado, para assinatura e rubrica, o mesmo deve estar em formatação adequada e com as caixas de rubricas no rodapé das páginas que não contenham assinatura. Após, fazer cópia fiel do TCLE aprovado e rubricado em duas vias: uma ficará com o pesquisador e outra com o participante da pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto aprovado sem pendências e/ou adequações.

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HC-UFPR, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/2012 e na Norma Operacional Nº 001/2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto, conforme proposto, para início da Pesquisa. Solicitamos que sejam apresentados a este CEP relatórios semestrais sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos. Os documentos da pesquisa devem ser mantidos arquivados.

É dever do CEP acompanhar o desenvolvimento dos projetos por meio de relatórios semestrais dos pesquisadores e de outras estratégias de monitoramento, de acordo com o risco inerente à

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181

Bairro: Alto da Glória

CEP: 80.060-900

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-1041

Fax: (41)3360-1041

E-mail: cep@hc.ufpr.br



HOSPITAL DE CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - HCUFPR



Continuação do Parecer: 4.520.993

pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Outros	Projeto_NaiaraSampaio_CORRIGIDO.docx	10/12/2020 09:35:38	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	TCLE_ADULTO_CORRIGIDO.docx	23/11/2020 16:31:49	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	CARTA_ENCAMINHAMENTO_PESQUISADOR_AO_CEP_CORRIGIDO.pdf	23/11/2020 16:31:16	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	Resposta_pendencias.docx	23/11/2020 16:29:41	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_detalhado.doc	07/10/2020 11:04:46	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	TERMO_GUARDA_MATERIAL_BIOLOGICO.pdf	07/10/2020 10:58:14	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	CheckList.pdf	07/10/2020 10:55:10	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	CONCORDANCIA_DOS_SERVICOS_ENVOLVIDOS_BLH.pdf	07/10/2020 10:54:01	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	DECLARACAO_COPARTICIPANTE.pdf	05/10/2020 13:09:54	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	ANALISE_MERITO.pdf	05/10/2020 13:09:08	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	DECLARACAO_SERVICOS_ENVOLVIDOS_PPGQ.pdf	05/10/2020 13:08:15	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	Concordancia_Unidades_DQUI.pdf	05/10/2020 13:07:53	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	CONCORDANCIA_DOS_SERVICOS_ENVOLVIDOS_TOCOGINECOLOGIA.pdf	05/10/2020 13:07:18	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181

Bairro: Alto da Glória

CEP: 80.060-900

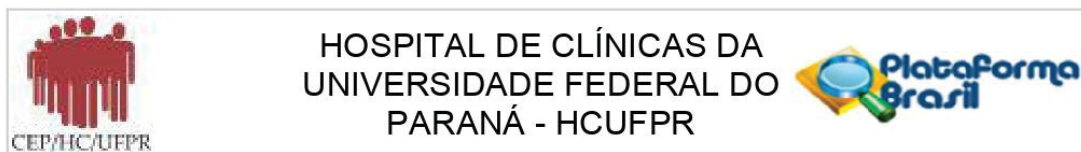
UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-1041

Fax: (41)3360-1041

E-mail: cep@hc.ufpr.br



Continuação do Parecer: 4.520.993

Outros	CARTA_ENCAMINHAMENTO_PESQUISADOR_AO_CEP.pdf	05/10/2020 11:52:48	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	DECLARACAO_AUSENCIA_CUSTOS.pdf	05/10/2020 11:50:42	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	Extrato_Atta_PPGQ.pdf	05/10/2020 11:45:55	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_ADULTO.docx	05/10/2020 11:33:48	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CURITIBA, 02 de Fevereiro de 2021

Assinado por:
Niazy Ramos Filho
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181
Bairro: Alto da Glória **CEP:** 80.060-900
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3360-1041 **Fax:** (41)3360-1041 **E-mail:** cep@hc.ufpr.br

ANEXO 3 – PRODUÇÃO CIENTÍFICA

O Quadro 1 apresenta a produção científica da aluna durante o Doutorado em Química.

QUADRO 2 – PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O DOUTORADO.

Tipo de trabalho	Evento/revista	Título	Ano
Artigo	Molecules	Evaluation of Polyvinyl Alcohol/Pectin-Based Hydrogel Disks as Extraction Phase for Determination of Steroidal Hormones in Aqueous Samples by GC-MS/MS.	1/2019
Artigo	Microchimica Acta	Polypyrrole nanotubes for electrochemically controlled extraction of atrazine, caffeine and progesterone.	1/2019
Congresso	Brazil MRS Meeting	A new hydrogel based on polyvinyl alcohol and pectin applied as a sorbent phase for the extraction of steroidal hormones from aqueous matrices.	2/2017
Congresso	Brazil MRS Meeting	Alginate/zein hydrogel as promising extraction phase for emerging contaminants.	2/2017
Congresso	Enqa	Hidrogel de álcool polivinílico/pectina como fase extratora para determinação de hormônios esteroidais em águas superficiais por GC-MS/MS.	2/2018
Congresso	Enqa	Síntese e avaliação de esferas de hidrogel como fase extratora para determinação de contaminantes de preocupação emergente em matrizes aquosas por GC-MS/MS.	2/2018
Congresso	Colacro	Alginate/zein hydrogel-coated polypropylene fiber as sorbent phase for solid phase microextraction.	2/2019
Congresso	Colacro	Evaluation of globular and nanotubular polypyrrole as extraction phase with electrochemical control for the detection of atrazine, caffeine, progesterone in aqueous samples by GC-MS.	2/2019