

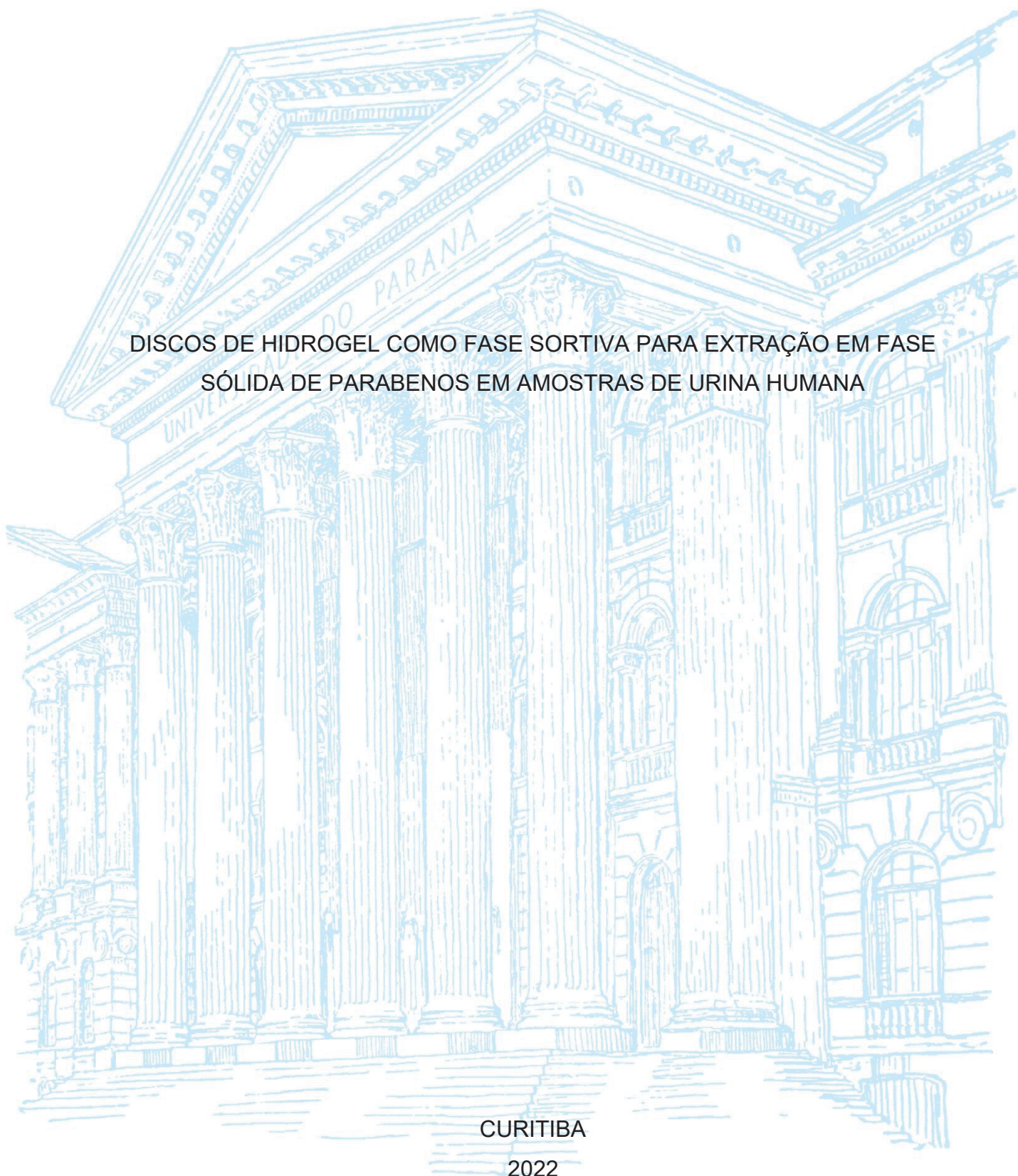
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANDRESSA MARINHO

DISCOS DE HIDROGEL COMO FASE SORTIVA PARA EXTRAÇÃO EM FASE
SÓLIDA DE PARABENOS EM AMOSTRAS DE URINA HUMANA

CURITIBA

2022



ANDRESSA MARINHO

DISCOS DE HIDROGEL COMO FASE SORTIVA PARA EXTRAÇÃO EM FASE
SÓLIDA DE PARABENOS EM AMOSTRAS DE URINA HUMANA

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do título de Mestre em Química, ao curso
de Pós-graduação em Química, Setor de Ciências
Exatas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Bruno José Gonçalves da
Silva

CURITIBA

2022

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Marinho, Andressa

Discos de hidrogel como fase sortiva para extração em fase sólida de parabenos em amostras de urina humana / Andressa Marinho. – Curitiba, 2022.

1 recurso on-line : PDF.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química.

Orientador: Bruno José Gonçalves da Silva

1. Hidrogel. 2. Parabenos. 3. Urina. 4. Álcool polivinílico. 5. Pectina. I. Universidade Federal do Paraná. II. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Silva, Bruno José Gonçalves da. IV. Título.

Bibliotecário: Elias Barbosa da Silva CRB-9/1894



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS EXATAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO QUÍMICA -
40001016026P2

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 dissertação de Mestrado de **ANDRESSA MARINHO** intitulada: **DISCOS DE HIDROGEL COMO FASE SORTIVA PARA EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA DE PARABENOS EM AMOSTRAS DE URINA HUMANA**, 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 mestra 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, 21 de Outubro de 2022.

Assinatura Eletrônica

21/10/2022 18:38:40.0

BRUNO JOSÉ GONÇALVES DA SILVA

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

21/10/2022 17:48:55.0

GILBERTO ABATE

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

24/10/2022 09:35:09.0

EDMAR MARTENDAL DIAS DE SOUZA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA)

Por toda paciência, incentivo e amor incondicional,
dedico essa dissertação à minha mãe.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me dar forças para concluir essa etapa tão importante na minha vida.

À minha mãe, Andréia, e ao meu irmão, André, por todo amor que tiveram comigo durante esse período, por não me deixarem desistir e serem meus maiores incentivadores.

Ao meu orientador, o Prof. Dr. Bruno José Gonçalves da Silva, por me permitir fazer parte do seu grupo de pesquisa, por toda paciência e principalmente por confiar em mim. Sua orientação contribuiu não somente para meu crescimento profissional, mas também pessoal.

Ao Prof. Dr. Gilberto Abate, pela dedicação na correção do meu projeto e relatório anual, assim como, nas fundamentais contribuições no exame de qualificação. Agradeço também o aceite em participar da minha banca de defesa da dissertação.

Aos professores membros da banca de qualificação, Prof^a. Dra. Glauca Pantano, e de defesa, Prof. Dr. Edmar Martendal Dias de Souza, pelas importantes contribuições a este trabalho.

À Prof^a. Dra. Noemi Nagata, por ceder os padrões analíticos utilizados neste trabalho e ao Prof. Dr. Marco Tadeu Grassi, por conceder o uso de diversos equipamentos que permitiram a realização desse projeto.

Aos voluntários, por gentilmente doarem as amostras biológicas para a realização desse trabalho.

Aos membros do CroMe, em especial à Beatriz, Carol e Rayta, por me ouvirem quando mais precisei, por todos os conselhos, por estarem sempre dispostas a me ajudar e pelos momentos de descontração no laboratório, a amizade de vocês com certeza tornou essa jornada muito mais fácil. Agradeço também a Camille por toda ajuda com o LC-DAD.

Às minhas amigas da graduação, Bianca, Bruna e Isabela, que mesmo seguindo caminhos diferentes, sei que posso contar com a amizade, o apoio e o carinho de vocês.

Aos colegas dos grupos de pesquisa GQA, GAQQ e Tecotrater.

À CAPES e ao CNPq, pelo apoio financeiro concedido para a realização deste mestrado.

Ao Programa de Pós-graduação em Química (PPGQ).

À Universidade Federal do Paraná.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a minha formação acadêmica.

“Em algum lugar, alguma coisa incrível está esperando para ser descoberta”.

(Carl Sagan)

RESUMO

Os parabenos são ésteres do ácido 4-hidroxibenzoico que possuem propriedades antimicrobianas e antifúngicas, e são amplamente empregados em produtos de higiene e cosméticos. Entretanto, o uso dessas substâncias pode implicar em alterações no sistema endócrino humano, acarretando em diversas doenças, entre elas o câncer. Assim, diversas pesquisas têm sido realizadas a fim de determinar esses compostos em diversas matrizes, por exemplo, ambiental e biológica. Porém, devido à complexidade dessas matrizes e a concentração dos parabenos a níveis de ng L^{-1} , necessita-se de uma etapa de preparo de amostra, onde a extração em fase sólida (SPE) é amplamente utilizada, contudo, apresenta algumas desvantagens, como o custo dos cartuchos comerciais e aplicação única. Desse modo, diversos estudos vêm sendo conduzidos no desenvolvimento de novos materiais sorventes, que apresentem menor custo, além da possibilidade de reuso e da extração de compostos polares, e entre eles, um material ainda pouco explorado e que vem ganhando destaque, tem-se o hidrogel. Dessa maneira, o objetivo deste trabalho foi a síntese de um disco de hidrogel composto de PVOH/pectina para a extração de metilparabeno (MPB), etilparabeno (EPB), propilparabeno (PPB) e butilparabeno (BPB) em amostras de urina humana utilizando a SPE e posterior determinação por LC-DAD. O hidrogel desenvolvido foi capaz de promover a extração dos quatro parabenos mesmo com a diferença de polaridade entre eles. Observou-se que os hidrogéis mais concentrados, ou seja, aqueles que utilizaram uma dispersão mais concentrada, apresentaram menores valores de desvio padrão relativo entre as extrações, e isso está correlacionado com o menor grau de intumescimento, já que hidrogéis mais concentrados apresentam maior densidade de reticulação, que acarreta em menor difusão de soluto no material. Assim, foi possível o desenvolvimento de uma metodologia analítica para a determinação dos parabenos em urina, onde para os quatro analitos, obteve-se uma linearidade adequada com valores de $R^2 \geq 0,99$ e LOQ de $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$, já o LOD encontrado foi de $0,034$, $0,020$, $0,007$, e $0,005 \mu\text{g mL}^{-1}$, para o MPB, EPB, PPB e BPB, respectivamente. O material também apresentou possibilidade de reuso, onde para 15 extrações consecutivas, não houve degradação física e não foi observado efeito memória. Os resultados obtidos nesse trabalho demonstram o potencial para uso do hidrogel e abre horizontes para uma maior compreensão para sua aplicação como fase extratora.

Palavras-chave: Hidrogel; SPE; Parabenos; Urina humana; LC-DAD; Álcool polivinílico; Pectina.

ABSTRACT

Parabens are 4-hydroxybenzoic acid esters that have antimicrobial and antifungal properties, and are widely used in hygiene products and cosmetics. However, the use of these substances can lead to changes in the human endocrine system, leading to several diseases, including cancer. Thus, several researches have been carried out in order to determine these compounds in different matrices, for example, environmental and biological. However, due to the complexity of these matrices and the concentration of parabens at levels of ng L^{-1} , a sample preparation step is needed, where solid phase extraction (SPE) is widely used, however having some disadvantages, such as the cost of commercial cartridges and single application. So, several studies have been conducted in the development of new sorbent materials, which have a lower cost, in addition to the possibility of reuse and extraction of polar compounds, and among them, a material still little explored and that has gained prominence, there is the hydrogel. Thereby, the objective of this work was the synthesis of a hydrogel disk composed of PVOH/pectin for the extraction of methylparaben (MPB), ethylparaben (EPB), propylparaben (PPB) and butylparaben (BPB) in human urine samples using SPE and subsequent determination by LC-DAD. The hydrogel developed was able to promote the extraction of the four parabens even with the difference in polarity between them. It was observed that the more concentrated hydrogels, that is, those that used a more concentrated dispersion, had lower values of relative standard deviation between extractions, and this is correlated with the lower degree of swelling, since more concentrated hydrogels have a higher density of crosslinking, which leads to less solute diffusion in the material. That way, it was possible to develop an analytical methodology for the determination of parabens in urine, which for the four analytes, adequate linearity was obtained with values of $R^2 \geq 0.99$ and LOQ of $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$, since the LOD found was 0.034, 0.020, 0.007, and $0.005 \mu\text{g mL}^{-1}$ for MPB, EPB, PPB and BPB, respectively. The material also presented the possibility of reuse, in which for 15 consecutive extractions, there was no physical degradation and no memory effect was observed. The results obtained in this work demonstrate the potential for using the hydrogel and open horizons for a better understanding of its application as an extractor phase.

Keywords: Hydrogel; SPE; Parabens; Human urine; LC-DAD; Polyvinyl alcohol; Pectin

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ESTRUTURA QUÍMICA DOS PARABENOS.....	23
FIGURA 2 - (a) EXEMPLO DE FASE EXTRATORA DISPONÍVEL COMERCIALMENTE EM FORMA DE DISCO E CARTUCHO, RESPECTIVAMENTE E (b) ETAPAS ENVOLVIDAS NA SPE.....	27
FIGURA 3 - APLICAÇÃO DE HIDROGÉIS COMO CURATIVOS, DISPONÍVEIS COMERCIALMENTE.....	29
FIGURA 4 - ESTRUTURA RETICULADA DO HIDROGEL	30
FIGURA 5 - POSSÍVEIS ESTRUTURAS DOS POLÍMEROS PVOH ALTAMENTE HIDROLISADO, PECTINA E ALGINATO.....	32
FIGURA 6 - (a) FIBRA DE POLIPROPILENO REVESTIDA COM HIDROGEL DE ALGINATO/ZEÍNA, (b) DISCOS DE HIDROGEL DE PVOH/PECTINA E (c) FIBRA DE POLIPROPILENO REVESTIDA COM HIDROGEL DE ALGINATO.....	33
FIGURA 7 - ROTA DE SÍNTESE DOS HIDROGÉIS DE PVOH/PECTINA.....	41
FIGURA 8 - DISPOSITIVO DE EXTRAÇÃO (a) FECHADO, (b) ABERTO E (c) SISTEMA MANIFOLD.....	42
FIGURA 9 - ETAPAS EMPREGADAS NA EXTRAÇÃO DOS ANALITOS.....	43
FIGURA 10 - CROMATOGRAMAS OBTIDOS NA SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA DOS ANALITOS (MPB, EPB, PPB E BPB – 1,0 µg mL ⁻¹ , NESSA ORDEM) PARA OS MÉTODOS 1 A 5.....	53
FIGURA 11 - CROMATOGRAMAS OBTIDOS NA SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA DOS ANALITOS (MPB, EPB, PPB E BPB – 1,0 µg mL ⁻¹ , NESSA ORDEM) PARA OS MÉTODOS 6 A 8.....	55
FIGURA 12 - CROMATOGRAMAS OBTIDOS NA SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA DOS ANALITOS (MPB, EPB, PPB E BPB – 1,0 µg mL ⁻¹ , NESSA ORDEM) PARA OS MÉTODOS 9 A 12.....	56
FIGURA 13 - HIDROGÉIS DE (a) P10PC3,0, (b) P15AI2,0, (c) P10PC1,0, (d) P15PC2,0 E (e) P15PC3,0.....	60
FIGURA 14 - CROMATOGRAMAS REFERENTES À EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DOS PARABENOS 1,0 µg mL ⁻¹ , (n=3).....	61
FIGURA 15 - CROMATOGRAMAS REFERENTES À EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DOS PARABENOS 1,0 µg mL ⁻¹ , UTILIZANDO O HIDROGEL (a) P10PC1,0, (b) P15PC2,0 E (c) P15PC3,0, (n=3).....	62
FIGURA 16 - CROMATOGRAMAS REFERENTES À EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DOS PARABENOS 5,0 µg mL ⁻¹ , UTILIZANDO O HIDROGEL (a) P10PC1,0, (b) P15PC2,0 E (c) P15PC3,0, (n=3).....	63

FIGURA 17 - ÁREAS MÉDIAS DOS PICOS CROMATOGRÁFICOS (n=3) DOS PARABENOS DE ACORDO COM A COMPOSIÇÃO DO HIDROGEL EMPREGADO NA EXTRAÇÃO DOS ANALITOS, NA CONCENTRAÇÃO DE 5,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$	64
FIGURA 18 - ÁREAS MÉDIAS DOS PICOS CROMATOGRÁFICOS (n=4) DOS PARABENOS DE ACORDO COM A COMPOSIÇÃO DO HIDROGEL EMPREGADO NA EXTRAÇÃO DOS ANALITOS, NA CONCENTRAÇÃO DE 5,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$	66
FIGURA 19 - GRAU DE INTUMESCIMENTO (% m/m) DOS HIDROGÉIS À 25 °C.	68
FIGURA 20 - PERDA DE ÁGUA (% m/m) DOS HIDROGÉIS À 25 °C.	69
FIGURA 21 - IMAGEM POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) DO HIDROGEL P15PC2 AMPLIADO 750x.....	70
FIGURA 22 - CROMATOGRAMAS REFERENTES À EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA ATZ 2,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, UTILIZANDO O HIDROGEL P20PC2,0, (n=3).	72
FIGURA 23 - GRÁFICO DE PARETO DOS EFEITOS PARA O (a) MPB, (b) EPB, (c) PPB E (d) BPB.....	76
FIGURA 24 - VARIAÇÃO DAS RESPOSTAS DO BPB PARA OS TRÊS PARÂMETROS AVALIADOS	77
FIGURA 25 - ÁREAS DOS PICOS CROMATOGRÁFICOS DO MPB, EPB, PPB E BPB PARA CADA ETAPA DA ELUIÇÃO (n=3).	78
FIGURA 26 - ÁREAS DE PICO CROMATOGRÁFICO DO MPB, EPB, PPB e BPB, NO MODO DE ELUIÇÃO DIRETA E EM ETAPAS COM (a) 4,0 mL E (b) 5,0 mL.....	79
FIGURA 27 - CROMATOGRAMAS REFERENTES À EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DOS PARABENOS UTILIZANDO URINA HUMANA, COM COMPRIMENTOS DE ONDA MONITORADOS DE (a) 254 nm E (b) 222 nm.	80
FIGURA 28 - CROMATOGRAMAS REFERENTES À EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DOS PARABENOS UTILIZANDO URINA HUMANA, COM COMPRIMENTO DE ONDA MONITORADO DE 270 nm.	81
FIGURA 29 - RAZÕES A_d/A_{PI} DAS 15 EXTRAÇÕES SUBSEQUENTES PARA O MPB, EPB, PPB E BPB EMPREGANDO O HIDROGEL P20PC2,0.	82
FIGURA 30 - CURVAS ANALÍTICAS EXTRAÍDAS OBTIDAS PARA O (A) MPB, (B) EPB, (C) PPB E (D) BPB, (n=3).	83
FIGURA 31 - CROMATOGRAMAS REFERENTES A EXTRAÇÃO DAS AMOSTRAS DE URINA (a)1, (b) 2 E (c) 3, SEM E COM FORTIFICAÇÃO.....	87

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS PARABENOS.	23
TABELA 2 - MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DE PARABENOS EM AMOSTRAS DE URINA.	25
TABELA 3 - NOVAS FASES EXTRATORAS EMPREGADAS NA EXTRAÇÃO DE ANALITOS EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS POR SPE.	28
TABELA 4 - EXEMPLOS DE APLICAÇÃO DO HIDROGEL COMO FASE EXTRATORA. ...	34
TABELA 5 - COMPOSIÇÃO E VAZÃO DE FASE MÓVEL AVALIADAS.	39
TABELA 6 - FÓRMULAS PARA DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS.	39
TABELA 7 - COMPOSIÇÃO DOS DISCOS DE HIDROGEL AVALIADOS.	41
TABELA 8 - COMPRIMENTOS DE ONDA DE MÁXIMA ABSORÇÃO.	45
TABELA 9 - CONDIÇÕES AVALIADAS NO PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ⁴	46
TABELA 10 - CONDIÇÕES AVALIADAS NO PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ³	46
TABELA 11 - COMPOSIÇÕES DE FASE MÓVEL (v/v) AVALIADAS NA SEPARAÇÃO DOS PARABENOS.	52
TABELA 12 - PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS PARA OS MÉTODOS 1 A 5.	54
TABELA 13 - PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS PARA OS MÉTODOS 6 A 8.	55
TABELA 14 - PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS PARA OS MÉTODOS 9 A 12.	57
TABELA 15 - HIDROGÉIS COM DIFERENTES PROPORÇÕES ENTRE OS POLÍMEROS	59
TABELA 16 - HIDROGÉIS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DAS DISPERSÕES DOS POLÍMEROS.	61
TABELA 17 - HIDROGÉIS SELECIONADOS PARA A AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA DISPERSÃO DE POLÍMERO UTILIZADA.	65
TABELA 18 - PADRÕES INTERNOS AVALIADOS.	71
TABELA 19 - MATRIZ DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ⁴ COM TRIPLICATA DO PONTO CENTRAL.	73
TABELA 20 - MATRIZ DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ³ COM TRIPLICATA DO PONTO CENTRAL.	74
TABELA 21 - RAZÃO ÁREA PICOS CROMATOGRÁFICOS (A_a/A_{PI}) PARA OS ENSAIOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ³ COM TRIPLICATA DO PONTO CENTRAL.	74
TABELA 22 - ÁREA DE PICO ACUMULADA E PROPORCIONAL DE CADA ETAPA.	78
TABELA 23 - COMPRIMENTOS DE ONDA MONITORADOS PARA OS PARABENOS E PI.	81
TABELA 24 - PARÂMETRO DE LINEARIDADE E LLOQ.	84

TABELA 25 – COMPARAÇÃO DE MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE MPB, EPB, PPB E BPB EM URINA.....	85
TABELA 26 - PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS PARA CADA CONCENTRAÇÃO DA CURVA ANALÍTICA (n=3).....	86
TABELA 27 - RESULTADOS DA APLICAÇÃO DA METODOLOGIA DESENVOLVIDA (n=3).	87

LISTA DE ABREVIATURAS

- ACN – Acetonitrila (*Acetonitrile*)
- ANOVA – Análise de Variância (*Analysis of Variance*)
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- ATZ – Atrazina (*Atrazine*)
- BPB – Butilparabeno (*Butylparaben*)
- BzBP – Benzilparabeno (*Benzylparaben*)
- CAS – *Chemical Abstracts Service*
- CBR – Carbaril (*Carbaryl*)
- CNA – Ácido Cinâmico (*Cinnamic Acid*)
- CroMe – Grupo de Cromatografia de Técnicas de Microextração
- DAD – Detector de arranjo de diodo (*Diode-Array Detector*)
- DES – Dietilestilbestrol (*Diethylstilbestrol*)
- DHPMM – Polimetilacrilato dihidroxilado (*Dihydroxylated polymethylmethacrylate*)
- DLLME – Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (*Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*)
- DMSPE – Extração em Fase Sólida Dispersiva Magnética (*Dispersive Micro Solid Phase Extraction*)
- DSPE – Microextração em fase sólida dispersiva (*Dispersive Solid Phase Extraction*)
- EGDMA – Dimetilacrilado de Etilenoglicol (*Ethylene Glycol Dimethacrylate*)
- EPB – Etilparabeno (*Ethylparaben*)
- FDA – *Food and Drug Administration*
- FID – Detector de ionização de chama (*Flame Ionization Detector*)
- FPSE – *Fabric Phase Sorptive Extraction*
- GC – Cromatografia Gasosa (*Gas Chromatography*)
- GO – Óxido de grafeno (*Graphene Oxide*)
- HepPB – Heptilparabeno (*Heptylparaben*)
- HLB – Balanço Hidrofílico-Lipofílico (*Hydrophilic-Lipophilic Balance*)
- HM – Alto grau de metoxilação (*High Methoxyl*)
- HPA – Hidrocarboneto Policíclico Aromático (*Polycyclic Aromatic Hydrocarbon*)
- iBPB – Isobutilparabeno (*Isobutylparaben*)
- iPPB – Isopropilparabeno (*Isopropylparaben*)
- IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada (*International Union of Pure and Applied Chemistry*)
- LC – Cromatografia Líquida (*Liquid Chromatography*)
- LDH – Hidróxido Duplo em Camada (*Lamellar Double-Hydroxide*)
- LLE – Extração Líquido-Líquido (*Liquid-Liquid Extraction*)

LLOQ – Limite Inferior de Quantificação (*Lower Limit of Quantification*)

LM – Baixo grau de metoxilação (*Low Methoxyl*)

LOD – Limite de Detecção (*Limit of Detection*)

Log $k_{o/w}$ – Logaritmo do coeficiente de partição octanol/água (*Logarithm of the octanol/water partition coefficient*)

MAA – Ácido Metacrílico (*Methacrylic Acid*)

MEOH – Metanol (*Methanol*)

MEPS – Microextração em Sorvente Empacotado (*Microextraction by Packed Sorbent*)

MEV – Microscopia Eletrônica de varredura (*Scanning electron microscope*)

MI-FSPE – *Magnet Integrated Fabric Phase Sorptive Extraction*

MIP – Polímero Molecularmente Impresso (*Molecularly Imprinted Polymer*)

MISPE – Extração em Fase Sólida com Impressão Molecular (*Molecularly Imprinted Solid Phase Extraction*)

MMMM – Microextração de Membrana Matricial Mista (*Mixed Matrix Membrane Microextraction*)

MOF – Estrutura Metalorgânica (*Metal Organic Framework*)

MPB – Metilparabeno (*Methylparaben*)

MS – Espectrometria de massas (*Mass Spectrometry*)

MS/MS – Espectrometria de massas sequencial (*Tandem Mass Spectrometry*)

MWCO – Limite de Massa Molecular (*Molecular Weight cut off*)

PC-HFME – Microextração em fibra oca revestida com polímero (*Polymer-coated hollow-fiber microextraction*)

PDVB-QPEI – Polidivinilbenzeno Modificado com Polietilenoimina e Glicidil Éter

pH – Potencial Hidrognônico (*Potential of Hydrogen*)

pH-HGME – Microextração com hidrogel sensível ao pH (*pH sensitive hydrogel microextraction*)

PhPB – Fenilparabeno (*Phenylparaben*)

PI – Padrão Interno (*Internal Standard*)

pK_a – Negativo do logaritmo na base 10 da constante de ionização do ácido

PPB – Propilparabeno (*Propylparaben*)

PPN – Propanil (*Propanyl*)

PVOH – Álcool Polivinílico (*Polyvinyl Alcohol*)

RAM – Material de Acesso Restrito (*Restricted Access Media*)

RSD – Desvio Padrão Relativo (*Relative Standard Deviation*)

SPE – Extração em Fase Sólida (*Solid Phase Extraction*)

SPME – Microextração em Fase Sólida (*Solid Phase Microextraction*)

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UHPLC – Cromatografia Líquida de Ultra eficiência (*Ultra-high Pressure Liquid Chromatography*)

UV – Ultravioleta (*Ultraviolet*)

VADLLME – Extração Líquido-Líquido Dispersiva Assistida por Vórtex (*Vortex Assisted Dispersive Liquid-Liquid Extraction*)

VP – 4-vinipiridina (*Vinylpyridine*)

LISTA DE SÍMBOLOS

% – Porcentagem

: – Proporção

< – Menor que

> – Maior que

≤ – Menor ou igual que

≥ – Maior ou igual que

® – Marca Registrada

° – Graus

a – Coeficiente angular

b – Coeficiente linear

k – Fator de retenção

N – Números de pratos teóricos

R² – Coeficiente de determinação

R_s – Resolução

t_r – Tempo de retenção

w_b – Largura de base de pico

α – Fator de seletividade

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
1.1.1 Parabenos	21
1.1.2 Preparo de amostras	24
1.1.3 Hidrogel como fase extratora	29
2 OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS.....	36
2.1 OBJETIVO GERAL:.....	36
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	36
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
3.1 MATERIAIS E REAGENTES	37
3.2 LIMPEZA DE VIDRARIAS	37
3.3 EQUIPAMENTOS	37
3.4 METODOLOGIA	38
3.4.1 Preparo das soluções de padrões.....	38
3.4.2 Otimização da separação cromatográfica	38
3.4.3 Preparo da fase extratora	39
3.4.3.1 Purificação da pectina.....	39
3.4.3.2 Preparo das dispersões de polímeros.....	40
3.4.3.3 Preparo dos discos de hidrogel.....	40
3.4.4 Extração dos analitos.....	41
3.4.5 Caracterização da fase extratora	43
3.4.5.1 Grau de intumescimento	43
3.4.5.2 Perda de água	44
3.4.5.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	44
3.4.6 Seleção do padrão interno	45
3.4.7 Extração do padrão interno.....	45
3.4.8 Otimização do processo SPE.....	45
3.4.8.1 Extração.....	45

3.4.8.2 Eluição	46
3.4.9 Ensaio com urina humana	47
3.4.10 Reutilização da fase extratora	47
3.4.11 Avaliação dos parâmetros de mérito	48
3.4.11.1 Estabilidade	48
3.4.11.2 Linearidade, LLOQ e LOD.....	49
3.2.11.3 Precisão.....	49
3.2.11.4 Exatidão.....	49
3.4.11.5 Reprodutibilidade	49
3.4.11.6 Repetibilidade	49
3.4.12 Aplicação da metodologia analítica desenvolvida	50
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
4.1 OTIMIZAÇÃO DA SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA.....	51
4.2 DESENVOLVIMENTO DA FASE EXTRATORA BASEADA EM HIDROGEL	58
4.3 EXTRAÇÃO DOS ANALITOS.....	61
4.4 CARACTERIZAÇÃO DA FASE EXTRATORA	67
4.4.1 Grau de intumescimento	67
4.4.2 Perda de água	69
4.4.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	70
4.5 SELEÇÃO DO PADRÃO INTERNO.....	71
4.6 EXTRAÇÃO DO PADRÃO INTERNO	71
4.7 OTIMIZAÇÃO DAS ETAPAS POR SPE.....	72
4.7.1 Extração.....	73
4.7.2 Eluição.....	77
4.8 ENSAIO EM URINA HUMANA.....	79
4.9 REUTILIZAÇÃO DA FASE EXTRATORA	81
4.10 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE MÉRITO.....	83
4.10.1 Linearidade, LLOD e LOD.....	83
4.10.2 Precisão e exatidão	85

4.11 Aplicação da metodologia analítica desenvolvida	86
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	89
REFERÊNCIAS	90
ANEXO 1 – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA – SETOR DE SAÚDE/UFPR	106

1 INTRODUÇÃO

Os parabenos, os quais constituem uma classe de antimicrobianos e antifúngicos, têm sido empregados em diversos produtos, como em alimentos (compotas, geleias, óleos) e produtos farmacêuticos, mas principalmente em cosméticos e artigos de higiene pessoal (shampoo, creme dental, hidratante corporal) (Grzeškowiak et al. 2016). Entretanto, esses compostos são atualmente reconhecidos como desreguladores endócrinos, ou seja, estão correlacionados a diversos efeitos nocivos à saúde humana (Raza et al. 2018).

Por isso, devido ao seu uso generalizado e o potencial risco à saúde, o biomonitoramento desses compostos tem se tornado um tópico cada vez mais comum nas pesquisas em todo o mundo (Silveira et al. 2020). Contudo, a Química Analítica enfrenta alguns desafios em relação à essa determinação, tais como, a complexidades das matrizes, a baixa concentração dos analitos, na ordem de ng L^{-1} , além da dificuldade de extrair os compostos de maior polaridade (Ghamat et al. 2019).

Assim, a etapa de preparo de amostra tem se mostrado fundamental, sendo a extração em fase sólida (SPE), uma das técnicas mais empregadas atualmente. Porém, os altos custos, falta de seletividade e a não possibilidade de reuso dos cartuchos comerciais, têm levado a um aumento nas pesquisas correlacionadas ao desenvolvimento de novas fases sorventes, de modo a suprir as necessidades atuais de pesquisa (Płotka-Wasyłka et al. 2016).

Dentre os materiais empregados para essa finalidade, tem-se o hidrogel, que por possuir grupos funcionais como hidroxila ($-\text{OH}$), carboxila ($-\text{COOH}$), ácido sulfônico ($-\text{SO}_3\text{H}$) e amina ($-\text{NH}_2$) em suas estruturas poliméricas, favorece a extração de compostos com ampla faixa de polaridade, sendo caracterizado com materiais de seletividade modulável, dependendo de sua composição. Além disso, tem sido um material que apresenta a possibilidade de reuso, sendo sintetizado, em grande parte, a partir de materiais naturais como alginato, pectina e zeína (Castilhos et al. 2017; Sampaio et al. 2019).

Desse modo, o objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de uma fase extratora baseada em hidrogel, para aplicação em SPE, para a extração de parabenos em amostras de urina humana e posterior determinação por cromatografia líquida acoplada com detector de arranjo de diodos (LC-DAD).

1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1.1 Parabenos

Desreguladores endócrinos são substâncias exógenas que interferem na síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação de hormônios naturais do corpo e que são

responsáveis pela manutenção, reprodução, desenvolvimento e/ou comportamento dos organismos (Bila; Dezotti 2007). Esses interferentes endócrinos podem ser encontrados em produtos utilizados para diversos fins, como, por exemplo, agrotóxicos, produtos infantis, plásticos, produtos de higiene pessoal e cosméticos, eletrônicos, materiais de construção e medicamentos (Kabir et al. 2015).

Os desreguladores endócrinos são reconhecidos atualmente com umas das principais ameaças à saúde pública global (Kahn et al. 2020), isso porque a exposição a essas substâncias, à níveis de ng L^{-1} , podem resultar em danos à saúde humana a longo prazo e afetar a susceptibilidade à doenças, mesmo em gerações subsequentes (Chen et al. 2013). Há ampla evidência de que essas substâncias estão correlacionadas a uma série de problemas como, por exemplo, partos prematuros, alterações no crescimento intrauterino, o desenvolvimento neurológico, obesidade, diabetes, alterações de hormônios reprodutores e câncer (Jusko et al. 2019; Lerro et al. 2015; Philips et al. 2017; Sharpe et al. 2008; Song et al. 2014; Sun et al. 2018).

Entretanto, apesar da crescente preocupação com a utilização dessas substâncias, algumas ainda são amplamente empregadas em produtos do cotidiano, como por exemplo, os conservantes, que são adicionadas a produtos como alimentos, medicamentos e a produtos de cosméticos e higiene pessoal, e que têm por função prevenir ou minimizar a degradação causada por micro-organismos ou processos químicos. Como exemplo de substâncias altamente empregada como conservantes têm-se os parabenos (Halla et al. 2018).

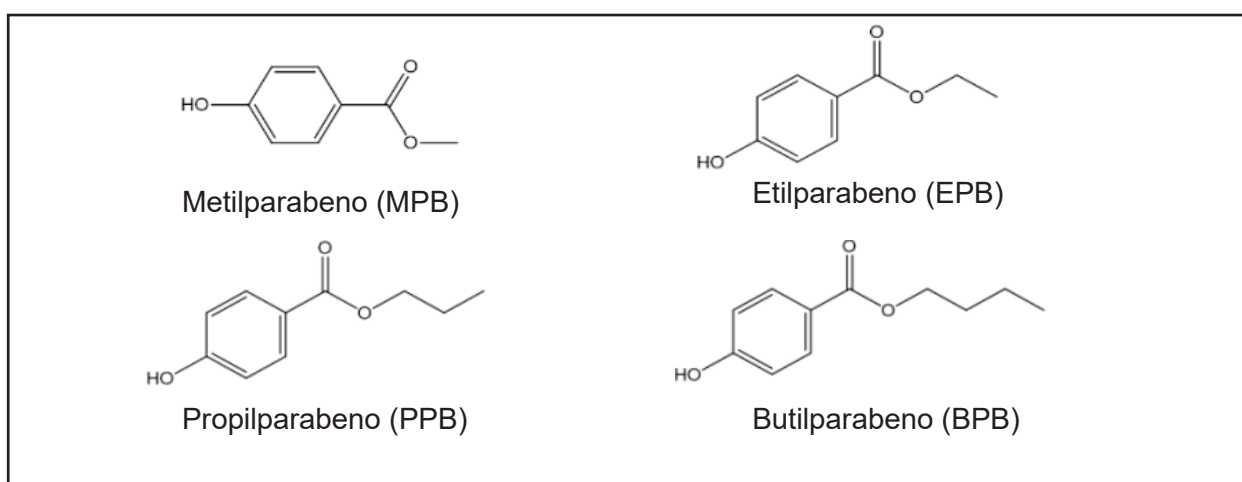
Os parabenos são ésteres do ácido 4-hidroxibenzóico, que se diferenciam apenas pela cadeia alquil ligada ao grupamento éster, sendo os principais compostos da classe, o metilparabeno (MPB), etilparabeno (EPB), propilparabeno (PPB) e butilparabeno (BPB). Esses ésteres são amplamente empregados como conservantes em produtos cosméticos e de higiene pessoal, seja na forma individual ou em conjunto (Lokhnauth et al. 2005). O seu baixo custo, amplo espectro de aplicação, estabilidade química e térmica e aceitação das agências regulatórias ao redor do mundo, explicam o amplo uso nas últimas décadas (Soni et al. 2005).

A atividade antimicrobiana dos parabenos está diretamente relacionada com o tamanho da cadeia alquil, ou seja, quanto maior a cadeia ligada ao grupamento éster, maior a atividade antimicrobiana, entretanto, esse aumento da cadeia faz com que solubilidade diminua. Como o crescimento microbiano se dá principalmente na fase aquosa, é necessário que os parabenos estejam dissolvidos, e como a solubilidade aumenta com a diminuição da cadeia carbônica ligada ao grupo éster, o MPB é o conservante mais utilizado comercialmente, sendo o PPB o segundo mais empregado (Soni et al. 2005).

Diversos estudos têm sido realizados com o objetivo de avaliar os efeitos do parabenos no funcionamento do corpo humano (Nowak et al. 2018). Em estudo realizado *in vivo* com ratos, foi demonstrado que uma exposição diária de 62,4 mg kg⁻¹ de parabenos, pode provocar o aumento de massa da glândula adrenal, que podem levar a graves implicações no equilíbrio hormonal (Vo et al. 2010). Além disso, a exposição aos parabenos, pode estar correlacionada com problemas de obesidade em adolescentes (Monteagudo et al. 2021) e diabetes tipo 2 (Li et al. 2018). Também foi comprovado que o uso de parabenos tem implicações na produção de hormônios sexuais e alteração no ciclo menstrual de mulheres jovens (Aker et al. 2016; Nishihama et al. 2016; Smarr et al. 2017). Já no estudo realizado por Koeppel et al. (2013), constatou-se que o uso de parabenos está diretamente correlacionado com a diminuição da concentração de hormônios tireoidianos.

Suas estruturas estão representadas na FIGURA 1, enquanto as propriedades físico-químicas são apresentadas na TABELA 1.

FIGURA 1 - ESTRUTURA QUÍMICA DOS PARABENOS.



FONTE: PubChem (2022).

TABELA 1 - PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS PARABENOS.

Composto	CAS	Fórmula molecular	Solubilidade em H ₂ O a 25°C/ mg L ⁻¹	Massa molar /g mol ⁻¹	pKa	Log k _{o/w}
Metilparabeno (MPB)	99-76-3	C ₈ H ₈ O ₃	2500	152,15	8,40	1,96
Etilparabeno (EPB)	120-47-8	C ₉ H ₁₀ O ₃	885	166,18	8,34	2,47
Propilparabeno (PPB)	94-13-3	C ₁₀ H ₁₂ O ₃	500	180,20	8,50	3,04
Butilparabeno (BPB)	94-26-8	C ₁₁ H ₁₄ O ₃	207	194,23	8,47	3,57

CAS: número de registro no banco de dados de *Chemical Abstracts Service*; Log k_{o/w}: coeficiente de partição octanol/água; pKa: constante de dissociação ácida.

FONTE: PubChem (2022).

Os parabenos têm sido determinados em matrizes ambientais, como por exemplo, água e solo (O'Malley et al. 2019; Tekin et al. 2022), e também em matrizes biológicas como urina, leite materno, plasma e saliva, na ordem de ng mL^{-1} (De Oliveira et al. 2019; Manouchehri et al. 2020; Rigkos et al. 2021; Tartaglia et al. 2019).

No que se refere às matrizes biológicas, como a urina se trata de uma amostra de alta disponibilidade, que pode ser coletada de forma não invasiva, esta é uma matriz altamente adequada tanto para estudos metabólicos, quanto para estudos de monitoramento de diversos biomarcadores, que podem refletir a exposição de um indivíduo à interferentes endócrinos (Randall et al. 2018).

Na literatura, em um estudo realizado por Smarr et al. (2017) a concentração urinária de MPB em mulheres foi de $60,0 \mu\text{g g}^{-1}$ creatinina, enquanto a concentração para homens foi de $6,37 \mu\text{g g}^{-1}$ creatinina. Tal resultado indica que as mulheres apresentam uma concentração urinária cerca de 10 vezes maior que os homens, o que pode ser explicado pelo fato de que as mulheres normalmente têm contato com uma maior variedade de produtos cosméticos em relação aos homens.

Em outro trabalho, conduzido por Honda et al. (2018) a concentração de parabenos na urina da população adulta foi de $4,01 \text{ ng mL}^{-1}$ para o MPB, $0,76 \text{ ng mL}^{-1}$ para o EPB e $0,37 \text{ ng mL}^{-1}$ para o PPB. Já em um estudo desenvolvido por Rocha et al. (2019), as concentrações urinárias de MPB, EPB, PPB e BPB na população adulta brasileira foram de 105 ng mL^{-1} ; $1,10 \text{ ng mL}^{-1}$; $4,04 \text{ ng mL}^{-1}$ e $0,56 \text{ ng mL}^{-1}$, respectivamente, evidenciando que o MPB tem sido o conservante mais amplamente empregado, seguido pelo PPB. Os trabalhos supracitados, apesar de diferirem nos procedimentos de preparo de amostras, possuem como semelhança o emprego de técnicas cromatográficas, acopladas aos sistemas apropriados de detecção, para determinação e quantificação dos parabenos, conferindo a estas metodologias detectabilidade, precisão e exatidão adequadas para o fim a que se propõe.

1.1.2 Preparo de amostras

Em diversos artigos científicos têm sido reportados estudos para a determinação de parabenos utilizando as técnicas de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) (Azzouz et al. 2016; Pastor-Belda et al. 2018), e a cromatografia líquida acoplada ao detector de arranjo de diodos (LC-DAD) (Alampanos ; V. et al. 2021; Rigkos et al. 2021; Tartaglia et al. 2019). A TABELA 2 apresenta os métodos utilizados pela literatura para a determinação de parabenos em amostras de urina.

TABELA 2 - MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DE PARABENOS EM AMOSTRAS DE URINA.

Analitos	Técnica de extração	Técnica analítica	LOD	Referência
MPB, EPB, iPPB, PPB, BPB, iBPB e BzPB	FPSE	LC-DAD	0,003 µg mL ⁻¹	(Rigkos et al. 2021)
MPB, EPB, iPPB, PPB, BPB, iBPB e HepPB	DLLME	LC-UV	0,1–0,4 ng mL ⁻¹	(Shen et al. 2017)
MPB, EPB, PPB, BPB e BzPB	MEPS	LC-MS/MS	0,01–0,1 ng mL ⁻¹	(Silveira et al. 2020)
MPB, EPB, iPPB, PPB, BPB, iBPB e BzPB	MISPE	LC-DAD	0,03 µg mL ⁻¹	(Tartaglia et al. 2019)
MPB, EPB, iPPB, PPB, BPB, iBPB e BzPB	LLE	UHPLC-MS/MS	0,01-0,5 ng mL ⁻¹	(Zhao et al. 2018)
MPB, EPB, iPPB, PPB, iBPB, BzPB e PhPB	DMSPE	GC-MS	0,09-2,01 ng mL ⁻¹	(Pastor-Belda et al. 2018)
MPB, EPB, PPB e BPB	LLE/SPE	GC-MS/MS	0,0019-0,0046 ng mL ⁻¹	(Lu et al. 2015)
MPB, EPB, PPB, BPB e BzPB	VADLLME	LC-MS/MS	0,01-0,20 ng mL ⁻¹	(Bocato et al. 2020)
MPB, EPB, PPB, BPB	MI-FPSE	LC-DAD	1,05-1,80 ng mL ⁻¹	(Alampanos et al. 2021)

MPB: metilparabeno; EPB: etilparabeno; PPB: propilparabeno; BPB: butilparabeno; iPPB: isopropilparabeno; iBPB: isobutilparabeno; BzBP: benzilparabeno; HepPB: heptilparabeno; PhPB: fenilparabeno; FSPE: *Fabric phase sorptive extraction*; DLLME: microextração líquido-líquido dispersiva; MEPS: microextração em sorvente empacotado; MISPE: extração em fase sólida com impressão molecular; LLE: extração líquido-líquido; DMSPE: extração em fase sólida dispersiva magnética; SPE: extração em fase sólida; VADLLME: extração líquido-líquido dispersiva assistida por vórtex; MI-FSPE: *magnet integrated fabric phase sorptive extraction*; GC: cromatografia gasosa; LC: cromatografia líquida; UHPLC: cromatografia líquida de ultraeficiência; DAD: detector de arranjo de diodos; UV: detector de ultravioleta; MS: espectrometria de massas e MS/MS: espectrometria de massas sequencial.

Conforme observado na TABELA 2 a maior parte das determinações de parabenos em amostras de urina têm realizadas com o auxílio da cromatografia líquida. A utilização da cromatografia gasosa, neste caso, apresenta alguns obstáculos, sendo um deles a necessidade de derivatização dos parabenos, pelo fato de não serem voláteis e termicamente estáveis, o que torna o método analítico mais moroso e com maiores desvios padrão entre as análises (Mohammadi et al. 2017; Tomšíková et al. 2012; Weiss et al. 2002).

Assim, a vantagem em trabalhar com a técnica de LC em relação ao GC é que não há necessidade de derivatização dos analitos, simplificando assim o método analítico, tanto no que se refere ao número de etapas (frequência analítica e menor desvio padrão) quanto ao custo dos agentes derivatizantes e demais reagentes necessários.

Porém, independentemente da técnica analítica empregada, por se tratar de amostras complexas, têm sido de extrema importância a aplicação e o desenvolvimento de técnicas de preparo de amostras, o que contribui para a pré-concentração do analitos (menores limites de quantificação), redução do efeito matriz (*clean-up* da amostra) e menores danos ao sistema analítico.

É sabido que o preparo de amostras consome grandes períodos de tempo e contribui para uma maior incidência de erros quando comparado às demais etapas do método analítico.

Sendo então, a precisão e a exatidão do método altamente dependentes desta etapa (Caldas et al. 2011, Maciel et al. 2019).

A análise cromatográfica de substâncias presentes em matrizes biológicas, como, plasma, urina, saliva, leite materno, entre outras, em geral, requer um pré-tratamento da amostra. Dentre as justificativas, destacam-se a complexidade das matrizes biológicas, a existência de proteínas, no caso de amostra de plasma e sangue total, que são incompatíveis com as colunas cromatográficas, e a concentração das substâncias a serem analisadas, a níveis de ng mL^{-1} . As técnicas de extração permitem então que a determinação dos componentes de interesse presentes nessas matrizes se torne possível. E como propósito final tem-se a obtenção de uma fração da amostra original enriquecida com os compostos de interesse, de forma que seja possível uma separação cromatográfica livre de interferentes, com detecção adequada e um tempo razoável de análise (Queiroz et al. 2001).

De maneira geral, as técnicas mais utilizadas para extração e/ou pré-concentração de compostos presentes em fluidos biológicos são: extração líquido-líquido (LLE), extração em fase sólida (SPE). Esta última possui certas vantagens, já que é uma técnica simples que permite a análise simultânea de várias amostras, seletiva, com baixo risco de contaminação ao analista, baixo consumo de reagentes e menor geração de resíduos tóxicos, quando comparada à extração líquido-líquido (Jardim 2010).

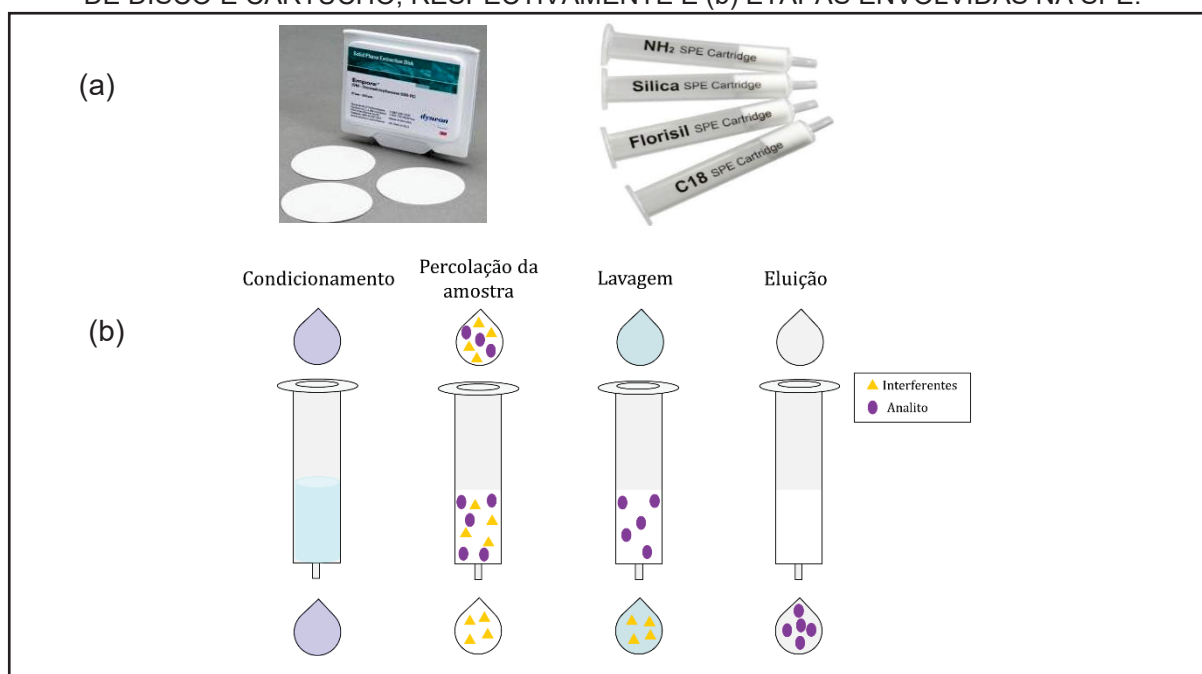
A SPE é empregada com o propósito de isolar compostos presentes em amostras complexas, sendo os mecanismos envolvidos na extração, especificamente, adsorção, partição, troca iônica e exclusão, são similares aos empregados na cromatografia líquida (Jardim 2010). Nessa técnica, os analitos contidos numa matriz aquosa são extraídos, juntamente com os compostos interferentes, após passarem por um cartucho contendo o material sorvente. Um solvente seletivo é geralmente utilizado para remover os interferentes e então, outro solvente orgânico é usado para eluir as espécies de interesse (Barrionuevo et al. 2001).

Na maioria das aplicações da SPE são utilizados os cartuchos na forma de seringa de material plástico para extração, porém é possível a aplicação de discos de extração nos quais as partículas ativas são imobilizadas em uma matriz inerte e estável de microfibras de politetrafluoretileno (PTFE) ou vidro, por exemplo. Quando comparados aos cartuchos, os discos possuem vantagens, como uma maior superfície de contato, menores riscos de entupimento devido material particulado presente na amostra, leito mais homogêneo, requisitar pressões menores durante a percolação da amostra e eluição, ausência de caminhos preferenciais, possibilidade de utilizar vazões mais altas, além de menores volumes de eluentes na remoção dos analitos (Jardim 2010; Płotka-Wasyłka et al. 2015). Na FIGURA 2a são apresentados exemplos de discos e cartuchos disponíveis comercialmente.

Independentemente do emprego da SPE na forma de cartuchos ou discos, os procedimentos de extração em fase sólida normalmente envolvem as seguintes etapas: 1) Condicionamento do sorvente com solvente adequado; 2) Extração dos compostos de interesse através da percolação da amostra pelo sorvente; 3) Remoção dos interferentes (*clean-up*) com solvente apropriado; e 4) Eluição dos analitos com solvente orgânico. Após a eluição, o extrato final obtido é geralmente concentrado para redução do volume da fase orgânica de eluição e, por fim, injetado no sistema cromatográfico.

Na FIGURA 2b é ilustrado o processo empregado na SPE com cartucho empacotado, entretanto as mesmas etapas são utilizadas quando se empregam discos de extração.

FIGURA 2 - (a) EXEMPLO DE FASE EXTRATORA DISPONÍVEL COMERCIALMENTE EM FORMA DE DISCO E CARTUCHO, RESPECTIVAMENTE E (b) ETAPAS ENVOLVIDAS NA SPE.



FONTE: (a) Select Science e Laboox e (b) A autora (2022).

Atualmente uma expressiva quantidade de fases sorventes estão disponíveis comercialmente. Em geral, os materiais sorventes, empregados para SPE, são similares aos usados em cromatografia líquida. Assim, carvão ativado, alumina, sílica gel, silicato de magnésio (Florisil®), fases quimicamente ligadas e polímeros, por exemplo, o copolímero de estireno entrecruzado com divinilbenzeno, têm sido empregados como extratores polares. Já extrações de compostos de menor polaridade são normalmente empregados sólidos C18, C8 e C2. Além das fases que atuam em uma faixa mais ampla de polaridade, conhecidas como as fases de balanço hidrofílico-lipofílico (HLB), e de troca iônica (Fontanals et al. 2005; Queiroz et al. 2001).

Entretanto, os cartuchos comerciais de SPE apresentam um custo elevado, sendo as fases extratoras de HLB as que apresentam maior valor. Além disso, esses dispositivos

são descartáveis, ou seja, utilizados para uma única aplicação, o que acarreta em gastos significativos com consumíveis e maior geração de resíduos. (Barbosa et al. 2020; Smith 2003).

Deste modo, muitos estudos vêm sendo conduzidos no desenvolvimento de novas fases extratoras, abrangendo as mais diversas áreas, como a de ciências dos materiais, síntese de polímeros e química analítica. Esses trabalhos visam desenvolver materiais mais seletivos, com maior interação entre analito e fase sorvente, maior estabilidade química e/ou física, possibilidade de reuso e menor custo. Algumas dessas novas fases extratoras são baseadas em sorvente magnético, em polímeros molecularmente impressos (MIP) e em materiais de acesso restrito (RAM) (Andrade-Eiroa et al. 2016). Alguns exemplos mais recentes no desenvolvimento de novas fases extratoras, empregadas na SPE, são apresentados na TABELA 3.

TABELA 3 - NOVAS FASES EXTRATORAS EMPREGADAS NA EXTRAÇÃO DE ANALITOS EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS POR SPE.

Analito	Matriz	Fase extratora	Modo SPE	Técnica Analítica	Referência
Sedativos	Urina	Nanofibras	Cartucho	LC-DAD	(An et al. 2021)
Cocaína e diazepam	Fluido oral	VP, MAA e EGDMA	Cartucho	UHPLC-MS/MS	(Sorribes-Soriano et al. 2021)
Bisfenol A	Urina	Nanocompósito magnético	Dispersiva	LC-DAD	(Bayatloo et al. 2022)
Parabenos	Soro humano	Carbono mesoporoso magnético	Dispersiva	UHPLC-MS/MS	(Zhang et al. 2021)
Ftalatos	Leite materno e urina	Biochar	Dispersiva	GC-FID	(Adenuga et al. 2020)
Bisfenol e ftalatos	Urina	PDVB-QPEI	Cartucho	LC-DAD	(Huang et al. 2022)
p-Cresil sulfato	Plasma humano	Nanocompósito	Dispersiva	Fluorescência	(Moradi et al. 2022)
Drogas	Urina	2-acrilamida-2-Ácido-metilpropano sulfônico	Cartucho	LC-MS	(Musile et al. 2018)
Ibuprofeno	Plasma humano	Fe ₃ O ₄ @C-nanodot@GO	Dispersiva	LC-DAD	(Yuvali et al. 2020)
Benzodiazepínicos	Urina	Fe ₃ O ₄ -NH ₂ /bio-MOF-1	Dispersiva	LC-MS	(Zhang et al. 2018)

MOF: estrutura metalorgânica; VP: 4-vinilpiridina; MAA: ácido metacrílico; EGDMA: dimetilacrilato de etilenoglicol; PDVB-QPEI: polidivinilbenzeno modificado com polietilenoimina e glicidil éter; GO: óxido de grafeno; LC: cromatografia líquida; GC: cromatografia gasosa; UHPLC: cromatografia líquida de ultraeficiência; DAD: detector de arranjo de diodo; MS: espectrometria de massas, MS/MS: espectrometria de massas sequencial e FID: detector de ionização de chama.

De acordo com os estudos recentes, apresentados na TABELA 3, é perceptível a relevância do desenvolvimento de novas fases extratoras ou a modificação de fases

comerciais a fim de se obter um melhor desempenho. Ainda é possível constatar que a maior parte das fases desenvolvidas tem sido para aplicação em cartuchos e dispersiva, sendo os discos de extração um campo menos explorado, apesar das vantagens supracitadas para o mesmo.

É um dos principais interesses em desenvolver essas novas fases extratoras, além do baixo custo e possibilidade de reutilização, é o emprego em extrações de compostos polares presentes em matrizes complexas. Isso porque estes compostos são difíceis de isolar e pré-concentrar, uma vez que a baixa afinidade com a fase sorvente e a alta polaridade da matriz da amostra, faz com que sejam facilmente perdidos durante as etapas de extração e *clean-up*. Nesse sentido, o hidrogel, material polimérico de origem natural ou sintética, tem chamado atenção em relação às suas potencialidades de aplicação como fase extratora (Carlos et al. 2013).

1.1.3 Hidrogel como fase extratora

Segundo a IUPAC, o gel pode ser definido como uma rede coloidal não fluida ou rede polimérica que se expande ao longo de todo seu volume por um fluido. Quando esse fluido é água, esse material recebe o nome de hidrogel (Alemán et al. 2007). Nas últimas duas décadas vêm crescendo de forma exponencial os trabalhos relacionados a aplicações deste material, que vão desde desenvolvimento de biossensores, de órgãos artificiais, liberação controlada de fármacos, curativos e até sistemas de purificação de água (Guo et al. 2020; Wang et al. 2018; Xiong et al. 2021). Na FIGURA 3 são apresentados exemplos desses materiais para uso como curativos, disponíveis comercialmente.

FIGURA 3 - APLICAÇÃO DE HIDROGÉIS COMO CURATIVOS, DISPONÍVEIS COMERCIALMENTE.



FONTE: Ebay (2022).

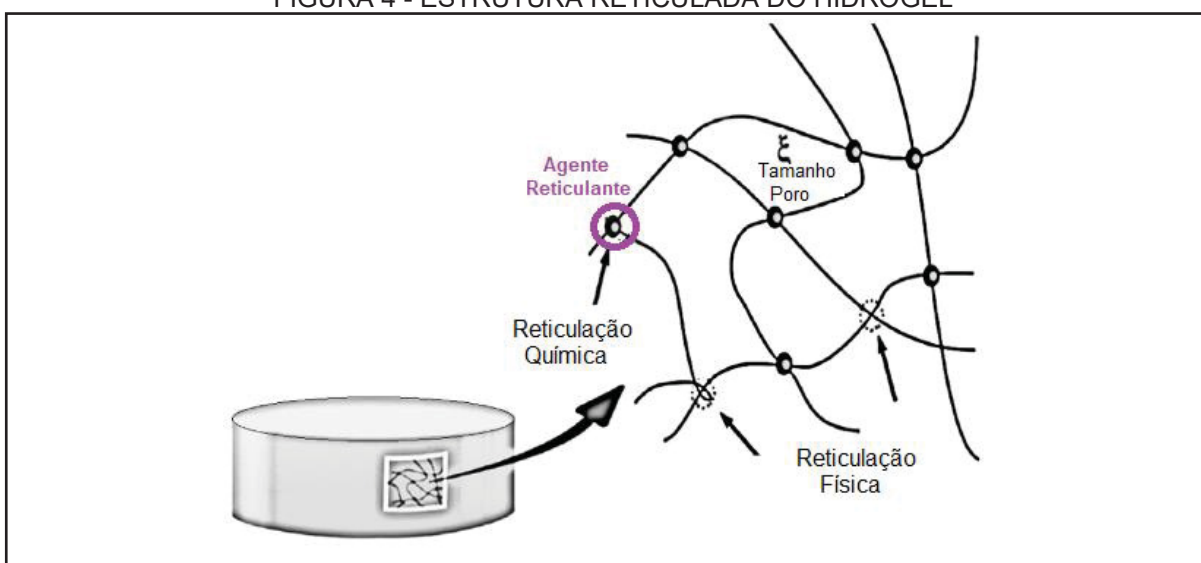
Os hidrogéis têm sido desenvolvidos como materiais de estímulos sensíveis, ou seja, apresentam respostas às mais finas mudanças no meio que os contém, sejam mudanças físicas (temperatura, luz, pressão, campo magnético), químicas (força iônica, pH) ou biológicas (enzimas, anticorpo/antígeno). (Brudno et al. 2015; El-Husseiny et al. 2022).

Devido as características supracitadas deste material, o mesmo tem mostrado grande potencial para aplicação como fase extratora. Além disso, esse material conta com a presença de grupos hidrofílicos, como $-OH$, $-COOH$, $-SO_3H$ e $-NH_2$, em sua rede polimérica, o que favorece a extração de compostos de maior polaridade, o que têm sido um desafio para as fases comerciais. Tal característica deste material, ou seja, sua hidrofílicidade, juntamente com a capacidade de formação de uma rede polimérica, permitem a passagem de uma grande quantidade de água e fluidos biológicos, por meio dos quais os compostos podem se difundir, sem haver a desintegração do material (Castilhos et al. 2017; El-Husseiny et al. 2022; Peppas et al. 1993).

Os hidrogéis são formados por redes poliméricas reticuladas. O retículo dos hidrogéis é formado por meio de reação de entrecruzamento, que visa unir suas cadeias poliméricas, ou ainda, ligar suas cadeias às de outros polímeros gerando redes poliméricas híbridas (Fan et al. 2013; Pal et al. 2009).

A reticulação pode ocorrer de duas maneiras, a primeira é a reticulação física, onde a ocorre uma interação não covalente como, por exemplo, a ligação de hidrogênio, ligação iônica e as interações de dipolos e hidrofóbica. Já a segunda é a reticulação química, que se dá por meio das ligações covalentes, na presença de agentes reticulantes, por exemplo, o ácido cítrico e o glutaraldeído. Essa última fornece um hidrogel com maior estabilidade e resistência mecânica quando comparada à primeira. (Caldas et al. 2011; Cui et al. 2014; El-Husseiny et al. 2022; Yang et al. 2022). A FIGURA 4 apresenta a estrutura geral de um hidrogel.

FIGURA 4 - ESTRUTURA RETICULADA DO HIDROGEL



FONTE: Adaptado de Ullah et al. (2015).

A reação de reticulação tem como objetivo modificar as propriedades moleculares dos polímeros, entre elas, estabilidade química e física, a rigidez e permeabilidade. Assim, o

grau de reticulação influencia na porosidade da rede polimérica e na permeabilidade da água, de forma que um menor grau de reticulação favorece um hidrogel mais elástico e com menor contração da rede polimérica, favorecendo assim uma maior absorção de água pelo hidrogel, ao passo que maior grau de reticulação, promove um hidrogel menos poroso e com menor absorção (Berger et al. 2004).

Em geral, os hidrogéis podem ser preparados a partir de polímeros de origem natural ou sintética, sendo que ambos os casos apresentam propriedades interessantes, enquanto os polímeros de origem natural apresentam biodegradabilidade e baixa toxicidade, os polímeros sintéticos apresentam maior resistência mecânica, maior capacidade de absorção de água e uma taxa de degradação mais lenta (Ahmed 2015). Sendo assim, a síntese de hidrogéis que combinam polímeros de origem natural e sintética tem se mostrado promissor.

O poli (álcool vinílico) também conhecido com álcool polivinílico (PVOH), é um polímero de origem sintética obtido por meio da hidrólise do acetato de polivinila, da qual a reação incompleta resulta em PVOH com diferentes graus de hidrólise. Dessa forma, o PVOH pode ser encontrado na forma altamente hidrolisado (acima de 98,5%) e parcialmente hidrolisado (entre 80 e 98,5%) (Hassan et al. 2000) . Devido aos grupamentos –OH presentes em sua estrutura (FIGURA 5), o PVOH é um polímero altamente hidrofílico (Gaaz et al. 2015). Assim, as vantagens apresentadas por esse polímero são a alta solubilidade em água, fácil preparação, capacidade de formação de filmes, estabilidade mecânica e resistência química, assim como a capacidade de formar géis através do entrecruzamento de suas cadeias com uma infinidade de agentes reticulantes, como por exemplo, o glutaraldeído e os ácidos cítrico, maleico e bórico (Attaran 2013; Bolto et al. 2009).

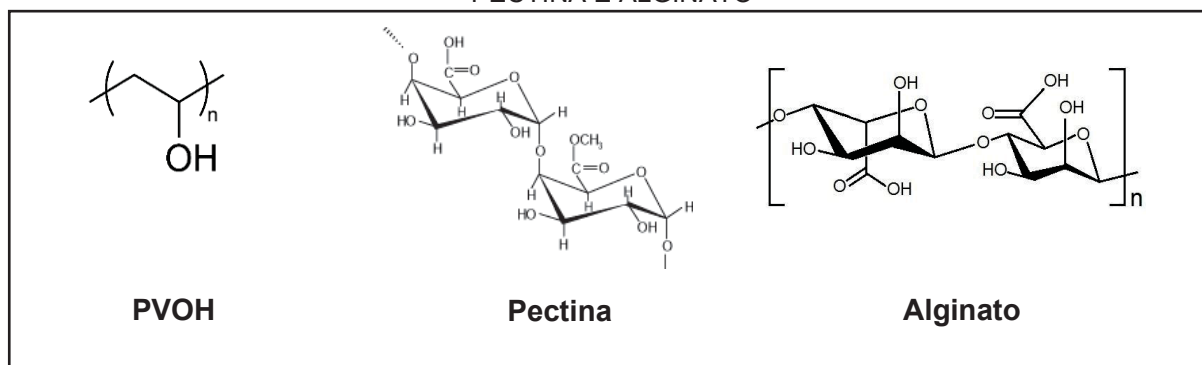
Entretanto, a utilização apenas de PVOH na síntese dos hidrogéis, acaba por formar materiais solúveis em água, pouco elásticos e com estrutura muito rígida. Dessa maneira, tem-se incorporado polímeros naturais à estrutura dos hidrogéis, como a pectina e o alginato por exemplo, de modo a se obter melhores propriedades mecânicas destes materiais (Gaaz et al. 2015; Kamoun et al. 2015).

A pectina é um polissacarídeo encontrado na parede celular de plantas superiores como laranjeiras e macieiras. O esqueleto péctico é primariamente um homopolímero de ácido galacturônico ligado em $\alpha(1\rightarrow4)$, com grau variável de grupos carboxilas metil esterificados, dependendo do seu grau de metoxilação. A pectina pode ser classificada como de alta metoxilação (HM), com percentual de grupamentos esterificados na cadeia superior a 50%, porém na prática apresenta-se entre 50 e 75%, ou de baixa metoxilação (LM), com grau de esterificação inferior a 50% (Canteri et al. 2012). A pectina é um polímero biodegradável, de baixo custo, além da capacidade de formar hidrogéis com alta estabilidade mecânica. (Thakur et al. 2019).

O alginato por sua vez é um polissacarídeo linear, de origem natural, encontrado principalmente na parede celular de algas marinhas marrons (Draget et al. 1997). Sua estrutura é constituída por resíduos dos monômeros, α -L-gulurônico e β -D-manurônico. Entre suas principais características está a capacidade de formar hidrogéis termoestáveis e na presença de íons metálicos bivalentes, como o cálcio (Donati et al. 2005).

A FIGURA 5 traz as estruturas possíveis dos polímeros utilizados nesse trabalho: PVOH altamente hidrolisado, alginato e pectina.

FIGURA 5 - POSSÍVEIS ESTRUTURAS DOS POLÍMEROS PVOH ALTAMENTE HIDROLISADO, PECTINA E ALGINATO



FONTE: PubChem (2022).

Apesar das inúmeras vantagens apresentadas pelos hidrogéis, sua aplicação como fase extratora é relativamente recente, sendo uma das primeiras publicações do final dos anos 1990, onde Min et al. (1998) desenvolveram um hidrogel de alginato para a remoção de arsênio em amostras de água. Ademais, as pesquisas nessa área são ainda pouco exploradas, e observa-se uma insuficiência de trabalhos relatados na literatura para essa aplicação. Alguns dos trabalhos mais recentes estão apresentados na TABELA 4.

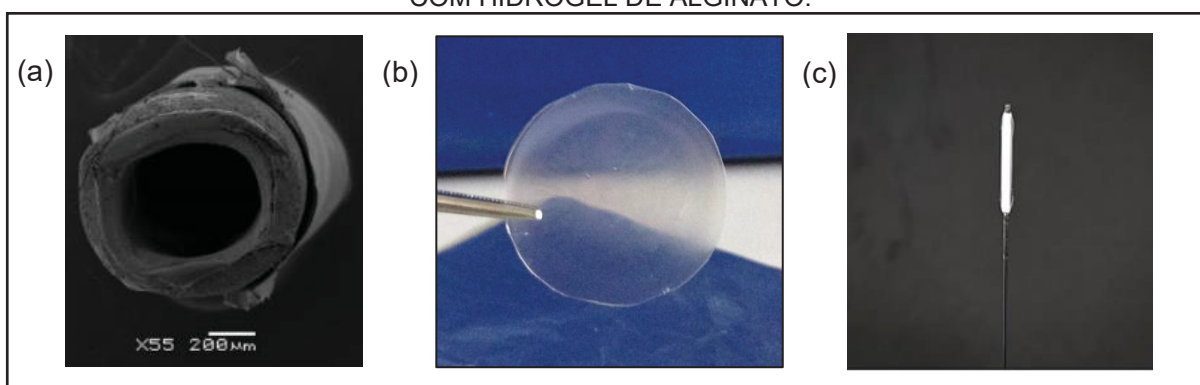
Nesse sentido, destaca-se o trabalho de Basheer e colaboradores (2005), que desenvolveram um método de microextração em fibra oca revestida com hidrogel de polimetilacrilato dihidroxilado para a determinação de interferentes endócrinos em amostras de água de torneira por GC-MS. Os autores do trabalho alcançaram limites de detecção de 0,03 a 0,8 ng L⁻¹ e coeficientes de variação de 3% a 7%. A faixa de linearidade foi de 0,025 a 10 µg L⁻¹ e alcançaram um coeficiente de determinação (R²) de 0,997.

Os trabalhos desenvolvidos por Castilhos et al. (2017), Sampaio et al. (2019) e Guzella et al. (2022), apresentados na TABELA 4, merecem destaque em razão de terem sido desenvolvidos no mesmo grupo de pesquisa do presente trabalho. O dispositivo desenvolvido pela primeira autora, uma fibra de polipropileno revestida com hidrogel de alginato/zeína, utilizando a técnica de SPME, demonstrou viabilidade para extração de contaminantes de preocupação emergente em matrizes aquosas, obtendo LOD de 0,05 – 0,05 µg L⁻¹ e linearidade, com R² superior a 0,99, para a faixa de concentração de 0,1 - 100 µg L⁻¹. Já o

dispositivo desenvolvido pela segunda autora, um disco de hidrogel de PVOH/pectina para aplicação em SPE, foi utilizado para a extração de hormônios em matrizes aquosas, alcançando LOD de $0,15 - 0,30 \mu\text{g L}^{-1}$ e valores de desvio padrão relativo (RSD) entre $0,5 - 12,3 \%$. Para os dois dispositivos desenvolvidos foi possível a extração de compostos de diferentes polaridades em meio aquoso e aplicação em matrizes reais, como água de rios, além disso, são materiais que apresentam baixo custo e a possibilidade de reuso (ao menos 10 vezes).

Já o trabalho mais recente, de Guzella et al. (2022), uma fibra de polipropileno revestida com hidrogel de alginato, com aplicação na SPME, foi utilizada para a extração de fármacos antidepressivos em plasma humano, e apresentou-se como dispositivo simples e barato, entretanto, a maior vantagem é que este agiu não só como fase extratora, mas também como um material de acesso restrito (RAM), promovendo a exclusão de proteínas plasmáticas. Este fato propiciou a possibilidade da eliminação da etapa de precipitação de proteínas, indicando o potencial uso da fase/dispositivo para fins quantitativos na extração dos fármacos em matrizes biológicas. Os dispositivos desenvolvidos pelas autoras estão apresentados na FIGURA 6.

FIGURA 6 - (a) FIBRA DE POLIPROPILENO REVESTIDA COM HIDROGEL DE ALGINATO/ZEÍNA, (b) DISCOS DE HIDROGEL DE PVOH/PECTINA E (c) FIBRA DE POLIPROPILENO REVESTIDA COM HIDROGEL DE ALGINATO.



FONTE: (a) (Castilhos et al. (2017), (b) Sampaio et al. (2019) e (c) Guzella et al. (2022).

TABELA 4 - EXEMPLOS DE APLICAÇÃO DO HIDROGEL COMO FASE EXTRATORA.

Técnica	Hidrogel	Análitos	Matriz	LOQ	Referência
pH-HGME	Poli(estireno-co-anidro)maleico	HPA e alquilfenol	Urina	0,03 $\mu\text{g L}^{-1}$	(González-Martín et al. 2020)
SPME	Alginato	Fluoxetina e norfluoxetina	Plasma humano	-	(Guzella et al. 2022)
SPME	Quitosana	Cádmio	Plantas	0,68 $\mu\text{g L}^{-1}$	(Öztürk Er et al. 2018)
FPSE	Celulose	Pesticidas	Vegetais	0,11 - 0,40 ng g^{-1}	(Kaur et al. 2019)
MMMM	Agarose	Sulfonamidas	Águas de abastecimento	0,20 - 0,56 $\mu\text{g L}^{-1}$	(Rozaini et al. 2019)
SPE	LDH/Alginato	Pb ²⁺	Suco, água e licor	1,31 $\mu\text{g L}^{-1}$	(Wang et al. 2018)
SPME	Alginato/zeína	Hormônios	Águas Superficiais	50,0 ng L^{-1}	(Castilhos et al. 2017)
SPE	PVOH/pectina	Hormônios	Água Superficiais	0,50 $\mu\text{g L}^{-1}$	(Sampaio et al. 2019)
PC-HFME	DHPMM	Interferentes endócrinos	Água de torneira	0,1 – 2,7 ng L^{-1}	(Basheer et al. 2005)
DSPE	Alginato	Ftalatos	Água, chá e suco	10 - 15 $\mu\text{g L}^{-1}$	(Orachorn et al. 2021)
SPE	PVOH	Rodamina B	Pimenta	-	(Huang et al. 2020)

pH-HGME: microextração com hidrogel sensível ao pH; HPA: hidrocarboneto policíclico aromático; FPSE: *Fabric phase sorptive extraction*; MMMM: microextração de membrana matricial mista; SPME: microextração em fase sólida; SPE: extração em fase sólida; LDH: hidróxido duplo em camada; DSPE: microextração em fase sólida dispersiva; PC-HFME: microextração em fibra oca revestida com polímero; DHPMM: polimetilacrilato dihidroxilado.

Conforme apresentado na TABELA 4, os hidrogéis utilizados como fase extratora têm permitido a determinação de diversos compostos, em concentrações da ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$. Além disso, esses materiais podem ser aplicados para uma série de matrizes, entre elas, alimentares, biológicas e ambientais, utilizando para isso as mais diversas técnicas de extração.

Por outro lado, embora o hidrogel apresente inúmeras vantagens, como citado anteriormente, a exemplo de sofrer grandes alterações mesmo a pequenos estímulos, não há muitos trabalhos publicados envolvendo esses materiais como fase sorvente, em especial para aplicação em matrizes biológicas, assim como na determinação de

interferentes endócrinos, como os parabenos. Uma razão para justificar tal carência, se dá pelo fato de se tratar de um estudo relativamente recente. Sendo assim, estes resultados abrem um horizonte para uma maior compreensão e avaliação destes materiais, puros ou modificados quimicamente, como fase extratora de diferentes analitos em fluidos biológicos, como a urina, por exemplo.

2 OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS

2.1 OBJETIVO GERAL:

Desenvolver uma fase extratora baseada em gel para extração via SPE, no formato de disco, e determinação por LC-DAD dos compostos MPB, EPB, PPB e BPB em amostras de urina humana.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- a) Desenvolvimento dos discos de extração baseados em hidrogéis de PVOH/pectina e PVOH/alginate;
- b) Avaliação dos hidrogéis de PVOH/pectina e PVOH/alginate como fase extratora;
- c) Caracterização físico-química do material proposto;
- d) Otimização das variáveis envolvidas no processo SPE;
- e) Avaliação dos parâmetros de mérito e aplicação da metodologia desenvolvida na determinação dos parabenos em amostras de urina humana.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS E REAGENTES

Os padrões de alta pureza $\geq 99,0\%$, dos analitos metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno e butilparabeno, assim como, os padrões de propanil, clorpirifós, atrazina, dietilbestrol, alacloro, carbaril, ácido cinânico, carbaril e fenantreno, foram todos fornecidos pela *Sigma-Aldrich*[®].

Os solventes de grau HPLC empregados foram acetonitrila (ACN) e metanol (MeOH), fornecidos pela *Biograde*[®]. Utilizou-se água ultrapura com resistividade controlada em 18,2 M Ω cm, purificada pelo sistema *Millipore-Simplicity UV (Bedford, MA, USA)*.

Para a obtenção das soluções tampão, utilizadas na composição da fase móvel, empregou-se ácido fosfórico (H₃PO₄) e dihidrogenofosfato de potássio (KH₂PO₄), fornecidos pela *J. T. Baker*[®] e monohidrogenofosfato de potássio (K₂HPO₄), fornecido pela *Vetec*[®].

Os polímeros usados na síntese dos hidrogéis foram álcool polivinílico (PVOH) (>99% hidrolisado, MM: 89.000 - 98.000 g mol⁻¹), alginato de sódio, ambos fornecidos pela *Sigma-Aldrich*[®], e pectina cítrica, que foi adquirida no Mercado Municipal da cidade de Curitiba-PR. Já o agente reticulante, o ácido cítrico anidro (C₆H₈O₇), foi fornecido pela *Qhemis*[®].

3.2 LIMPEZA DE VIDRARIAS

Para a limpeza das vidrarias, estas foram enxaguadas com água de torneira, então colocadas em banho de ácido nítrico (10% v/v) por um período mínimo de 12 h, sendo em seguida enxaguadas novamente com água da torneira, seguido por banho ultrassônico com água destilada e água ultrapura. As vidrarias volumétricas foram secas ao ar, enquanto as demais secas em estufa.

3.3 EQUIPAMENTOS

Para as pesagens utilizou-se uma balança analítica digital *Mettler Toledo*[®] (XS205DU) com precisão de 0,01 mg. O ajuste do pH da fase móvel foi efetuado com o auxílio de um pHmetro *Orion 3-star (Thermo Scientific*[®]), utilizando, para isso, soluções de base e ácido forte, NaOH e HCl, na concentração de 0,01 mol L⁻¹. As dispersões poliméricas foram preparadas em chapa de aquecimento com agitação magnética da marca *IKA*[®] (C-MAG HS7).

A liofilização da pectina cítrica comercial purificada ocorreu em um liofilizador L101 (*Liobras*[®]). A extrações foram realizadas com o auxílio do sistema *manifold Visiprep*

(*Supelco*[®]). Para a percolação da amostra e solvente pelo material extrator e para a secagem do mesmo, foi utilizado a bomba de vácuo *Tecnal*[®] (TE-0581). Já os extratos obtidos na etapa final do processo SPE, foram secos em concentrador à vácuo da marca *Christ*[®] (AVC 2-18 CD).

Para as determinações cromatográficas foi utilizado um cromatógrafo a líquido, marca *Varian*[®], modelo LC920, equipado com injetor *Rheodyne* (com *loop* de 20,0 µL) e detector de arranjo de diodos (DAD).

3.4 METODOLOGIA

3.4.1 Preparo das soluções de padrões

As soluções estoque de cada analito e do padrão interno (PI), foram preparadas de forma individual pela dissolução dos padrões de alta pureza em metanol (grau HPLC), resultando em concentrações de 1,0 g L⁻¹. A partir das soluções estoque, foram preparadas soluções mix de trabalho, contendo os quatro analitos, na concentração de 100,0 e 10,0 µg mL⁻¹, e uma solução de trabalho do PI na concentração de 100,0 µg mL⁻¹. O armazenamento de tais soluções foi feito ao abrigo da luz a -20 °C. As soluções na concentração de 1,0 µg mL⁻¹, empregadas na etapa de otimização cromatográfica, foram preparadas diariamente por diluições da solução mix em fase móvel.

3.4.2 Otimização da separação cromatográfica

Para a etapa de otimização cromatográfica, foi empregada coluna *Varian*[®] de octadecilsilano (C18 – 5 µm, 150 mm x 4,6 mm), com pré coluna de fase estacionária similar. As análises foram realizadas em temperatura ambiente, o volume de injeção foi de 50 µL e monitorado o comprimento de onda de 254 nm para os quatro analitos. As condições cromatográficas, como composição da fase móvel (obtidas através da combinação dos solventes ACN, água e solução tampão fosfato) e vazão foram otimizadas, todos os ensaios foram avaliados no modo isocrático, conforme mostrado na TABELA 5.

TABELA 5 - COMPOSIÇÃO E VAZÃO DE FASE MÓVEL AVALIADAS.

ACN	H ₂ O (pH 7,0)	pH 3,0	pH 6,0	Vazão (mL min ⁻¹)
60%	40%	-	-	1,0
55%	45%	-	-	1,0
50%	50%	-	-	1,0
40%	60%	-	-	1,0
55%	45%	-	-	0,8
60%	-	40%	-	1,0
50%	-	50%	-	1,0
40%	-	60%	-	1,0
60%	-	-	40%	1,0
55%	-	-	45%	1,0
50%	-	-	50%	1,0
40%	-	-	60%	1,0

Para o preparo da solução tampão pH 3,0 na concentração de 10,0 mmol L⁻¹, foram utilizados o ácido H₃PO₄ e o sal KH₂PO₄. Já para o preparo da solução tampão pH 6,0 na concentração de 10,0 mmol L⁻¹, foram utilizados os sais K₂HPO₄ e KH₂PO₄. Essas soluções foram previamente filtradas antes da utilização no sistema cromatográfico, para isso foi utilizada a membrana de nitrato de celulose (0,45 µm, 47 mm Sartorius®). Todos os solventes empregados na separação cromatográfica foram desgaseificados em banho ultrassônico por 30 minutos.

A seleção da condição de compromisso foi baseada na análise dos parâmetros cromatográficos como: fator de retenção (k), fator de seletividade (α), resolução (Rs) e número de pratos teóricos (N), para todos os analitos no comprimento de onda de 254 nm.

As fórmulas empregadas para esses cálculos estão apresentadas na TABELA 6.

TABELA 6 - FÓRMULAS PARA DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS.

Fator de retenção (k)	Fator de seletividade (α)	Resolução (Rs)	Número de pratos teóricos (N)
$k = \left(\frac{t_r - t_m}{t_m} \right)$	$\alpha = \frac{k_y}{k_x}$	$Rs = \frac{2 \cdot [t_r(y) - t_r(x)]}{w_b(y) + w_b(x)}$	$N = 16 \cdot \left(\frac{t_r}{w_b} \right)^2$

t_r: Tempo de retenção; t_m: Tempo morto; w_b: largura da base do pico; k_x e k_y: fator de retenção para dois picos adjacentes.

3.4.3 Preparo da fase extratora

3.4.3.1 Purificação da pectina

A pectina cítrica comercial precisou ser purificada por meio do processo de diálise, empregando-se membrana de celulose regenerada com MWCO (*Molecular weight cut off*) de 12 a 14 kDa (Spectra/Por®). Para isso, uma dispersão em água ultrapura de pectina 10 % (m/v), foi acondicionada no interior da membrana de celulose regenerada, e esta, por sua vez, foi imersa em um banho de água destilada. A diálise ocorreu durante um período de 3 dias, no qual trocou-se a água destilada 4 vezes ao dia. Após esse processo a dispersão de pectina foi liofilizada por um período de 5 dias, e então armazenada à temperatura ambiente.

3.4.3.2 Preparo das dispersões de polímeros

As dispersões dos polímeros empregados neste trabalho são descritas a seguir:

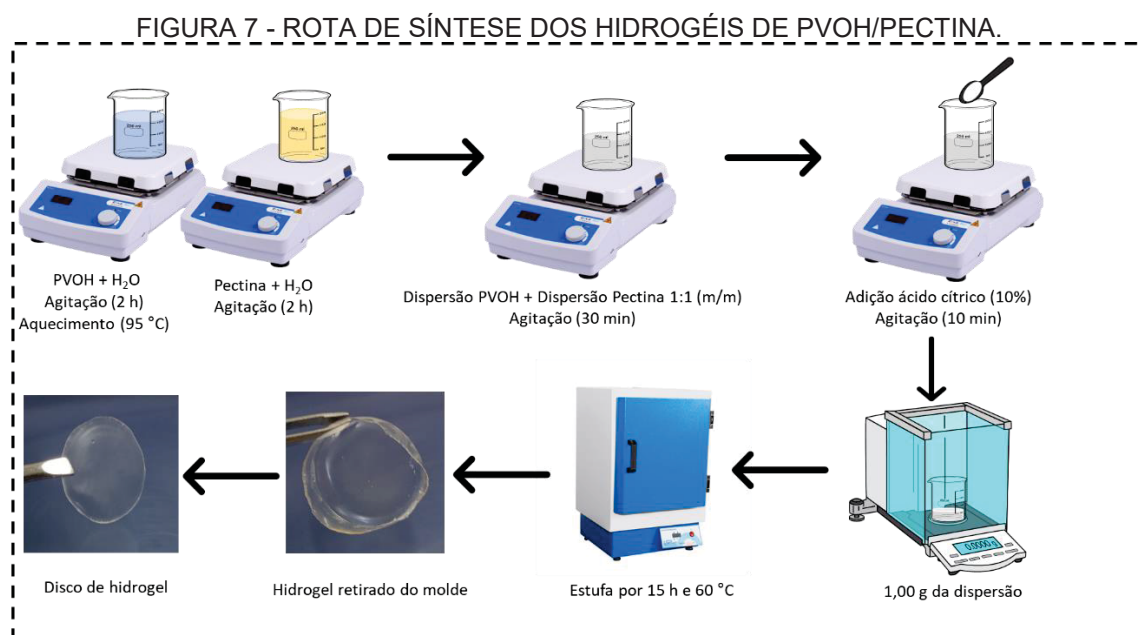
- Álcool polivinílico: foram preparadas as dispersões de PVOH, nas concentrações 10%, 15% e 20% (m/v), pela dissolução do polímero em água ultrapura. Para a solubilização do PVOH foi empregado aquecimento (~95 °C) e agitação magnética durante 2 horas.
- Alginato: foram preparadas as dispersões de alginato, na concentração de 2,0% (m/v), pela dissolução do polímero em água ultrapura, sob agitação magnética durante um período de 2 horas.
- Pectina dialisada: foram preparadas as dispersões de pectina, na concentração de 1,0%; 1,3%; 1,5%; 2,0%; 2,7% e 3,0% (m/v), pela dissolução do polímero em água ultrapura, sob agitação magnética durante um período de 2 horas.

3.4.3.3 Preparo dos discos de hidrogel

A síntese dos discos de hidrogel, foram realizadas com base no trabalho de Sampaio et al. (2019), onde foram preparados discos de hidrogel em diferentes proporções e massas de PVOH e pectina, reticulados com ácido cítrico. Para isto, foi preparada uma dispersão na proporção 1:1 (m/m) da dispersão de PVOH com a dispersão de um dos polímeros naturais (pectina ou alginato). Essa nova dispersão ficou sob agitação magnética por 30 minutos, em seguida, adicionou-se uma quantidade de ácido cítrico que correspondia a 10% da massa total dos polímeros. Para que houvesse a solubilização do ácido cítrico, empregou-se agitação por 10 minutos.

Em seguida, aproximadamente 1,0 g da dispersão foi transferida para um béquer de 10 mL, que serviu como molde para os discos. Esses géis foram então transferidos para estufa à 60 °C por um período de 15 h, para reticulação e secagem do mesmo. Após esse período os hidrogéis foram retirados dos moldes e cortados, para que ficassem do tamanho apropriado para o acoplamento ao dispositivo de extração. A FIGURA 7 apresenta um esquema

detalhado para a síntese dos hidrogéis de PVOH/pectina. Os hidrogéis de PVOH/alginato seguem o mesmo esquema de preparo, apenas com a substituição da pectina por alginato.



Os discos de hidrogel foram sintetizados avaliando-se: dois diferentes polímeros naturais (alginato e pectina), a concentração das dispersões de polímeros utilizadas e também a proporção entre os polímeros. Na TABELA 7 estão apresentadas as dispersões empregadas na síntese de cada gel, assim como, a proporção entre os polímeros.

TABELA 7 - COMPOSIÇÃO DOS DISCOS DE HIDROGEL AVALIADOS.

Identificação do disco de extração	Dispersão dos polímeros (m/v)		Proporção entre os polímeros (m/m)
P10PC3,0	PVOH 10%	Pectina 3,0%	3,3:1
P15PC3,0	PVOH 15%	Pectina 3,0%	5,0:1
P10PC1,3	PVOH 10%	Pectina 1,3%	7,5:1
P15PC2,0	PVOH 15%	Pectina 2,0%	7,5:1
P20PC2,7	PVOH 20%	Pectina 2,7%	7,5:1
P10PC1,0	PVOH 10%	Pectina 1,0%	10:1
P15PC1,5	PVOH 15%	Pectina 1,5%	10:1
P20PC2,0	PVOH 20%	Pectina 2,0%	10:1
P15AL2,0	PVOH 15%	Alginato 2,0%	7,5:1

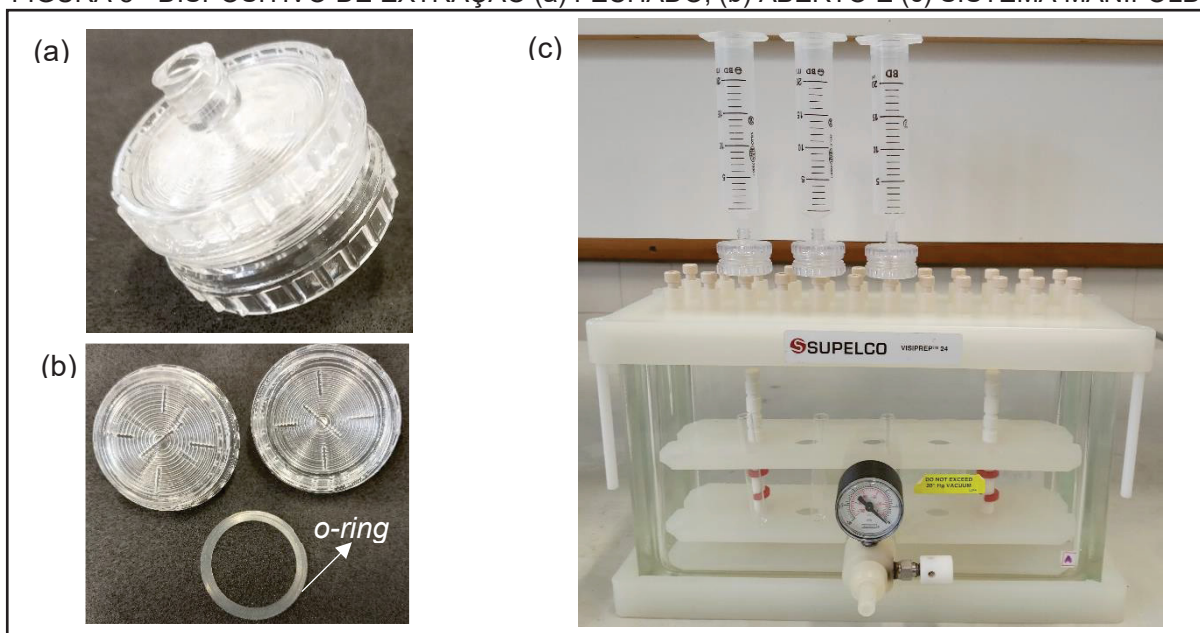
3.4.4 Extração dos analitos

Os discos de hidrogel, previamente obtidos, foram avaliados como fase extratora para os compostos estudados (MPB, EPB, PPB e BPB). Para testes iniciais utilizou-se água ultrapura como matriz, isso porque a urina é composta majoritariamente por água, cerca de 95% (Rose et al. 2015).

Os testes iniciais foram realizados avaliando-se diferentes proporções entre os polímeros PVOH e pectina, assim como a substituição da pectina pelo alginato. Para isso amostras de água ultrapura, enriquecida com os analitos na concentração de $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, foram empregadas.

Como dispositivos de extração utilizou-se suportes reutilizáveis de policarbonato para filtro de membrana, denominados *holder*, para ser acoplado em seringa, com diâmetro de 25 mm, dentro dos quais eram dispostos os discos extração. Com o disco de extração dentro do suporte, era colocado sobre o mesmo um anel de vedação (*o-ring*), de forma a evitar vazamento da amostra. Para o processo de extração fez-se o uso de um sistema *manifold*, onde os dispositivos de extração foram posicionados e aos quais se acoplou uma seringa de 20 mL sem o embolo para que se pudesse verter a amostra. Na FIGURA 8 é apresentado o dispositivo empregado juntamente com o sistema *manifold*.

FIGURA 8 - DISPOSITIVO DE EXTRAÇÃO (a) FECHADO, (b) ABERTO E (c) SISTEMA MANIFOLD.



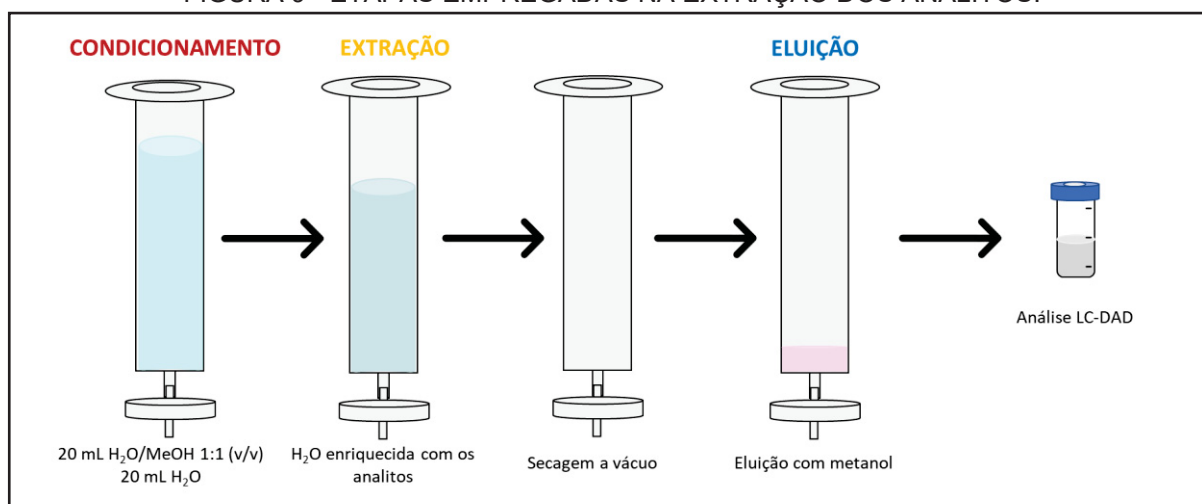
FONTE: A autora (2022).

Os discos de hidrogel, devidamente cortados e dispostos no suporte de filtro de seringa, foram hidratados pela percolação de 10,0 mL de água ultrapura, com o auxílio de um embolo de seringa. A hidratação prévia, antes do acoplamento ao sistema *manifold*, tem como objetivo facilitar a visualização de vazamentos. Em seguida, o dispositivo foi acoplado ao

sistema *manifold*, onde foram percolados 20,0 mL de uma mistura H₂O:metanol 1:1 (v/v) seguidos de 20,0 mL de água ultrapura, para condicionamento do disco.

A extração consistiu da percolação de 10,0 mL de água ultrapura enriquecida com os analitos, nas concentrações supracitadas. Em seguida ocorreu a secagem do hidrogel por 30 minutos. A dessorção dos analitos ocorreu pela percolação de 1,0 mL de metanol através do disco de extração. O extrato então obtido foi analisado por LC-DAD, de acordo com o método previamente estabelecido. Todo o procedimento de extração, desde a etapa de condicionamento até a etapa de eluição, ocorreu com auxílio de vácuo, à uma pressão de 5 mmHg. Um esquema com as etapas do processo está representado na FIGURA 9.

FIGURA 9 - ETAPAS EMPREGADAS NA EXTRAÇÃO DOS ANALITOS.



FONTE: A autora (2022).

As extrações em replicatas, de cada um dos hidrogéis estudados, foram realizadas utilizando-se o mesmo hidrogel. Assim, entre cada replicata era realizada uma etapa de limpeza do hidrogel, de modo a evitar o efeito de memória. A etapa de limpeza consistia na percolação de 20,0 mL de H₂O:metanol 1:1 (v/v), seguidos de 20,0 mL de água ultrapura. Após o processo de limpeza, iniciava-se uma nova extração de amostra de água enriquecida com os analitos, de acordo com o descrito anteriormente.

3.4.5 Caracterização da fase extratora

Após a síntese da fase extratora, a mesma foi submetida a uma caracterização físico-química a partir de ensaios de grau de intumescimento e estudo de perda de água, com base no trabalho de Sampaio et al. (2019). Ambas foram realizadas em triplicata e a temperatura ambiente.

3.4.5.1 Grau de intumescimento

Para avaliar o grau de intumescimento, o hidrogel foi submerso em 30 mL em água ultrapura. Então a cada 30 minutos, mediu-se a massa dos hidrogéis intumescidos, para isso o excesso de água foi removido com papel absorvente. Esse procedimento foi avaliado por um período de 180 minutos. O grau de intumescimento do gel foi calculado de acordo com a EQUAÇÃO 1.

$$I (\%) = \frac{M_i - M_o}{M_o} \times 100 \quad (1)$$

Onde:

I – grau de intumescimento;

M_i – massa do gel intumescido após um período de tempo (t);

M_o – massa inicial do gel.

3.4.5.2 Perda de água

Para o estudo de perda de água, o hidrogel ficou submerso em 30 mL de água de um dia para o outro, garantindo assim que atingisse o equilíbrio de intumescimento. Então, monitorou-se a variação de massa do hidrogel por 240 min, com intervalos de 30 min e calculou-se o percentual de perda de água, com base na EQUAÇÃO 2.

$$PA (\%) = \frac{M_{eq} - M_t}{M_{eq}} \times 100 \quad (2)$$

Onde:

PA – teor de perda de água;

M_{eq} – massa do gel hidratado no equilíbrio;

M_t – massa do gel após um período de tempo (t);

3.4.5.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A análise morfológica da fase extratora sintetizada foi embasada em trabalhos anteriormente desenvolvidos no mesmo grupo de pesquisa (CroMe). O estudo foi fundamentado no trabalho desenvolvido por (Sampaio et al. 2019), onde os discos de hidrogel foram secos com nitrogênio líquido e em seguida, fraturados. Por se tratar de um material não condutor é necessário a deposição de uma fina camada de ouro sobre sua superfície. As análises no trabalho supraindicado foram observadas por um microscópio eletrônico de varredura modelo JSM-6360LV (JOEL®), operando em 10 kV.

3.4.6 Seleção do padrão interno

Para a seleção do PI, foram testados diferentes compostos disponíveis no laboratório onde o presente trabalho foi desenvolvido. Assim, os padrões avaliados foram: dietilestilbestrol, carbaril, ácido cinâmico, propanil e atrazina. Para isso, foram preparadas soluções em fase móvel, de cada um dos compostos, na concentração de $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. As análises ocorreram de acordo com o método estabelecido anteriormente para os parabenos, com ressalva no comprimento de onda monitorado. A TABELA 8 apresenta os comprimentos de onda de máxima absorção de cada um dos compostos, comprimentos esses então monitorados no DAD.

TABELA 8 - COMPRIMENTOS DE ONDA DE MÁXIMA ABSORÇÃO.

Composto	Comprimento de onda (nm)
Ácido cinâmico (CNA)	205 e 272
Atrazina (ATZ)	222
Carbaril (CBR)	290
Dietilestilbestrol (DES)	245
Propanil (PPN)	258

FONTE: PubChem (2022).

3.4.7 Extração do padrão interno

Foi avaliado então o disco de hidrogel, previamente selecionado, como fase extratora para o PI. Desse modo, utilizou-se água ultrapura enriquecida com o analito na concentração de $2,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, a extração foi realizada em triplicata com o mesmo hidrogel, de acordo com o item 3.4.4.

3.4.8 Otimização do processo SPE

3.4.8.1 Extração

Realizou-se um estudo da otimização das variáveis envolvidas na SPE, a fim de definir as condições de compromisso a serem empregadas nas etapas posteriores. Para esse fim, foram empregados 2 planejamentos fatoriais, um planejamento 2^3 , envolvendo os parâmetros pH, vazão e volume de amostra, e um planejamento 2^4 envolvendo os parâmetros pH, teor de NaCl, vazão e volume de amostra. Ambos os planejamentos foram realizados com a triplicata do ponto central. Os planejamentos foram executados de acordo com o descrito por Neto et al. (2001).

As condições empregadas em cada planejamento fatorial, em relação aos níveis inferiores (-1), superiores (+1) e o ponto central (0), estão apresentadas na TABELAS 9 e TABELA 10.

TABELA 9 - CONDIÇÕES AVALIADAS NO PLANEJAMENTO FATORIAL 2⁴.

Variáveis	Níveis		
	(-)	0	(+)
% NaCl	0,0	10,0	20,0
pH	3,0	5,0	7,0
Vazão (mL min ⁻¹)	1,0	2,0	3,0
Volume (mL)	10,0	20,0	30,0

TABELA 10 - CONDIÇÕES AVALIADAS NO PLANEJAMENTO FATORIAL 2³.

Variáveis	Níveis		
	(-)	0	(+)
pH	3,0	5,0	7,0
Vazão (mL min ⁻¹)	1,0	2,0	3,0
Volume (mL)	10,0	20,0	30,0

Para a etapa de otimização, amostras de água ultrapura pura enriquecida com analitos e PI, ambos na concentração de 1,0 µg mL⁻¹, foram empregadas. O procedimento de extração ocorreu conforme descrito no item 3.3.4, exceto que não houve reutilização do gel, ou seja, para cada condição do planejamento foi utilizado um hidrogel diferente.

3.4.8.2 Eluição

Tendo selecionado as condições de compromisso para a extração, foi realizada a otimização da eluição dos analitos, de forma univariada. Nessa etapa foi avaliado o número de eluições, assim como o modo de eluição direta ou em etapas. O solvente utilizado durante todo o processo foi metanol (grau HPLC).

Para isso, foram empregadas amostras de água ultrapura enriquecida com os analitos e PI na concentração de 1,0 µg mL⁻¹.

Primeiramente, avaliou-se o número de eluições. Assim, após o procedimento de extração, eluiu-se os analitos com 6 adições de metanol, de 1,0 mL cada. Cada um dos extratos foi coletado separadamente e analisado por LC-DAD.

Em seguida, realizou-se uma comparação entre a eluição em etapas e a eluição direta, ou seja, a adição de uma só vez de 4,0 e 5,0 mL de metanol. Nessa etapa, os extratos obtidos de 4,0 e 5,0 mL, foram secos em concentrador, com temperatura de 55 °C por período de 2h, e reconstituídos em 1,0 mL de metanol, e posteriormente analisados. Ambas as eluições, em etapas ou direta, foram avaliadas em triplicata, utilizando-se um hidrogel diferente para cada replicata.

3.4.9 Ensaio com urina humana

A utilização de urina humana para o desenvolvimento deste trabalho foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisas do Setor da Saúde da UFPR, o qual está apresentado no ANEXO 1.

Os voluntários foram convidados para realizar a doação da urina, onde cada um recebeu o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), onde foram detalhados os objetivos da pesquisa e o modo de coleta do material biológico.

Assim, cada voluntário recebeu um frasco âmbar de 3,3 L onde deveriam realizar a coleta do fluido por um período de 24 h, ou seja, a primeira urina do dia até a primeira coleta do dia seguinte. Entre os intervalos da coleta o frasco deveria ser armazenado sob refrigeração a 4 °C. Os participantes da pesquisa realizaram a entrega do frasco para a pesquisadora responsável no laboratório de Cromatografia e Técnicas de Microextração (CroMe). As amostras foram então codificadas e fracionadas, em seguida, armazenadas à -18 °C até o momento do uso, no qual foram então descongeladas à temperatura ambiente.

Inicialmente, foi realizado um ensaio com 5 urinas humanas distintas, para verificar se essas urinas poderiam ser utilizadas como prova em branco para os analitos (MPB, EPB, PPB e BPB) e PI (ATZ).

Assim, para a extração, 30,0 mL de amostra de cada um dos voluntários foi ajustada para pH 3,0, conforme determinado na etapa de otimização item 3.4.8.1. Em seguida, percolou-se a amostra pelo hidrogel com vazão de 1,0 mL min⁻¹, após a secagem do hidrogel, por 30 minutos, fez-se a eluição com 5 adições de metanol de 1,0 mL cada, o extrato obtido foi então seco em concentrador e reconstituído com fase móvel para 1,0 mL. Por fim, os extratos finais foram analisados por LC-DAD.

As amostras eram provenientes de doadores de diferentes gêneros, masculino e feminino, e diferentes idades, com faixa de 18 - 55 anos.

3.4.10 Reutilização da fase extratora

A capacidade de reutilização da fase extratora baseada em gel foi avaliada. Para esse fim, um mesmo disco de hidrogel foi submetido a quinze extrações consecutivas, realizadas em dois dias consecutivos.

Assim, amostras provenientes de um *pool* de urina humana, previamente determinadas como prova em branco, foram fortificadas com $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ dos analitos e PI. A extração e determinação dos analitos se deu conforme descrito no item 3.4.9. Entre cada uma das extrações foi realizada a etapa de limpeza com 20,0 mL de H_2O :metanol 1:1 (v/v) seguidos de 20,0 mL de água ultrapura, para evitar o efeito de memória. Como as extrações foram conduzidas em dias diferentes, o dispositivo de extração contendo o disco de hidrogel foi armazenado submerso em água ultrapura a 4°C .

3.4.11 Avaliação dos parâmetros de mérito

A avaliação dos parâmetros de mérito como estabilidade, linearidade, limite inferior de quantificação (LLOQ – *Lower Limit of Quantification*), limite de detecção (LOD – *Limit of Detection*), precisão, exatidão, repetibilidade e reprodutibilidade, foram avaliados de acordo com as orientações do Bioanalytical Method Validation (FDA, 2018) e Validação de Métodos Analíticos e Bionalíticos (ANVISA, 2017).

3.4.11.1 Estabilidade

O parâmetro de estabilidade de parabenos, tanto em fluidos biológicos, quanto em solvente, já está bem consolidado na literatura. Desse modo, foi realizada uma revisão a respeito desses valores.

A estabilidade dos quatro analitos em metanol é de dois meses com armazenamento à 4°C (Rigkos et al. 2021), e de seis meses quando armazenada à -20°C (Martín-Pozo et al. 2021; Van Overmeire et al. 2019). Assim, o período máximo estabelecido para o armazenamento das soluções supracitadas foi seis meses à -20°C .

Já a estabilidade dos parabenos na matriz de trabalho, ou seja, em urina, foi avaliada no trabalho conduzido por Tartaglia et al. (2019), onde os autores analisaram a estabilidade a longo prazo (40 dias) em três condições de temperatura, sendo elas, temperatura ambiente, refrigeração a 4°C e congelamento a -20°C , e os parabenos apresentaram estabilidade em matriz, em todas as condições supracitadas. No trabalho desenvolvido por Zhou et al. (2014), foi avaliado a estabilidade dos analitos em amostras de urina, armazenadas por um período de seis meses e submetidas a vários ciclos de congelamento e descongelamento, e os analitos não sofreram degradação. Há ainda relatos na literatura que os analitos apresentam estabilidade em urina de até 30 meses, quando armazenados a -70°C (Calafat et al. 2009).

Esses estudos demonstram que os analitos avaliados são estáveis na matriz biológica de interesse por um longo período de tempo, em diferentes temperaturas e a ciclos de congelamento e descongelamento.

3.4.11.2 Linearidade, LLOQ e LOD

A linearidade foi avaliada para o intervalo de concentração, com cinco níveis de concentração, de 0,1 a 1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Para esse fim, amostras de urina humana como prova em branco enriquecidas com os analitos na supracitada faixa de concentração, com o PI na concentração fixa de 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, passaram pelo procedimento de SPE, de acordo com o item 3.4.9, e posterior análise por LC-DAD. O ensaio foi realizado em triplicata.

O limite inferior de quantificação (LLOQ) foi determinado como a menor concentração da curva analítica, com valores de RSD de até 20% e exatidão entre 80 – 120 % (FDA, 2018).

Já o limite de detecção (LOD) foi determinado por meio da seguinte fórmula: $LOD = \frac{(3,3 \cdot sd)}{a}$, onde sd é desvio padrão do intercepto e a é coeficiente angular da curva analítica (ANVISA, 2017).

3.2.11.3 Precisão

A precisão foi avaliada de acordo com os valores de RSD para cada uma das concentrações da curva analítica. Esses valores devem ser inferiores a 20% e 15% para o LLOQ e demais pontos da curva, respectivamente.

3.2.11.4 Exatidão

A exatidão foi avaliada por meio da proximidade entre valor real de concentração e o valor obtido por meio da interpolação dos pontos nas equações da curva analítica definida para cada analito. Esse valor deve compreender a faixa de 80 – 120% e 85 – 115%, para LLOQ e demais pontos, respectivamente.

3.4.11.5 Reprodutibilidade

A reprodutibilidade foi avaliada por meio do ensaio de precisão, item 3.2.11.3, uma vez que foram utilizados diferentes discos de extração.

3.4.11.6 Repetibilidade

A repetibilidade foi avaliada por meio do ensaio de reutilização da fase extratora, item 3.4.10, uma vez que foi utilizado o mesmo disco de extração.

3.4.12 Aplicação da metodologia analítica desenvolvida

O método desenvolvido foi aplicado em 3 diferentes amostras de urina, doadas por voluntários do sexo feminino e masculino e com faixa etária 28 – 65 anos.

As amostras foram submetidas a metodologia desenvolvida de duas maneiras distintas. Inicialmente, as amostras foram fortificadas apenas com PI, na concentração de $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$. O segundo modo foi a fortificação das mesmas com os analitos e PI, ambos na concentração de $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$. Nos dois casos a metodologia foi aplicada em triplicata.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos para o desenvolvimento de metodologia analítica proposta, como, a otimização da separação cromatográfica, a síntese da fase extratora baseada em hidrogel e sua aplicação para a extração dos parabenos, seguido pela caracterização físico-química da mesma, até a etapa de otimização do procedimento de SPE e avaliação dos parâmetros analíticos de mérito, estão apresentados a seguir, nessa ordem.

4.1 OTIMIZAÇÃO DA SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA

A etapa de otimização da separação cromatográfica tem como objetivo o desenvolvimento do método cromatográfico, de modo a se obter um menor tempo de análise mantendo-se uma resolução satisfatória entre os picos. A separação dos compostos de interesse foi realizada utilizando-se diferentes condições cromatográficas, sendo elas, a composição fase e vazão da fase móvel.

A coluna utilizada para a separação cromatográfica é composta de fase estacionária de octadecilsilano (C18) quimicamente ligada à sílica. Em pH extremos, seja ácido ou básico, os grupos silanóis e siloxanos dessa fase estacionária podem reagir com os componentes da fase móvel, e desse modo, sofrer dissolução, causando perda da fase estacionária e, eventualmente, colapso da estrutura do leito da coluna. Portanto, para que a coluna apresente uma maior estabilidade e vida útil, a faixa de pH entre 2,0 – 8,0 deve ser respeitada (Jardim 2010; Maldaner et al. 2009; Tonhi et al. 2002). Desse modo, optou-se por testar fase móvel composta por pH 3,0; pH 6,0 e água (com pH 7,0) e verificar se haveria alteração nos parâmetros cromatográficos dos compostos. Para isso, foram testados 12 diferentes métodos cromatográficos, que estão apresentados na TABELA 11.

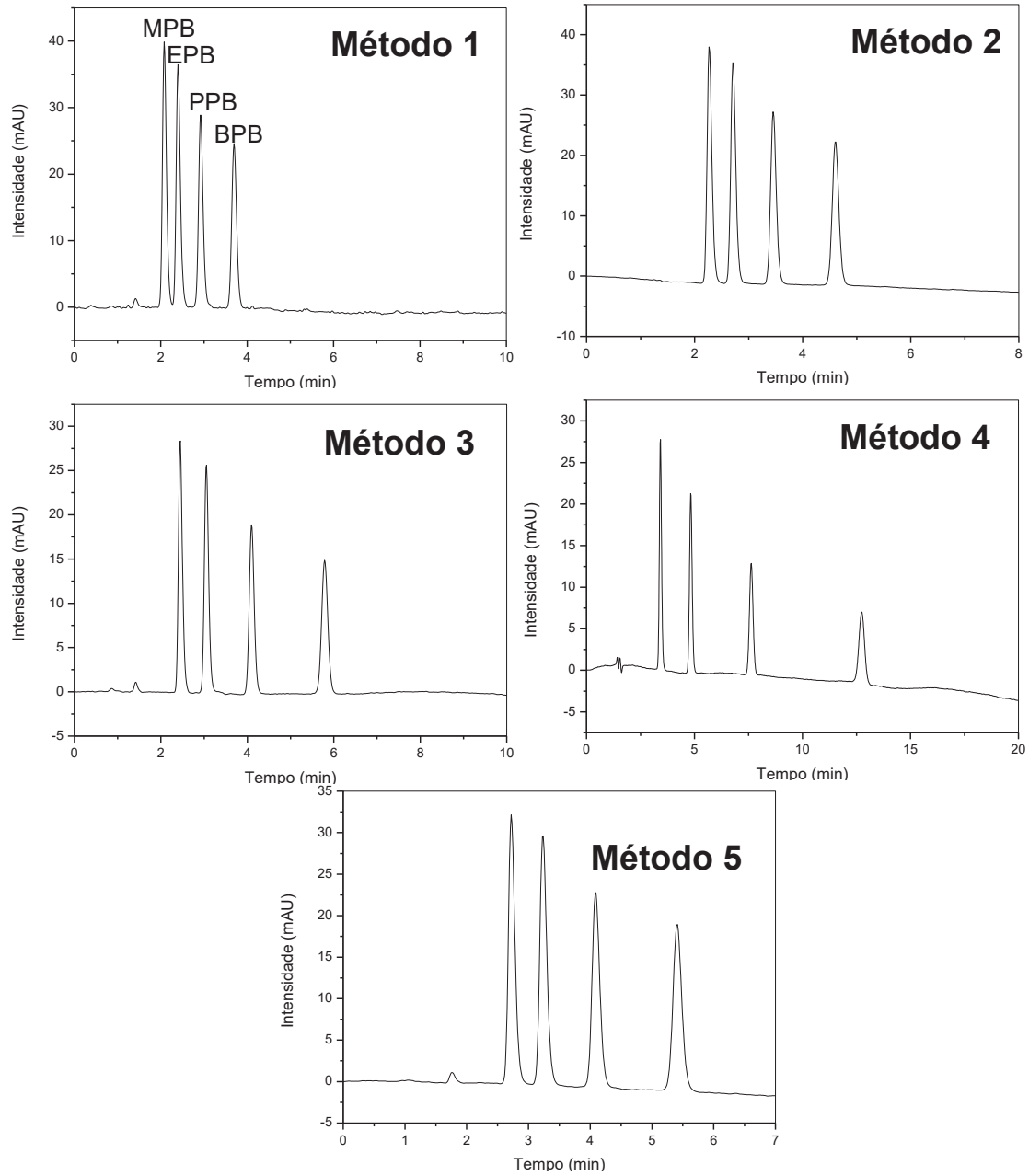
TABELA 11 - COMPOSIÇÕES DE FASE MÓVEL (v/v) AVALIADAS NA SEPARAÇÃO DOS PARABENOS.

Método	ACN	H ₂ O (pH 7,0)	pH 3,0	pH 6,0	Vazão (mL min ⁻¹)
1	60%	40%	-	-	1,0
2	55%	45%	-	-	1,0
3	50%	50%	-	-	1,0
4	40%	60%	-	-	1,0
5	55%	45%	-	-	0,8
6	60%	-	40%	-	1,0
7	50%	-	50%	-	1,0
8	40%	-	60%	-	1,0
9	60%	-	-	40%	1,0
10	55%	-	-	45%	1,0
11	50%	-	-	50%	1,0
12	40%	-	-	60%	1,0

As condições de compromisso foram selecionadas com base nos parâmetros cromatográficos, calculados para cada cromatograma obtido. Foram calculados os valores para os parâmetros de tempo de retenção (t_R), largura da base do pico (w_b), fator de retenção (k), fator de separação (α), número de pratos teóricos (N), resolução (R_s) para cada analito, na ordem de eluição. Foram obtidos os cromatogramas e os respectivos valores calculados para os métodos 1 - 5 (FIGURA 10, TABELA 12), métodos 6 – 8 (FIGURA 11, TABELA 13) e métodos 9 – 12 (FIGURA 12, TABELA 14). Como α e R_s são calculados para dois picos adjacentes, os valores apresentados em cada linha nas tabelas correspondem ao analito da linha correspondente e ao consecutivo, ou seja, o valor de R_s apresentado na primeira linha do método 1, refere-se à resolução entre os picos do MPB e ETB.

A ordem de eluição dos compostos depende da sua interação com a fase estacionária. Como foi utilizada a cromatografia de fase reversa, onde a fase estacionária é apolar, a ordem de eluição será a seguinte: primeiro o MPB, que é o mais polar por ter menor cadeia alquílica do grupo éster e, portanto, menor interação com a fase estacionária. Assim, basicamente pelo acréscimo da cadeia carbônica ligada ao grupo éster dos parabenos, o segundo, terceiro e quarto pico cromatográfico corresponde a, respectivamente, EPB, PPB e BPB, apresentando este último o maior tempo de eluição.

FIGURA 10 - CROMATOGRAMAS OBTIDOS NA SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA DOS ANALITOS (MPB, EPB, PPB E BPB – $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, NESSA ORDEM) PARA OS MÉTODOS 1 A 5.



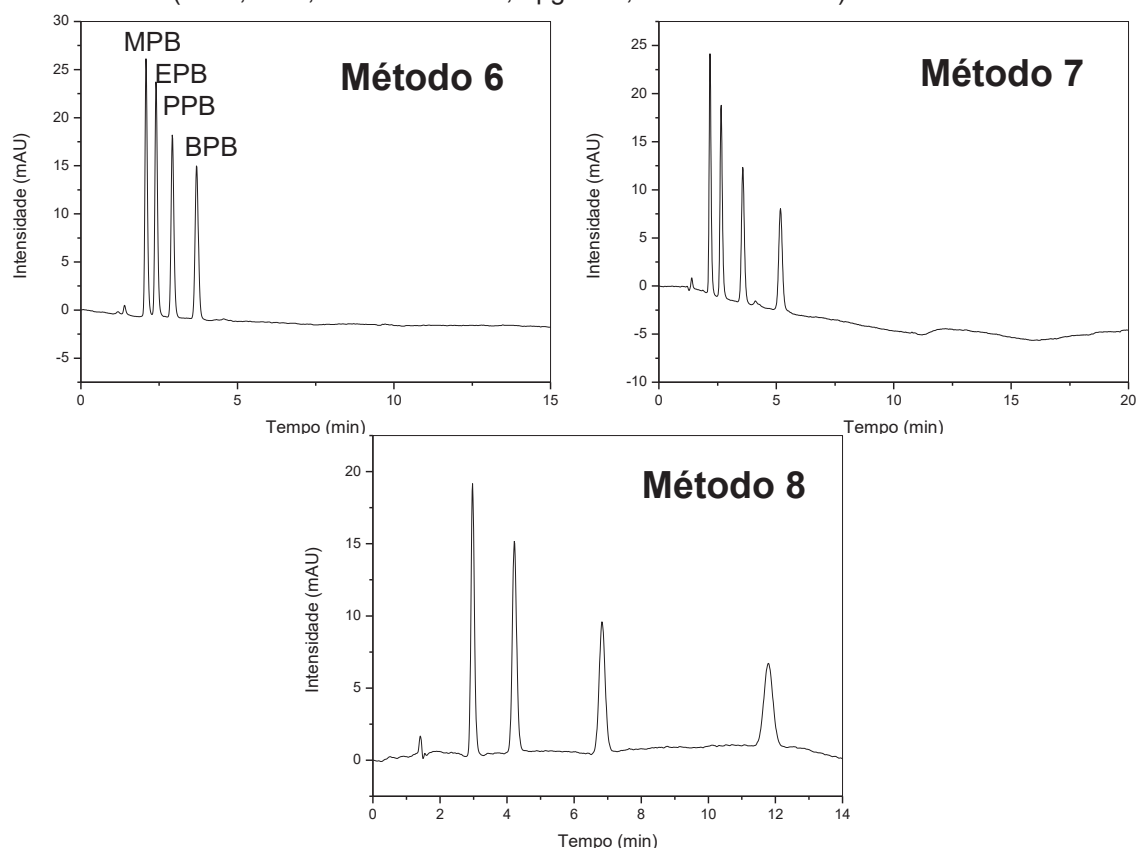
FONTE: A autora (2021).

TABELA 12 - PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS PARA OS MÉTODOS 1 A 5.

Analito	t_r (min)	w_b (min)	k	α	N	R_s
Método 1						
MPB	2,080	0,3600	0,4628	1,486	534,1	0,8731
EPB	2,400	0,3733	0,6879	1,532	661,2	1,182
PPB	2,920	0,5067	1,054	1,515	531,4	1,656
BPB	3,693	0,4267	1,597		1198	
Método 2						
MPB	2,267	0,4268	0,5709	1,534	451,5	1,099
EPB	2,707	0,3733	0,8758	1,591	841,0	1,805
PPB	3,453	0,4533	1,393	1,571	928,5	2,423
BPB	4,600	0,4933	2,188		1391	
Método 3						
MPB	2,453	0,4267	0,7133	1,588	528,9	1,300
EPB	3,053	0,5200	1,133	1,642	551,6	2,026
PPB	4,093	0,5067	1,860	1,640	1044	3,010
BPB	5,797	0,6267	3,050		1364	
Método 4						
MPB	3,427	0,5467	1,174	1,756	628,6	2,412
EPB	4,830	0,5867	2,062	1,861	1082	4,610
PPB	7,627	0,6267	3,838	1,846	2369	6,755
BPB	12,75	0,9200	7,086		3071	
Método 5						
MPB	2,720	0,4800	0,5389	1,546	513,8	1,114
EPB	3,240	0,4533	0,8331	1,580	817,3	1,800
PPB	4,093	0,4933	1,316	1,568	1101	2,411
BPB	5,411	0,6000	2,063		1302	

Na FIGURA 11 estão apresentados os cromatogramas obtidos utilizando como fase móvel tampão pH 3,0.

FIGURA 11 - CROMATOGRAMAS OBTIDOS NA SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA DOS ANALITOS (MPB, EPB, PPB E BPB – 1,0 µg mL⁻¹, NESSA ORDEM) PARA OS MÉTODOS 6 A 8.



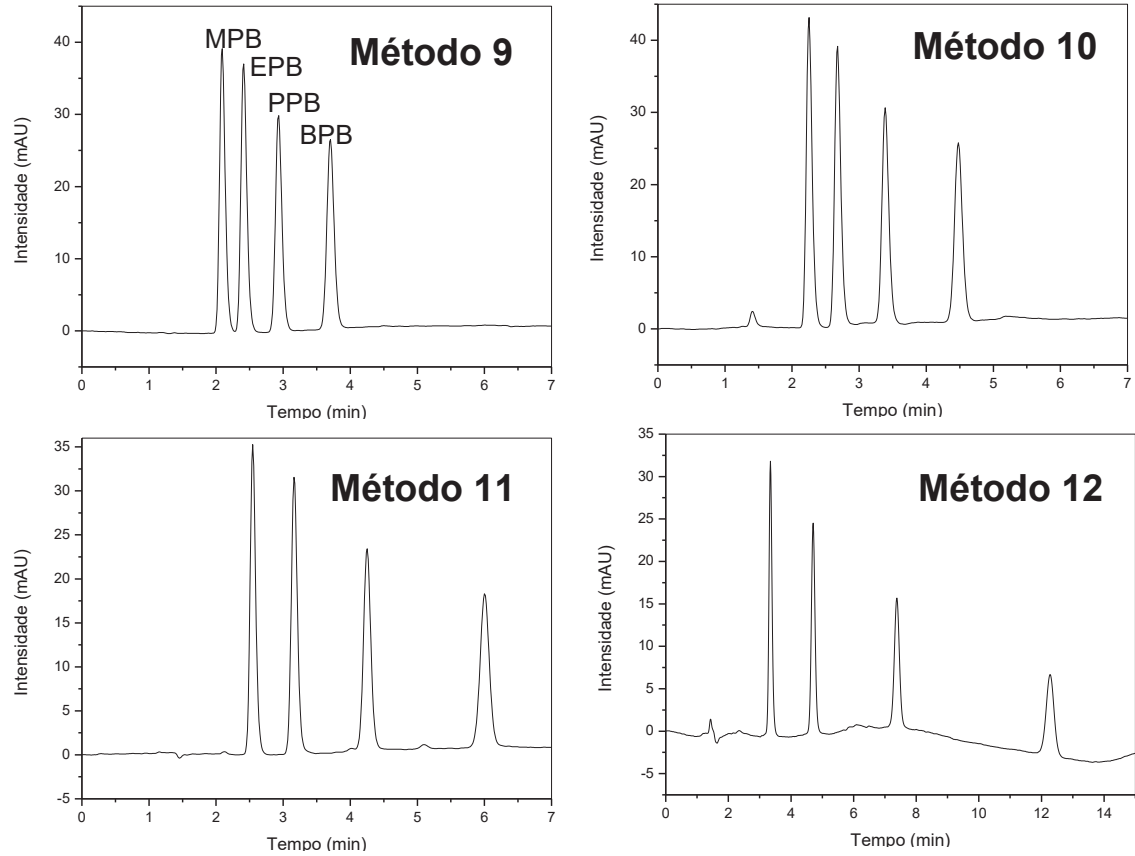
FONTE: A autora (2021).

TABELA 13 - PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS PARA OS MÉTODOS 6 A 8.

Analito	t_r (min)	w_b (min)	k	α	N	R_s
Método 6						
MPB	2,080	0,3467	0,4778	1,476	736,0	0,857
EPB	2,400	0,400	0,7050	1,523	900,0	1,258
PPB	2,920	0,4267	1,074	1,512	1135	1,650
BPB	3,693	0,5100	1,624		1459	
Método 7						
MPB	2,174	0,4133	0,5524	1,620	442,3	1,057
EPB	2,653	0,4933	0,8952	1,733	462,8	1,805
PPB	3,580	0,5333	1,552	1,736	718,2	2,780
BPB	5,173	0,6133	2,695		1138	
Método 8						
MPB	2,973	0,440	1,130	1,787	730,6	2,658
EPB	4,213	0,493	2,019	1,928	1167	4,455
PPB	6,826	0,680	3,892	1,913	1612	6,532
BPB	11,79	0,840	7,445		3150	

Na FIGURA 12 estão apresentados os cromatogramas obtidos utilizando como fase móvel tampão pH 6,0.

FIGURA 12 - CROMATOGRAMAS OBTIDOS NA SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA DOS ANALITOS (MPB, EPB, PPB E BPB – 1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, NESSA ORDEM) PARA OS MÉTODOS 9 A 12.



FONTE: A autora (2021).

TABELA 14 - PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS PARA OS MÉTODOS 9 A 12.

Analito	t_r (min)	w_b (min)	k	α	N	R_s
Método 9						
MPB	2,093	0,320	0,5090	1,453	684,7	0,9323
EPB	2,410	0,360	0,7397	1,506	719,0	1,400
PPB	2,933	0,387	1,114	1,510	920,8	1,904
BPB	3,707	0,426	1,672		1207	
Método 10						
MPB	2,253	0,4133	0,5950	1,508	475,5	0,9855
EPB	2,680	0,4533	0,8971	1,551	559,2	1,494
PPB	3,387	0,4933	1,397	1,554	754,0	2,129
BPB	4,480	0,5333	2,171		1129	
Método 11						
MPB	2,547	0,4533	0,7373	1,568	504,9	1,293
EPB	3,160	0,5333	1,156	1,645	561,7	2,158
PPB	4,253	0,4800	1,902	1,626	1256	3,240
BPB	6,000	0,6000	3,093		1600	
Método 12						
MPB	3,347	0,5200	1,334	1,711	662,7	2,323
EPB	4,710	0,6534	2,283	1,819	830,4	3,788
PPB	7,387	0,7600	4,152	1,822	1511	5,476
BPB	12,28	1,027	7,565		2289	

A resolução (R_s) é um parâmetro calculado para determinar a separação de dois compostos adjacentes, quando $R_s \leq 1$ significa que os compostos estão coeluinto, ou seja, não há separação suficiente, já para $R_s = 1,25$ significa que há separação dos compostos em termos quantitativos, e $R_s \geq 1,5$ significa separação completa (Paschoal et al. 2008). Desse modo, avaliou-se os cromatogramas obtidos, levando-se em consideração menores tempos de retenção e largura de base do pico concomitantemente a separação quantitativa dos compostos, ou seja, $R_s \geq 1,25$.

Pode-se notar que utilizando a solução tampão pH 3,0, há uma pequena redução no tempo de retenção dos parabenos, e conseqüentemente uma redução no tempo total de análise, quando comparados com a solução tampão pH 6,0 e água pH 7,0, para a condição de 50% de acetonitrila, o tempo total de corrida cromatográfica utilizando pH 3,0 é de 5,50 min, enquanto que utilizando água o tempo total é de 6,10 min.

Apesar da redução no tempo de análise, foi observada uma menor resolução entre os picos do MPB e EPB, na condição de pH 3,0, quando comparados com a solução tampão pH 6,0 e água (pH 7,0), não permitindo assim uma análise quantitativa.

Assim, utilizando-se os métodos 6 e 7 não foi possível obter uma resolução satisfatória para os picos do MPB e EPB, e no método 8 foi possível a separação quantitativa de todos os compostos. Entretanto, com a troca de fase móvel pH 3,0 por pH 6,0 e água foi possível alcançar uma separação cromatográfica com menor tempo de análise e resolução satisfatória. Portanto, a decisão de qual fase móvel utilizar, se deu com base nos dados obtidos para fase móvel solução tampão pH 6,0 e água (pH 7,0).

Quanto maior for a proporção do solvente orgânico, menor será o tempo de retenção dos analitos. Com proporções acima de 55% de acetonitrila, não se obteve resolução adequada entre os picos do MPB e EPB, tanto pH 6,0, quanto para pH 7,0. O teste com proporção de acetonitrila 55% e vazão $0,8 \text{ mL min}^{-1}$, foi testada com o intuito de melhorar a resolução entre os picos do MPB e EPB, com um tempo de corrida menor que quando utilizando, 50% H_2O e vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. Entretanto esse método ainda não apresentou uma resolução satisfatória.

Com fase móvel com proporção de água de 50%, obteve-se a resolução apropriada entre os picos dos quatro analitos. Para proporções maiores de fase aquosa, o tempo de corrida foi demasiado longo, passando de 6,10 min (50 H_2O : 50 ACN) para 13,18 min (60 H_2O : 40 ACN), causando assim alargamento dos picos, com a largura de base do BPB passando de 0,6267 para o 0,9200, e também diminuição das suas intensidades.

Ao fazer a comparação dos métodos utilizando a mesma proporção de solvente orgânico, não houve diferença expressiva no tempo de análise, resolução entre os picos, largura de base e fator de retenção ao utilizar água ou solução tampão pH 6,0, já que para ambas condições de pH os parabenos encontram-se majoritariamente na sua forma não protonada (Noorashikin et al. 2014).

Sendo assim, optou-se por utilizar o método 3 (50% água e 50% acetonitrila, v/v), para as etapas seguintes do projeto, de modo desenvolver uma metodologia analítica mais simples, ou seja, com um menor número de etapas, já que não necessita mais a etapa de preparo da solução tampão, o que pode garantir também maior vida útil da coluna cromatográfica.

4.2 DESENVOLVIMENTO DA FASE EXTRATORA BASEADA EM HIDROGEL

Primeiramente, foram sintetizados os discos de extração variando-se as proporções entre a dispersão de PVOH para a dispersão de pectina, bem como a substituição da pectina por alginato. As diferentes proporções entre o PVOH e pectina pode alterar a polaridade da fase extratora, alterando assim os mecanismos de retenção dos analitos. Já a substituição da pectina por alginato também está correlacionada com a alteração da polaridade da fase extratora, sendo que a pectina apresenta um caráter mais anfifílico quando comparada ao

alginate (Sampaio et al. 2019). Nesse sentido, e como os parabens estudados possuem uma faixa considerável de polaridade, já que o $\text{Log } k_{o/w}$ está entre 1,96 – 3,57, optou-se por testar apenas uma composição de alginato para verificar se apresentaria uma diferença significativa na extração, quando comparado com a mesma proporção de pectina. Os hidrogéis sintetizados nessa etapa do trabalho estão apresentados na TABELA 15.

TABELA 15 - HIDROGÉIS COM DIFERENTES PROPORÇÕES ENTRE OS POLÍMEROS.

Identificação do disco de extração	Dispersão dos polímeros (m/v)		Proporção entre polímeros (m/m)
P10PC3,0	PVOH10%	Pectina 3,0%	3,3:1
P15PC3,0	PVOH 15%	Pectina 3,0%	5,0:1
P15PC2,0	PVOH 15%	Pectina 2,0%	7,5:1
P10PC1,0	PVOH 10%	Pectina 1,0%	10:1
P15AL2,0	PVOH 15%	Alginato 2,0%	7,5:1

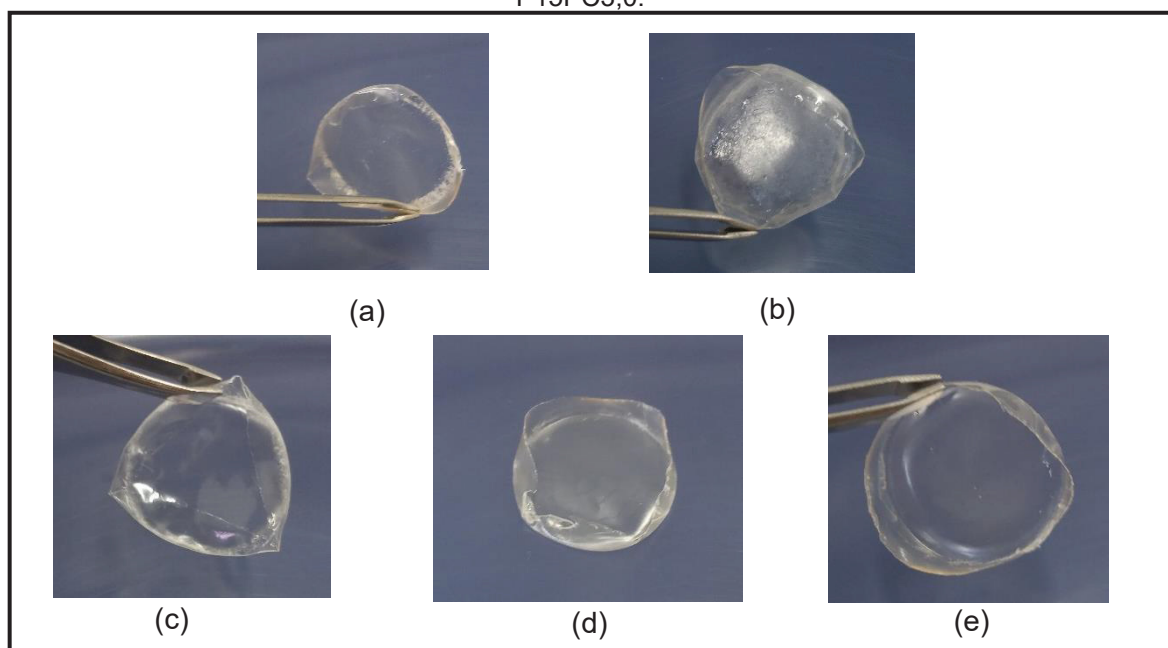
As primeiras sínteses dos discos de hidrogel não acarretaram em bons resultados, uma vez que os géis se apresentavam com um aspecto amarelado, quebradiço e com bolhas.

Mais duas sínteses foram avaliadas, preparando-se novas dispersões dos polímeros. Entretanto, ainda apresentavam o aspecto descrito acima. Nessa etapa do trabalho os géis estavam sendo sintetizados de maneira diferente do descrito no item 3.4.3.3, sendo que a mistura entre as dispersões foi realizada de modo individual para cada disco. Para isto, em um béquer de 10 mL foram pesados 500 mg da dispersão de PVOH e 500 mg da dispersão de pectina/alginato, assim como o agente reticulante (ácido cítrico), essa dispersão foi agitada por 10 minutos, em seguida colocada na estufa para secagem.

Como o aspecto dos discos de hidrogel não estava satisfatório, foi realizada a revisão de todos os cálculos envolvidos no preparo do disco, principalmente na quantidade de agente reticulante, além disso, optou-se por alterar o modo de preparo de gel. Nesse momento seguiu-se a metodologia descrita no item 3.4.3.3.

Ao utilizar a nova metodologia, segundo o item 3.4.3.3, os géis P10PC3,0 (FIGURA 13a) e P15AI2,0 (FIGURA 13b) ainda apresentavam bolhas e aspecto de não uniformidade, enquanto que os géis P10PC1,0 (FIGURA 13c), P15PC2,0 (FIGURA 13d) e P15PC3,0 (FIGURA 13e) apresentaram-se homogêneos.

FIGURA 13 - HIDROGÉIS DE (a) P10PC3,0, (b) P15AI2,0, (c) P10PC1,0, (d) P15PC2,0 E (e) P15PC3,0.



FONTE: A autora (2021).

Desse modo, apenas os discos os géis que apresentaram uniformidade foram utilizados para a extração dos parabens, ou seja, P10PC1,0; P15PC2,0 e P15PC3,0. Após fazer o primeiro teste de extração, avaliando apenas a proporção entre as dispersões de polímeros, selecionou-se os hidrogéis mais promissores, em termos de robustez e uniformidade, nesse caso, P10PC1,0 e P15PC2,0. Então a partir das proporções apresentadas pelos dois hidrogéis selecionados (7,5:1 e 10:1 m/m), foram sintetizados hidrogéis variando-se as concentrações da dispersão individuais dos polímeros. Diferentes concentrações de dispersão de polímero utilizadas alteram a quantidade de sorvente na fase extratora, que, por sua vez, altera parâmetros como o número de caminhos de percolação da amostra e grau de intumescimento, e assim acarreta em alterações na eficiência de extração (Sampaio et al. 2019). Os géis sintetizados nessa segunda etapa estão representados na TABELA 16.

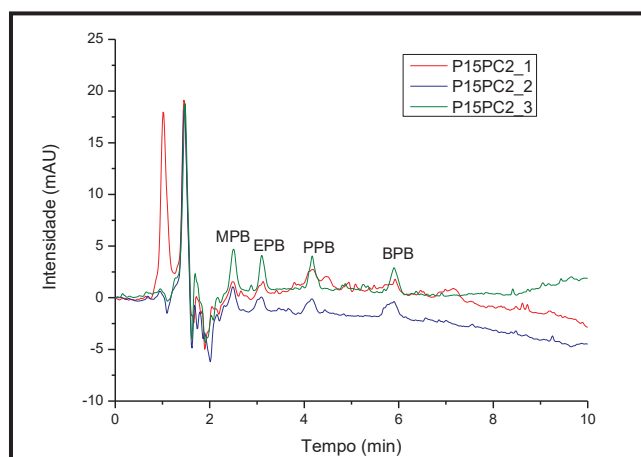
TABELA 16 - HIDROGÉIS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DAS DISPERSÕES DOS POLÍMEROS.

Identificação do disco de extração	Dispersão dos polímeros (m/v)		Proporção entre polímeros (m/m)
P10PC1,3	PVOH 10%	Pectina 1,3%	7,5:1
P15PC2,0	PVOH 15%	Pectina 2,0%	7,5:1
P20PC2,7	PVOH 20%	Pectina 2,7%	7,5:1
P10PC1,0	PVOH 10%	Pectina 1,0%	10:1
P15PC1,5	PVOH 15%	Pectina 1,5%	10:1
P20PC2,0	PVOH 20%	Pectina 2,0%	10:1

Todos os géis sintetizados com variação nas concentrações dos polímeros apresentaram-se robustos e homogêneos, sendo assim todos eles foram empregados na próxima etapa, visando a viabilidade dos mesmos frente à extração dos compostos de interesse, ou seja, na extração dos parabenos.

4.3 EXTRAÇÃO DOS ANALITOS

Como o primeiro gel a ser obtido foi o gel P15PC2,0, realizou-se um teste inicial para verificar se o hidrogel apresentava interação suficiente com os analitos a fim de promover extração dos compostos de interesse. A extração foi realizada em triplicata, utilizando-se amostra de água ultrapura enriquecida com os analitos na concentração de $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Com base no cromatograma apresentado na FIGURA 14, é possível concluir que o hidrogel P15PC2,0 foi capaz de extrair os parabenos, já que é possível identificar quatros picos com tempo de retenção que correspondem aos analitos estudados.

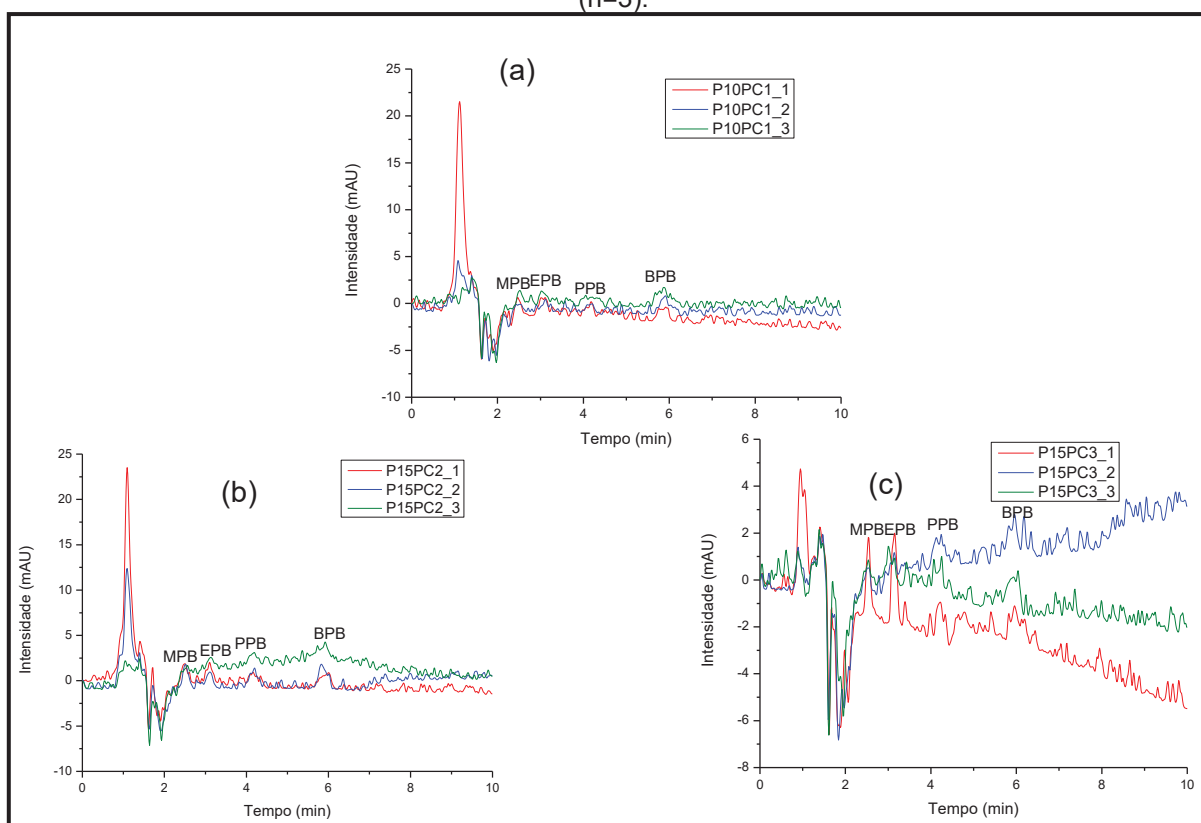
FIGURA 14 - CROMATOGRAMAS REFERENTES À EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DOS PARABENOS $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, (n=3).

FONTE: A autora (2021).

P15PC2_1: primeira replicata; P15PC2_2: segunda replicata e P15PC2_3: terceira replicata.

Diante da resposta positiva para a extração dos parabenos, optou-se por sintetizar novamente todos os hidrogéis com variação de proporção entre os polímeros, e conforme descrito no item 4.2, os hidrogéis que se apresentaram homogêneos e com potencial de uso foram: P15PC3,0, P15PC2,0 e P10PC1,0. Assim foi realizado um teste em triplicata com água ultrapura enriquecida com os analitos na concentração de $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, para verificar qual hidrogel apresentaria uma melhor eficiência de extração. Os cromatogramas obtidos para a extração estão representados na FIGURA 15.

FIGURA 15 - CROMATOGRAMAS REFERENTES À EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DOS PARABENOS $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, UTILIZANDO O HIDROGEL (a) P10PC1,0, (b) P15PC2,0 E (c) P15PC3,0, (n=3).



FONTE: A autora (2021).

P10PC1_1: primeira replicata; P10PC1_2: segunda replicata e P10PC1_3: terceira replicata.

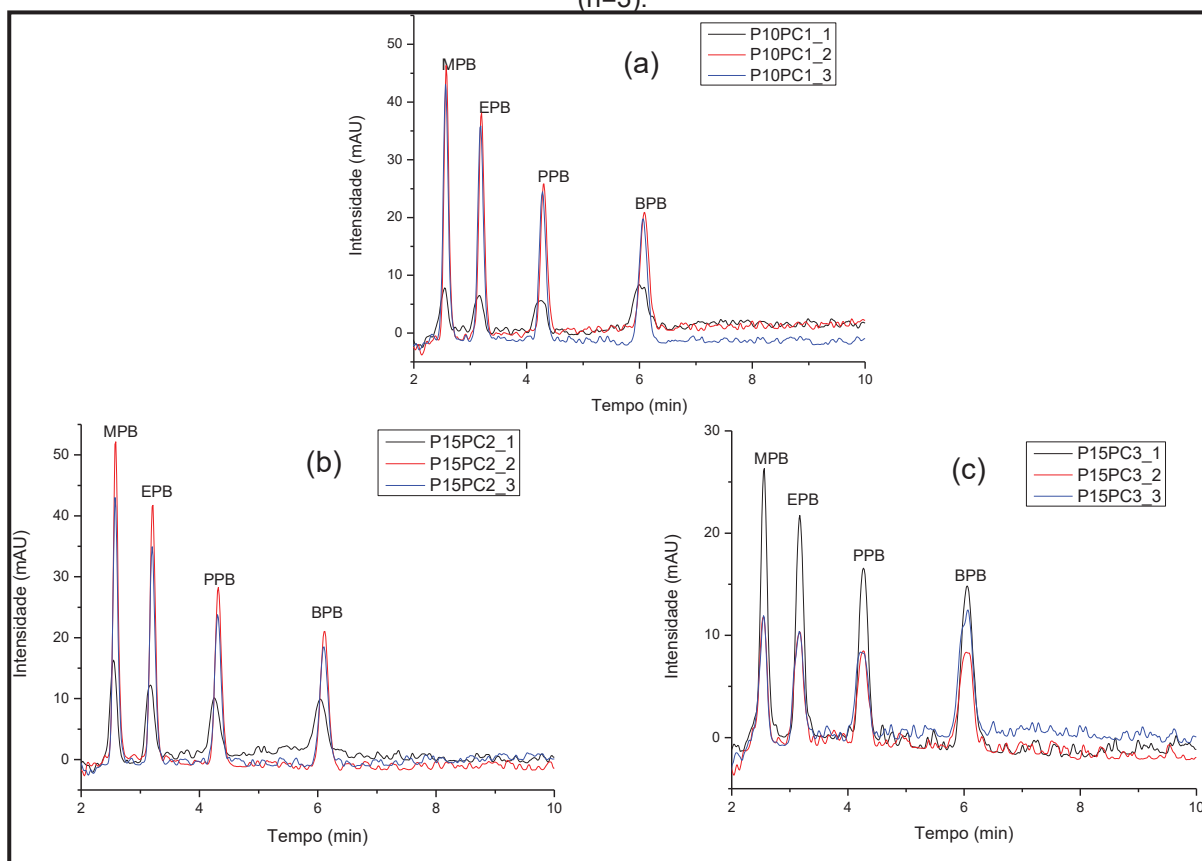
P15PC2_1: primeira replicata; P15PC2_2: segunda replicata e P15PC2_3: terceira replicata.

P15PC3_1: primeira replicata; P15PC3_2: segunda replicata e P15PC3_3: terceira replicata.

Nessa etapa do trabalho foi empregada água ultrapura enriquecida com os analitos na concentração de $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e para a eluição dos analitos, 2,0 mL de metanol. Conforme constatado na FIGURA 15, as intensidades dos picos foram muito baixas, sendo que no caso do hidrogel P10PC1,0, é possível identificar visualmente apenas o pico referente ao BPB, próximo a 6 minutos. Já no caso do P15PC3,0 e P15PC2,0 é possível identificar os picos referentes ao MPB, EPB, PPB e BPB, porém, não seria possível realizar a integração dos dois últimos. Devido à essa baixa intensidade dos picos, optou-se

por repetir a extração, desta vez, empregando uma concentração de parabens 5 vezes maior que a anterior, ou seja, $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e, para dessorção dos analitos, 1,0 mL de metanol. Os cromatogramas obtidos para a nova extração estão representados na FIGURA 16.

FIGURA 16 - CROMATOGRAMAS REFERENTES À EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DOS PARABENOS $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, UTILIZANDO O HIDROGEL (a) P10PC1,0, (b) P15PC2,0 E (c) P15PC3,0, (n=3).



FONTE: A autora (2021).

P10PC1_1: primeira replicata; P10PC1_2: segunda replicata e P10PC1_3: terceira replicata.

P15PC2_1: primeira replicata; P15PC2_2: segunda replicata e P15PC2_3: terceira replicata.

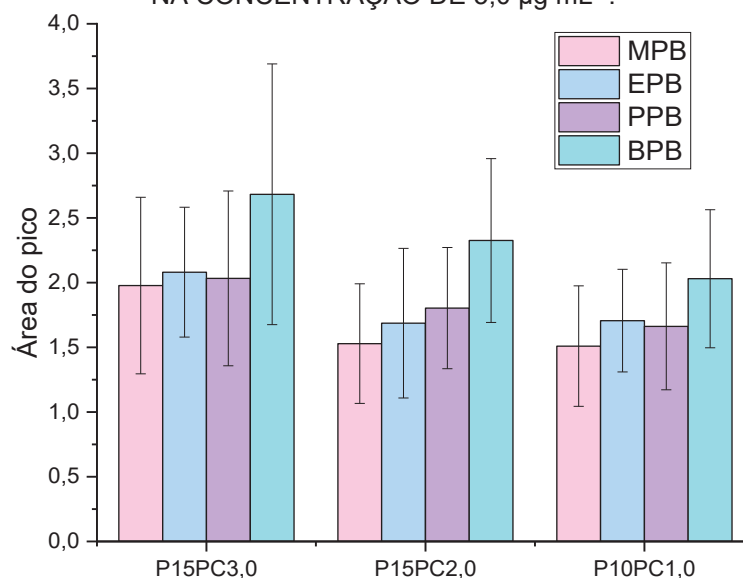
P15PC3_1: primeira replicata; P15PC3_2: segunda replicata e P15PC3_3: terceira replicata.

De acordo com os cromatogramas apresentados na FIGURA 16, observa-se que os picos referentes à primeira replicata, utilizando os géis P15PC2,0 e P10PC1,0, têm uma intensidade muito inferior quando comparado às demais replicatas, chegando a um valor de até 4 vezes menor. Isso pode ser explicado pelo fato de que entre as replicatas, era percolado metanol pelo hidrogel para promover a limpeza e evitar o efeito memória. Entretanto, na primeira extração era percolado apenas água pelo hidrogel, de modo a intumescê-lo. Já com o hidrogel P15PC3,0, ocorreu exatamente o contrário, o pico da primeira replicata foi mais intenso que os demais picos. Desse modo, é possível que o metanol esteja interferindo no tamanho da abertura das cadeias poliméricas do gel, ou interagindo com os sítios reativos do hidrogel, e assim alterando a eficiência de extração.

Ainda com base na FIGURA 16, identifica-se que a intensidade dos picos para o hidrogel P15PC3,0 é cerca de 70% menor que quando comparado aos demais hidrogéis testados. Em vista disto, realizou-se uma nova extração com os hidrogéis. Porém, desta vez após a etapa de hidratação do gel com 10,0 mL de água, foi percolado também 20,0 mL de H₂O:metanol 1:1 (v/v), seguidos de 20,0 mL de água, conforme descrito no item 3.4.4, de modo a verificar se a ausência da etapa de limpeza com metanol na primeira replicata estaria interferindo no processo de extração.

Na FIGURA 17 é apresentado o gráfico com os resultados da segunda extração, utilizando os hidrogéis de P15PC3,0, P15PC2,0 e P10PC1,0. No gráfico são dadas as médias das áreas de pico de cada analito de acordo com o disco de extração utilizado.

FIGURA 17 - ÁREAS MÉDIAS DOS PICOS CROMATOGRÁFICOS (n=3) DOS PARABENOS DE ACORDO COM A COMPOSIÇÃO DO HIDROGEL EMPREGADO NA EXTRAÇÃO DOS ANALITOS, NA CONCENTRAÇÃO DE 5,0 µg mL⁻¹.



FONTE: A autora (2021).

P10PC1,0: PVOH 10% e pectina 1,0%; P15PC3,0: PVOH 15% e pectina 3,0%; P15PC2,0: PVOH 15% e pectina 2,0%.

A percolação de metanol já no início da extração, fez com que os picos referentes à primeira replicata fossem mais intensos. Desse modo, todas as extrações realizadas adiante no presente estudo estão de acordo com o descrito no item 3.4.4.

Com os dados obtidos, aplicou-se a Análise de Variância (ANOVA) de fator único para verificar se haveria diferença significativa entre as médias de área de pico para cada analito, de acordo com o disco de extração empregado.

Com base no tratamento estatístico utilizando a ANOVA, foi constatado que não houve diferença significativa, para um nível de confiança de 95%, entre os hidrogéis utilizados na extração. Ao comparar as médias de cada analito, de acordo com o hidrogel empregado, os valores de $F_{\text{tab}} > F_{\text{cal}}$ para os quatros analitos.

Portanto, os géis PVA15PC2,0 e PVA10PC1,0 foram selecionados para o teste de variação de massa. Nesta etapa, o gel PVA15PC3,0 foi descartado, pois, durante a síntese dos mesmos alguns géis não ficaram uniformes e apresentam muitas bolhas, mostrando que a síntese não foi reprodutível, por isso apenas os demais hidrogéis foram selecionados para a continuidade do trabalho.

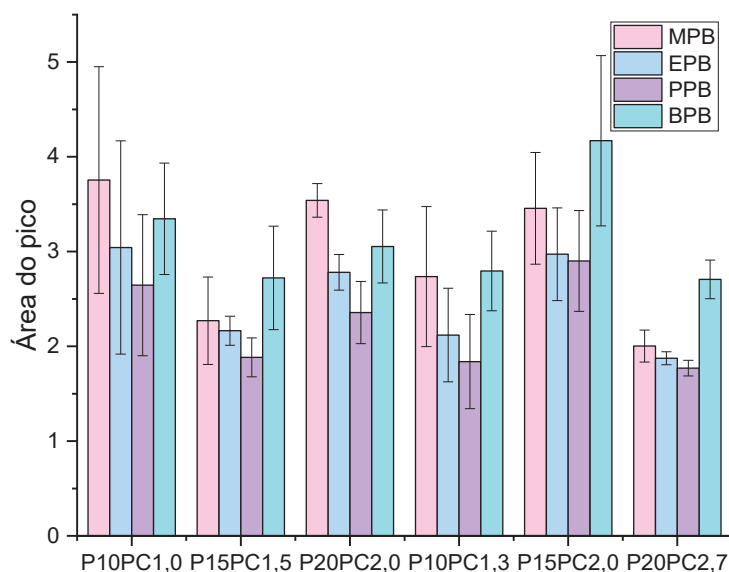
Em seguida foram sintetizados géis mantendo as proporções de 7,5:1 (m/m) e 10:1 (m/m) de PVOH:pectina, respectivamente, porém, alterando a concentrações das dispersões de polímeros utilizadas. Como as dispersões de PVOH acima de 20% apresentaram alta viscosidade e de difícil manuseio, selecionou-se essa concentração como limite máximo de trabalho. Além disso, concentrações de PVOH menores que 10% acabaram por apresentar-se como um gel muito maleável, se deformando dentro do suporte empregado para as extrações, fato que pode corroborar não somente em altas imprecisões quanto na perda da amostra durante os processos de SPE (Sampaio et al. 2019). Portanto, os hidrogéis selecionados para a avaliação de massa na eficiência da extração estão apresentados na TABELA 17

TABELA 17 - HIDROGÉIS SELECIONADOS PARA A AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA DISPERSÃO DE POLÍMERO UTILIZADA.

Proporção 10:1 (m/m)	Proporção 7,5:1 (m/m)
P10PC1,0	P10PC1,3
P15PC1,5	P15PC2,0
P20PC2,0	P20PC2,7

As extrações variando-se a massa da dispersão de polímero foram realizadas em quadruplicata, de acordo com o item 3.4.4. A FIGURA 18 traz o gráfico com os resultados da extração, utilizando os hidrogéis listados na TABELA 17. No gráfico são dadas as médias das áreas de pico de cada analito de acordo com o disco de extração utilizado.

FIGURA 18 - ÁREAS MÉDIAS DOS PICOS CROMATOGRÁFICOS (n=4) DOS PARABENOS DE ACORDO COM A COMPOSIÇÃO DO HIDROGEL EMPREGADO NA EXTRAÇÃO DOS ANALITOS, NA CONCENTRAÇÃO DE 5,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$.



FONTE: A autora (2021).

P10PC1: PVOH 10% e pectina 1,0%; P15PC1,5: PVOH 15% e pectina 1,5%; P20PC2,0: PVOH 20% e pectina 2,0%; P10PC1,3: PVOH 10% e pectina 1,3%; P15PC2,0: PVOH 15% e pectina 2,0%; P20PC2,7: PVOH 20% e pectina 2,7%.

Ao analisar o gráfico da FIGURA 21, é possível constatar que não há um padrão na extração em relação aos analitos. Contudo, é possível observar que os hidrogéis com uma menor concentração dos polímeros, apresentaram um maior valor de RSD, por exemplo, o gel P10PC1,0 apresentou desvios na faixa de 17,6% para o BPB até 37,0% para o MPB, enquanto que, para o gel P10PC1,3 os desvios apresentaram valores de até 27,0% para MPB e PPB. Já os discos de extração com maiores concentrações das dispersões de PVOH e pectina, apresentaram um valor de RSD menor, sendo que o gel com a maior concentração dos polímeros (P20PC2,7) apresentou o menor valor de RSD, de 3,6% para EPB até 8,4% para MPB. Cabe ressaltar que, até o presente momento, não foi empregado o uso de PI. Para as etapas de otimização de extração e avaliação dos parâmetros de mérito, espera-se que o uso de PI acarrete em menores valores de RSD entre as replicatas.

Assim, para selecionar o hidrogel que será utilizado nas etapas posteriores do trabalho, como na otimização do processo de extração e na avaliação dos parâmetros de mérito, foi aplicada a ANOVA de fator único para verificar se houve diferença significativa entre os géis, ou seja, se algum hidrogel apresentou uma maior eficiência de extração.

Com o auxílio do teste estatístico, ANOVA, foi constatada uma diferença significativa nas médias de área do pico para o MPB e BPB, para um intervalo de confiança de 95%. Já o EPB e PPB não apresentaram diferença significativa. Para averiguar quais hidrogéis apresentaram diferença significativa entre si, foi aplicado o teste de Tukey, e para o MPB os

discos que apresentaram diferença significativa foram P10PC1,0 e P20PC2,7, sendo que o primeiro apresentou uma resposta significativamente maior. Já para o BPB a diferença estava nos discos P20PC2,7 e P15PC2,0 e também P15PC2,0 e P15PC1,5.

Com base nos resultados obtidos por meio da ANOVA, decidiu-se pela exclusão dos hidrogéis que apresentaram diferença significativa para pelo menos um dos analitos. Assim, os hidrogéis P15PC1,5 e P20PC2,7 foram descartados. Os hidrogéis restantes não apresentaram diferença significativa para nenhum dos analitos, deste modo a seleção ocorreu com base no valor de RSD, sendo então selecionado o hidrogel que apresentou o menor valor de RSD. Conseqüentemente, o disco P20PC2,0 foi selecionado para as etapas posteriores do trabalho, já que dos géis que não apresentaram diferença significativa, esse gel foi que apresentou um valor de $RSD < 15\%$ para os quatro analitos estudados. Vale ressaltar que essa menor variação pode estar relacionada não somente com os processos de interação analitos/fase extratora, mas também com a resistência físico-química do gel entre as replicatas de extração e dessorção.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DA FASE EXTRATORA

O processo de intumescimento determina a capacidade de absorção de solvente e o volume disponível para o transporte dos solutos. Já o processo de perda de água está relacionado com a difusão de solvente de dentro para fora da cadeia polimérica. Sendo assim, tais parâmetros estão diretamente correlacionados com o processo de extração.

4.4.1 Grau de intumescimento

O intumescimento do hidrogel está correlacionado com a quantidade de água que o mesmo pode absorver. Primeiramente a hidratação do hidrogel se dá pela interação da água com grupos hidrofílicos presentes em sua estrutura, e posteriormente pela absorção de água nos interstícios e poros da rede polimérica, fazendo com que a estrutura do hidrogel possa inchar até centenas de vezes o valor de sua massa (Niu et al. 2015; Zhang et al. 2015).

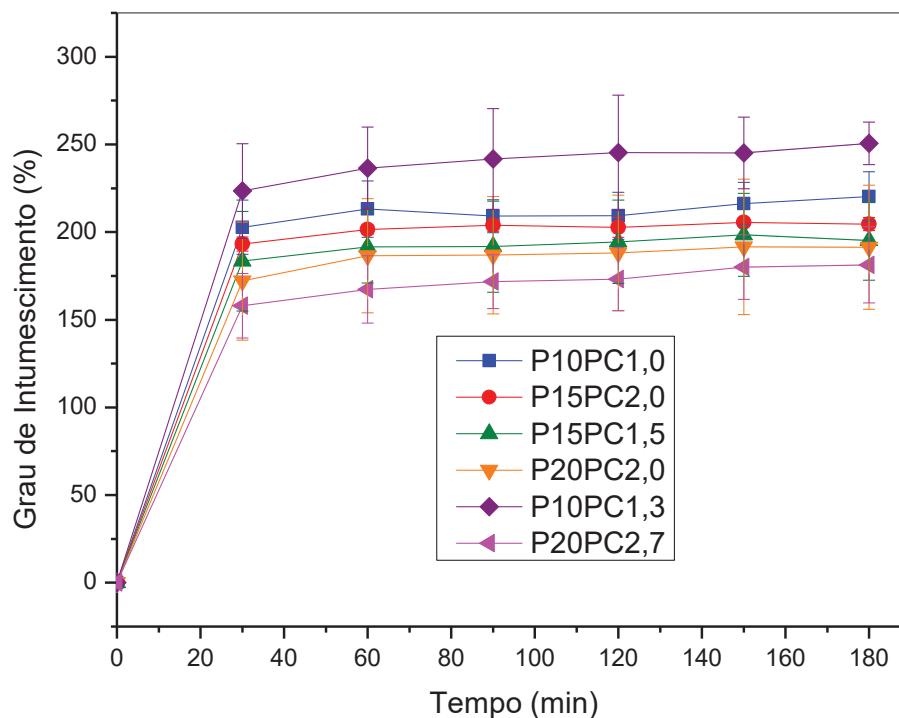
O processo de intumescimento de hidrogel é governado por forças químicas e físicas que induzem a entrada de líquido na matriz polimérica. Essa capacidade de intumescer depende do volume livre existente entre as cadeias dos polímeros. A força de intumescimento é contrabalanceada pela força de retração imposta pela estrutura reticulada, fazendo com que seja atingido o equilíbrio de intumescimento do material (Zheng et al. 2007).

Assim, o grau de intumescimento dos hidrogéis é dependente de vários fatores, como a composição do polímero que forma o hidrogel e mudanças no pH, temperatura e força iônica

também apresentam influência sob esse parâmetro. Entretanto, o fator mais importante é o grau de reticulação do hidrogel (Peppas; 2000).

O gráfico da FIGURA 19 mostra o comportamento de intumescimento dos hidrogéis (com variação da concentração de polímero) avaliados como fase extratora.

FIGURA 19 - GRAU DE INTUMESCIMENTO (% m/m) DOS HIDROGÉIS À 25 °C.



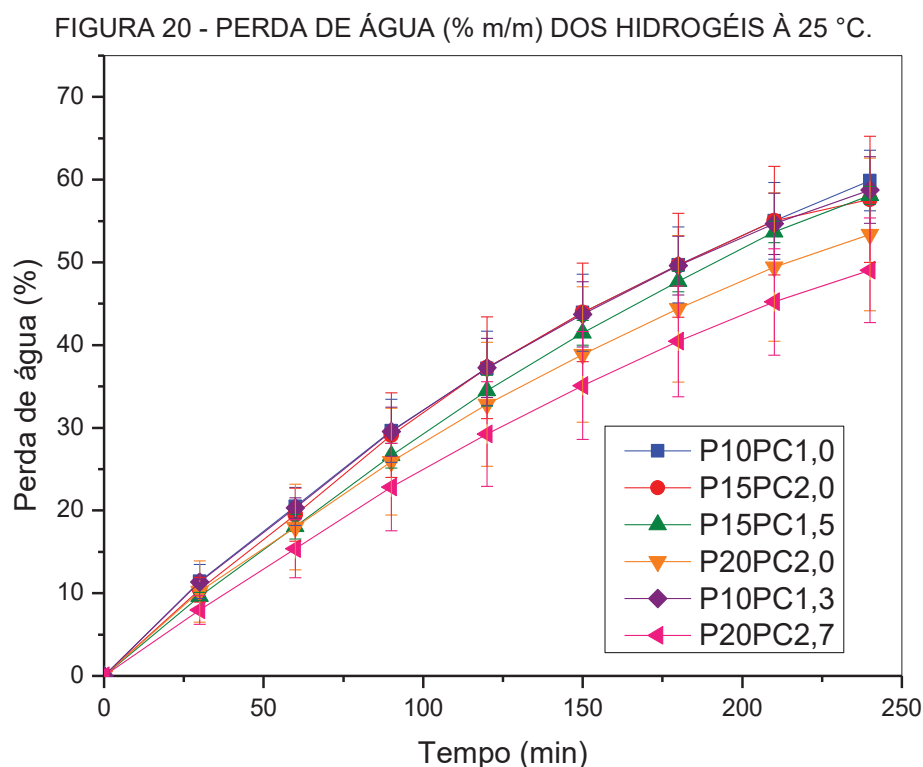
FONTE: A autora (2022).

Para todos os hidrogéis avaliados, o equilíbrio de intumescimento foi atingido já na primeira medida, em 30 minutos, o que apresenta uma vantagem para o processo da SPE, porque quanto mais rápido o intumescimento, mais rápido o material estará apto para realizar as extrações. Além disso, o aumento da concentração de polímero fez com que o hidrogel apresentasse um menor grau de intumescimento. As dispersões mais concentradas de polímeros possuem uma maior quantidade de sítios reativos para a reticulação, logo apresentam uma maior densidade de reticulação, aumentando assim a força de retração da rede polimérica, que é a força contrária ao inchamento, e por consequência disso, apresentam um menor grau de intumescimento (Peng et al. 2012). Enquanto a porcentagem de intumescimento do hidrogel P10PC1,3 foi cerca de 240%, o do hidrogel P20PC2,0 foi de aproximadamente 175%. Além disso, nota-se que os discos de hidrogel que apresentaram um menor valor de RSD para a extração, foram aqueles que apresentaram um menor grau de intumescimento, dando indícios de que o grau de intumescimento pode interferir no processo de extração.

Segundo o trabalho de Sampaio et al. (2019) hidrogéis que absorvem maiores quantidades de água, ou seja, aqueles que utilizam dispersões menos concentradas de polímeros, a distância entre as cadeias poliméricas é maior, o que dificulta a retenção do analito pela fase sorvente. Outra consequência para uma maior absorção de água, é que por conta do maior distanciamento entre as cadeias, a difusão dos solutos é maior. Essa maior dificuldade de retenção e maior difusão, pode explicar um maior valor de RSD das extrações com os hidrogéis de dispersões menos concentradas, quando comparados aos das dispersões mais concentradas.

4.4.2 Perda de água

O processo de perda de água do hidrogel é causado pela contração da rede polimérica, logo está correlacionado com a difusão do solvente de dentro para fora do hidrogel (Sampaio et al. 2019). Os resultados obtidos para esse estudo estão apresentados na FIGURA 20.



FONTE: A autora (2022).

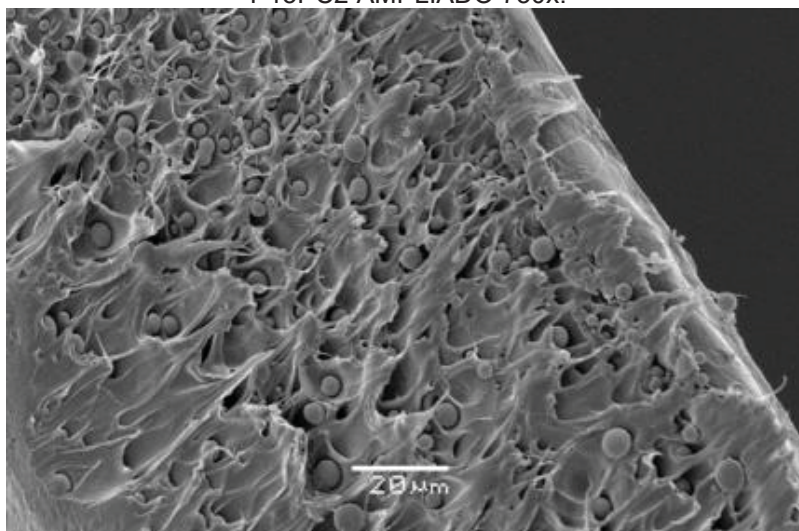
Os hidrogéis com concentração de PVOH 10% e 15%, apresentaram comportamento muito semelhante ao processo de perda de água, que foi em torno de 60%. Já para concentrações de PVOH de 20%, a porcentagem de perda de água foi menor, ficando em torno de 53% para o hidrogel P20PC2,0 e de 49% para o P20PC2,7.

No trabalho de Sampaio et al. (2019), foi constatado que o grau de intumescimento e perda de água são diretamente proporcionais, ou seja, menores concentrações acabam por acarretar maiores taxas de difusão de solvente e soluto de dentro para fora da rede polimérica, mostrando assim que isso pode ser a causa de maiores valores de RSD de hidrogéis que utilizaram soluções menos concentradas de polímeros.

4.4.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

No trabalho desenvolvido anteriormente por (Sampaio et al. 2019), foi realizada uma análise de MEV utilizando hidrogel de PVOH/pectina (P15PC2) com a proporção entre eles, de 7,5:1 (m/m), respectivamente. O hidrogel selecionado no presente estudo foi preparado utilizando a proporção de 10:1 (m/m) PVOH/pectina. Contudo, é possível analisar os aspectos morfológicos do mesmo com base no estudo supracitado. Na FIGURA 21 está representada a imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura do hidrogel P15PC2.

FIGURA 21 - IMAGEM POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) DO HIDROGEL P15PC2 AMPLIADO 750x.



FONTE: Sampaio et al. (2019)

Ainda que o características físicas do material na análise por MEV sejam diferentes do utilizado na extração, já que no primeiro caso foi utilizado o material seco e fraturado, enquanto no segundo é utilizado no modo intumescido, a análise de MEV, permite compreender o como as redes poliméricas do material estão unidas. Assim, com base na FIGURA 21 nota-se a presença de depressões e elevações esféricas na estrutura do material devida à presença da pectina. A forma esférica da pectina indica que as fases poliméricas que formam o hidrogel são imiscíveis. Ademais, a pectina promove um aumento da área superficial do PVOH, permitindo que os grupos funcionais desse polímero interajam com os

analitos, e atribuiu um caráter mais anfífilo a fase extratora, visto que, em hidrogéis compostos apenas de PVOH não foi possível a permeação de água pelo disco (Sampaio et al. 2019).

4.5 SELEÇÃO DO PADRÃO INTERNO

A utilização de padrão interno tem por objetivo a correção de efeitos interferentes nos procedimentos de análise experimental, melhorando assim, a qualidade dos resultados analíticos, tais como, precisão e exatidão (Silvestre et al. 2014).

Assim, diferentes padrões analíticos, disponíveis no laboratório, foram avaliados para sua utilização como PI. A TABELA 18 apresenta os tempos de retenção de cada analito, nos parâmetros do método previamente estabelecido, assim como a resolução entre o pico do PI e os picos adjacentes dos analitos.

TABELA 18 - PADRÕES INTERNOS AVALIADOS

Composto	Tempo de retenção (t_r)/min	Picos adjacentes	Resolução
Ácido cinâmico	2,00	Pico t_m	--
Atrazina	4,97	PPB BPB	1,39 1,35
Carbaril	4,13	PPB	0,02
Dietilestilbestrol	6,20	BPB	0,63
Propanil	6,60	BPB	0,95

t_m : tempo morto.

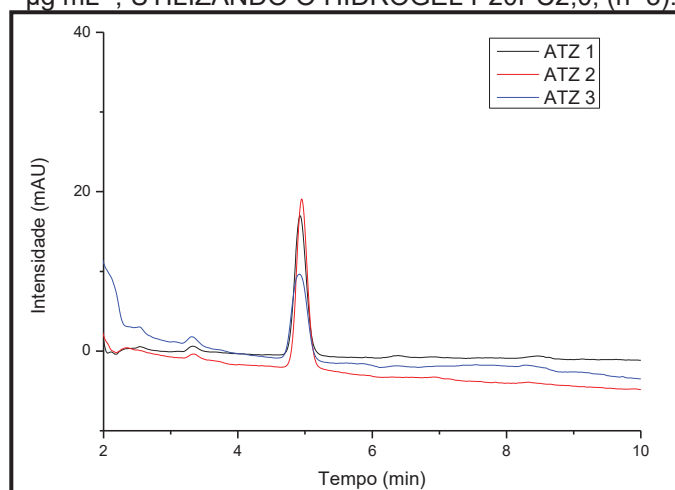
De acordo com a TABELA 18, dos compostos avaliados, apenas a ATZ apresentou uma resolução satisfatória com os picos dos analitos, não sendo necessário nenhum ajuste, seja de composição ou vazão de fase móvel, no método anteriormente determinado para os parabens, com a ressalva do monitoramento dos comprimentos de onda, sendo monitorados então os comprimentos de 254 nm e 222 nm, para os parabens e ATZ, respectivamente.

Além disso, um dos requisitos para que o composto possa ser utilizado como PI, é que o mesmo não deve ser encontrado na matriz da amostra. Assim, a ATZ é metabolizada pelo organismo, gerando metabólitos desalquilados e hidroxilados, sendo que quantidade do composto na forma inalterada, excretada na urina, menor que 2% da quantidade inicial a qual o indivíduo foi exposto (Kuklenyik et al. 2012; Panuwet et al. 2008). Portanto, a mesma foi selecionada como PI e utilizada nas etapas posteriores do trabalho.

4.6 EXTRAÇÃO DO PADRÃO INTERNO

Nessa etapa, realizou-se um ensaio para verificar se haveria interação da fase extratora (P20PC2,0) com o PI selecionado, ou seja, se a fase sorvente promoveria a extração da ATZ, de modo a confirmar que a mesma poderia ser utilizada nas extrações subsequentes. Os cromatogramas referentes às extrações estão representados na FIGURA 22.

FIGURA 22 - CROMATOGRAMAS REFERENTES À EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA ATZ 2,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, UTILIZANDO O HIDROGEL P20PC2,0, (n=3).



FONTE: A autora (2022).

ATZ 1: replicata 1; ATZ 2: replicata 2 e ATZ 3: replicata 3.

Conforme observado na FIGURA 22, o hidrogel foi capaz de extrair a ATZ, confirmando assim seu uso como PI.

4.7 OTIMIZAÇÃO DAS ETAPAS POR SPE

A otimização de um processo tem como objetivo descobrir as variáveis que resultam em um melhor rendimento. Na química analítica, diversas variáveis podem apresentar influência sobre determinado procedimento, sendo necessária a otimização dessas variáveis para alcançar a melhor resposta (Novaes et al. 2017).

A avaliação das variáveis envolvidas em um processo de forma individual, ou seja, univariada, pode apresentar algumas desvantagens como, por exemplo, maior quantidade de experimentos e não visualização de efeitos entre as variáveis (Lundstedt et al. 1998).

Por isso, a análise multivariada tem se mostrado promissora, uma vez que permite a redução do número de experimentos, o que suscita em menores tempos e gastos com reagentes, além de permitir a avaliação de dependência entre as variáveis, facilitando a visualização das melhores condições. Assim, para a análise multivariada são empregados

planejamentos fatoriais, completos ou fracionários, que permitem a obtenção do melhor rendimento (Brown et al. 2009; Bruns et al. 2006).

4.7.1 Extração

Inicialmente, para um estudo multivariado, aplicou-se um planejamento fatorial completo, $N = 2^k + C$, com N = número de experimento, k = variáveis (4) e C = ponto central (3), onde foram avaliadas as variáveis: pH, teor de NaCl, volume de amostra e vazão. Na TABELA 19 está representada a matriz do planejamento fatorial.

TABELA 19 - MATRIZ DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2^4 COM TRIPLICATA DO PONTO CENTRAL.

Ensaio	Teor de NaCl (%)	pH	Vazão (mL min ⁻¹)	Volume (mL)
1	0,0 (-)	3,0 (-)	1,0 (-)	10,0 (-)
2	10 (+)	3,0 (-)	1,0 (-)	10,0 (-)
3	0,0 (-)	7,0 (+)	1,0 (-)	10,0 (-)
4	10 (+)	7,0 (+)	1,0 (-)	10,0 (-)
5	0,0 (-)	3,0 (-)	3,0 (+)	10,0 (-)
6	10 (+)	3,0 (-)	3,0 (+)	10,0 (-)
7	0,0 (-)	7,0 (+)	3,0 (+)	10,0 (-)
8	10 (+)	7,0 (+)	3,0 (+)	10,0 (-)
9	0,0 (-)	3,0 (-)	1,0 (-)	30,0 (+)
10	10 (+)	3,0 (-)	1,0 (-)	30,0 (+)
11	0,0 (-)	7,0 (+)	1,0 (-)	30,0 (+)
12	10 (+)	7,0 (+)	1,0 (-)	30,0 (+)
13	0,0 (-)	3,0 (-)	3,0 (+)	30,0 (+)
14	10 (+)	3,0 (-)	3,0 (+)	30,0 (+)
15	0,0 (-)	7,0 (+)	3,0 (+)	30,0 (+)
16	10 (+)	7,0 (+)	3,0 (+)	30,0 (+)
17	5 (0)	5,0 (0)	2,0 (0)	20,0 (0)
18	5 (0)	5,0 (0)	2,0 (0)	20,0 (0)
19	5 (0)	5,0 (0)	2,0 (0)	20,0 (0)

Ao realizar o planejamento descrito na TABELA 19, na etapa de eluição dos analitos com metanol, houve a precipitação de sal no extrato, sendo que na condição de 10% de NaCl foi observada a precipitação de uma grande quantidade de sal, enquanto que a condição de 5% a solução apresentou uma coloração turva. Sendo assim, não foi possível realizar a injeção desses extratos, uma vez que sal pode causar danos ao LC-DAD, como entupimento da agulha do autoamostrador e também deposição de sal na coluna.

Desse modo, a otimização da extração foi avaliada sem o parâmetro do teor de NaCl. Assim, foi aplicado um planejamento fatorial completo, 2^3 com triplicata do ponto central, avaliando os seguintes parâmetros: pH, vazão e volume de amostra. Na TABELA 20 está representada a matriz do planejamento fatorial.

TABELA 20 - MATRIZ DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2³ COM TRIPLICATA DO PONTO CENTRAL.

Ensaio	pH	Volume (mL)	Vazão (mL min ⁻¹)
1	3,0 (-)	10,0 (-)	1,0 (-)
2	7,0 (+)	10,0 (-)	1,0 (-)
3	3,0 (-)	30,0 (+)	1,0 (-)
4	7,0 (+)	30,0 (+)	1,0 (-)
5	3,0 (-)	10,0 (-)	3,0 (+)
6	7,0 (+)	10,0 (-)	3,0 (+)
7	3,0 (-)	30,0 (+)	3,0 (+)
8	7,0 (+)	30,0 (+)	3,0 (+)
9	5,0 (0)	20,0 (0)	2,0 (0)
10	5,0 (0)	20,0 (0)	2,0 (0)
11	5,0 (0)	20,0 (0)	2,0 (0)

Na TABELA 21 estão representados os resultados obtidos para o planejamento fatorial 2³, os resultados estão expressos em razão da área dos picos cromatográficos dos analitos e do padrão interno (A_a/A_{PI}).

TABELA 21 - RAZÃO ÁREA PICOS CROMATOGRÁFICOS (A_a/A_{PI}) PARA OS ENSAIOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2³ COM TRIPLICATA DO PONTO CENTRAL.

Ensaio	Razão A_a/A_{PI}			
	MPB	EPB	PPB	BPB
1	0,5755	0,5809	0,5443	0,7878
2	0,6098	0,4526	0,4286	0,6900
3	0,5620	0,6424	0,6476	0,8341
4	0,5216	0,5643	0,5055	0,5805
5	0,5060	0,6126	0,6043	0,7705
6	0,4374	0,4876	0,4992	0,5958
7	0,6367	0,6486	0,5576	0,7236
8	0,5723	0,5075	0,3661	0,7118
9	0,3680	0,4103	0,4674	0,6210
10	0,4376	0,5092	0,4630	0,6162
11	0,6117	0,6071	0,5104	0,6372

Conforme apresentado na TABELA 21, as condições que promoveram uma melhor extração para mais de 75% dos analitos, foram as condições do ensaio 3, ou seja, pH 3,0, volume de amostra de 30,0 mL e vazão de percolação da amostra de 1,0 mL min⁻¹.

Foi observado que uma diminuição no pH proporcionou uma melhor extração. Os analitos estudados, MPB, EPB, PPB e BPB, estão na sua forma não ionizada em toda a faixa de pH avaliada (pH 3,0 – 7,0) (Noorashikin et al. 2014), dessa forma, não deveria haver diferença na eficiência de extração com a mudança de pH, em relação aos analitos.

Assim, essa alteração na eficiência de extração está relacionada a composição da fase extratora. Quando o pH do meio é maior que o pKa do PVOH (4,76), os íons ^{-}OH causam a hidrólise dos grupos acetatos residuais, fazendo com que a estrutura apresente alta densidade de carga iônica, provocando a repulsão entre as cadeias poliméricas, o que aumenta a distância entre elas, gerando assim, um maior grau de intumescimento e conseqüentemente, uma maior difusão dos analitos (Mansur et al. 2008). Além disso, a pectina, independente do grau de metoxilação, apresenta pKa na faixa de 3,55 – 4,10, logo em $\text{pH} < \text{pKa}$, a estrutura encontra-se na sua forma neutra, formando ligações de hidrogênio entre o grupos hidroxilas da pectina e o grupos carboxilas dos acetatos residuais, o que por sua vez diminui a distância entre as cadeias e aumenta a força retração, resultando em um menor grau de intumescimento (Mishra et al. 2008). Desta forma, para ambos os polímeros utilizados na síntese, um menor pH promoveu um menor grau de intumescimento, que por sua vez acarretou em menor difusão dos solutos, favorecendo a extração.

O volume de amostra também interfere na eficiência da extração, ao comparar os ensaios 1 e 3, onde o pH e vazão são mantidos constante, variando-se apenas o volume de amostra, o aumento desse parâmetro ocasionou uma maior eficiência de extração. Isso porque, maiores volumes de amostra acarretam em uma maior quantidade de matéria dos analitos, favorecendo assim uma maior extração.

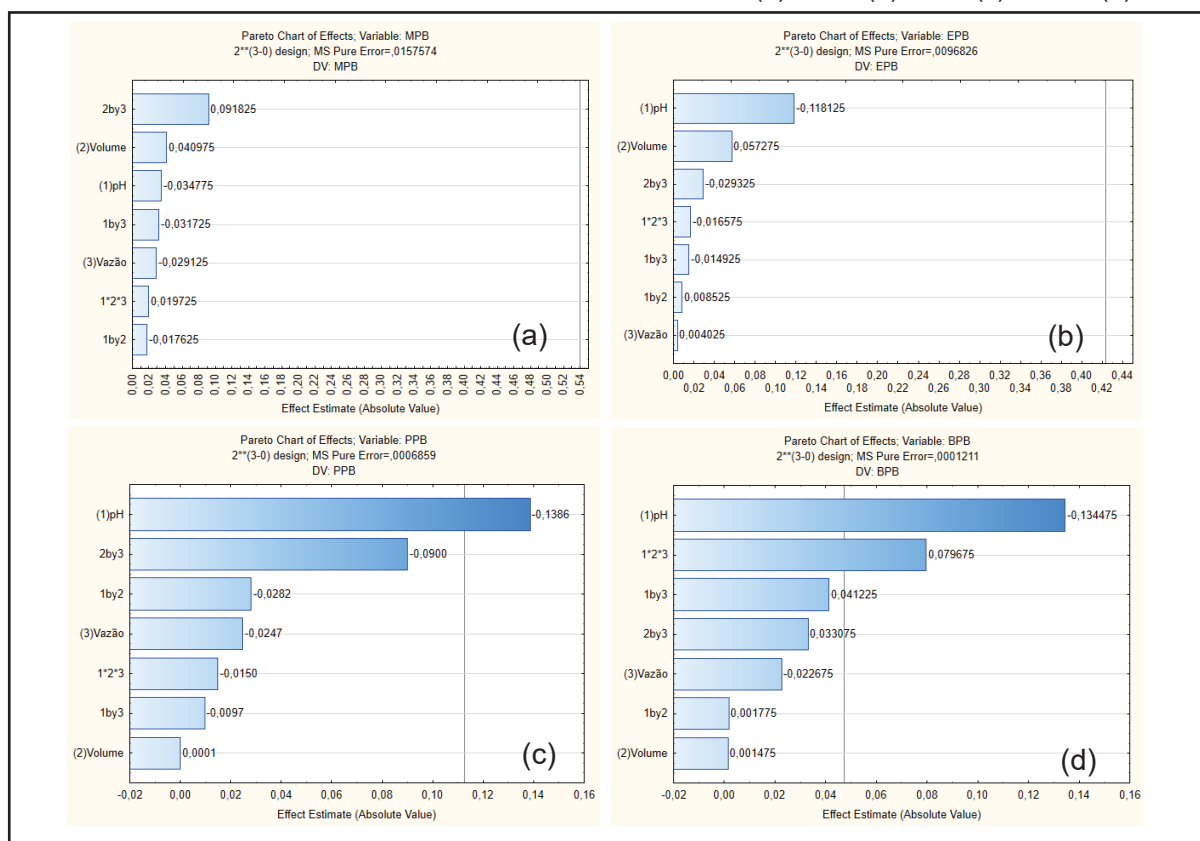
E por fim, ao comparar os ensaios 3 e 7, observa-se que menores vazões de percolação de amostra, implicaram em melhores resultados. Menores vazões ocasionam maiores tempos de contato dos analitos com a fase extratora, que gera dois resultados distintos, o primeiro é uma maior interação com essa fase e melhor eficiência de extração, que geralmente são observados para compostos de menor polaridade, ou segundo, que esse maior tempo de contato pode fazer com que a própria matriz da amostra promova a dessorção dos analitos, resultado esse mais comum em compostos de maior polaridade que tem uma maior afinidade com a matriz. O fator resposta para a razão entre os resultados do ensaio 3 e 7, variam de 0,88 a 1,15, enquanto o valor de $\text{Log } k_{o/w}$ varia de 1,96 – 3,57, do MPB ao BBP, respectivamente, evidenciando assim que há um aumento mais pronunciado na eficiência de extração dos compostos de menor polaridade utilizando-se menores vazões.

Os valores de RSD foram calculados utilizando a triplicata do ponto central, sendo de 26,6%, 19,3%, 5,4% e 1,8% para o MPB, EPB, PPB e BPB, respectivamente. Maiores valores de RSD para o MPB e EPB, analitos de maior polaridade, podem estar correlacionados a vazão de percolação da amostra, como citado anteriormente a própria matriz da amostra pode levar a dessorção dos analitos devido o tempo de contato. Além disso, esse maior desvio pode estar associado com a composição da fase extratora, já que o PVOH apresenta um caráter mais hidrofóbico, devido à impossibilidade de percolação de água em hidrogéis compostos unicamente desse polímero (Sampaio et al. 2019), e também a pectina,

que nesse trabalho passou pelo processo de purificação, que resulta em aumento no grau de metoxilação, ou seja, a pectina utilizada é classificada como de alta metoxilação (HM) (Lopes et al. 2017), desse modo, o aumento na esterificação faz com que a pectina apresente um caráter mais apolar. E essa menor afinidade dos polímeros com os compostos de maior polaridade pode explicar os maiores valores de RSD apresentados pelos mesmos.

Dos quatro analitos avaliados, somente o PPB e BPB apresentaram efeitos principais e de interação significativos. Na FIGURA 23 estão representados com gráficos de Pareto de cada um dos analitos com os valores absolutos dos efeitos. Os efeitos principais e de interação significativos são aqueles que apresentam valor superior à estimativa de desvio padrão associada ao valor de t de Student para um nível de confiança de 95% ($t_{95\%} = 4,303$, $u = 2$), sendo esse desvio representado pela linha vertical cinza de cada gráfico de Pareto.

FIGURA 23 - GRÁFICO DE PARETO DOS EFEITOS PARA O (a) MPB, (b) EPB, (c) PPB E (d) BPB.

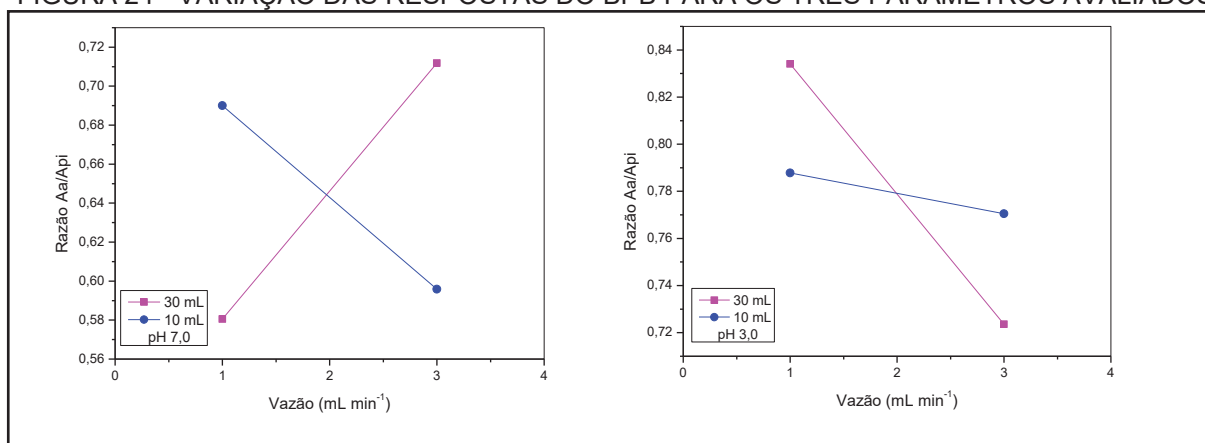


O PPB apresentou apenas efeito de primeira ordem em relação ao pH da amostra. Já o BPB apresentou efeito de primeira ordem em relação ao pH e também efeito de interação de terceira ordem.

O efeito do pH na extração do PPB está correlacionado com a composição da fase extratora, como citado anteriormente.

Os efeitos de interação de terceira ordem do BPB podem ser visualizados na FIGURA 24.

FIGURA 24 - VARIAÇÃO DAS RESPOSTAS DO BPB PARA OS TRÊS PARÂMETROS AVALIADOS



FONTE: A autora (2022).

Com base no gráfico da FIGURA 24, é possível observar que para 30,0 mL de amostra em pH 3,0 há um decréscimo pronunciado na razão A_a/A_{Pl} ao passar de vazões de $1,0 \text{ ml min}^{-1}$ para $3,0 \text{ mL min}^{-1}$, comportamento este contrário ao observado para o mesmo volume de amostra em pH 7,0. Já ao utilizar menores volumes de amostra, o comportamento em pH 7,0 é semelhante ao pH 3,0, apenas com diferença no coeficiente angular da reta, onde, para o volume de 10,0 mL e pH 7,0, o aumento da vazão de percolação da amostra acarreta em uma diminuição da eficiência de extração mais pronunciada.

Conforme citado anteriormente, um menor pH favorece a extração. Somado a isso, um maior volume de amostra e menor vazão, aumentam a quantidade de matéria do analito e o tempo de contato com a fase extratora. Como o BPB é o composto mais apolar dentre os avaliados, a menor vazão não apresenta efeitos negativos na interação do mesmo com a fase extratora, ao contrário dos menos apolares, provocando assim, um efeito entre esses fatores e aumentando a eficiência de extração.

Portanto, as condições de compromisso selecionadas para serem empregadas na etapa de extração foram: pH 3,0, volume de amostra de 30,0 mL e vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$.

4.7.2 Eluição

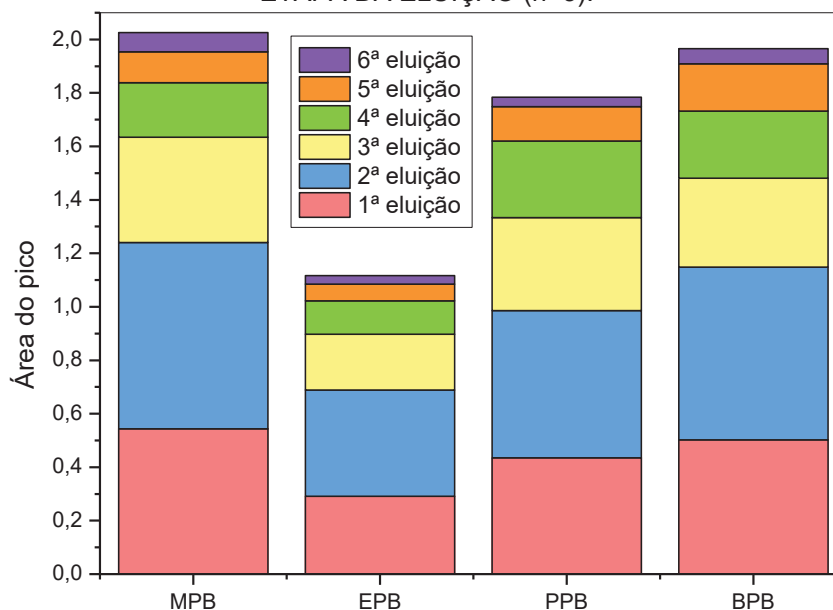
A etapa de eluição dos analitos foi avaliada de maneira univariada, considerando dois modos de eluição, o modo de eluição em etapas e a eluição direta. Em relação à natureza do solvente, foi avaliado apenas o metanol, uma vez que outros solvente como acetato de etila e diclorometano são incompatíveis com o *holder* de policarbonato, levando a deterioração do mesmo (Sampaio, 2017).

Primeiramente, foi avaliada a dessorção dos analitos em etapas, utilizando o solvente metanol. Esse ensaio teve por objetivo identificar o menor volume de solvente capaz de

promover a dessorção dos analitos, assim como, avaliar um possível efeito memória relacionado a reutilização do hidrogel.

Assim, para a dessorção dos analitos foram avaliadas 6 etapas de eluição com 1,0 mL cada. Cada um dos extratos obtidos foi analisado separadamente. A FIGURA 25 apresenta o gráfico empilhado, com a área do pico cromatográfico dos analitos, de cada uma das etapas empregadas. Já a TABELA 22 apresenta os resultados de área de pico proporcional e acumulada de cada etapa.

FIGURA 25 - ÁREAS DOS PICOS CROMATOGRÁFICOS DO MPB, EPB, PPB E BPB PARA CADA ETAPA DA ELUIÇÃO (n=3).



FONTE: A autora (2022).

TABELA 22 - ÁREA DE PICO ACUMULADA E PROPORCIONAL DE CADA ETAPA.

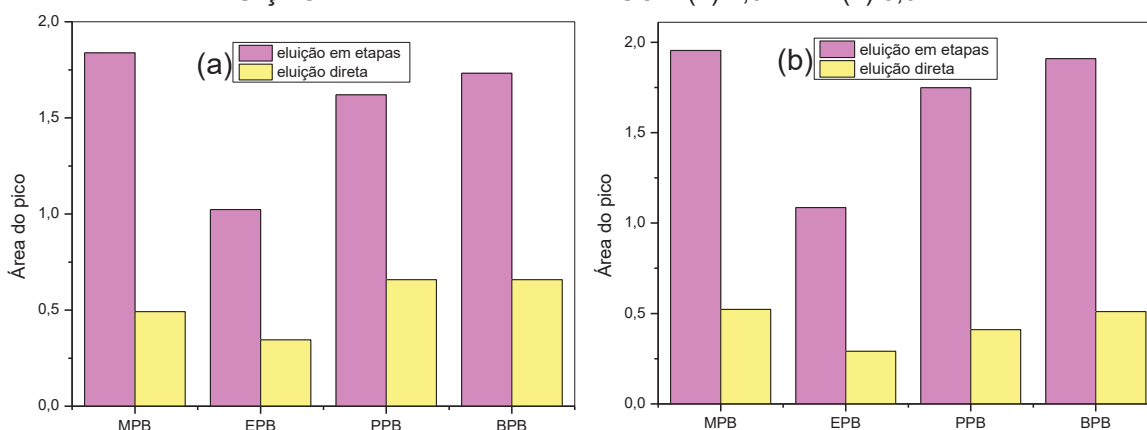
Analito	Área de pico proporcional e acumulada/%											
	1	T	2	T	3	T	4	T	5	T	6	T
MPB	26,82	26,82	34,40	61,22	19,46	80,68	10,06	90,74	5,71	96,45	3,55	100
EPB	26,03	26,03	35,62	61,65	18,65	80,30	11,22	91,52	5,62	97,14	2,86	100
PPB	24,41	24,41	30,83	55,24	19,51	74,75	16,00	90,75	7,19	97,94	2,06	100
BPB	25,56	25,56	32,89	58,45	16,92	75,37	12,75	88,12	9,03	97,15	2,85	100

Com base nos resultados apresentados na FIGURA 25 e TABELA 22, a adição de 2 mL de metanol, em duas etapas, foi responsável por mais de 50% de área de pico acumulada. Enquanto a adição de 4,0 mL e 5,0 mL foram responsáveis por mais de 88% e 96% da área acumulada, respectivamente.

Desse modo, os volumes que promoveram uma eluição dos analitos superior a 88%, 4,0 mL e 5,0 mL, foram avaliados utilizando o modo de eluição direta. Assim, os extratos obtidos de cada um dos volumes supracitados foram secos e reconstituídos com 1,0 mL de

metanol, com o propósito de igualar os volumes finais dos extratos de cada um dos modos de eluição, e tornar possível a comparação entre os ensaios. Na FIGURA 26 estão representadas as áreas de pico cromatográfico de cada analito, utilizando os volumes de 4,0 mL e 5,0 mL, no modo de eluição direta e em etapas.

FIGURA 26 - ÁREAS DE PICO CROMATOGRÁFICO DO MPB, EPB, PPB e BPB, NO MODO DE ELUIÇÃO DIRETA E EM ETAPAS COM (a) 4,0 mL E (b) 5,0 mL.



FONTE: A autora (2022).

É possível constatar que a eluição em etapas promoveu uma melhor dessorção dos analitos, ao utilizar o volume de 4,0 mL de solvente, a eluição em etapas apresentou áreas de pico cromatográfico 2 a 4 vezes maiores quando comparadas a eluição direta. Já ao utilizar volume de 5,0 mL o ganho em termos de área de pico foi em média 3,8 vezes.

De forma análoga ao que acontece na LLE, na SPE, a adição de alíquotas de menor volume de solvente promovem um maior tempo de contato com os analitos, o que favorece a dessorção dos mesmos e aumenta assim a eficiência de extração, quando comparado a adição de um volume maior de solvente em uma única etapa (Lanças, 2004).

Desse modo, para a eluição dos analitos na última etapa do procedimento de extração, selecionou-se o modo de eluição que promovesse um acúmulo de área de pico cromatográfico superior a 95%, ou seja, o modo em etapas com volume de 5,0 mL em 5 adições de 1,0 mL cada. Assim, o fator de enriquecimento foi de 30 vezes.

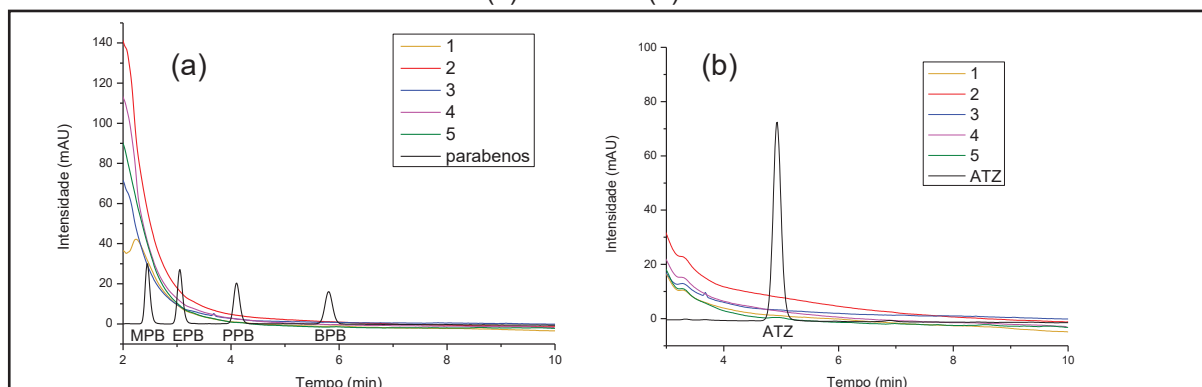
Vale ressaltar que cerca de 3% dos analitos ainda permanecem na fase extratora, sendo necessário uma etapa de limpeza entre ensaios que façam a reutilização da fase extratora.

4.8 ENSAIO EM URINA HUMANA

Os cromatogramas obtidos, pós extração, das amostras doadas pelos 5 voluntários, assim como, os cromatogramas referentes a injeção dos padrões dos parabenos e PI na

concentração de $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, estão representados na FIGURA 27, onde foram monitorados os comprimentos de onda dos analitos (a) 254 nm e do PI (b) 222 nm.

FIGURA 27 - CROMATOGRAMAS REFERENTES À EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DOS PARABENOS UTILIZANDO URINA HUMANA, COM COMPRIMENTOS DE ONDA MONITORADOS DE (a) 254 nm E (b) 222 nm.

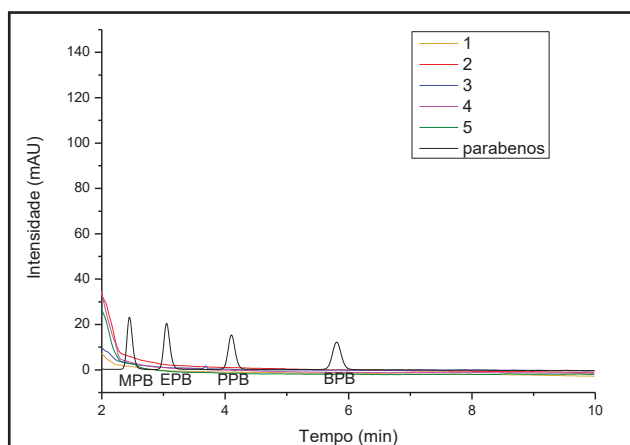


FONTE: A autora (2022)

Conforme observado na FIGURA 27b as urinas humanas avaliadas não apresentaram interferentes no tempo de retenção referente ao PI. Já em relação aos parabens, na FIGURA 27a, nota-se que todas as amostras apresentaram interferência para o MPB e EPB no comprimento de onda monitorado de 254 nm, contudo, é possível o monitoramento do PPB e BPB no comprimento de onda de máxima absorção, uma vez que não foi observada interferência significativa em relação a esses analitos.

Assim, para que fosse possível a utilização das amostras para as etapas posteriores do trabalho, avaliou-se a monitorização do MPB e EPB em outros comprimentos de onda, onde não houvesse absorção para os interferentes, somente para os analitos. Na FIGURA 28 estão representados os cromatogramas obtidos, pós extração, assim como, os cromatogramas referentes a injeção dos padrões dos parabens na concentração de $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, no comprimento de onda de 270 nm.

FIGURA 28 - CROMATOGRAMAS REFERENTES À EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DOS PARABENOS UTILIZANDO URINA HUMANA, COM COMPRIMENTO DE ONDA MONITORADO DE 270 nm.



FONTE: A autora (2022)

Com base na FIGURA 28, para o comprimento de onda de 270 nm é possível quantificar os parabenos mais polares com baixo nível de interferência. Dessa forma, os comprimentos de onda monitorados, nas etapas posteriores desse trabalho, estão apresentados na TABELA 23.

TABELA 23 - COMPRIMENTOS DE ONDA MONITORADOS PARA OS PARABENOS E PI.

Composto	Comprimento de onda (nm)
MPB	270
EPB	270
PPB	254
BPB	254
ATZ	222

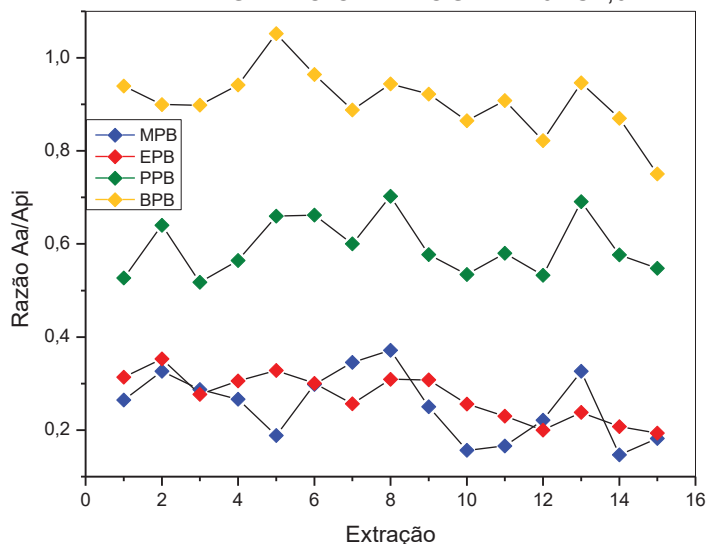
Os extratos finais, obtidos após a etapa de eluição, das amostras provenientes dos voluntários com idade acima de 40 anos, apresentaram uma coloração mais turva em relação aos demais, além de uma maior intensidade dos picos interferentes. Assim, optou-se por preparar um *pool* com as amostras 1 e 3, oriundas dos doadores mais jovens, que apresentaram um extrato final com menor quantidade de sal, e esse *pool* foi utilizado nas etapas posteriores deste trabalho.

4.9 REUTILIZAÇÃO DA FASE EXTRATORA

Utilizando-se um único hidrogel, foram realizadas 15 extrações sucessivas, executadas em dois dias, entre os quais, o hidrogel juntamente com o *holder*, ficaram submersos em água ultrapura a 4 °C, de modo a garantir que o material se mantivesse intumescido. A fase extratora apresentou estabilidade física e mecânica, já que permaneceu intacta e não apresentou danos, mesmo sendo exposta, ao vácuo, a água, solvente orgânico

(MeOH) e amostra biológica em pH 3,0, durante as extrações, além do armazenamento sob refrigeração. Os resultados obtidos para esse ensaio estão representados na FIGURA 29.

FIGURA 29 - RAZÕES A_a/A_{PI} DAS 15 EXTRAÇÕES SUBSEQUENTES PARA O MPB, EPB, PPB E BPB EMPREGANDO O HIDROGEL P20PC2,0.



FONTE: A autora (2022)

Conforme observado no gráfico da FIGURA 29, a dispersão aleatória dos dados indicou não haver presença de efeito memória, ou seja, a etapa de limpeza e acondicionamento da fase sorvente se mostrou eficiente, possibilitando a reutilização.

Os valores de RSD obtidos para as extrações foram de 29,0%, 18,4%, 10,4% e 7,0% para o MPB, EPB, PPB e BPB, respectivamente. Conforme descrito anteriormente, uma menor vazão de percolação da amostra pode acarretar no efeito negativo de a própria matriz da amostra promover a dessorção dos analitos menos apolares, além do fato da fase extratora ter maior afinidade com compostos mais apolares, explicando assim os maiores valores de RSD para os compostos MPB e EPB quando comparados ao PPB e BPB. Entretanto, foi possível a realização de 15 extrações com valores de RSD < 20% para mais de 75% dos compostos estudados.

O principal objetivo no desenvolvimento de novas fases extradoras é suprir as desvantagens apresentadas pelas fases extradoras comerciais, que apresentam alto custo e são utilizadas uma única vez (Nováková et al. 2009). Desse modo, apesar da necessidade de estudos mais criteriosos a respeito da síntese e processos de interação, a ausência de efeito memória e estabilidade do hidrogel tem apresentado resultado positivo quanto a reutilização do mesmo, podendo ser futuramente avaliado para um número ainda maior de extrações, principalmente por não ter sido constatada uma tendência de diminuição no desempenho de extração até quinze vezes de uso.

Dessa forma, um material que supre as desvantagens supracitadas, podendo ser reutilizado e conseqüentemente apresentando um menor custo, além de contribuir com os princípios da química verde, já que o reuso do material acarreta em uma menor geração de resíduos.

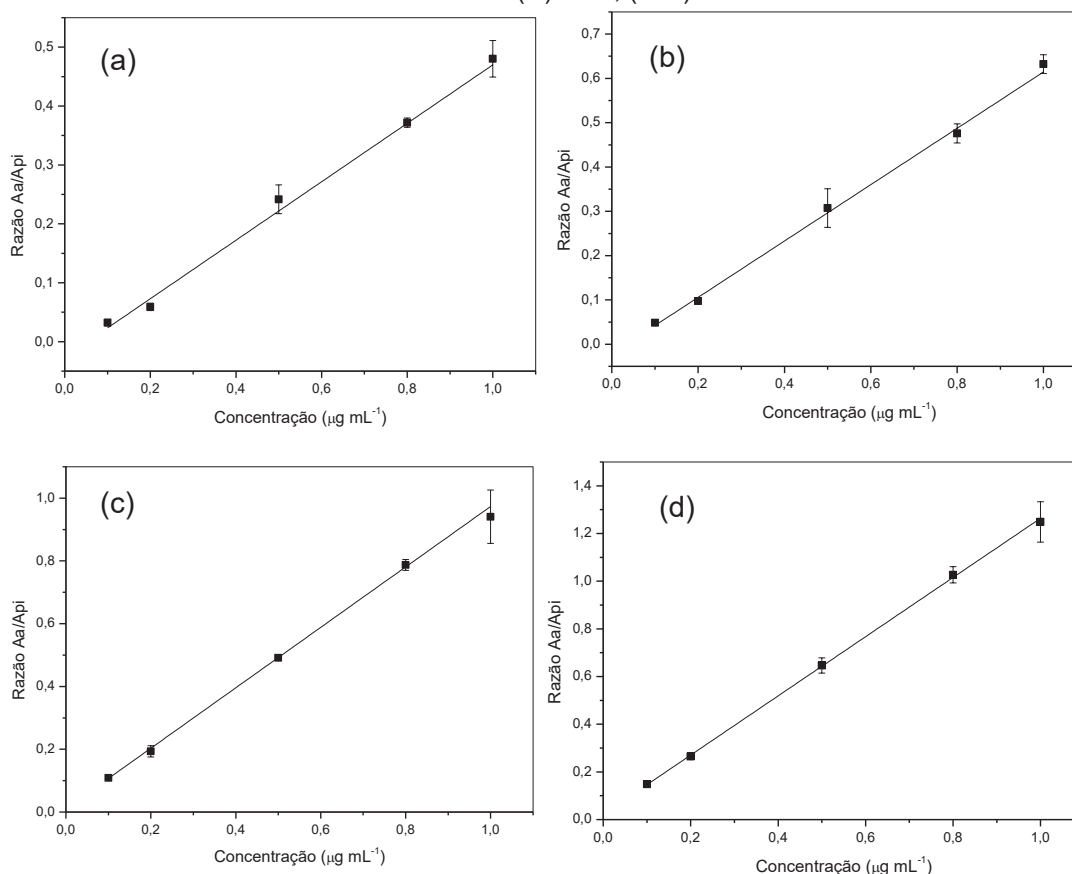
4.10 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE MÉRITO

4.10.1 Linearidade, LLOD e LOD

A linearidade do método foi avaliada para a faixa de concentração de 0,1 a 1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de acordo com os trabalhos desenvolvidos por Rigkos et al. (2021) e Tartaglia et al. (2019), onde os autores utilizaram a técnica de LC-DAD para a determinação de parabenos em amostras de urina.

Assim, as curvas analíticas extraídas foram obtidas pela extração de amostra de urina humana branco enriquecidas com analitos e PI. A FIGURA 30 apresenta as curvas analíticas obtidas para cada um dos analitos.

FIGURA 30 - CURVAS ANALÍTICAS EXTRAÍDAS OBTIDAS PARA O (A) MPB, (B) EPB, (C) PPB E (D) BPB, (n=3).



FONTE: A autora (2022)

A TABELA 24 apresenta a faixa linear de trabalho, os dados da regressão linear e os valores de LLOQ para cada analito.

TABELA 24 - PARÂMETRO DE LINEARIDADE E LLOQ.

Analito	Faixa Linear ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Equação da reta ($y = ax + b$)	R^2	LLOQ		
				Conc. ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	RSD (%)	Exatidão (%)
MPB	0,1 – 1,0	$y = 0,49627 x - 0,02629$	0,9926	0,1	17,4	118,2
EPB	0,1 – 1,0	$y = 0,63600 x - 0,02141$	0,9951	0,1	12,1	109,8
PPB	0,1 – 1,0	$y = 0,96275 x + 0,01072$	0,9996	0,1	6,4	101,7
BPB	0,1 – 1,0	$y = 1,24171 x + 0,02220$	0,9992	0,1	3,8	101,3

R^2 : coeficiente de determinação; a: coeficiente angular e b: coeficiente linear.

Com base na ANOVA, com nível de confiança de 95%, as regressões lineares foram significativas para os 4 analitos, uma vez que o valor de F_{cal} , foi superior ao F_{tab} , além disso, a distribuição dos resíduos foi aleatória.

De acordo com os guias de validação das agências regulatórias, ANVISA e FDA, a linearidade deve apresentar um coeficiente de determinação (R^2) acima de 0,99. Já o LLOQ é determinado como a menor concentração da curva analítica que apresente valores de RSD inferiores a 20% e exatidão entre 80 – 120%. Com base na TABELA 24, constatou-se que os quatro analitos apresentaram linearidade adequada para faixa de concentração avaliada. Além da obtenção de um LLOQ com a menor concentração mensurada. Vale ressaltar que com a diminuição da polaridade, há também a diminuição do valor de RSD para o LLOQ, resultado condizente com o fato de que analitos de menor polaridade sofrem menos o efeito negativo da dessorção dos analitos da fase sorvente pela própria matriz, além da maior interação com a fase extratora.

Já o LOD obtido foi de 0,034, 0,020, 0,007, e 0,005 $\mu\text{g mL}^{-1}$, para o MPB, EPB, PPB e BPB, respectivamente. A TABELA 25 apresenta um comparativo entre os trabalhos publicados na literatura e o método desenvolvido.

TABELA 25 – COMPARAÇÃO DE MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE MPB, EPB, PPB E BPB EM URINA.

Preparo de amostra	Técnica analítica	Pré-tratamento urina	LLOQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Referências
DLLME	cLC-UV	Hidrólise enzimática	0,023 – 0,036	0,007 – 0,011	(Carrasco-Correa et al. 2015)
FPSE	LC-DAD	-	0,01	0,003	(Rigkos et al. 2021)
FPSE	LC-DAD	-	0,1	0,03	(Tartaglia et al. 2019)
MEPS	LC-MS/MS	Hidrólise enzimática	0,00005 -0,00033	0,0001	(Silveira et al. 2020)
SPE	UPLC-MS/MS	Hidrólise enzimática	0,0003 – 0,001	0,00009 - 0,00037	(Dewalque et al. 2014)
SPE	LC-DAD	-	0,1	0,005 – 0,034	Presente trabalho

DLLME: microextração líquido-líquido dispersiva; cLC: cromatografia líquida capilar; UV: detector ultravioleta; FPSE: fabric phase sorptive extraction; DAD: detector de arranjo de diodo; MEPS: microextração em sorvente empacotado; LC: cromatografia líquida; MS/MS: espectrometria de massas sequencial; SPE: extração em fase sólida e UPLC: cromatografia líquida de ultra eficiência.

Os valores determinados de LLOQ e LOD para os parabenos estão de acordo com o encontrado na literatura utilizando técnicas analíticas similares. Também se observa que trabalhos que apresentam menores valores desses parâmetros utilizaram detectores mais sensíveis, como é o caso do espectrômetro de massas, entretanto, acarretam em um maior custo.

Portanto, o método desenvolvido apresenta as vantagens de não requerer o pré-tratamento da amostra, o que diminui o número de etapas do procedimento, além de utilizar equipamentos de menor custo, tornando assim o método mais barato e menos moroso.

4.10.2 Precisão e exatidão

Os dados de precisão e exatidão avaliados a partir da obtenção da curva analítica, estão apresentados na TABELA 26.

TABELA 26 - PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS PARA CADA CONCENTRAÇÃO DA CURVA ANALÍTICA (n=3).

Analito	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	RSD (%)	Exatidão (%)
MPB	0,1	17,4	118,2
	0,2	10,7	89,0
	0,5	10,1	108,0
	0,8	2,1	100,3
	1,0	6,4	102,1
EPB	0,1	12,1	109,8
	0,2	6,5	93,6
	0,5	14,2	103,3
	0,8	4,5	97,7
	1,0	3,4	102,8
PPB	0,1	6,4	101,7
	0,2	9,2	94,9
	0,5	1,5	99,8
	0,8	2,2	100,8
	1,0	9,0	96,6
BPB	0,1	3,8	101,3
	0,2	3,9	97,5
	0,5	5,0	99,5
	0,8	3,3	101,1
	1,0	6,8	98,8

Conforme preconizam os guias de validação de metodologia analítica, os valores obtidos de RSD foram inferiores a 20% para o LLOQ e 15% para os demais pontos, para os quatro analitos. Assim como, a exatidão para a menor concentração da curva analítica e demais pontos, está situada na faixa de 80 – 120% e 85 – 115%, nessa ordem.

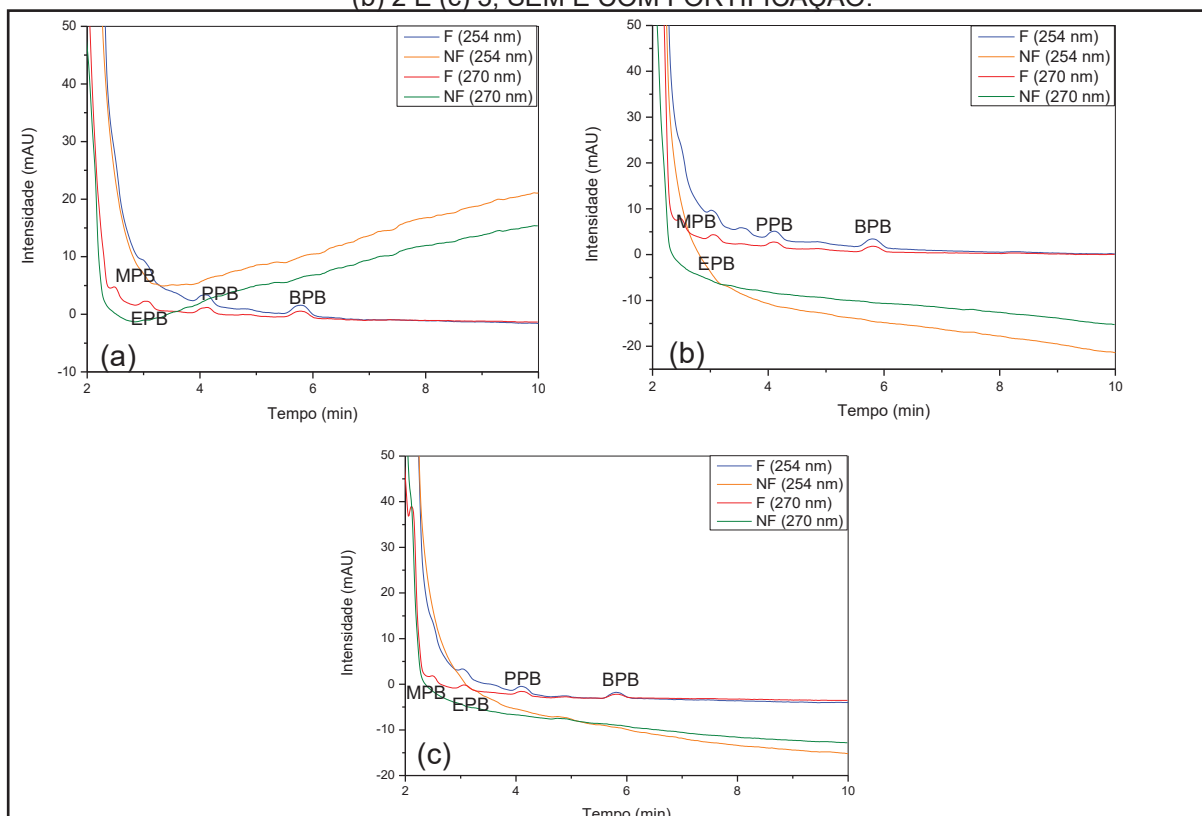
Assim, o método analítico desenvolvido apresenta precisão e exatidão satisfatória para os quatro analitos.

Além disso, como foram utilizados discos de hidrogel diferentes para cada curva analítica, utilizando-se dispersões de PVOH e pectina preparadas em dias distintos, é possível afirmar com base nos valores de RSD que o material desenvolvido apresenta reprodutibilidade satisfatória, contrariamente as fases comercialmente disponíveis para SPE, que apresentam uma baixa reprodutibilidade entre lotes (Nováková et al. 2009).

4.11 APLICAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA DESENVOLVIDA

Nas amostras onde ocorreu a fortificação apenas com PI, foi avaliado o valor de concentração encontrados para os analitos. Já nas amostras fortificadas com os parabenos e PI, foi calculada a média da concentração encontrada, o valor de RSD em relação a concentração adicionada e a recuperação. Os valores estão apresentados na TABELA 27 enquanto os cromatogramas das amostras com e sem fortificação estão apresentados na FIGURA 31.

FIGURA 31 - CROMATOGRAMAS REFERENTES A EXTRAÇÃO DAS AMOSTRAS DE URINA (a)1, (b) 2 E (c) 3, SEM E COM FORTIFICAÇÃO.



FONTE: A autora (2022)

F: fortificada com analitos e PI e NF: fortificada apenas com PI.

TABELA 27 - RESULTADOS DA APLICAÇÃO DA METODOLOGIA DESENVOLVIDA (n=3).

ANALITOS	AMOSTRA		
	1	2	3
MPB			
Concentração na amostra	< LOD	< LOD	< LOD
Concentração adicionada	0,50 µg mL ⁻¹	0,50 µg mL ⁻¹	0,50 µg mL ⁻¹
Concentração encontrada	0,40 µg mL ⁻¹	0,44 µg mL ⁻¹	0,53 µg mL ⁻¹
RSD/ %	20,4	36,2	30,1
Recuperação/ %	80,7	88,0	105,6
EPB			
Concentração na amostra	< LOD	< LOD	< LOD
Concentração adicionada	0,50 µg mL ⁻¹	0,50 µg mL ⁻¹	0,50 µg mL ⁻¹
Concentração encontrada	0,48 µg mL ⁻¹	0,50 µg mL ⁻¹	0,54 µg mL ⁻¹
RSD/ %	14,2	15,0	6,6
Recuperação/ %	97,1	100,2	107,2
PPB			
Concentração na amostra	< LOD	< LOD	< LOD
Concentração adicionada	0,50 µg mL ⁻¹	0,50 µg mL ⁻¹	0,50 µg mL ⁻¹
Concentração encontrada	0,51 µg mL ⁻¹	0,56 µg mL ⁻¹	0,51 µg mL ⁻¹
RSD/ %	10,8	13,6	10,0
Recuperação/ %	102,0	112,9	102,0
BPB			
Concentração na amostra	< LOD	< LOD	< LOD
Concentração adicionada	0,50 µg mL ⁻¹	0,50 µg mL ⁻¹	0,50 µg mL ⁻¹
Concentração encontrada	0,52 µg mL ⁻¹	0,59 µg mL ⁻¹	0,55 µg mL ⁻¹
RSD/ %	10,8	14,6	18,2
Recuperação/ %	105,2	117,9	110,5

Conforme apresentado na FIGURA 31, nas três amostras de urina humana analisadas os analitos não foram detectados. Desse modo, foi realizada a fortificação das amostras e a razão obtida de A_a/A_{PI} obtidas para cada analito foram substituídas nas equações da curva analítica determinadas para cada um deles, fornecendo assim o valor de concentração determinada.

Para o EPB e PPB os valores de precisão foram satisfatórios para as três amostras, ou seja, abaixo dos 15%, assim como, a exatidão expressa em termos de recuperação, com valores entre 85 e 115%. Já o BPB apresentou resultados aceitáveis de recuperação para as três amostras e precisão para as amostras 1 e 2.

Já o MPB foi o analito que apresentou os resultados mais discrepantes, com valores de RSD acima de 15% e recuperação abaixo dos 85%. Como explanado anteriormente, o MPB apresenta um $\text{Log } k_{o/w}$ de 1,96, apresentando caráter muito mais polar que os demais analitos avaliados. Assim, pode estar havendo uma competição de interação entre o analito-fase extratora e analito-matriz, justificando assim a baixa precisão, além disso, pode estar ocorrendo um maior efeito matriz para esse composto nas amostras avaliadas. Como as composições de urina humana variam muito entre os indivíduos, o método não apresentou resultado satisfatório para a determinação de MPB nessas amostras, o que não significa que o método não poderá ser aplicado para a determinação desse analito em outras amostras, já que o mesmo apresentou linearidade, precisão e exatidão aceitáveis.

Dessa maneira, conclui-se que o método desenvolvido para a determinação de parabenos em amostras de urina pode ser satisfatoriamente aplicado, sendo que para parabenos com maior valor de $\text{Log } k_{o/w}$ há aumento na precisão e exatidão.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foi desenvolvida uma fase sorvente, para aplicação em SPE, baseada em hidrogel. Essa fase foi utilizada para a extração de desreguladores endócrinos em amostras de urina humana e posterior determinação por LC-DAD. Para tal, foi desenvolvido um método cromatográfico, que promoveu uma separação satisfatória dos quatro analitos (MPB, EPB, PPB e BPB) em apenas 10 minutos.

Já em relação a fase extratora, foram avaliados alguns parâmetros em relação a sua composição, como, as diferentes proporções entre os polímeros constituintes e as diferentes concentrações das dispersões utilizadas. Todos os hidrogéis avaliados foram capazes de promover a extração dos quatro analitos, mesmo com a diferença de polaridade entre eles, uma vez que o valor de $\text{Log } k_{o/w}$ encontra-se na faixa de 1,96 - 3,57, evidenciando que se comportam como fases de caráter anfífilico, e apresentam um custo muito menor em comparação as fases comerciais, como HLB, por exemplo.

Além disso, o hidrogel selecionado é sintetizado a partir de polímeros de origem natural, como a pectina, apresentando a vantagem de ser biodegradável, e também de polímeros de origem sintética como PVOH, que são capazes de conferir resistência física ao material. Ambos os polímeros exibem as vantagens de serem atóxicos e também de apresentarem um baixo custo.

Todavia, um dos principais objetivos no desenvolvimento de novos materiais sorventes é que os mesmos possam ser reutilizados. O hidrogel avaliado pôde ser reutilizado por no mínimo 15 vezes, o que acarreta em redução do custo do material e também coopera com a química verde para uma menor geração de resíduos.

Assim sendo, o método desenvolvido, empregando a nova fase sorvente, apresentou linearidade satisfatória, alcançando LLOQ de $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ para os quatro compostos e LOD com valores entre $0,034 - 0,005 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Ademais, a aplicação do material em amostra biológica apresentou precisão, inferior a 15%, e exatidão, entre 85 – 115%. Esses resultados demonstram que além da repetibilidade, o hidrogel também apresenta reprodutibilidade apropriada.

Em suma, foi possível o desenvolvimento de uma metodologia analítica que permitiu a determinação de parabenos em matriz biológica, como a urina. Contudo, vale ressaltar a necessidade de mais estudos em relação aos processos de interação entre o hidrogel e os analitos, além do emprego desse mesmo material para outras classes de compostos e diferentes matrizes.

REFERÊNCIAS

ADENUGA, A. A.; AYINUOLA, O.; ADEJUYIGBE, E. A.; OGUNFOWOKAN, A. O. Biomonitoring of phthalate esters in breast-milk and urine samples as biomarkers for neonates' exposure, using modified quechers method with agricultural biochar as dispersive solid-phase extraction absorbent. **Microchemical Journal**, v. 152, p. 104277, 2020.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada - **RDC nº 166**, de 24 de julho de 2017. Disponível em <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2017/rdc0166_24_07_2017.pdf>. Acesso em 22 de agosto de 2022.

AHMED, E. M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. **Journal of Advanced Research**, v. 6, n. 2, p. 105–121, 2015.

AKER, A. M.; WATKINS, D. J.; JOHNS, L. E.; et al. Phenols and parabens in relation to reproductive and thyroid hormones in pregnant women. **Environmental Research**, v. 151, p. 30–37, 2016.

ALAMPANOS, V.; KABIR, A.; FURTON, K. G.; SAMANIDOU, V. Rapid exposure monitoring of six bisphenols and diethylstilbestrol in human urine using fabric phase sorptive extraction followed by high performance liquid chromatography – photodiode array analysis. **Journal of Chromatography B**, v. 1177, p. 122760, 2021.

ALAMPANOS, VASILEIOS; KABIR, A.; FURTON, K.; SAMANIDOU, V. Magnet integrated fabric phase sorptive extraction of selected endocrine disrupting chemicals from human urine followed by high-performance liquid chromatography – photodiode array analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1654, p. 462459, 2021.

ALEMÁN, J. V.; CHADWICK, A. V.; HE, J.; 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.

AN, J.; DONG, Z.; ZHANG, W.; et al. Development of a simple nanofiber-based solid phase extraction procedure coupled with high performance liquid chromatography analysis for the quantification of eight sedative-hypnotic drugs in human urine samples. **Microchemical Journal**, v. 168, p. 106475, 2021.

ANDRADE-EIROA, A.; CANLE, M.; LEROY-CANCELLIERI, V.; CERDÀ, V. Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review (Part I). **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 80, p. 641 - 654, 2016.

ATTARAN, A. M. Fabrication and Characterization of Poly Vinyl Alcohol/ Poly Vinyl Pyrrolidone/MnTiO₃ Nanocomposite Membranes for PEM Fuel Cells. **Iranica Journal of Energy & Environment**, v. 4, n. 2, 2013.

AZZOUZ, A.; RASCÓN, A. J.; BALLESTEROS, E. 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.

BARBOSA, M. O.; RIBEIRO, R. S.; RIBEIRO, A. R. L.; PEREIRA, M. F. R.; SILVA, A. M. T. Solid-phase extraction cartridges with multi-walled carbon nanotubes and effect of the oxygen functionalities on the recovery efficiency of organic micropollutants. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 22304, 2020.

BARRIONUEVO, W. R.; LANÇAS, F. M. Extração em fase sólida (SPE) e micro extração em fase sólida (SPME) de piretróides em água. **Química Nova**, v. 24, p. 172 - 175, 2001.

BASHEER, C., JAYARAMAN, A., KEE, M. K., 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, n. 2, p. 137-143, 2005.

BAYATLOO, M. R.; NOJAVAN, S. Rapid and simple magnetic solid-phase extraction of bisphenol A from bottled water, baby bottle, and urine samples using green magnetic hydroxyapatite/ β -cyclodextrin polymer nanocomposite. **Microchemical Journal**, v. 175, p. 107180, 2022.

BERGER, J.; REIST, M.; MAYER, J. M.; et al. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 57, n. 1, p. 19–34, 2004.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e conseqüências. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 651–666, 2007.

BOCATO, M. Z.; CESILA, C. A.; LATARO, B. F.; et al. A fast-multiclass method for the determination of 21 endocrine disruptors in human urine by using vortex-assisted dispersive liquid-liquid microextraction (VADLLME) and LC-MS/MS. **Environmental Research**, v. 189, p. 109883, 2020.

BOLTO, B.; TRAN, T.; HOANG, M.; XIE, Z. Crosslinked poly(vinyl alcohol) membranes. **Progress in Polymer Science**, v. 34, n. 9, p. 969–981, 2009.

BROWN, S. D.; TAULER, R.; WALCZAK, B.; *Comprehensive Chemometrics: Chemical and Biochemical Data Analysis*, vol. 1, 1st ed., **Elsevier: Amsterdam**, 2009.

BRUDNO, Y.; MOONEY, D. J. On-demand drug delivery from local depots. **Journal of Controlled Release**, v. 219, p. 8–17, 2015.

BRUNS, R. E.; SCARMINIO, I. S.; NETO, B. B.; *Statistical Design – Chemometrics*, 1st ed., **Elsevier Science: Amsterdam**, 2006.

CALAFAT, A. M.; WEUVE, J.; YE, X.; et al. Exposure to Bisphenol A and Other Phenols in Neonatal Intensive Care Unit Premature Infants. **Environmental Health Perspectives**, v. 117, n. 4, p. 639–644, 2009.

CALDAS, S. S.; GONÇALVES, F. F.; PRIMEL, E. G.; et al. Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 34, n. 9, p. 1604–1617, 2011.

CANTERI, M. H. G.; MORENO, L.; WOSIACKI, G.; SCHEER, A. DE P. Pectina: da matéria-prima ao produto final. **Polímeros**, v. 22, n. 2, p. 149–157, 2012.

CARLOS, C. W.; RODRIGUES, F. H. A.; MARCUS, M. V.; 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.

CARRASCO-CORREA, E. J.; VELA-SORIA, F.; BALLESTEROS, O.; RAMIS-RAMOS, G.; HERRERO-MARTÍNEZ, J. M. Sensitive determination of parabens in human urine and serum using methacrylate monoliths and reversed-phase capillary liquid chromatography–mass

spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1379, p. 65–73, 2015.

CASTILHOS, N. D. B.; SAMPAIO, N. M. F. M.; DA SILVA, B. C.; 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.

CHEN, B.; HUANG, Y.; HE, M.; HU, B. 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.

CUI, L.; JIA, J.; GUO, Y.; LIU, Y.; ZHU, P. Preparation and characterization of IPN hydrogels composed of chitosan and gelatin cross-linked by genipin. **Carbohydrate Polymers**, v. 99, p. 31–38, 2014.

DA SILVA, B. C.; ZANUTTO, A.; PIETROBELLI, J. M. Biosorption of reactive yellow dye by malt bagasse. **Adsorption Science & Technology**, v. 37, n. 3–4, p. 236–259, 2019.

DE OLIVEIRA, M. L.; ROCHA, B. A.; SOUZA, V. C. DE O.; BARBOSA, F. Determination of 17 potential endocrine-disrupting chemicals in human saliva by dispersive liquid-liquid microextraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 196, p. 271–276, 2019.

DEWALQUE, L.; PIRARD, C.; DUBOIS, N.; CHARLIER, C. Simultaneous determination of some phthalate metabolites, parabens and benzophenone-3 in urine by ultra high pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 949–950, p. 37–47, 2014.

DONATI, I.; HOLTAN, S.; MØRCH, Y. A.; et al. New Hypothesis on the Role of Alternating Sequences in Calcium–Alginate Gels. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 2, p. 1031–1040, 2005.

DRAGET, K. I.; SKJÅK-BRÆK, G.; SMIDSRØD, O. Alginate based new materials. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 21, n. 1–2, p. 47–55, 1997.

EL-HUSSEINY, H. M.; MADY, E. A.; HAMABE, L.; et al. Smart/stimuli-responsive hydrogels: Cutting-edge platforms for tissue engineering and other biomedical applications. **Materials Today Bio**, v. 13, p. 100186, 2022.

FAN, L.; TAN, C.; WANG, L.; et al. Preparation, characterization and the effect of carboxymethylated chitosan-cellulose derivatives hydrogels on wound healing. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 128, n. 5, p. 2789–2796, 2013.

FONTANALS, N.; MARCÉ, R. M.; BORRULL, F. New hydrophilic materials for solid-phase extraction. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, 2005.

Food and Drug Administration (FDA). Bioanalytical Method Validation - Guidance for Industry, may of 2018. Disponível em <Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry (fda.gov)> Acesso em 22 de agosto de 2022.

GAAZ, T.; SULONG, A.; AKHTAR, M.; et al. Properties and Applications of Polyvinyl Alcohol, Halloysite Nanotubes and Their Nanocomposites. **Molecules**, v. 20, n. 12, p. 22833–22847, 2015.

GHAMAT, S. N.; TALEBPOUR, Z.; MEHDI, A. Click reactions: Recent trends in preparation of new sorbents and stationary phases for extraction and chromatographic applications. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 118, p. 556–573, 2019.

GONZÁLEZ-MARTÍN, R.; PACHECO-FERNÁNDEZ, I.; MAITI, B.; 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, 2020.

GRZEŚKOWIAK, T.; CZARCZYŃSKA-GOŚLIŃSKA, B.; ZGOŁA-GRZEŚKOWIAK, A. Current approaches in sample preparation for trace analysis of selected endocrine-disrupting compounds: Focus on polychlorinated biphenyls, alkylphenols, and parabens. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 75, p. 209–226, 2016.

GUO, Y.; LU, H.; ZHAO, F.; et al. Biomass-Derived Hybrid Hydrogel Evaporators for Cost-Effective Solar Water Purification. **Advanced Materials**, v. 32, n. 11, p. 1907061, 2020.

GUZELLA, C. S.; SOUTO, D. E. P.; SILVA, B. J. G. Alginate-based hydrogel fiber as a restricted access material for microextraction of drugs in biological samples. **Carbohydrate Polymers**, v. 294, p. 119810, 2022.

HALLA, N.; FERNANDES, I.; HELENO, S.; et al. Cosmetics Preservation: A Review on Present Strategies. **Molecules**, v. 23, n. 7, p. 1571, 2018.

HASSAN, C. M.; PEPPAS, N. A. Structure and Applications of Poly(vinyl alcohol) Hydrogels Produced by Conventional Crosslinking or by Freezing/Thawing Methods. **Biopolymers · PVA Hydrogels, Anionic Polymerisation Nanocomposites**. p.37–65, 2000. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

HIDROGEL. Disponível em < <https://www.ebay.com/itm/262303858115>>. Acesso em 01 de fevereiro de 2022.

HONDA, M.; ROBINSON, M.; KANNAN, K. Parabens in human urine from several Asian countries, Greece, and the United States. **Chemosphere**, v. 201, p. 13–19, 2018.

HUANG, C.; YANG, J.; MA, J.; et al. An efficient mixed-mode strong anion-exchange adsorbent based on functionalized polyethyleneimine for simultaneous solid phase extraction and purification of bisphenol analogues and monoalkyl phthalate esters in human urine. **Microchemical Journal**, v. 180, p. 107536, 2022.

HUANG, Y.; WANG, D.; LIU, W.; et al. Rapid screening of rhodamine B in food by hydrogel solid-phase extraction coupled with direct fluorescence detection. **Food Chemistry**, v. 316, p. 126378, 2020.]

JARDIM, I. C. S. F. Solid phase extraction: theoretical basics and new strategies for solid phase preparation. **Scientia Chromatographica**, v. 2, p. 13 - 25, 2010.

JUSKO, T. A.; VAN DEN DRIES, M. A.; PRONK, A.; et al. Organophosphate Pesticide Metabolite Concentrations in Urine during Pregnancy and Offspring Nonverbal IQ at Age 6 Years. **Environmental Health Perspectives**, v. 127, n. 1, p. 017007, 2019.

KABIR, E. R.; RAHMAN, M. S.; RAHMAN, I. A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 40, n. 1, p. 241–258, 2015.

KAHN, L. G.; PHILIPPAT, C.; NAKAYAMA, S. F.; SLAMA, R.; TRASANDE, L. Endocrine-disrupting chemicals: implications for human health. **The Lancet Diabetes & Endocrinology**, v. 8, n. 8, p. 703–718, 2020.

KAMOUN, E. A.; CHEN, X.; MOHY ELDIN, M. S.; KENAWY, E.-R. S. Crosslinked poly(vinyl

alcohol) hydrogels for wound dressing applications: A review of remarkably blended polymers. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 8, n. 1, p. 1–14, 2015.

KAUR, RAMANDEEP; KAUR, RIPNEEL; RANI, S.; et al. Application of fabric phase sorptive extraction with gas chromatography and mass spectrometry for the determination of organophosphorus pesticides in selected vegetable samples. **Journal of Separation Science**, v. 42, n. 4, p. 862 - 870, 2019.

KOEPPE, E. S.; FERGUSON, K. K.; COLACINO, J. A.; MEEKER, J. D. Relationship between urinary triclosan and paraben concentrations and serum thyroid measures in NHANES 2007–2008. **Science of The Total Environment**, v. 445–446, p. 299–305, 2013.

KUKLENYIK, Z.; PANUWET, P.; JAYATILAKA, N. K.; PIRKLE, J. L.; CALAFAT, A. M. Two-dimensional high performance liquid chromatography separation and tandem mass spectrometry detection of atrazine and its metabolic and hydrolysis products in urine. **Journal of Chromatography B**, v. 901, p. 1–8, 2012.

LABBOX . Disponível em <<https://labbox.eu/product/spe-solid-phase-extraction-cartridges/>>. Acesso em 22 de agosto de 2022.

LANÇAS, F. M. Extração em Fase Sólida (SPE). **RIMa**, São Carlos, 2004.

LERRO, C. C.; KOUTROS, S.; ANDREOTTI, G.; et al. Organophosphate insecticide use and cancer incidence among spouses of pesticide applicators in the Agricultural Health Study. **Occupational and Environmental Medicine**, v. 72, n. 10, p. 736–744, 2015.

LI, A. J.; XUE, J.; LIN, S.; et al. Urinary concentrations of environmental phenols and their association with type 2 diabetes in a population in Jeddah, Saudi Arabia. **Environmental Research**, v. 166, p. 544–552, 2018.

LOKHNAUTH, J. K.; SNOW, N. H. Determination of Parabens in Pharmaceutical Formulations by Solid-Phase Microextraction-Ion Mobility Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 18, p. 5938–5946, 2005.

LOPES, L. C.; SIMAS-TOSIN, F. F.; CIPRIANI, T. R.; 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.

LU, D.; FENG, C.; WANG, D.; et al. Analysis of twenty phenolic compounds in human urine: hydrochloric acid hydrolysis, solid-phase extraction based on K₂CO₃-treated silica, and gas chromatography tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, n. 14, p. 4131–4141, 2015.

LUNDSTEDT, T.; SEIFERT, E.; ABRAMO, L.; et al. Experimental design and optimization. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 42, n. 1–2, p. 3–40, 1998.

MACIEL, E. V. S.; de Toffoli, A. L.; Neto, E. S.; et al. New materials in sample preparation: Recent advances and future trends. **TrAc Trends in Analytical Chemistry**, v. 119, p. 115633, 2019.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 214–222, 2009.

MANOUCHEHRI, M.; SEIDI, S.; ROUHOLLAHI, A.; NOORMOHAMMADI, H.; SHANEHSAZ, M. 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. 126223, 2020.

MANSUR, H. S.; SADAHIRA, C. M.; SOUZA, A. N.; MANSUR, A. A. P. FTIR spectroscopy characterization of poly (vinyl alcohol) hydrogel with different hydrolysis degree and chemically crosslinked with glutaraldehyde. **Materials Science and Engineering: C**, v. 28, n. 4, p. 539–548, 2008.

MARTÍN-POZO, L.; GÓMEZ-REGALADO, M. DEL C.; MOSCOSO-RUIZ, I.; ZAFRA-GÓMEZ, A. Analytical methods for the determination of endocrine disrupting chemicals in cosmetics and personal care products: A review. **Talanta**, v. 234, p. 122642, 2021.

MIN, J. H.; HERING, J. G. Arsenate sorption by Fe(III)-doped alginate gels. **Water Research**, v. 32, n. 5, p. 1544–1552, 1998.

MISHRA, R. K.; DATT, M.; BANTHIA, A. K. Synthesis and Characterization of Pectin/PVP Hydrogel Membranes for Drug Delivery System. **AAPS PharmSciTech**, v. 9, n. 2, p. 395–403, 2008.

MOHAMMADI, M.; KAMANKESH, M.; HADIAN, Z.; MORTAZAVIAN, A. M.; MOHAMMADI, A.

Determination of Biogenic Amines in Cheese Using Simultaneous Derivatization and Microextraction Method Followed by Gas Chromatography–Mass Spectrometry. **Chromatographia**, v. 80, n. 1, p. 119–126, 2017.

MONTEAGUDO, C.; ROBLES-AGUILERA, V.; SALCEDO-BELLIDO, I.; et al. Dietary exposure to parabens and body mass index in an adolescent Spanish population. **Environmental Research**, v. 201, p. 111548, 2021.

MORADI, M.; SOLEYMANI, J.; JOUYBAN, A. A combination of amino-functionalized fibrous silica (KCC-1-NH₂)/effectively and efficiently oxidized graphene oxide (EEGO) nanocomposite for dispersive solid-phase extraction, pre-concentration and fluorescence determination of total para-cresol in plasm. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 214, p. 114746, 2022.

MUSILE, G.; CENCI, L.; PILETSKA, E.; et al. Development of an in-house mixed-mode solid-phase extraction for the determination of 16 basic drugs in urine by High Performance Liquid Chromatography-Ion Trap Mass Spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 2018.

NETO, B. B., SCARMINIO, I. S., BRUNS, R. E. Como Fazer Experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria. **Bookman Editora**, São Paulo, 2001.

NISHIHAMA, Y.; YOSHINAGA, J.; IIDA, A.; et al. Association between paraben exposure and menstrual cycle in female university students in Japan. **Reproductive Toxicology**, v. 63, p. 107–113, 2016.

NIU, H.; WANG, F.; WEISS, R. A. Hydrophobic/Hydrophilic Triblock Copolymers: Synthesis and Properties of Physically Cross-Linked Hydrogels. **Macromolecules**, v. 48, n. 3, p. 645–654, 2015.

NOORASHIKIN, M. S.; MOHAMAD, S.; ABAS, M. R. Extraction and determination of parabens in water samples using an aqueous two-phase system of ionic liquid and salts with beta-cyclodextrin as the modifier coupled with high performance liquid chromatography. **Anal. Methods**, v. 6, n. 2, p. 419–425, 2014.

NOVAES, C. G.; YAMAKI, R. T.; DE PAULA, V. F.; et al. Optimization of Analytical Methods Using Response Surface Methodology - Part I: Process Variables. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 3, p. 1184–1215, 2017.

NOVÁKOVÁ, L.; VLČKOVÁ, H. A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation. **Analytica Chimica Acta**, v. 656, n. 1–2, p. 8–35, 2009.

NOWAK, K.; RATAJCZAK–WRONA, W.; GÓRSKA, M.; JABŁOŃSKA, E. Parabens and their effects on the endocrine system. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 474, p. 238–251, 2018.

O'MALLEY, E.; O'BRIEN, J. W.; TSCHARKE, B.; THOMAS, K. V.; MUELLER, J. F. Per capita loads of organic UV filters in Australian wastewater influent. **Science of The Total Environment**, v. 662, p. 134–140, 2019.

ORACHORN, N.; KLONKLAEW, P.; BUNKOED, O. A composite of magnetic GOx@MOF incorporated in alginate hydrogel fiber adsorbent for the extraction of phthalate esters. **Microchemical Journal**, v. 171, p. 106827, 2021.

ÖZTÜRK ER, E.; MALTEPE, E.; BAKIRDERE, S. A novel analytical method for the determination of cadmium in sorrel and rocket plants at ultratrace levels: Magnetic chitosan hydrogels based solid phase microextraction-slotted quartz tube-flame atomic absorption spectrophotometry. **Microchemical Journal**, v. 143, p. 393 - 399, 2018.

PAL, K.; BANTHIA, A. K.; MAJUMDAR, D. K. Polymeric Hydrogels: Characterization and Biomedical Applications. **Designed Monomers and Polymers**, v. 12, n. 3, p. 197–220, 2009.

PANUWET, P.; NGUYEN, J. V.; KUKLENYIK, P.; et al. Quantification of atrazine and its metabolites in urine by on-line solid-phase extraction–high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 391, n. 5, p. 1931–1939, 2008.

PASCHOAL, J. A. R.; RATH, S.; AIROLDI, F. P. DA S.; REYES, F. G. R. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1190–1198, 2008.

PASTOR-BELDA, M.; MARÍN-SOLER, L.; CAMPILLO, N.; VIÑAS, P.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. Magnetic carbon nanotube composite for the preconcentration of parabens from water and urine samples using dispersive solid phase extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1564, p. 102–109, 2018.

PENG, Z.; LI, Z.; ZHANG, F.; PENG, X. Preparation and Properties of Polyvinyl Alcohol/Collagen Hydrogel. **Journal of Macromolecular Science, Part B**, v. 51, n. 10, p. 1934–1941, 2012.

PEPPAS, N. Hydrogels in pharmaceutical formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, n. 1, p. 27–46, 2000.

PEPPAS, N. A.; KHARE, A. R. Preparation, structure and diffusional behavior of hydrogels in controlled release. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 11, n. 1 - 2, p. 27 - 46, 1993.

PHILIPS, E. M.; JADDOE, V. W. V.; TRASANDE, L. Effects of early exposure to phthalates and bisphenols on cardiometabolic outcomes in pregnancy and childhood. **Reproductive Toxicology**, v. 68, p. 105–118, 2017.

PŁOTKA-WASYLKA, J.; SZCZEPAŃSKA, N.; DE LA GUARDIA, M.; NAMIEŚNIK, J. Miniaturized solid-phase extraction techniques. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 73, p. 19–38, 2015.

PŁOTKA-WASYLKA, J.; SZCZEPAŃSKA, N.; DE LA GUARDIA, M.; NAMIEŚNIK, J. Modern trends in solid phase extraction: New sorbent media. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 77, p. 23–43, 2016.

PubChem. Disponível em <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em 22 de agosto de 2022.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Quimica Nova**, v. 24, n. 1, p. 68–76, 2001.

RANDALL, D. G.; NAIDOO, V. Urine: The liquid gold of wastewater. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 6, n. 2, p. 2627 - 2635, 2018.

RAZA, N.; KIM, K.-H.; ABDULLAH, M.; RAZA, W.; BROWN, R. J. C. Recent developments in analytical quantitation approaches for parabens in human-associated samples. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 98, p. 161–173, 2018.

RIGKOS, G.; ALAMPANOS, V.; KABIR, A.; et al. An improved fabric-phase sorptive extraction

protocol for the determination of seven parabens in human urine by HPLC–DAD. **Biomedical Chromatography**, v. 35, n. 2, 2021.

ROCHA, B. A.; DE OLIVEIRA, S. R.; DA SILVA, R. M.; et al. An eco-friendly sample preparation procedure base on low-density solvent-based air-assisted liquid-liquid microextraction for the simultaneous determination of 21 potential endocrine disruptors in urine samples by liquid chromatography-tandem mass spectro. **Microchemical Journal**, v. 147, p. 207–214, 2019.

ROSE, C.; PARKER, A.; JEFFERSON, B.; CARTMELL, E. The characterization of feces and urine: A review of the literature to inform advanced treatment technology. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 45, n. 17, p. 1827 - 1879, 2015.

ROZAINI, M. N. H.; SEMAIL, N. FARIHIN; SAAD, B.; et al. Molecularly imprinted silica gel incorporated with agarose polymer matrix as mixed matrix membrane for separation and preconcentration of sulfonamide antibiotics in water samples. **Talanta**, v. 199, p. 522 - 531, 2019.

SAMPAIO, N. M. F. M. Avaliação de hidrogéis como fase extratora para a determinação de hormônios em matrizes aquosas por GC-MS/MS. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal Do Paraná. Paraná, p. 113, 2017.

SAMPAIO, N. M. F. M.; CASTILHOS, N. D. B.; DA SILVA, B. C.; RIEGEL-VIDOTTI, I. C.; SILVA, B. J. G. 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, n. 1, p. 40, 2019.

SELECT SCIENCE. Disponível em <<https://www.selectscience.net/products/3m%20empore%20carbon%2047%20mm%20disk/>>. Acesso em 22 de agosto de 2022.

SHARPE, R. M.; SKAKKEBAEK, N. E. Testicular dysgenesis syndrome: mechanistic insights and potential new downstream effects. **Fertility and Sterility**, v. 89, n. 2, p. 33–38, 2008.

SHEN, X.; LIANG, J.; ZHENG, L.; LV, Q.; WANG, H. Application of dispersive liquid-liquid microextraction for the preconcentration of eight parabens in real samples and their determination by high-performance liquid chromatography. **Journal of Separation Science**,

v. 40, n. 22, p. 4385–4393, 2017.

SILVEIRA, R. S.; ROCHA, B. A.; RODRIGUES, J. L.; BARBOSA, F. Rapid, sensitive and simultaneous determination of 16 endocrine-disrupting chemicals (parabens, benzophenones, bisphenols, and triclocarban) in human urine based on microextraction by packed sorbent combined with liquid chromatography tandem mass spectrom. **Chemosphere**, v. 240, p. 124951, 2020.

SILVESTRE, D. M.; NAOZUKA, J.; CORREIA, P. R. M.; NOMURA, C. S. EXPERIMENT USING GRAINS TO EXPLORE CALIBRATION IN CHEMICAL ANALYSES. **Química Nova**, v. 37, p. 1545 - 1549, 2014.

SMARR, M. M.; SUNDARAM, R.; HONDA, M.; KANNAN, K.; LOUIS, G. M. B. Urinary Concentrations of Parabens and Other Antimicrobial Chemicals and Their Association with Couples' Fecundity. **Environmental Health Perspectives**, v. 125, n. 4, p. 730–736, 2017.

SMITH, R. M. Before the injection - Modern methods of sample preparation for separation techniques. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, n. 1-2, p. 3-27, 2003.

SONG, Y.; HAUSER, R.; HU, F. B.; et al. Urinary concentrations of bisphenol A and phthalate metabolites and weight change: a prospective investigation in US women. **International Journal of Obesity**, v. 38, n. 12, p. 1532–1537, 2014.

SONI, M. G.; CARABIN, I. G.; BURDOCK, G. A. Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens). **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, n. 7, p. 985–1015, 2005.

SORRIBES-SORIANO, A.; ESTEVE-TURRILLAS, F. A.; ARMENTA, S.; HERRERO-MARTÍNEZ, J. M. Dual mixed-mode poly (vinylpyridine-co-methacrylic acid-co-ethylene glycol dimethacrylate)-based sorbent for acidic and basic drug extraction from oral fluid samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 1167, p. 338604, 2021.

SUN, J.; MA, X.; WANG, W.; et al. The Adsorption Behavior of Atrazine in Common Soils in Northeast China. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 103, n. 2, p. 316–322, 2019.

SUN, Q.; ZONG, G.; VALVI, D.; et al. Plasma Concentrations of Perfluoroalkyl Substances

and Risk of Type 2 Diabetes: A Prospective Investigation among U.S. Women. **Environmental Health Perspectives**, v. 126, n. 3, p. 037001, 2018.

TARTAGLIA, A.; KABIR, A.; ULUSOY, S.; et al. FPSE-HPLC-PDA analysis of seven paraben residues in human whole blood, plasma, and urine. **Journal of Chromatography B**, v. 1125, p. 121707, 2019.

TEKIN, Z.; KARLIDAĞ, N. E.; ÖZDOĞAN, N.; KOÇOĞLU, E. S.; BAKIRDERE, S. Dispersive solid phase extraction based on reduced graphene oxide modified Fe₃O₄ nanocomposite for trace determination of parabens in rock, soil, moss, seaweed, feces, and water samples from Horseshoe and Faure Islands. **Journal of Hazardous Materials**, v. 426, p. 127819, 2022.

THAKUR, S.; CHAUDHARY, J.; KUMAR, V.; THAKUR, V. K. Progress in pectin based hydrogels for water purification: Trends and challenges. **Journal of Environmental Management**, v. 238, p. 210–223, 2019.

TOMŠÍKOVÁ, H.; AUFARTOVÁ, J.; SOLICH, P.; et al. High-sensitivity analysis of female-steroid hormones in environmental samples. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 34, p. 35–58, 2012.

TONHI, E.; COLLINS, K. E.; JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H. Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 616–623, 2002.

ULLAH, F.; OTHMAN, M. B. H.; JAVED, F.; AHMAD, Z.; AKIL, H. M. Classification, processing and application of hydrogels: A review. **Materials Science and Engineering: C**, v. 57, p. 414–433, 2015.

VAN OVERMEIRE, I.; VRIJENS, K.; NAWROT, T.; et al. Simultaneous determination of parabens, bisphenols and alkylphenols in human placenta by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 1121, p. 96–102, 2019.

VO, T. T. B.; YOO, Y.-M.; CHOI, K.-C.; JEUNG, E.-B. Potential estrogenic effect(s) of parabens at the prepubertal stage of a postnatal female rat model. **Reproductive Toxicology**, v. 29, n. 3, p. 306–316, 2010.

WANG, J.; YANG, Q.; ZHANG, L.; et al. A hybrid monolithic column based on layered double hydroxide-alginate hydrogel for selective solid phase extraction of lead ions in food and water samples. **Food Chemistry**, v. 257, p. 155-162, 2018.

WANG, L.; DENG, F.; WANG, W.; et al. Construction of Injectable Self-Healing Macroporous Hydrogels via a Template-Free Method for Tissue Engineering and Drug Delivery. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 10, n. 43, p. 36721–36732, 2018.

WEISS, T.; ANGERER, J. Simultaneous determination of various aromatic amines and metabolites of aromatic nitro compounds in urine for low level exposure using gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 778, n. 1-2, p. 179-192, 2002.

XIONG, Z.; ACHAVANANTHADITH, S.; LIAN, S.; et al. A wireless and battery-free wound infection sensor based on DNA hydrogel. **Science Advances**, v. 7, n. 47, 2021.

YANG, Y.; XU, L.; WANG, J.; et al. Recent advances in polysaccharide-based self-healing hydrogels for biomedical applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 283, p. 119161, 2022.

YUVALI, D.; NARIN, I.; SOYLAK, M.; YILMAZ, E. Green synthesis of magnetic carbon nanodot/graphene oxide hybrid material (Fe₃O₄@C-nanodot@GO) for magnetic solid phase extraction of ibuprofen in human blood samples prior to HPLC-DAD determination. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 179, p. 113001, 2020.

ZHANG, J.; XIAO, H.; LI, N.; PING, Q.; ZHANG, Y. Synthesis and characterization of super-absorbent hydrogels based on hemicellulose. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 132, n. 34, 2015.

ZHANG, Q.; ZHI, Y.; BAO, L.; 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. 122817, 2021.

ZHANG, S.; YAO, W.; FU, D.; ZHANG, C.; ZHAO, H. Fabrication of magnetic zinc adeninate metal–organic frameworks for the extraction of benzodiazepines from urine and wastewater. **Journal of Separation Science**, v. 41, n. 8, p. 1864-1870, 2018.

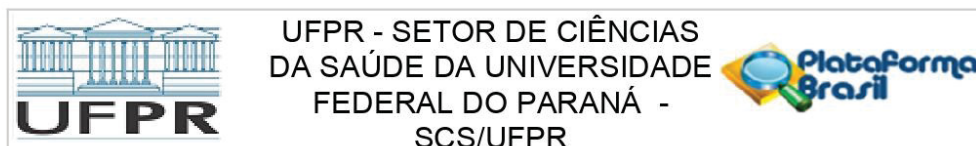
ZHAO, H.; LI, J.; MA, X.; et al. Simultaneous determination of bisphenols, benzophenones and

parabens in human urine by using UHPLC-TQMS. **Chinese Chemical Letters**, v. 29, n. 1, p. 102–106, 2018.

ZHENG, Y.; LI, P.; ZHANG, J.; WANG, A. Study on superabsorbent composite XVI. Synthesis, characterization and swelling behaviors of poly(sodium acrylate)/vermiculite superabsorbent composites. **European Polymer Journal**, v. 43, n. 5, p. 1691–1698, 2007.

ZHOU, X.; KRAMER, J. P.; CALAFAT, A. M.; YE, X. Automated on-line column-switching high performance liquid chromatography isotope dilution tandem mass spectrometry method for the quantification of bisphenol A, bisphenol F, bisphenol S, and 11 other phenols in urine. **Journal of Chromatography B**, v. 944, p. 152–156, 2014.

ANEXOS

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 FASES EXTRATORAS BASEADAS EM GEL PARA DETERMINAÇÃO DE AMINAS AROMÁTICAS EM URINA HUMANA

Pesquisador: BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 46267121.2.0000.0102

Instituição Proponente: Programa de pós graduação em química

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.785.097

Apresentação do Projeto:

O projeto em análise ética tem como título: "DESENVOLVIMENTO DE FASES EXTRATORAS BASEADAS EM GEL PARA DETERMINAÇÃO DE AMINAS AROMÁTICAS EM URINA HUMANA" e está sob responsabilidade do Prof. Dr. Bruno José Gonçalves da Silva do PPG em Química - UFPR

Projeto a ser desenvolvido a partir do momento da aprovação por este comitê até a data de 31 de agosto de 2023.

Como membros da pesquisa tem-se a inclusão de Andressa Marinho e Beatriz Isabella Cestaro.

Objetivo da Pesquisa:

Segundo o pesquisador o objetivo do projeto é:

"Desenvolver dispositivos de extração empregando fases sortivas baseadas em gel para determinação de aminas aromáticas carcinogênicas em urina humana por técnicas cromatográficas."

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

São riscos e benefícios descritos pelo pesquisador:

"Riscos:

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - 1º andar

Bairro: Alto da Glória

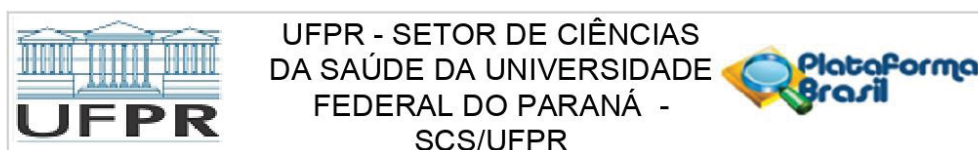
UF: PR

Município: CURITIBA

CEP: 80.060-240

Telefone: (41)3360-7259

E-mail: cometica.saude@ufpr.br



Continuação do Parecer: 4.785.097

Os riscos relacionados à participação nesta pesquisa são mínimos, devido à urina ser coletada de forma não invasiva. Dentre os possíveis riscos podem ser citados um pequeno desconforto e constrangimento relacionados à realização da coleta, assim como o breve contato acidental com a amostra.

Benefícios:

O principal benefício deste projeto é o desenvolvimento de um protocolo analítico para determinação de aminas aromáticas carcinogênicas em urina humana, os quais poderão ser futuramente empregados em estudos de biomonitoramento de uma importante classe de substâncias prejudiciais à saúde humana em decorrência do uso de cigarro. Além disso, os protocolos farão uso, em maioria, de materiais obtidos a partir de fontes renováveis, como casca de laranja e algas, e que são biodegradáveis, representando alternativas com menor impacto ambiental e de baixo custo quando comparadas que outras fases sortivas atualmente utilizadas.

O principal benefício para o voluntário da pesquisa é a satisfação pessoal na contribuição em benefício da ciência e no desenvolvimento de novos materiais extratores e métodos de análise. Houve a inclusão da frase que não haverá benefício direto ao participante"

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O pesquisador descreve que "o método analítico para determinação de aminas aromáticas em urina de voluntários fumantes passivos e ativos será desenvolvido e validado utilizando amostras de urina branco, fornecida por voluntários não fumantes. Nesta etapa serão otimizados os procedimentos de extração empregando dispositivos lab-made baseados em fases sortivas de gel e também serão otimizados os métodos cromatográficos envolvidos na determinação dos compostos selecionados. Após a validação dos métodos analíticos desenvolvidos, os mesmos serão aplicados a amostras de urina de fumantes passivos e ativos.

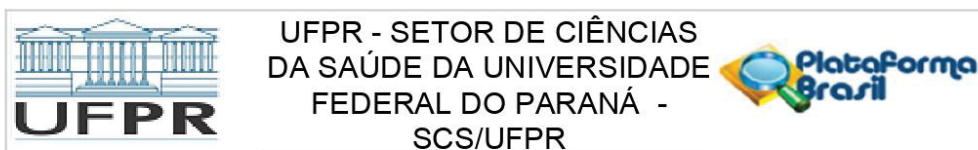
Como critérios de inclusão e exclusão, o pesquisador considera:

"Critério de Inclusão:

Os critérios de inclusão serão distintos para cada grupo de voluntários.

Como critério de inclusão para o grupo dos fumantes ativos, os voluntários devem fazer uso

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: 4.785.097

regular de cigarros num período mínimo de 7 dias anteriores à coleta de urina.

Para o grupo de fumantes passivos, o critério de inclusão é que os voluntários dividam uma residência com fumantes ativos, o qual deve ter feito uso regular de cigarros convencionais num período mínimo de 7 dias anteriores à coleta de urina do fumante passivo. O critério de exclusão para este grupo é que os voluntários tenham feito uso de produtos de tabaco (ex: narguilé, cigarros eletrônicos, etc) num período mínimo de 30 dias anteriores à coleta de urina.

O grupo de não-fumantes, cujas amostras de urina serão empregadas no desenvolvimento dos métodos analíticos e na avaliação preliminar dos parâmetros de mérito dos mesmos, tem como critérios de inclusão a abstinência de qualquer produto de tabaco num período mínimo de 30 dias anteriores à coleta de urina e a não coabitação com fumantes ativos neste mesmo período.

Critério de Exclusão:

Os critérios de exclusão serão distintos para cada grupo de voluntários.

Para o grupo dos fumantes ativos e para o grupo dos não-fumantes não há critérios de exclusão.

O critério de exclusão para o grupo dos fumantes passivos é que os voluntários tenham feito uso de produtos de tabaco (ex: narguilé, cigarros eletrônicos, etc) num período mínimo de 30 dias anteriores à coleta de urina."

Estratégias para o recrutamento

Será estabelecido contato com possíveis voluntários através do e-mail institucional da UFPR do pesquisador principal, convidando alunos matriculados na Graduação e no Programa de Pós-Graduação em Química da UFPR. Este e-mail também será distribuído pelo Departamento de Química para os demais departamentos e programas de pós-graduação. Neste convite será solicitada a participação voluntária de indivíduos pertencentes a três grupos distintos: fumantes ativos, fumantes passivos e não fumantes. Os esclarecimentos serão apresentados na forma de uma conversa simples, solicitando a participação voluntária de indivíduos usuários de cigarro, para fornecer as amostras reais, explicando de maneira simples e concisa os objetivos do estudo e qual será sua participação no projeto de pesquisa. Serão voluntário será apresentado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e explicado os detalhes do projeto, e com a concordância final do participante, será solicitada a assinatura do TCLE.

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: 4.785.097

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram apresentados.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Considerando-se que todos os pontos questionados foram esclarecidos e modificações pertinentes ao TCLE foram realizadas a contento, visando a manutenção do caráter ético do projeto, este parecerista é favorável ao desenvolvimento da pesquisa.

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 Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1745189.pdf	08/06/2021 09:18:44		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura	projeto_CEP_BJGS_02_corrigido.docx	08/06/2021 09:16:31	BRUNO JOSE GONCALVES DA	Aceito

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - 1º andar

Bairro: Alto da Glória

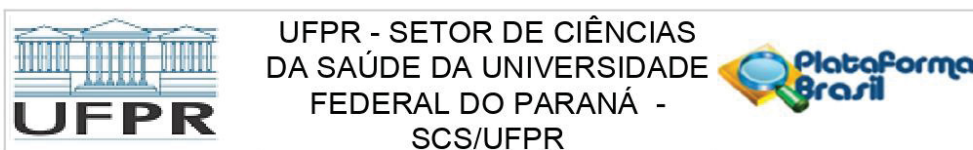
CEP: 80.060-240

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-7259

E-mail: cometica.saude@ufpr.br



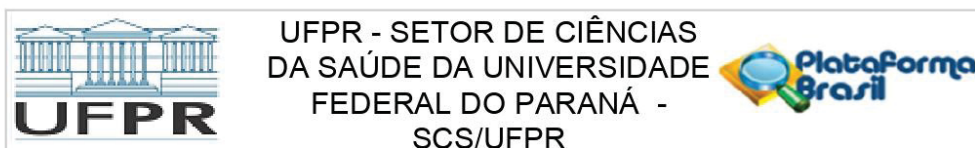
Continuação do Parecer: 4.785.097

Investigador	projeto_CEP_BJGS_02_corrigido.docx	08/06/2021 09:16:31	SILVA	Aceito
Outros	Carta_simples_pendencias_CEP.docx	08/06/2021 09:15:47	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO_DE_CONSENTIMENTO_LIVRE_E_ESCLARECIDO_03_corrigido.docx	08/06/2021 09:15:28	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO_DE_CONSENTIMENTO_LIVRE_E_ESCLARECIDO_02.docx	30/04/2021 09:53:00	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_CEP_BJGS_01.docx	29/04/2021 15:55:36	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	Check_List_Documental_02122020_ok_assinado_final.pdf	29/04/2021 15:54:34	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	Termo_Anuencia_Graduacao.pdf	29/04/2021 15:51:23	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	TERMO_DE_GUARDA_DE_MATERIAL_BIOLOGICO.pdf	29/04/2021 15:49:38	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	DECLARACAO_DE_COMPROMISSOS_DA_EQUIPE_DA_PESQUISA.pdf	29/04/2021 15:48:40	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	CONCORDANCIA_DOS_SERVICOS_ENVOLVIDOS.pdf	29/04/2021 15:47:45	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	ANALISE_DO_MERITO_CIENTIFICO.pdf	29/04/2021 15:47:04	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	Aprovacao_PPGQ_Extra_Atta_CEP.pdf	29/04/2021 15:46:34	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Outros	CARTA_DE_ENCAMINHAMENTO_DO_PESQUISADOR_AO_CEP.pdf	29/04/2021 15:45:14	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto_assinada.pdf	29/04/2021 15:41:48	BRUNO JOSE GONCALVES DA SILVA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - 1º andar	CEP: 80.060-240
Bairro: Alto da Glória	
UF: PR	Município: CURITIBA
Telefone: (41)3360-7259	E-mail: cometica.saude@ufpr.br



Continuação do Parecer: 4.785.097

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CURITIBA, 16 de Junho de 2021

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

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