



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro de Tecnologia e Ciências

Faculdade de Engenharia

Rodrigo Coutinho da Silva

**Microextração Líquido-Líquido Dispersiva na Determinação de
Bisfenóis (A, S, F, AF) e de Benzofenona em Amostras
Aquosas Reais e Complexas: Desenho Experimental (DoE) e
Otimização de Processos**

Rio de Janeiro

2020

Rodrigo Coutinho da Silva

**Microextração Líquido-Líquido Dispersiva na Determinação de Bisfenóis
(A, S, F, AF) e de Benzofenona em Amostras Aquosas Reais e Complexas:
Desenho Experimental e Otimização de Processos**



Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Engenharia Ambiental ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Controle da Poluição Urbana e Industrial.

Orientadora: Prof^a Marcia Marques Gomes, PhD.

Coorientador: Marco Tadeu Gomes Vianna, DSc.

Rio de Janeiro

2020

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CTC/B

S586 Silva, Rodrigo Coutinho da.
Microextração líquido-líquido dispersiva na determinação de bisfenóis (A, S, F, AF) e de benzofenona em amostras aquosas reais e complexas: desenho experimental e otimização de processos / Rodrigo Coutinho da Silva. – 2020.
95f.

Orientadora: Marcia Marques Gomes.
Coorientador: Marco Tadeu Gomes Vianna.
Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Engenharia.

1. Engenharia ambiental - Teses. 2. Água - Poluição - Teses.
3. Extração (Química) - Teses. 4. Cromatografia a líquido - Teses. 5. Espectrometria de massa - Teses. I. Gomes, Marcia Marques. II. Vianna, Marco Tadeu Gomes. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Engenharia. IV. Título.

CDU 628.16

Bibliotecária: Júlia Vieira – CRB7/6022

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Rodrigo Coutinho da Silva

**Microextração Líquido-Líquido Dispersiva na Determinação de Bisfenóis
(A, S, F, AF) e de Benzofenona em Amostras Aquosas Reais e Complexas:
Desenho Experimental e Otimização de Processos**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Engenharia Ambiental ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Controle da Poluição Urbana e Industrial.

Aprovada em _____.

Banca examinadora:

Prof. Dra. Marcia Marques Gomes (Orientadora)
Faculdade de Engenharia – UERJ

Dr. Marco Tadeu Gomes Vianna (Coorientador)
InovUERJ

Prof. Deivisson Lopes Cunha
Faculdade de Engenharia – UERJ

Prof. Davyson Moreira
FIOCRUZ

Rio de Janeiro
2020

DEDICATÓRIA

Em memória de minha amada esposa Sara Cristina Resende Coutinho da Silva, meu aprendizado de força, perseverança e amor eterno.

AGRADECIMENTOS

À Deus, aos Sagrados e todos os mentores espirituais que me forneceram estrutura e equilíbrio nesse desafio.

À minha família por todo suporte e determinação me fornecendo todo auxílio necessário. Aos meus pais Carlos e Maria e minha maninha Paloma por todo carinho, incentivo e ajuda. Aos meus sogros Enivaldo e Cora por todos os conselhos e energias positivas. Em especial, à minha amada esposa, Sara, em memória, por todo amor, carinho e atenção, compartilhando comigo todos os momentos e me incentivando sempre, do seu jeito único e precioso de ser.

À minha orientadora Marcia Marques pela oportunidade, confiança e generosidade em compartilhar seus conhecimentos e acreditar em meu potencial, me fornecendo o apoio necessário em todos os momentos. Ao meu coorientador Marco Tadeu Gomes Vianna, grande amigo, por estar ao meu lado em todos os experimentos desse projeto me direcionando e dando forças em todas as etapas. Aos professores e toda equipe do LABIFI-UERJ, principalmente ao Prof. André Salomão por toda motivação e contribuição, ao Dr. Deivisson Lopes Cunha, pela amizade e discussões valiosas e as técnicas Priscila Cunha, Gabriele Araújo e Vanda Azevedo pela parceria.

Aos amigos que sempre me fortaleciam com palavras de superação, torcendo por minhas conquistas e me impulsionando nos desafios e caminhos da vida.

Às empresas nas quais trabalhei e aos colegas de trabalho por proporcionarem o meu crescimento profissional.

À Universidade do Estado do Rio de Janeiro, da qual tenho o orgulho de ser servidor, agradeço a oportunidade e a infraestrutura disponibilizada para o desenvolvimento do trabalho.

Às agências de fomento FAPERJ (Processo E-26/202.894/2018); CNPq (Processos 308335/2017-1 e 435883/2018-6) e FINEP (Convênio 01.14.0081.00) por toda a ajuda financeira.

De tudo, ficaram três coisas:
A certeza de que estamos sempre recomeçando...
A certeza de que precisamos continuar...
A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar...
Portanto devemos fazer da interrupção um caminho novo...
Da queda, um passo de dança...
Do medo, uma escada...
Do sonho, uma ponte...
Da procura, um encontro...

Fernando Pessoa

RESUMO

SILVA, Rodrigo Coutinho da. *Microextração líquido-líquido dispersiva na determinação de bisfenóis (A, S, F, AF) e de benzofenona em amostras aquosas reais e complexas: desenho experimental e otimização de processos*. 2020. 95f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Faculdade de Engenharia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

O método de microextração líquido-líquido dispersiva (MELLD) é uma técnica de extração e concentração de compostos-alvo aplicada a matrizes aquosas de alta complexidade, tais como efluentes urbanos, industriais e outras amostras ambientais. Bisfenóis e Benzofenona são substâncias orgânicas amplamente aplicadas na manufatura de produtos em diferentes setores industriais que têm sido frequentemente encontradas em diferentes matrizes ambientais e biológicas. Sabe-se atualmente que tais substâncias estão associadas a uma variedade de disfunções fisiológicas e agravos à saúde. Portanto, a detecção/quantificação segura dessas substâncias faz-se necessária. O objetivo do presente trabalho foi encontrar as melhores condições para extração e recuperação simultânea de Bisfenol A (BPA), Bisfenol S (BPS), Bisfenol F (BPF), Bisfenol AF (BPAF) e Benzofenona (BZP) por meio do método de Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (MELLD), utilizando-se para tanto, a abordagem de Desenho Experimental (DoE) para otimização de processos. Em seguida, o MELLD otimizado foi utilizado na extração/recuperação dessas substâncias em matrizes aquosas complexas. Os analitos foram identificados e quantificados utilizando-se cromatografia líquida de ultra eficiência e espectrometria de massas com Xevo TQD® Quadrupolo (UPLC-MS/MS Waters). As variáveis e as condições consideradas relevantes para otimização da MELLD foram escolhidas por meio da construção sucessiva de duas matrizes de Plackett-Burman Design (PB), seguida de Delineamento Composto Central Rotacional (CCRD) para otimização simultânea do conjunto de substâncias. Após otimização, as condições que resultaram na melhor extração foram aplicadas a cinco amostras aquosas reais (esgotos bruto e tratado e águas superficiais) obtidas na cidade do Rio de Janeiro. As eficiências de recuperação variavam de 83%-121% para BPA, 76%-91% para BPS, 89%-98% para BPF, 60%-92% para BPAF e 81.5%-99% para BZP. As concentrações das substâncias-alvo encontradas nas amostras reais foram: BPA (0,054-150 $\mu\text{g L}^{-1}$), BPS (0,329-18,2 $\mu\text{g L}^{-1}$), BPF (0,048-0,091 $\mu\text{g L}^{-1}$), BPAF (0,005-0,027 $\mu\text{g L}^{-1}$), BZP (0,402-0,923 $\mu\text{g L}^{-1}$). A associação de MELLD com UPLC-MS/MS atendeu aos requisitos de validação adotados. Destacam-se as seguintes vantagens na aplicação de tal técnica de extração, quando comparada à técnica SPE mais comumente utilizada: baixo custo analítico (0,10 USD por amostra); baixo volume de amostra requerido; ausência de resíduos gerados por métodos que utilizam cartuchos, permitindo assim a condução de análises cromatográficas de um número maior de amostras de forma mais rápida, com eficiência e simplicidade e ambientalmente mais sustentável.

Palavras-chave: MELLD; Bisfenol; Benzofenona; Cromatografia líquida; Espectrometria de massas; Otimização de processos; Amostras reais.

ABSTRACT

SILVA, Rodrigo Coutinho da. *Dispersive liquid-liquid microextraction do detect bisphenols (A, S, F, AF) and benzophenone in real complex aqueous samples: design of experiments and process optimization*. 2020. 95f. Dissertation (Professional MSc in Environmental Engineering) – Faculty of Engineering, Rio de Janeiro State University, Rio de Janeiro, 2020.

The Dispersive Liquid-liquid Microextraction (DLLME) is a technique for extraction and concentration of target compounds applied to aqueous matrices of high complexity, such as sewage, industrial effluents and environmental samples. Bisphenol and benzophenone are widely applied in the manufacture of products in different industrial sectors and have been increasingly detected in different environmental and biological matrices. These compounds are associated to a variety of physiological dysfunctions and health impacts. Therefore, proper detection and quantification of bisphenols and benzophenone in aqueous matrices are necessary. The objective of this study was to find the best condition for a joint extraction/recovery process of Bisphenol A (BPA), Bisphenol S (BPS), Bisphenol F (BPF), Bisphenol AF (BPAF) and Benzophenone (BZP) by Dispersive Liquid-liquid Microextraction (DLLME), using the statistical approach Design of Experiments (DoE) for process optimization. In the present study, optimised DLLME was used for extraction/recovery of these compounds in complex aqueous matrices. Analytes were identified and quantified using a Xevo TQD®, Quadrupole (UPLC-MS/MS Waters) equipment. The selection of variables and conditions considered relevant for optimization of DLLME was done with the construction of two successive matrices of Plackett-Burman Design (PB) followed by a Central Composite Rotatable Design (CCRD) for a joint optimization. After the optimization, the best extraction condition was applied to five real samples (raw and treated wastewaters and surface waters) obtained in Rio de Janeiro city, Brazil. The recovery efficiencies ranged from 83 to 121% for BPA, 76 to 91% for BPS, 89 to 98% for BPF, 60% to 92% for BPAF and 81 to 99% for BZP. The concentrations of target analytes found in real samples were: BPA (0.054-150 $\mu\text{g L}^{-1}$), BPS (0.329-18.2 $\mu\text{g L}^{-1}$), BPF (0.048-0.091 $\mu\text{g L}^{-1}$), BPAF (0.005-0.027 $\mu\text{g L}^{-1}$), BZP (0.402-0.923 $\mu\text{g L}^{-1}$). The association of DLLME with the UPLC-MS/MS met the validation requirements adopted and enabled high analytical standards. Additional advantages of applying this extraction technique instead of SPE commonly used is the low analytical cost per analysis (\$0.10 USD) and low sample volume required, making it possible to process a larger number of samples quickly, with simplicity and efficiency, besides being environmentally friend.

Keywords: DLLME; Bisphenol; Benzophenone; Liquid chromatography; Mass spectrometry; Process optimization; Environmental samples.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma dos possíveis caminhos percorridos pelos contaminantes emergentes.	20
Figura 2 - Estrutura química dos bisfenóis e benzofenona.	24
Figura 3 - Desenho esquemático de um espectrômetro de massas triplo quadrupolo (in tandem)	27
Figura 4 - Principais vantagens e desvantagens das métodos de preparo de amostras.....	29
Figura 5 - Comportamento das etapas de interação dos solventes da DLLME.	30
Figura 6 - Tipos de solventes orgânicos de extração mais utilizados na MEELD.....	32
Figura 7 - Tipos de solventes orgânicos dispersivos mais utilizados na MEELD.	32
Figura 8 - Principais variáveis que influenciam a MEELD.	34
Figura 9 - Esquema das fases do planejamento experimental para otimização da MELLD.	36
Figura 10 – Preparo da MELLD.....	40
Figura 11 - Estratégia de otimização aplicada na MELLD.....	40
Figura 12 - Cromatografia em fase líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas XEVO TQD, Triplo Quadrupolo – Waters.	45
Figura 13 - Analisador de carbono orgânico total (TOC-V CPN, Shimadzu)...	46
Figura 14 - Diagrama de Pareto dos Efeitos Padronizados - BPA	51
Figura 15 - Diagrama de Pareto dos Efeitos Padronizados - BPAd ₁₆	51
Figura 16 - Diagrama de Pareto dos Efeitos Padronizados - BPS	52
Figura 17 - Diagrama de Pareto dos Efeitos Padronizados - BPF	53
Figura 18 - Diagrama de Pareto dos Efeitos Padronizados - BPF	54
Figura 19 - Diagrama de Pareto dos Efeitos Padronizados - BZP	55
Figura 20 - Diagrama de Pareto dos Efeitos Padronizados PB12 – BPA, BPAd ₁₆ e BPF	58
Figura 21 - Diagrama de Pareto dos Efeitos Padronizados PB12 – BPS.....	59
Figura 22 - Diagrama de Pareto dos Efeitos Padronizados PB12 – BPAF	59

Figura 23 - Diagrama de Pareto dos Efeitos Padronizados PB12 – BZP	60
Figura 24 - Cromatograma: Padrão (BPA e BPS) versus melhores condições alcançadas pela MELLD com base no PB12.	63
Figura 25 - Cromatograma: Padrão (BPF, BPS e BZP) versus melhores condições alcançadas pela DLLME com base no PB12.	64
Figura 26 - Superfície de Resposta do BPS.....	66
Figura 27 - Otimização da Resposta através da função desejabilidade	67
Figura 28 - Comportamento das formas de BPA na escala de pH pelo gráfico de pka.	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Propriedades físico-químicas dos bisfenóis e benzofenona.....	24
Tabela 2 - Plackett-Burman (PB16): Matriz decodificada para os experimentos na Etapa 1.....	41
Tabela 3 - Plackett-Burman (PB12): matriz decodificada para os experimentos na Etapa 2.....	42
Tabela 4 - Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) decodificado.	44
Tabela 5 - Determinação da melhor condição dos parâmetros do MS/MS para cada substância-alvo.....	46
Tabela 6 - Recuperações dos compostos-alvo obtidos pela matriz Plackett-Burman – Etapa 1 (PB16).	48
Tabela 7 - Tabela de Efeitos das variáveis relevantes no PB16.	49
Tabela 8 - Recuperação do composto-alvo obtido em diferentes ensaios do delineamento PB-Etapa 2 (PB12).	56
Tabela 9 - Efeitos das variáveis independentes relevantes: Delineamento PB12 (Etapa2).....	61
Tabela 10 - Resultados de Recuperação dos 6 substâncias-alvo após aplicação do DCCR.....	65
Tabela 11- Carbono orgânico dissolvido (COD) e salinidade em 5 amostras reais complexas utilizadas para validar o método de extração sob as condições definidas.....	69
Tabela 12 - Efeito Matriz (EM%) e taxa de recuperação (REC%) para BPA, BPS, BPF, BPAF, BZP em diferentes matrizes, a partir da concentração de $1\mu\text{g.L}^{-1}$ (n=3).....	70
Tabela 13 - Parâmetros de qualidade do método proposto para estudos de recuperação (MELLD-UPLC-MS / MS).	72
Tabela 14 - Parâmetros estatísticos das curvas analíticas	73
Tabela 15 - Ocorrência de BPA, BPS, BPF, BPAF e BZP em matrizes reais complexas (n = 3) utilizando MELLD como método de extração.	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABG	Amostra Baía de Guanabara
ACN	Acetonitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AS	Adição de sal
BG	Banho de Gelo
BPA	Bisfenol A
BPA d ₁₆	Bisfenol A deuterado
BPAF	Bisfenol AF
BPF	Bisfenol F
BPS	Bisfenol S
BZP	Benzofenona
CAS	Chemical Abstracts Service
COD	Carbono Orgânico Dissolvido
CG-MS	Cromatografia em fase Gasosa acoplada ao espectrômetro de massas
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
DE	Desreguladores Endócrinos
DLLME	<i>Dispersive Liquid-Liquid Microextraction</i>
DoE	<i>Design of Experiments</i>
DP	Desvio Padrão
DPR	Desvio Padrão Relativo
EBC	Amostra de Esgoto Bruto Condominial
EBM	Amostra de Esgoto Bruto Municipal
EM	Efeito de Matriz
ETC	Amostra de Esgoto Tratado Condominial
ETM	Amostra de Esgoto Tratado Municipal
ESI	Ionização por Electrospray, do inglês <i>Electrospray Ionization</i>
EC	Energia de Colisão
EFS	Extração em Fase Sólida

ELL	Extração Líquido-Líquido
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i>
ETE's	Estações de Tratamentos de Esgotos
FDA	<i>Food and Drug Administrator</i>
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i>
IL-DLLME	<i>Ionic Liquid-based Dispersive Liquid-Liquid Microextraction</i>
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia e Normalização
IUPAC	<i>International of Pure and Applied Chemistry</i>
ISO	<i>International Standard Organization</i>
LC-ESI-MS/MS	Cromatografia Líquida acoplada a Fonte de Ionização por Electrospray acoplada à Espectrometria de massas <i>tandem</i> Espectrometria de massas
LC-MS	Cromatografia em fase Líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas
LD	Limite de Detecção
LDM	Limite de Detecção do Método
LQ	Limite de Quantificação
LQM	Limite de Quantificação do Método
MELLD	Microextração Líquido-Líquido Dispersiva
MeOH	Metanol
MM	Massa Molar
MRM	Monitoramento de Reações Múltiplas
PF	Ponto de Fusão
PB	Plackett–Burman Design

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	15
OBJETIVOS.....	18
Objetivo Geral.....	18
Objetivos Específicos	18
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
1.1 Contaminantes emergentes	19
1.1.1 Contaminantes emergentes no ambiente.....	19
1.1.2 Bisfenóis.....	21
1.1.3 Benzofenonas	22
1.1.4 Bisfenóis e benzofenona em matrizes aquosas	25
1.2 Instrumentação analítica para análise de contaminantes emergentes	26
1.3 Preparo de amostras ambientais	27
1.4 Microextração Líquido-Líquido Dispersiva - MELLD.....	29
1.4.1 Variáveis da MELLD.....	31
1.5 Desenho experimental	33
1.6 Validação de método.....	36
1.6.1 Efeito de Matriz	37
2 MATERIAIS E MÉTODOS	38
2.1 Preparo Experimental	38
2.1.1 Analitos.....	38
2.1.2 Limpeza das vidrarias.....	38
2.1.3 Soluções estoque	38
2.1.4 Filtração das amostras	38
2.2 Critério de escolha das variáveis.....	38
2.3. Procedimento de Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (MELLD)	39
.....	
2.4 Desenho Experimental.....	40
2.4.1 Etapa 1 - Matriz PB16	42
2.4.2 Etapa 2 - Matriz PB12:	43
2.4.3 Etapa 3 – Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).....	43
2.5 Cromatografia em fase líquida e espectrometria de massas	44

2.6 Parâmetros físico-químicos	45
2.7 Matrizes Aquosas Complexas.....	46
2.8 Validação do Método.....	47
2.9 Análise Estatística.....	47
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
3.1 Delineamento Experimental PB16 - Etapa 1.....	48
3.1.1 Efeitos das variáveis independentes sobre a recuperação de cada composto-alvo	50
3.2 Delineamento Experimental PB12 – Etapa 2.....	55
3.2.1 Efeitos das variáveis sobre as taxas de recuperação de cada substância- alvo.....	57
3.3 Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) - Etapa 3	64
3.3.1 Otimização do DCCR	67
3.4 Aplicação do método a amostras reais complexas	68
4 CONCLUSÕES	77
5 RECOMENDAÇÕES.....	78
REFERÊNCIAS.....	79

INTRODUÇÃO

Grandes quantidades de fármacos, produtos de uso pessoal (protetores solar, cremes, xampus etc) e aditivos de uso industrial são produzidos anualmente, visando atender o crescimento populacional mundial. Este panorama de alto consumo aliado a inadequada disposição desses produtos é um fenômeno que pode contribuir para presença de contaminantes orgânicos em águas residuais (ARISTIZABAL-CIRO *et al.*, 2017; STRAUB, 2016).

Resíduos de fármacos e produtos químicos orgânicos oriundos dos processos de fabricação de itens de uso doméstico e de cuidado pessoal são tecnicamente classificados como micropoluentes ou contaminantes emergentes e estão sendo amplamente monitorados em diversas matrizes ambientais, tais como águas superficiais, água potável (oriundas de sistemas de tratamento), água subterrânea e efluentes domésticos e industriais (ARISTIZABAL-CIRO *et al.*, 2017; BECERRIL BRAVO, 2009; PETROVIĆ; GONZALEZ; BARCELÓ, 2003a). Tais contaminantes são organizados em classes, de acordo com suas estruturas químicas e também sua atuação terapêutica ou industrial (PUGAJEVA *et al.*, 2017; VAN DE STEENE; LAMBERT, 2008).

Entre as classes de contaminantes frequentemente encontradas em estudos de detecção e quantificação no ambiente, os aditivos plásticos se destacam, principalmente os fenóis, como o bisfenol A, e as benzofenonas utilizadas na proteção da radiação UV em produtos cosméticos.

Nesse sentido, fenóis e benzofenonas são classes cada vez mais estudadas, por se tornarem uma grande preocupação para a saúde pública e ambiental, e principalmente devido as possíveis intoxicações crônicas oriundas de exposições prolongadas a baixas concentrações dessas substâncias (DOERGE *et al.*, 2011; MOREMAN *et al.*, 2017).

Os comprovados efeitos tóxicos sobre os diferentes níveis tróficos da cadeia alimentar de ecossistemas aquáticos e o risco em potencial para a saúde humana gerados por esses micropoluentes reforçam a importância de programas de monitoramento, e indicam a necessidade de controle ou restrição de lançamento dessas substâncias no ambiente. Dessa forma, diversos estudos realizados indicam que vários desses compostos, entre eles os aditivos plásticos podem desequilibrar o sistema endócrino de diferentes espécies, devido aos efeitos similares aos produzidos por hormônios, por exemplo, os

estrogênicos (BILA; DEZOTTI, 2007; DE SÁ SALOMÃO; MARQUES, 2015; VÄLITALO *et al.*, 2016)

A maioria desses desreguladores endócrinos (DE) apresentam elevada recalcitrância e seus metabólitos ou subprodutos persistem após o tratamento de esgotos e água em sistemas de tratamento convencionais. Tal fator contribui de forma significativa para a presença desses contaminantes em ecossistemas aquáticos e consequentemente, na água de abastecimento (BLAIR *et al.*, 2015; CHRISTA S. MCARDELL *et al.*, 2003; MOMPELAT; LE BOT; THOMAS, 2009).

Para a análise desses contaminantes orgânicos diversas técnicas analíticas são propostas, sendo as mais aplicadas, a cromatografia gasosa e líquida com detecção por espectrometria de massas (CG-MS e LC-MS/MS). No entanto, devido aos baixos níveis de concentração desses compostos ($\mu\text{g L}^{-1}$ ou ng L^{-1}), técnicas de preparação de amostras são necessárias para possibilitar a extração e o enriquecimento do composto-alvo, e assim permitir a sua identificação em concentrações menores (BAKER; KASPRZYK-HORDERN, 2011; GROS; RODRÍGUEZ-MOZAZ; BARCELÓ, 2013).

Nota-se que a maioria dos métodos de determinação química realiza um processo de preparo de amostras em cartuchos de extração em fase sólida (EFS ou SPE em inglês) antes da identificação e quantificação dos analitos por cromatografia, normalmente em camada delgada (WANG, ZHONGHE *et al.*, 2018). Apesar da técnica de preparo de amostra por EFS ser muito consolidada, sua utilização envolve alto custo e tempo de execução, além da geração de resíduo, pois o cartucho deve ser descartado (ZGOŁA-GRZEŚKOWIAK; GRZEŚKOWIAK, 2011).

A técnica de Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (MELLD) desenvolvida em 2006 (BERIJANI *et al.*, 2006; REZAEI *et al.*, 2006) vem recentemente sendo aplicada no desenvolvimento de metodologias para análise de micropoluentes, particularmente quando presentes em matrizes aquosas de alta complexidade, tais como de origem biológica e ambiental (AMIN; EBRAHIM; POURSAFA, 2017; ROCHA *et al.*, 2016a; RYU *et al.*, 2012; VAGHAR-LAHIJANI *et al.*, 2018; VELA-SORIA *et al.*, 2014). Esse tipo de extração está enquadrada como uma operação simples, rápida e de bons rendimentos na recuperação dos analitos (GUAN *et al.*, 2016; SARAJI; BOROUJENI, 2014), mostrando-se como uma alternativa em potencial para a extração de compostos orgânicos em esgoto sanitário.

O desenvolvimento de metodologias de extração necessita o estudo das variáveis que mais influenciam na recuperação dos compostos de interesse.

Muitos procedimentos utilizam a combinação univariada, no qual um parâmetro varia de cada vez, fornecendo assim uma aproximação do efeito de cada variável na resposta (HAMADA; WU, 1992; MOUSAVI; TAMIJI; KHOSHAYAND, 2018). Entretanto, o desenho experimental vem ganhando espaço no cenário analítico como uma ferramenta viável, pois pode permite delinear uma resposta ótima, com a seleção das variáveis de maior influência, além de reduzir o número de experimentos e manter a confiabilidade estatística dos modelos gerados (CHÁVEZ-MORENO *et al.*, 2018; XIA; XIANG; ZHANG, 2008)

O estudo pretende otimizar o processo de extração/recuperação de aditivos plásticos (BPA, BPS, BPF, BPAF, DEP e BZP) em matrizes aquosas complexas, utilizando-se técnica de microextração líquido-líquido dispersiva (MELLD) e abordagem estatística (Plackett–Burman *design* - PB e delineamento composto central rotacional - DCCR) com vistas à otimização de processo, tendo como variáveis independentes, aquelas consideradas relevantes ao processo de microextração, segundo levantamento bibliográfico.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Desenvolver uma alternativa para extração simultânea de um conjunto de compostos aditivos plásticos (Bisfenol A, Bisfenol S, Bisfenol F, Bisfenol AF) e um bloqueador solar (Benzofenona) para posterior análise, demonstrando ao mesmo tempo, sua aplicabilidade em diferentes matrizes aquosas reais e complexas.

Objetivos Específicos

- Selecionar as variáveis com relevância estatística significativa para aplicação na MELLD para as substâncias-alvo;
- Direcionar o melhor rendimento das variáveis menos relevantes na contribuição da resposta global da MELLD;
- Criar um modelo que explique os resultados experimentais gerados, através do DCCR;
- Otimizar o modelo por meio da ferramenta de análise estatística: desejabilidade;
- Realizar a validação do método da MELLD;
- Demonstrar a aplicabilidade do método MELLD otimizado em amostras aquosas de matrizes reais e complexas, como esgotos bruto e tratado e água superficial.
- Analisar as amostras aquosas reais por cromatografia em fase líquida acoplada a espectrometria de massas para a quantificação das substâncias de interesse.

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Contaminantes emergentes

Contaminantes emergentes são substâncias orgânicas oriundas de diversas fontes antrópicas, tais como fármacos, produtos de cuidado pessoal, aditivos plásticos, pesticidas entre outros. A preocupação com essas substâncias se tornou uma questão mundial, devido ao aumento da ocorrência desses contaminantes no ambiente e também a não inclusão dos mesmos nos programas de monitoramento (USEPA, 2015; COMTOIS-MAROTTE *et al.*, 2017; LUO *et al.*, 2014). Além disso, muitas dessas substâncias apresentam persistência ou geram produtos de degradação que podem desencadear potenciais riscos à saúde humana e efeitos ecológicos indesejáveis ao ambiente. Já outras substâncias não apresentam elevada recalcitrância, porém por sua introdução contínua no ambiente também são enquadradas nessa classe de contaminantes. Esse comportamento impulsiona os contaminantes emergentes a serem fortes candidatos a uma legislação futura (EGGEN *et al.*, 2014; GAGO-FERRERO *et al.*, 2019; PETROVIĆ; GONZALEZ; BARCELÓ, 2003b).

1.1.1 Contaminantes emergentes no ambiente

Nas últimas décadas a preocupação com os contaminantes emergentes tem crescido e os trabalhos científicos direcionados à identificação e quantificação dessas substâncias em diversas matrizes têm sido cada vez mais frequentes. As estações de tratamentos de esgotos (ETE) é um dos caminhos que grande parte desses contaminantes percorre, antes de chegar aos corpos hídricos, porém muitos sistemas de tratamento convencionais não possuem tecnologias adequadas, apresentando assim uma deficiência na remoção ou mineralização da maioria dos contaminantes emergentes (ARISTIZABAL-CIRO *et al.*, 2017; GROS; PETROVIĆ; BARCELÓ, 2009). Além disso, outra parte dessas substâncias não alcançam as ETE e acabam chegando ao meio ambiente, por vazamentos ou lançamentos *in natura*, o que agrava bastante, com o retorno desses compostos orgânicos ao consumidor (Figura 1).

física pelo acúmulo desses materiais no ambiente, o plástico pode potencialmente transferir contaminantes químicos adsorvidos em sua superfície, destacando-se, entre eles, os classificados como aditivos plásticos (HERMABESSIERE *et al.*, 2017; TEUTEN *et al.*, 2009).

Aditivos plásticos são compostos químicos, que fornecem as propriedades necessárias a um polímero plástico ou são incorporadas para facilitar o processo de fabricação agregando funções como plastificantes, retardadores de chama, estabilizadores, antioxidantes e pigmentadores. BPA e suas estruturas análogas estão enquadrados como aditivos plásticos e benzofenona que em alguns casos pode ser utilizada como filtro de radiação UV de embalagens de diversos PCP's. (OCDE, 2004).

1.1.2 Bisfenóis

O grupo de compostos denominados como bisfenóis é amplamente utilizado na manufatura de produtos plásticos em diferentes setores industriais (alimentos, construção civil, eletrônicos, medicina, brinquedos, entre outros), sendo considerada uma das classes de substâncias mais utilizadas no mundo (VANDENBERG *et al.*, 2007). Bisfenol A (BPA), por exemplo, pode ser utilizado na produção de policarbonatos e resinas epóxi aplicadas em materiais utilizados na indústria de alimentos, mídias digitais (CDs, DVDs, Blu-Ray), papel térmico, tubulações para água, dispositivos médicos, selantes dentais e é o principal componente de muitos produtos de consumo, tais como mamadeiras, revestimentos internos de latas de bebidas e alimentos. (CHEN, DA *et al.*, 2016).

O BPA é atualmente associado a uma variedade de disfunções fisiológicas e doenças, tais como diabetes, obesidade, desordens reprodutivas, doenças cardiovasculares, defeitos congênitos e câncer (GIULIVO *et al.*, 2016; ZIV-GAL; FLAWS, 2016). Foi demonstrado que o BPA age como elicitador de toxicidade leve a moderada em plantas, incluindo efeitos em níveis macroscópico (ex: germinação de sementes, crescimento de raiz, caule e folhas) e microscópico (fotossíntese, captação de nutrientes minerais, secreção de hormônios vegetais, funcionamento de sistemas antioxidantes e sistema reprodutivo) (XIAO *et al.*, 2019).

Bisfenóis, assim como outros aditivos plásticos têm sido detectados cada vez mais, em diferentes matrizes ambientais e biológicas (CHEN, DA *et al.*, 2016; ROCHA *et al.*, 2016a; SUN, X. *et al.*, 2018; YANG *et al.*, 2014). Devido à

existência de efeitos deletérios comprovados sobre a saúde humana e de ecossistemas aquáticos, BPA, em particular foi enquadrado como substância de origem sintética e desreguladora do sistema endócrino (DE) (KABIR; RAHMAN; RAHMAN, 2015).

Com base nas evidências dos efeitos deletérios, durante a última década, vários países têm adotado restrições ao uso e até mesmo o banimento do BPA em produtos industrializados, especialmente aqueles produzidos para consumo de crianças e recém-nascidos (ULLAH *et al.*, 2018; ZHANG, YIN FENG *et al.*, 2018). Tais restrições resultaram na substituição do BPA por novos compostos com propriedades análogas, tais como o Bisfenol S (BPS), Bisfenol F (BPF) e o Bisfenol AF (BPAF). Como consequência, BPS, por exemplo, é atualmente encontrado em vários produtos domésticos comercializados sob a legenda "*BPA free*" (CLARK, 2000; LIAO; LIU; KANNAN, 2012; ROCHESTER; BOLDEN, 2015), incluindo colas epóxi, revestimentos de latas e papéis térmicos (utilizados no comércio em impressoras térmicas para emissão de recibos) (CHEN, DA *et al.*, 2016); BPF tem sido utilizado na manufatura de embalagens de alimentos e tubulações de água (CABADO *et al.*, 2008; ZOU *et al.*, 2012). Já o BPAF tem sido comumente empregado em eletrônicos, fibra ótica, como monômero para poliamidas de alto desempenho e outros em polímeros (BARADIE; SHOICHET, 2005; CHEN, DA *et al.*, 2016; KONNO *et al.*, 2004).

Entretanto, foi verificado que tais análogos do BPA também causam, em algum nível, efeitos de desregulação endócrina; alguns destes compostos são inclusive mais tóxicos do que o BPA e, portanto, não são mais considerados opções seguras ao BPA (ELADAK *et al.*, 2015). Adicionalmente, análogos são menos biodegradáveis do que o BPA, o que prolonga a persistência dessas substâncias no ambiente (DANZL *et al.*, 2009; IKE *et al.*, 2006). As estruturas alternativas ao BPA podem causar efeitos tóxicos incluindo citotoxicidade, comprometimento reprodutivo, neurotoxicidade e desregulação endócrina (CHEN, DA *et al.*, 2016). Além disso, BPS, BPAF e BPF podem ter efeito androgênico, antiandrogênico, estrogênico e antiestrogênico (LIAO *et al.*, 2012; MANDRAH *et al.*, 2015).

1.1.3 Benzofenonas

Os compostos orgânicos encontrados nos protetores solares também são motivo de preocupações ambientais. Alguns compostos usados para proteger a

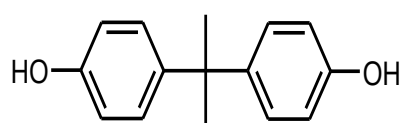
pele contra a radiação UV da luz solar também são micropoluentes importantes. Enquanto a maioria dos compostos orgânicos do filtro solar é lipofílica, a benzofenona (BZP) é um filtro UV solúvel em água usado em produtos de cuidados pessoais para proporcionar uma textura mais leve e menos oleosa.

A BZP também pode ser encontrada em xampus, géis de barbear, creme dental, produtos farmacêuticos, antitranspirantes e cosméticos (MOLINS-DELGADO; DÍAZ-CRUZ; BARCELÓ, 2016). Experimentos *in vitro* mostram que o BZP tem efeitos antiandrogênicos, pró-estrogênicos e antiestrogênicos e aumenta a proliferação de células do câncer de mama (SCHNEIDER; LIM, 2019).

Segundo Danovaro et al. (2008), compostos como o BZP ativam vírus que atacam os corais, culminando em estresse oxidativo, levando a expulsão de algas simbióticas e, portanto, branqueamento de corais.

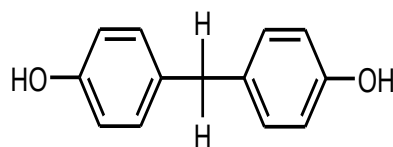
Uma investigação recente para explicar os mecanismos responsáveis pela citotoxicidade da oxibenzona (Benzofenona-3 ou BZP-3) em várias células usando timócitos de ratos demonstrou que a citotoxicidade da BZP-3 foi causada pela sensibilidade induzida pelo íon zinco (Zn^{2+}) ao estresse oxidativo (UTSUNOMIYA et al., 2019). Outros efeitos do BZP nas espécies vivas são: diminuição do sucesso de incubação; malformações em embriões; indução da síntese da proteína vitelogenina em machos (precursor da gema de ovo encontrada apenas em fêmeas) e; mortalidade em peixes-zebra (BALÁZS et al., 2016). Esses resultados sugerem que BZP pode alterar o equilíbrio de estrogênio e testosterona, como um composto desregulador endócrino. A figura 2 ilustra as estruturas dos bisfenóis, benzofenona e o padrão deuterado aplicados no presente trabalho e a tabela 1 as suas respectivas propriedades físico-químicas.

Figura 2 - Estrutura química dos bisfenóis e benzofenona.



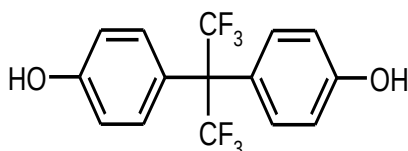
Bisfenol A

BPA, CAS 80-05-7



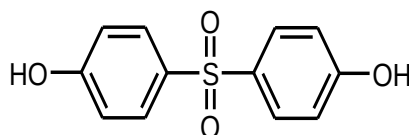
Bisfenol F

BPF, CAS 620-92-8



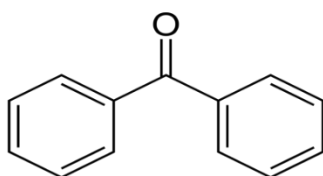
Bisfenol AF

BPAF, CAS 1748-61-1



Bisfenol S

BPS, CAS 80-09-1



Benzofenona

BZP, CAS 119-61-9

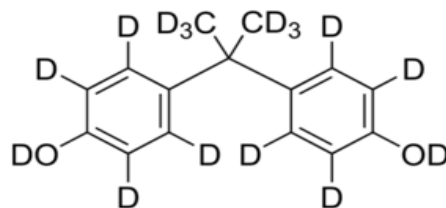
Bisfenol A d₁₆BPA d₁₆, CAS 96210-87-6

Tabela 1- Propriedades físico-químicas dos bisfenóis e benzofenona.

Substância	Acrônimo	Fórmula	MM ^(a)	Solubilidade em Água (mg L ⁻¹)	Log K _{ow}	pKa	PF (°C)
Bisfenol A	BPA	C ₁₅ H ₁₆ O ₂	228,29	120-300	3,32	9,6/11,3	150- 160
Bisfenol A d ₁₆	BPA d ₁₆	C ₁₅ D ₁₆ O ₂	244,38	-	-	-	-
Bisfenol S	BPS	C ₁₂ H ₁₀ O ₄ S	240,5	3518 ^(b)	1,65	8,2	240,5
Bisfenol F	BPF	C ₁₃ H ₁₂ O ₂	200,24	542,8 ^(b)	2,91	7,55/10,8	162,5
Bisfenol AF	BPAF	C ₁₅ H ₁₀ F ₆ O ₂	336,23	4,3	4,47	9,2	159- 162
Benzofenona	BZP	C ₁₃ H ₁₀ O	182,22	137	3,18	-7,5	48,5

Fonte: PubChem; (a) Massa Molar; (b) Estimated by US Environmental Protection Agency's EPISuite™

1.1.4 Bisfenóis e benzofenona em matrizes aquosas

A detecção e quantificação adequada de bisfenóis e BZP em matrizes aquosas é, portanto, uma preocupação justificada pela liberação frequente desses micropoluentes nas águas residuais de estações de tratamento de águas residuais domésticas e industriais com tecnologias de tratamento convencionais (FLINT *et al.*, 2012; GUERRA *et al.*, 2015). As concentrações de BPA encontradas nos esgotos municipais atingem $12 \mu\text{g L}^{-1}$ (concentração tóxica para algumas espécies aquáticas) (SANTOS *et al.*, 2016). O BPA foi quantificado em efluentes de estações de tratamento de águas residuais de Hong Kong, China e Alemanha, com concentrações médias variando de 116 a 1430 ng L^{-1} (MAN *et al.*, 2018). No Japão, concentrações de BPA de até $370 \mu\text{g L}^{-1}$ foram registradas em águas residuais (FLINT *et al.*, 2012; FUKAZAWA *et al.*, 2002). No Brasil, a presença de BPA foi relatada por Starling, Amorim & Leão (2019) em água potável ($0,16 \text{ ng L}^{-1}$), água superficial (até 13 ng L^{-1}) e esgotos municipais (até $84 \mu\text{g L}^{-1}$).

O BPS, composto muito menos estudado do que o BPA foi detectado em águas superficiais e em sedimentos nas concentrações de $7,2 \mu\text{g L}^{-1}$ e $1,1 \text{ ng g}^{-1}$ respectivamente (YAMAZAKI *et al.*, 2015b; YANG *et al.*, 2014).

O BPF foi detectado em águas residuais e lodos na China, Índia, Espanha e Noruega, (ČESEN *et al.*, 2018). Uma concentração de $6,2 \mu\text{g L}^{-1}$ de BPF foi encontrada em um efluente de uma ETE na Eslovênia (THOMAS; SCHLABACH, 2014).

De acordo com Chen *et al.* (2016), BPAF apresenta a maior persistência ambiental quando comparado com os demais análogos e na China, foi encontrado em água (concentração de até $15,3 \mu\text{g L}^{-1}$), sedimentos (até $2,0 \mu\text{g g}^{-1}$) e solos (até 331 ng g^{-1}). Quanto ao BZP, Almeida *et al.* (2013) relataram que amostras de águas residuárias coletadas na Estação de Tratamento Beirolas, localizada em Lisboa, Portugal, apresentou níveis de benzofenona variando de $2,2$ a $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$. Kasprzyk-Hordern *et al.* (2009) relataram altas concentrações de até $13,3 \text{ mg L}^{-1}$ em esgoto bruto e até $4,3 \text{ mg L}^{-1}$ em efluente tratado, para o derivado benzofenona-4; para amostras ambientais, Gago-Ferrero *et al.* (2013) encontraram concentrações de até $1,4 \mu\text{g L}^{-1}$, enquanto que Wick *et al.* (2010) mencionaram níveis de $0,57 \mu\text{g L}^{-1}$. Tsui *et al.* (2019) investigaram a ocorrência de filtros ultravioleta (inclusive BZP) na água do mar, em regiões costeiras no sul da China e encontraram concentrações de BZP de até $36,6 \text{ ng L}^{-1}$. No

Japão, Kameda, Kimura e Miyazaki (2011) quantificaram benzofenona (2,0 – 68,0 ng L⁻¹), em rios com diferentes graus de contaminação na cidade de Saitama.

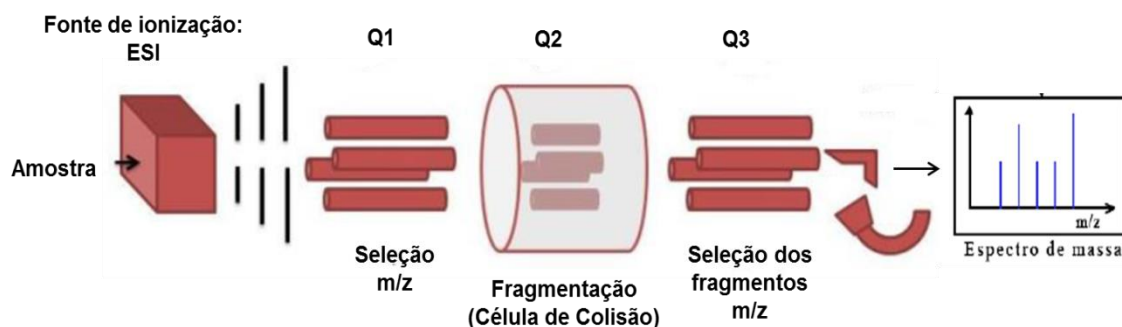
1.2 Instrumentação analítica para análise de contaminantes emergentes

Os bisfenóis e benzofenonas podem ser detectados e quantificados por várias técnicas analíticas, sendo as mais aplicadas a cromatografia gasosa e a cromatografia líquida de alta eficiência, ambas com detecção por espectrometria de massa (CG-MS e LC-MS, respectivamente). A necessidade de instrumentação analítica de alta sensibilidade e seletividade é de extrema importância, devido às baixas concentrações encontradas desses compostos em matrizes ambientais (medidas em µg L⁻¹ a ng L⁻¹). A determinação do método instrumental está condicionada às características físico-químicas das substâncias de interesse, tais como polaridade, volatilidade e termoestabilidade (GARCÍA-CÓRCOLES *et al.*, 2019; PETROVIĆ; GONZALEZ; BARCELÓ, 2003a).

Os avanços nas técnicas LC-MS tem possibilitado maior resolução e sensibilidade na análise de micropoluentes, principalmente, em matrizes aquosas complexas. O sistema de Cromatografia Líquida acoplada a Fonte de Ionização por Electrospray da Espectrometria de massas *in tandem* (LC-ESI-MS/MS) é um dos instrumentos que representam essa evolução, principalmente os que apresentam ultraeficiência (UPLC), proporcionando uma redução do tempo de análise e a ampliação do escopo analítico, o que possibilita avaliar várias substâncias, em uma única corrida cromatográfica, com tempos inferiores a 10 min.

A detecção por espectrometria de massas possibilita de forma seletiva a análise das massas correspondentes às moléculas de interesse e seus fragmentos. Essas moléculas são ionizadas e seus respectivos íons são acelerados por um campo elétrico e assim separados conforme a razão entre a sua massa e a sua carga elétrica (m/z) (HARRIS, 2003). O sistema triplo quadrupolo (Q1, Q2 e Q3) é um dos mais aplicados no campo da espectrometria de massas, onde os quadrupolos Q1 e Q3 atuam como filtros das massas da molécula de interesse e o Q2 como célula de colisão para a geração dos fragmentos de identificação e confirmação, dessa forma é obtido o espectro de massas (Figura 3).

Figura 3 - Desenho esquemático de um espectrômetro de massas triplo quadrupolo (*in tandem*)



Fonte: Adaptado de Jaikrishan e Praveen (2005)

1.3 Preparo de amostras ambientais

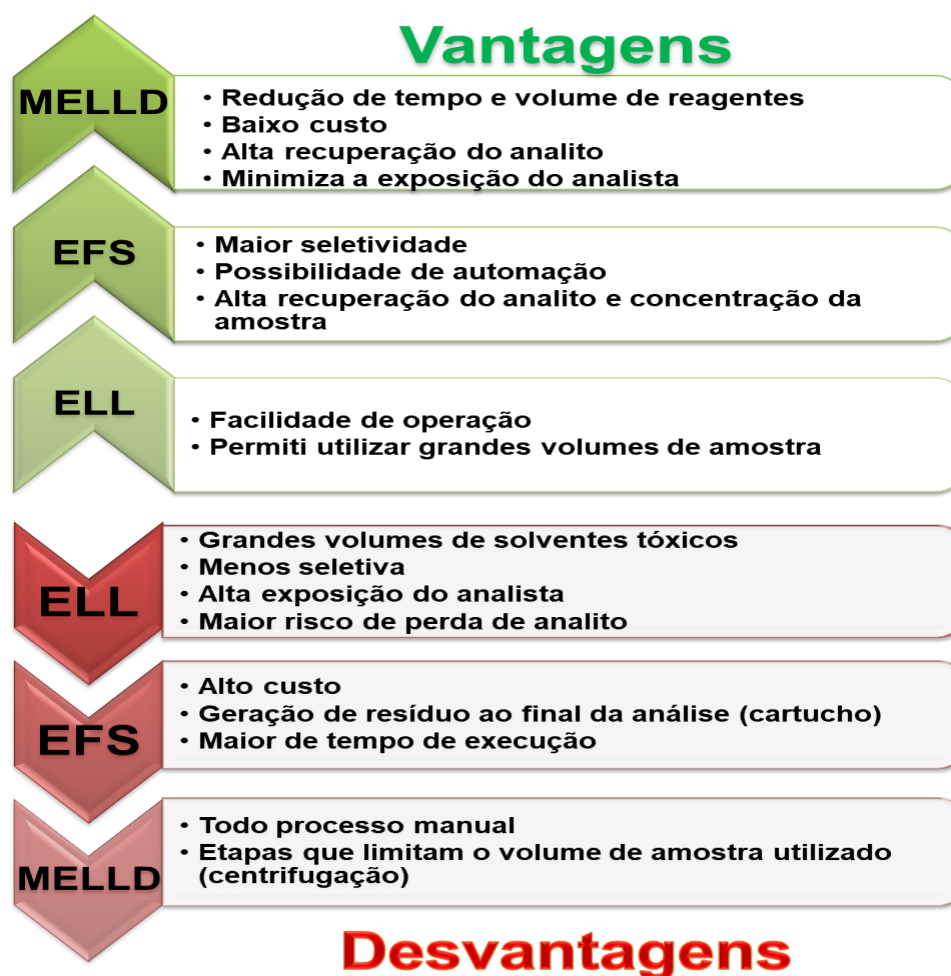
O procedimento analítico de determinação de contaminantes emergentes geralmente pode ser esquematizado pelas seguintes etapas: preparo do meio de amostragem, amostragem, acondicionamento, tratamento da amostra, separação do analito ou da matriz, análise química e tratamento de dados. Todas as etapas são de extrema importância no desempenho de resultados consistentes, entretanto o passo mais importante e laborioso é o preparo de amostra, sendo a etapa que necessita de maior tempo de desenvolvimento e aplicação, tornando-se assim um pré-requisito fundamental. O tempo e o número de estágios dentro da preparação de amostras estão condicionados ao tipo de amostra e suas propriedades, assim como o analito a ser determinado. Geralmente esse processo é contituído pelos estágios de homogeneização, extração, purificação e concentração (PAVLOVIĆ et al., 2007; SCOGNAMIGLIO et al., 2016).

Entre as técnicas de preparo de amostras mais comumente aplicadas estão a extração líquido-líquido (ELL) e a extração em fase sólida (EFS). A ELL é uma técnica tradicional, que visa a separação dos analitos por meio do uso de dois solventes imisíveis (ROCHA; DE OLIVEIRA; BARBOSA, 2018; SARAJI; BOROUJENI, 2014). Já a metodologia EFS é uma das técnicas de preparo de amostras mais aplicadas na literatura antes das análises cromatográficas (WANG, ZHONGHE et al., 2018). Esse tipo de extração visa uma separação líquido-sólido com isolamento dos analitos da matriz, por meio de um cartucho recheado, contendo um sorvente, no qual esses analitos são retidos e posteriormente eluídos com um solvente (LANÇAS, 2004).

Embora a técnica EFS seja bastante consolidada e bem-sucedida, a mesma requer o uso de cartuchos, que apresentam custo elevado, de aproximadamente 70 reais a unidade, e, além disso, após o seu uso o cartucho é enquadrado como um resíduo sólido, necessitando assim descarte adequado.(ZGOŁA-GRZEŚKOWIAK; GRZEŚKOWIAK, 2011). Porém algumas aplicações estão sendo estudadas visando a reutilização dos cartuchos, com nanomateriais como fase sólida.(WANG, YU; WANG; LIU, 2019)

O gasto de grande quantidade de solventes orgânicos caros e perigosos, o alto consumo de tempo e o uso de procedimentos de várias etapas, levando a possíveis perdas de analito são fatores que justificam a necessidade do desenvolvimento de técnicas sustentáveis, menos agressivas ao meio ambiente e ao analista e também apresentando um melhor custo-benefício (SARAJI; BOROUJENI, 2014). Dessa forma, buscando maior simplicidade de manuseio e redução de tempo e reagentes na rotina analítica, as microtécnicas surgem como uma alternativa em potencial para o preparo de amostras, quando se compara as vantagens e desvantagens entre as metodologias (Figura 4).

Figura 4 - Principais vantagens e desvantagens dos métodos de preparo de amostras.



Fonte: Autor, 2020

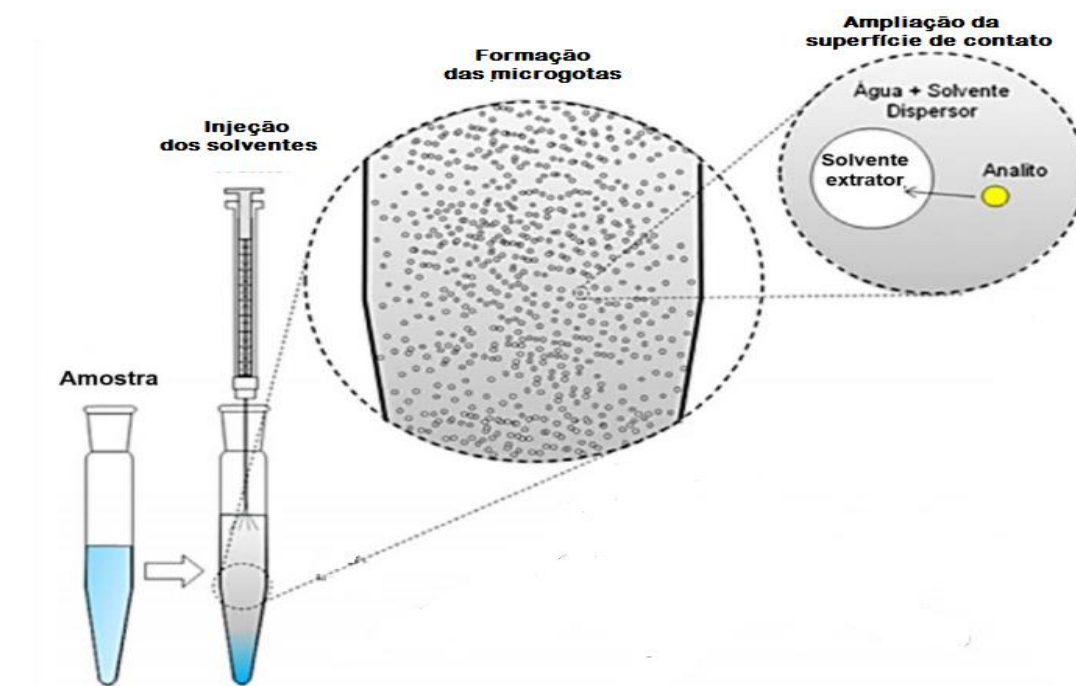
1.4 Microextração Líquido-Líquido Dispersiva - MELLD

Técnica de extração e concentração de compostos desenvolvida inicialmente em 2006 (BERIJANI *et al.*, 2006; REZAEE *et al.*, 2006), a DLLME é um preparo de amostra inovador e conveniente, estruturado em um sistema ternário de solventes, que consiste no equilíbrio de distribuição do analito (micropoluinte) entre as fases doadora (amostra) e aceptora (solvente orgânico), sendo ideal para a extração de compostos com propriedade lipofílica moderada a alta, ou que possam ter o seu coeficiente de partição ($\log D$) alterado pelo controle do pH, força iônica e temperatura (MOREIRA; YOKOYA; GAITANI, 2014; SARAJI; BOROUJENI, 2014; ZANG *et al.*, 2009).

Nesse contexto, a MELLD baseia-se em um solvente dispersor (SD), este miscível a fase aceptora e doadora, e um solvente extrator (SE), insolúvel a

amostra aquosa. Esses solventes, quando injetados na amostra formam microgotas por toda solução aquosa, ampliando a superfície de contato entre o SE e os analitos, favorecendo sua posterior extração (Figura 5) (CALDAS *et al.*, 2011).

Figura 5 - Comportamento das etapas de interação dos solventes da MELLD.



Fonte: Adaptado de Caldas et al, 2011

Esse tipo de extração vem representando aproximadamente cerca de 60% das publicações na área de microextração em fase líquida e mais recentemente, tem sido aplicada no desenvolvimento de metodologias específicas para análise de compostos orgânicos alvo em matrizes aquosas de alta complexidade, tais como urina, plasma, águas residuais, esgotos, além de amostras ambientais, tais como água superficial (AMIN; EBRAHIM; POURSAFA, 2017; MOREIRA; YOKOYA; GAITANI, 2014; ROCHA *et al.*, 2016a; RYU *et al.*, 2012; VAGHAR-LAHIJANI *et al.*, 2018; VELA-SORIA *et al.*, 2014). Dessa forma, a MELLD tem demonstrado ser uma alternativa em potencial para extração de compostos orgânicos de matrizes aquosas de forma mais sustentável (incluindo aspectos como custo, consumo, tempo e geração de resíduos), quando comparada a técnica mais difundida por EFS.

1.4.1 Variáveis da MELLD

As principais variáveis que afetam o desempenho da MELLD estão relacionadas aos tipos de solvente extrator e dispersivo utilizado e seus respectivos volumes. A definição de bons solventes de extração é determinante para a avaliação de uma melhor resposta da MELLD. Geralmente hidrocarbonetos halogenados convencionais são escolhidos como solventes de extração, tendo em vista sua alta densidade, contribuindo para separação das fases. Entre os solventes extratores mais utilizados estão: clorofórmio, (18,6%), tetracloreto de carbono (15,1%), clorobenzeno (6,3%) e diclorometano (2,8%), segundo estudo de Campillo et al. (2017). (Figura 6)

Com a função de regular o tamanho das microgotas formadas, a escolha do solvente dispersivo deve ser considerada, sendo sua miscibilidade na fase aquosa, um parâmetro importante para sua definição. Os solventes dispersivos mais aplicados na literatura são: metanol (26,5%), acetonitrila (23,7%) acetona (18,5%) e etanol (15%)(CAMPILLO *et al.*, 2017). (Figura 7)

Os volumes dos solventes de extração e dispersivo nos trabalhos são muito flutuantes, porém a maioria dos estudos não ultrapassam a faixa de 2 mL, de cada tipo de solvente (ALSHANA *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2017; ROCHA *et al.*, 2016b; VELA-SORIA *et al.*, 2014)

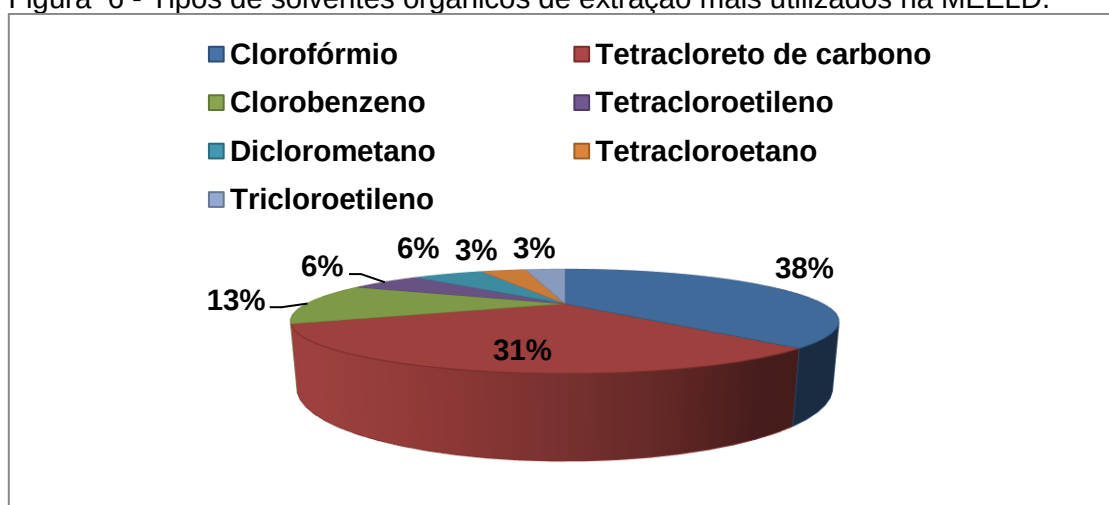
Outras variáveis experimentais também são apontadas por refletirem influência no rendimento da MELLD como: o volume de amostra; a adição de aditivos, o pH e a inclusão de outros procedimentos combinados como a sonicação, mistura por vórtex e banho de gelo (PARRILLA VÁZQUEZ *et al.*, 2013b).

O volume de amostra está diretamente relacionado ao fator de concentração da microextração, normalmente os trabalhos variam entre 5 a 40 mL. Já os aditivos, como a adição de sal são utilizados para diminuir a solubilidade das substâncias de interesse na amostra e assim facilitar a ação do solvente de extração, sendo o cloreto de sódio, na concentração de 1 a 30% p/v, o mais testado na literatura, nos ensaios de força iônica. (CAMPILLO *et al.*, 2017)

O pH da amostra também é um parâmetro que precisa ser ajustado, visando melhorar a eficiência de extração das substâncias ionizáveis. Com isso por meio do pK_a de cada analito pode-se estimar a faixa de pH a ser testada, visando a maior afinidade das substâncias de interesse pela fase orgânica no processo da MELLD.

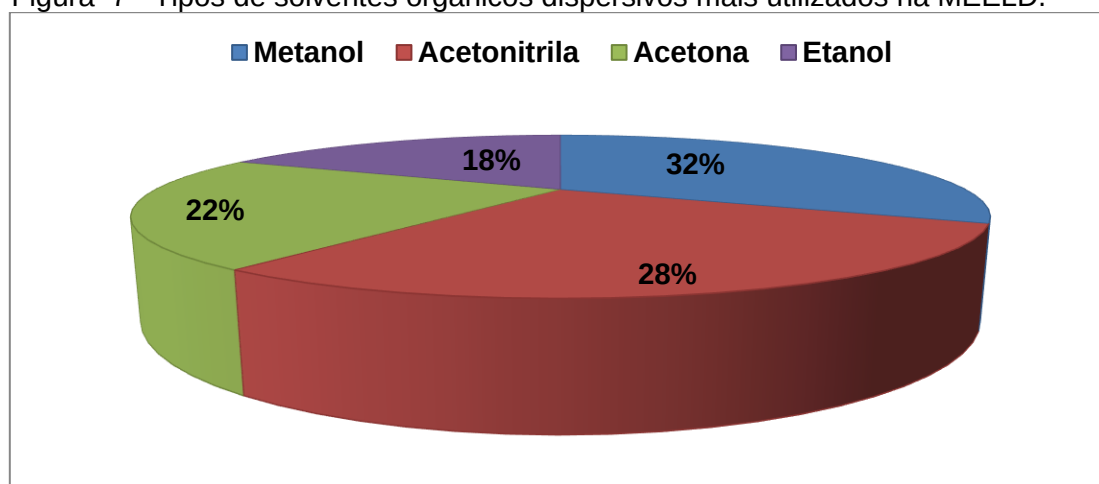
Procedimentos combinados (sonicação e mistura por vórtex) podem também ser empregados na MELLD, atuando como energia auxiliar e consequentemente contribuindo no processo de emulsificação da amostra com os solventes. (CHEN, WEI *et al.*, 2016; ZHANG, YUFENG; LEE, 2012; ZHAO *et al.*, 2016). Outro teste também realizado, buscando aumentar a recuperação dos analitos na microextração é o banho de gelo. Nesta etapa avalia-se se a redução de temperatura propicia a resposta da técnica, contribuindo para a dispersão entre os líquidos da extração (BERIJANI *et al.*, 2006; PARRILLA VÁZQUEZ *et al.*, 2013a)

Figura 6 - Tipos de solventes orgânicos de extração mais utilizados na MEELD.



Fonte: Adaptado de Campillo et al, 2017

Figura 7 - Tipos de solventes orgânicos dispersivos mais utilizados na MEELD.



Fonte: Adaptado de Campillo et al, 2017

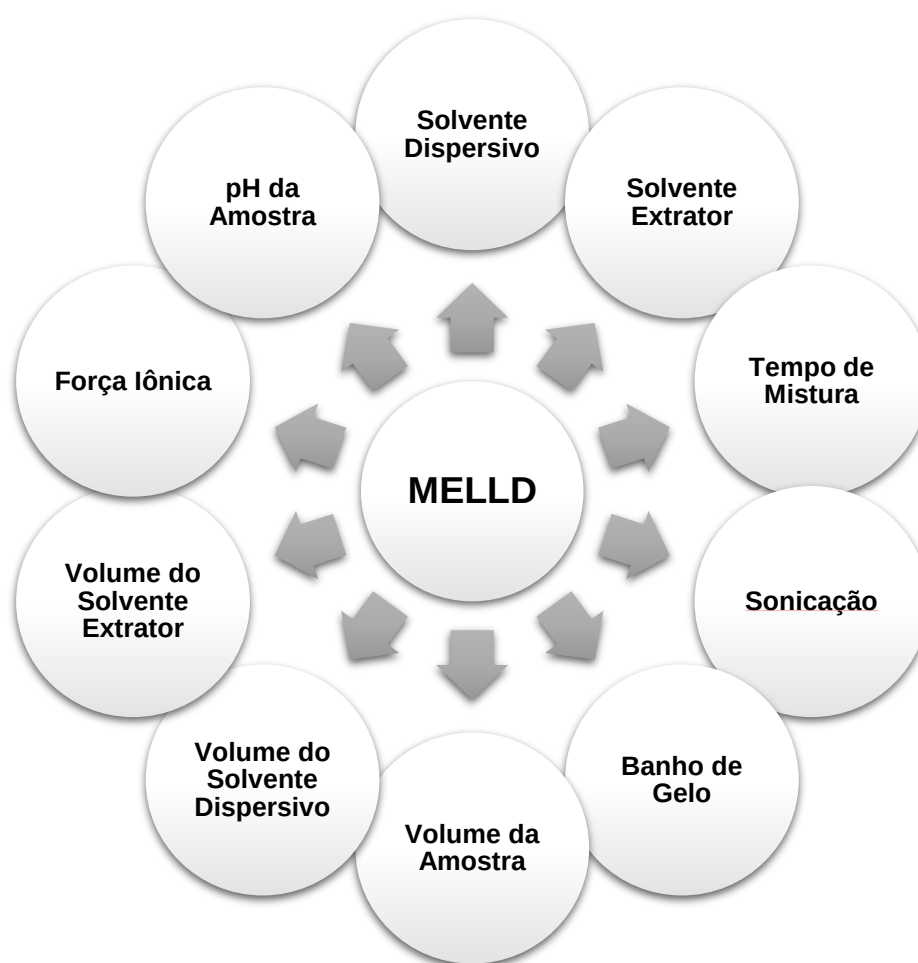
1.5 Desenho experimental

Muitos procedimentos utilizam a combinação univariada para a determinação da melhor resposta experimental, onde todos os parâmetros relacionados sofrem variação enquanto as outras variáveis são mantidas fixadas em um conjunto específico de condições, fornecendo assim uma aproximação do efeito de cada variável na resposta. No entanto, este procedimento requer um número alto de execuções, além do elevado consumo de tempo de análise (CHÁVEZ-MORENO *et al.*, 2018; XIA; XIANG; ZHANG, 2008).

A abordagem estatística baseada no desenho experimental (Design of Experiments - DoE) para otimização de processos vem ganhando espaço no cenário analítico como ferramenta importante, pois permite o delineamento de uma resposta ótima, com a seleção de variáveis e níveis dessas variáveis de maior influência no processo. Além disso, avalia a interação entre os parâmetros e reduz o número de experimentos necessários, mantendo a confiabilidade estatística dos modelos gerados (KHODADOUST; HADJMOHAMMADI, 2011; RODRIGUES; IEMMA, 2014).

As técnicas de preparo de amostras apresentam diversas variáveis que necessitam ser avaliadas para se obter respostas satisfatórias de recuperação dos analitos. O mesmo acontece com a MELLD, sendo preciso avaliar com apoio da literatura, quais as variáveis que influenciam essa microtécnica em função da recuperação desejada (Figura 8).

Figura 8 - Principais variáveis que influenciam a MELLD.



Fonte: Adaptado de Moreira et al, 2014

Diante desse panorama, o planejamento experimental é uma ferramenta apropriada no aprimoramento de metodologias analíticas e assim vem sendo aplicado na seleção e melhora de desempenho das variáveis da MEELD (MOUSAVI; TAMIJI; KHOSHAYAND, 2018).

Segundo Moreira et al (2014) recentemente, trabalhos que usam a DLLME no preparo de amostra, vem utilizando o delineamento experimental em duas fases: o delineamento Plackett–Burman – PB seguido do delineamento composto central rotacional – DCCR (Figura 9).

A primeira fase é o PB, um design de triagem que visa selecionar quais as principais variáveis que afetam a resposta do modelo, sendo mais eficiente na identificação de efeitos principais, não avaliando interações entre variáveis. Geralmente esse tipo de desenho experimental é tratado como um modelo polinomial de primeira ordem, onde os fatores do modelo estimado podem ser

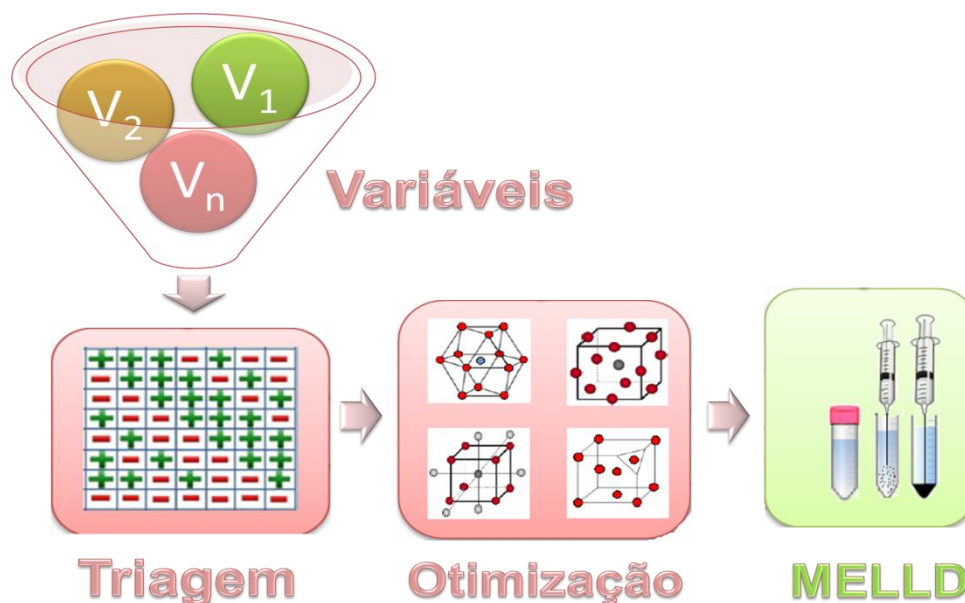
verificados pela análise de variância (ANOVA)(HAMADA; WU, 1992; PHOA; WONG; XU, 2009).

Após a indicação dos principais parâmetros, segue-se para a segunda fase do planejamento experimental. O DCCR é um dos modelos de otimização mais utilizados na avaliação dos valores numéricos e as interações entre variáveis. Esta fase é constituída por três componentes: (a) o planejamento fatorial incluindo todas as combinações possíveis entre as variáveis dos níveis inferior e superior; (b) os pontos axiais, em que a codificação de todos os fatores está centralizada; e (c) os pontos centrais, nos quais todos os ensaios tem a mesma codificação central, ou seja, o mesmo valor fixado (MOUSAVI; TAMIJI; KHOSHAYAND, 2018; RODRIGUES; IEMMA, 2014).

Visando atender os critérios estabelecidos pelas agências reguladoras e alcançar as melhores condições de resposta, a função de desejabilidade, do inglês *desirability function* é uma opção estatística viável nos processos de otimização (DERRINGER; SUICH, 1980). Essa ferramenta desenvolvida em 1980 por Derringer e Suich se tornou uma das soluções de otimização de experimentos de respostas multivariadas, permitindo que o analista encontre os níveis das condições experimentais para alcançar, simultaneamente, a resposta ideal para todas as variáveis avaliadas, incluindo as prioridades do pesquisador durante o processo de otimização (DERRINGER; SUICH, 1980; VERA CANDIOTI *et al.*, 2014).

Dessa maneira, por meio da combinação do PB e do DCCR com a aplicação da função de desejabilidade, se torna possível construir uma superfície de resposta que representa estatisticamente a melhor condição do modelo, através de uma equação matemática.

Figura 9 - Esquema das fases do planejamento experimental para otimização da MELLD.



Fonte: Adaptado de Mousavi et al., 2018.

1.6 Validação de método

Os resultados analíticos obtidos em ensaios de laboratório necessitam de critérios que possam avaliar e fornecer confiabilidade nos resultados alcançados. Dessa forma, o atendimento desse passo está na validação do método pretendido.

A validação de um método busca demonstrar se o estudo experimental está apropriado conforme as aplicações e parâmetros estabelecidos pelas agências reguladoras e conforme enquadramento de cada metodologia (INMETRO, 2003)

O Brasil possui duas agências credenciadoras que visam verificar e orientar quanto aos critérios e as competências adotadas pelos laboratórios. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Nacional de Metrologia e Normalização (INMETRO) disponibilizam procedimentos de validação de métodos analíticos por meio da Resolução Anvisa RE nº 166', de 25/07/2017 e o documento INMETRO DOQ-CGCRE-008, de março de 2003, respectivamente

No cenário internacional diversos órgãos adotam diretrizes por meio de guias ou documentos oficiais para o enquadramento dos processos de

validação como o *International Conference on Harmonisation* (ICH), *International of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), *International Standard Organization* (ISO) entre outros. Seguindo o mesmo princípio, algumas agências formalizam orientações de validação de forma mais específica, conforme a característica da matriz, como por exemplo, a *Environmental Protect Agency* (EPA) para análise de amostras ambientais e a *Food and Drug Administration* (FDA) para análise de alimentos e amostras biológicas.

Os parâmetros abordados no processo de validação normalmente são: seletividade, linearidade, faixa de trabalho, precisão, exatidão (recuperação), limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e robustez. Porém esses parâmetros devem estar relacionados a intenção do uso do método e podem ser direcionados e selecionados de forma a atender a necessidade analítica estabelecida com avaliações estatísticas e critérios de aceitação de resultados. (RIBANI *et al.*, 2004)

1.6.1 Efeito de Matriz

O efeito de matriz é um parâmetro que visa avaliar como um aumento ou uma supressão de sinal na resposta do detector é influenciada, quando comparamos a presença do analito no extrato da matriz com o mesmo analito presente em um solvente orgânico (CALDAS; , 2009). Nesse sentido o efeito de matriz pode influenciar nos processos de validação, sendo de fundamental importância seu dimensionamento em matrizes complexas (STEENE; LAMBERT, 2008)

Devido à complexidade e variabilidade das matrizes ambientais, o efeito de matriz pode surgir de substâncias desconhecidas e imprevisíveis. Com isso uma atenção especial deve ser dada, visando melhorar as condições instrumentais e de preparo de amostras. Uma forma consolidada no combate aos efeitos de matriz é a utilização de padrões internos marcados isotopicamente (BENIJTS *et al.*, 2004; STEENE; LAMBERT, 2008)

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Preparo Experimental

2.1.1 Analitos

Padrões de bisfenol A (98,7%, CAS 80-05-7), bisfenol A d_{16} (100,0%, CAS 96210-87-6), bisfenol S ($\geq 98,0\%$, CAS 80-09-1), bisfenol F ($\geq 98,0\%$, CAS 620-92-8), bisfenol AF ($\geq 99\%$, CAS 1478-61-1) e benzofenona (99,9%, CAS 119-61-9) foram adquiridos da Sigma-Aldrich, assim como os solventes e demais reagentes utilizados nas extrações. Água deionizada ultrapura (resistividade de 18,2 M Ω cm) utilizada ao longo dos experimentos foi obtida com um sistema de purificação de água Milli-Q[®] (Milli-Q Direct 8, Millipore).

2.1.2 Limpeza das vidrarias

A limpeza das vidrarias foi realizada com água corrente seguida da rinsagem de uma sequência de solventes: (1) hexano, (2) água deionizada, (3) metanol, (4) água ultrapura. Depois dessa etapa as vidrarias foram levadas à estufa para a secagem por 1h (60°C).

2.1.3 Soluções estoque

As soluções estoques de todos os analitos (1000 mg.L⁻¹) foram preparadas individualmente com dissolução em metanol (MeOH) e armazenadas sob refrigeração a 10 °C.

2.1.4 Filtração das amostras

As amostras foram inicialmente filtradas à vácuo com membrana fibra de vidro 0,7 μ m de porosidade e 47 mm de diâmetro (Merck – Millipore).

2.2 Critério de escolha das variáveis

A seleção das variáveis e suas respectivas faixas, comumente utilizadas na avaliação da MELLDD foi realizada com base no apontamento bibliográfico e

nas condições laboratoriais de infraestrutura e disponibilidade de materiais e reagentes. Com isso, tornou-se possível indicar as variáveis independentes iniciais para o planejamento experimental (Tabela 2).

2.3. Procedimento de Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (MELLD)

Os ensaios foram conduzidos segundo as condições estabelecidas por um Desenho Experimental (Design of Experiments - DoE), conforme Tabelas 2, 3 e 4, utilizando como matriz água ultrapura, de acordo com os seguintes passos ou etapas:

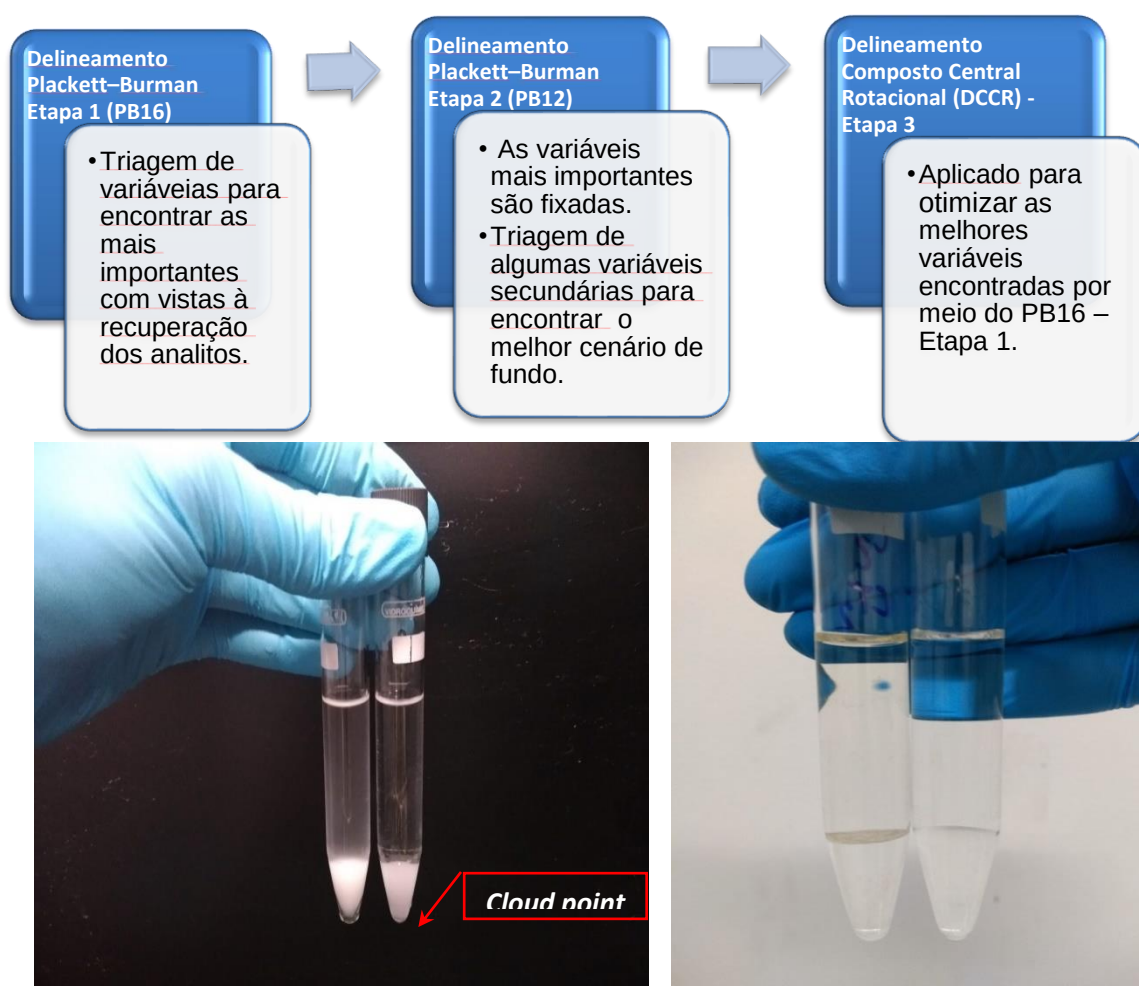
1. O pH da amostra foi ajustado antes das análises para assegurar que as condições de extração definidas no DoE foram alcançadas, com auxílio do medidor multiparâmetro (Orion Star, Thermo Scientific);
2. Uma quantidade adequada de sal foi adicionada para ajustar a salinidade, de acordo com o DoE;
3. A quantidade de amostra pré-estabelecida foi adicionada a um tubo de vidro de 15 mL com fundo cônico;
4. A quantidade estabelecida do respectivo solvente de dispersão foi adicionada ao tubo;
5. A quantidade estabelecida do respectivo solvente de extração foi, em seguida, também adicionada ao tubo (Figura 11);
6. O tubo com amostra e solventes foi colocado em um equipamento de mistura do tipo vórtex (VM 1300, Vixar) durante o tempo estabelecido no DoE;
7. O tubo com a amostra e solventes foi inserido em um equipamento de banho para sonicação (1400A, Unique) pelo tempo definido no DoE, quando necessário;
8. O tubo com amostra foi inserido em um banho de gelo, durante o período estabelecido no DoE, quando necessário;

9. A mistura foi centrifugada por 15 min a 4000 rpm (Centrífuga 5810R, Eppendorf);
10. A fase sedimentada foi retirada com uma micropipeta;
11. O extrato foi evaporado gentilmente com purga de gás nitrogênio em temperatura ambiente e reconstituído para 200 μ L com uma solução de MeOH:H₂O (1:1) (fase móvel aplicada no método cromatográfico) e injetado na coluna de UPLC para análise.

2.4 Desenho Experimental

A Figura 10 e as Tabelas 2, 3 e 4 apresentam o DoE em etapas.

Figura 10 - de otimização aplicada na MELLD.



(a) (b)
 Legenda: (a) - Formação das microgotas (*Cloud point*) com a adição dos solventes dispersivo e extrator; (b) - Separação das fases após a etapa de centrifugação.

Fonte: Autor, 2019

Tabela 2 - Plackett-Burman (PB16): Matriz decodificada para os experimentos na Etapa 1.

Ensaio	(SD)	(SE)	VSD (μ L)	VSE (μ L)	VA (mL)	pH	AS (%)	TM (s)	SONIC (s)	BG (min)
1	Acetonitrila	Clorofórmio	200	200	10	4	0	30	60	0
2	Acetonitrila	Diclorometano	200	200	5	11	0	0	60	05:00
3	Acetonitrila	Diclorometano	1000	200	5	4	10	0	0	05:00
4	Acetonitrila	Diclorometano	1000	1000	5	4	0	30	0	0
5	Acetona	Diclorometano	1000	1000	10	4	0	0	60	0
6	Acetonitrila	Clorofórmio	1000	1000	10	11	0	0	0	05:00
7	Acetona	Diclorometano	200	1000	10	11	10	0	0	0
8	Acetonitrila	Clorofórmio	1000	200	10	11	10	30	0	0
9	Acetonitrila	Diclorometano	200	1000	5	11	10	30	60	0
10	Acetona	Diclorometano	1000	200	10	4	10	30	60	05:00
11	Acetona	Clorofórmio	1000	1000	5	11	0	30	60	05:00
12	Acetonitrila	Clorofórmio	200	1000	10	4	10	0	60	05:00
13	Acetona	Diclorometano	200	200	10	11	0	30	0	05:00
14	Acetona	Clorofórmio	1000	200	5	11	10	0	60	0
15	Acetona	Clorofórmio	200	1000	5	4	10	30	0	05:00
16	Acetona	Clorofórmio	200	200	5	4	0	0	0	0
17-19	1:1 ^(a)	1:1 ^(b)	600	600	7,5	7,5	5	15	30	02:30

Solvente Dispersivo (SD); Solvente Extrator (SE); Volume do Solvente Dispersivo (VSD); Volume do Solvente Extrator (VSE); Volume da Amostra (VA); pH; Adição de Sal (AS); Tempo de Mistura com Vórtex (TM); Tempo de Sonicação (SONIC); Tempo em Banho de Gelo (BG); ^(a) Acetonitrila: Acetona (1:1); ^(b) Clorofórmio: Diclorometano (1:1).

Tabela 3 - Plackett-Burman (PB12): matriz decodificada para os experimentos na Etapa 2.

Ensaio	SD	SE	pH	AS (%)	TM (s)
1	Acetonitrila	Clorofórmio	4	0	30
2	Acetonitrila	Diclorometano	2	10	30
3	Metanol	Diclorometano	4	0	60
4	Acetonitrila	Clorofórmio	4	10	30
5	Acetonitrila	Diclorometano	2	10	60
6	Acetonitrila	Diclorometano	4	0	60
7	Metanol	Diclorometano	4	10	30
8	Metanol	Clorofórmio	4	10	60
9	Metanol	Clorofórmio	2	10	60
10	Acetonitrila	Clorofórmio	2	0	60
11	Metanol	Diclorometano	2	0	30
12	Metanol	Clorofórmio	2	0	30
13-16	1:1 ^(a)	1:1 ^(b)	3	5	45

Solvente Dispersivo (SD); Solvente Extrator (SE); pH; Adição de Sal (AS); Tempo de Mistura com Vortex (TM); (a) Acetonitrila: Acetona (1:1); (b) Clorofórmio: Diclorometano (1:1).

A avaliação e seleção de variáveis e condições consideradas relevantes para otimização do MELLD foram acessadas a partir da construção de duas matrizes sucessivas (Etapas 1 e 2) do Delineamento Plackett-Burman (PLACKETT; BURMAN, 1946) (PB), seguidas pelo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) combinado com a função de desejabilidade para otimização (*desirability function for optimization*) realizada com o Software MINITAB 19 (RODRIGUES; IEMMA, 2014).

As matrizes foram construídas e analisadas com o apoio do Software Protimiza Experimental Design (PROTOMIZA, 2014).

2.4.1 Etapa 1 - Matriz PB16

A primeira matriz (PB16) foi construída utilizando-se 10 variáveis independentes para otimizar o processo, o que resultou em 19 ensaios, com triplicatas nos pontos centrais (Tabela 2). As seguintes variáveis independentes foram incluídas no desenho experimental, sendo que os níveis máximo e mínimo para cada variável foram obtidos a partir da revisão bibliográfica em literatura especializada. As 10 variáveis foram: Solvente Extrator (SE); Solvente

Disperso (SD); Volume do Solvente Extrator (VSE); Volume do Solvente Dispersor (VSD); Volume da Amostra (VA); pH; Adição de Sal (AS); Tempo de mistura com Vórtex (TM); Sonicação (SONIC) e Banho de Gelo (BG).

2.4.2 Etapa 2 - Matriz PB12:

A segunda matriz PB (PB12) foi elaborada com base nos resultados dos ensaios montados com a primeira matriz. Neste segundo delineamento Plackett-Burman (PB12), algumas das variáveis mais importantes tiveram os seus níveis fixados, com base nas melhores respostas obtidas (ou seja, condições que resultaram na mesma taxa de recuperação observada para o analito de interesse). Tais níveis ou valores que resultaram na melhor taxa de recuperação foram fixados, para que as variáveis de menor relevância fossem então testadas (Tabela 3). Neste caso o delineamento sucessivo também pode ser uma ferramenta de triagem, visando explorar a contribuição das variáveis menos relevantes na resposta global do modelo.

2.4.3 Etapa 3 – Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

Finalmente, um DCCR baseado na metodologia de superfície de resposta (*Response Surface Methodology*-RSM) foi aplicado (BOX; WILSON, 1951) para otimizar as variáveis mais relevantes encontradas na Etapa 1 - PB16, enquanto todas as outras variáveis foram fixadas, de acordo com a triagem da Etapa 2 - PB12.

A principal vantagem do DCCR sobre o planejamento fatorial completo é que ele fornece resultados semelhantes com menos experimentos. Essa metodologia inclui planejamento de experimentos; análise dos efeitos de cada variável e as interações entre as variáveis nas respostas; desenvolvimento de modelos de regressão para prever e melhorar as condições operacionais e a construção de modelos reais. O número de experimentos de um DCCR é:

$$2^k + 2k + C_p \quad \text{Eq. 01}$$

Onde:

C_p = número de replicatas do ponto central;

k = número de fatores.

No presente estudo, o DCCR foi construído utilizando 3 (três) variáveis independentes para otimizar o processo, resultando em 17 ensaios, incluindo triplicatas no ponto central (ensaios 15, 16 e 17 na Tabela 4).

Tabela 4 - Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) decodificado.

Ensaio	TM (s)	VSD (μL)	VSE (μL)
1	15	500	500
2	45	500	500
3	15	1500	500
4	45	1500	500
5	15	500	1500
6	45	500	1500
7	15	1500	1500
8	45	1500	1500
9	4,77	1000	1000
10	55,2	1000	1000
11	30	159,1	1000
12	30	1841	1000
13	30	1000	159,1
14	30	1000	1841
15	30	1000	1000
16	30	1000	1000
17	30	1000	1000

Tempo de Mistura com Vortex (TM); Volume Solvente Dispersivo (SD); Volume Solvente Extrator (VSE).

2.5 Cromatografia em fase líquida e espectrometria de massas

Os analitos foram identificados e quantificados por meio de equipamento de cromatografia em fase líquida de ultra eficiência sistema WATERS ACQUITY® acoplado a um espectrômetro de massas *in tandem* Xevo TQD®, Quadrupolo (UPLC-MS/MS Waters) (Figura 12). A coluna utilizada foi a AQUITY UPLC® BEH C18, 50 mm x 2,1 mm x 1.7 μm , (Waters) a 50°C, com vazão de 0,4 mL min⁻¹ e as fases móveis A (água ultrapura) e B (metanol), ambos com 0,01% de hidróxido de amônia. O volume de injeção foi 5 μL e o tempo de corrida foi de 8 min, no modo gradiente, com condição inicial de 90% de fase A até 4 min, sendo então reduzido a 1% dessa fase até 5 min e finalmente,

retornando e permanecendo no estado inicial até o final da corrida. O detector de massa fonte *electrospray* (ESI) foi operado em ambos os modos (negativo e positivo) com monitoramento de reação múltipla (MRM). A tensão capilar foi de $\pm 3,2$ kV (dependendo do modo de ionização). As temperaturas da fonte e de dessolvatação foram 150 °C e 600 °C respectivamente. Nitrogênio (N₂) foi utilizado como gás de cone e de dessolvatação (150 e 1100 L h⁻¹, respectivamente). Argônio (Ar) foi utilizado como gás de colisão no detector de massas MS/MS (0,15 mL min⁻¹).

Para cada analito, duas transições (confirmação e quantificação) foram utilizadas para identificação, de acordo com a energia de colisão e voltagem do cone otimizada para intensidade máxima. Os parâmetros de detecção encontram-se listados na Tabela 5. O processamento de dados foi feito pelo software Mass Lynx v 4.1 (Waters).

Figura 10- Cromatografia em fase líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas XEVO TQD, Triplo Quadrupolo – Waters.



Fonte: Acervo LABIFI-UERJ, 2018.

2.6 Parâmetros físico-químicos

O Carbono Orgânico Dissolvido (COD) foi quantificado com o equipamento *Total Organic Carbon Analyzer* (TOC-V CPN, Shimadzu) e as porções filtradas das amostras foram utilizadas para análise (Figura 13). A salinidade foi medida com auxílio de um refratômetro portátil (REF 211, Nova Instruments). O pH foi ajustado por meio do medidor de bancada (Orion Star, Thermo Scientific).

Figura 11 - Analisador de carbono orgânico total (TOC-V CPN, Shimadzu)



Fonte: Autor, 2019

Tabela 5 - Determinação da melhor condição dos parâmetros do MS/MS para cada substância-alvo.

Substância	Modo de Ionização (ESI ^(b))	t _{Rm} ^(c) (min)	Precursor (m/z)	Quantificação			Confirmação		
				Produto (m/z)	EC ^(a) (V)	Cone (V)	Produto (m/z)	EC (V)	Cone (V)
BPA	(-)	3,6	227,0	212,0	18	45	133,0	25	45
BPA _{d16}	(-)	3,6	241,3	223,3	19	45	142,3	25	45
BPS	(-)	0,33	249,0	108,0	25	35	159,0	25	35
BPF	(-)	3,2	199,0	93,0	20	35	105,0	18	35
							77,0	20	35
BPAF	(-)	3,9	334,9	265,0	25	35	197,0	30	35
BZP	(+)	3,9	183,0	105,0	15	32	77,0	30	32

^(a)EC: Energia de Colisão; ^(b)ESI: Ionização por *Electrospray*, ^(c)Tempo de retenção médio..

2.7 Matrizes Aquosas Complexas

Amostras de 5 (cinco) matrizes aquosas reais foram coletadas: (1) Esgoto bruto (EBM) e (2) Esgoto tratado (ETM) de uma estação de tratamento de esgotos municipal localizada na cidade do Rio de Janeiro, composta de tratamento preliminar, primário e secundário (biológico); (3) Esgoto bruto (EBC) e (4) Esgoto tratado (ETC) de uma estação de tratamento de esgotos condominial (edifício residencial), composta por

tratamento preliminar e primário localizado na zona oeste do Estado do Rio de Janeiro; (5) Água superficial (ABG) de um ponto amostral (22°48'33.5"S, 43°10'39.2"W) da Baía de Guanabara, na cidade do Rio de Janeiro.

O procedimento amostral, acondicionamento, transporte e armazenamento das amostras seguiu o estabelecido em norma nacional e internacional (APHA - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2012; CETESB - ANA, 2011).

As amostras foram filtradas e o padrão deuterado BPA d_{16} foi adicionado em todas as amostras a fim de mitigar os efeitos de supressão iônica ou aumento de sinal superestimado.

2.8 Validação do Método

A metodologia de análise por cromatografia em fase líquida foi validada utilizando-se os parâmetros de linearidade, faixa linear, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), limite de detecção do método (LDM), limite de quantificação do método (LQM), exatidão (taxa de recuperação-REC%), precisão (Desvio Padrão Relativo-DPR%) e finalmente, efeito matriz (ICH, 2005). As curvas de analíticas foram construídas por regressão linear da taxa entre a área de cada composto com seu padrão interno (PI) e a concentração do analito, utilizando Metanol:H₂O (1:1), como solvente.

A taxa de recuperação (REC%) e o efeito matriz (EM%) foram avaliados por meio de 3 (três) grupos de amostras (Equações 2 e 3): (1) uma delas consistindo de substância padrão pura (C1); (2) outra preparada em uma matriz em branco (diferentes fontes de esgoto) extraída e fortificada após a extração (C2); e (3) a terceira, enriquecida antes da extração (C3) (B. K. MATUSZEWSKI; M. L. CONSTANZER; CHAVEZ-ENG, 2003).

$$REC\% = (\text{área C3}/\text{área C2}) \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

$$EM\% = (\text{área C2}/\text{área C1}) \times 100 \quad (\text{Eq. 3})$$

2.9 Análise Estatística

As matrizes do desenho experimental foram construídas e analisadas com o apoio do Software Protimiza Experimental Design (PROTOMIZA, 2014).

A ferramenta desejabilidade e o tratamento das curvas analíticas foram analisados com auxílio do Software MINITAB 19.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Delineamento Experimental PB16 - Etapa 1

A Tabela 6 apresenta as taxas de recuperação dos analitos sob condições definidas pela matriz Plackett-Burman – Etapa 1 (PB16).

Tabela 6 - Recuperações dos compostos-alvo obtidos pela matriz Plackett-Burman – Etapa 1 (PB16).

Ensaio	BPA (%)	BPA _{d16} (%)	BPS (%)	BPF (%)	BPAF (%)	BZP (%)
1	33,4	36,1	0,98	13,6	43,8	0,2
2	8,8	9	0	9,4	8,4	0,2
3	30,9	36,3	0	31,9	27,9	5,7
4	99,5	110,6	63,3	113,2	100,5	54,3
5	26,2	29,9	19,7	30,1	27	0,1
6	18,3	20,2	0	16,2	18	0,2
7	9,7	11,5	0	9,7	11,1	0,1
8	68,4	75,9	0	56,8	68,9	0,4
9	82,2	91,2	0	79,8	69,7	14,8
10	55,5	62,7	8,02	60,2	51	3,6
11	90,8	101,1	0,1	99,1	102,6	0,3
12	15,9	18,1	0,8	16,9	17,5	0,1
13	8,52	9,1	0,1	2,3	4,8	0,3
14	25,9	28,4	0	27,7	29,3	0,3
15	91,9	81,1	22,7	103,5	87,3	2,1
16	9,7	11	5,47	10,2	10,1	0,2
17	34,7	39,1	6,3	29,3	41,6	0,2
18	39,6	44,5	4,6	35,8	49,9	0,2
19	56,4	53,2	5,3	38,3	52,3	0,2

*Em negrito, as melhores taxas de recuperação.

De acordo com os resultados, a melhor recuperação foi obtida nas condições do ensaio 4, como se segue: solvente extrator (SE): diclorometano;

solvente dispersivo (SD): acetonitrila; volume do solvente extrator (VSE): 1000 μ L; volume do solvente dispersivo (VSD): 1000 μ L; volume da amostra (VA): 5 mL; pH: 4; sem adição de sal (AS); tempo de mistura com vórtex (TM): 30 segundos; sem sonificação (SONIC) e; sem banho de gelo (BG). Sob tais condições, as recuperações obtidas foram 99.5% para BPA; 110.6% para BPAd₁₆; 63.3% para BPS; 113.2% para BPF; 100.5% para BPAF e; 54.3% para BZP. Recuperações excelentes foram observadas para BPA, BPAd₁₆, BPF e BPAF. Para esses 4 analitos, as taxas de recuperação alcançaram níveis exigidos pelas agências de controle, em termos de recuperação de substâncias-alvo (70-120%) (AOAC, 2011; EPA, 1992; INMETRO, 2003). A Tabela 7 apresenta os principais resultados dos efeitos primários das variáveis sobre as taxas de recuperação.

Tabela 7 - Tabela de Efeitos das variáveis relevantes no PB16.

Analito	Variável	Efeito	Erro Padrão	t calc	valor p
BPA	Média	42,22	2,39	17,63	5E-07
	VSD. (x ₃)	19,43	4,79	4,06	5E-03
	VSE (x ₄)	24,18	4,79	5,05	1E-03
	VA (x ₅)	-25,48	4,79	-5,32	1E-03
	TM (x ₈)	48,09	4,79	10,04	2E-05
BPAd ₁₆	Média	39,35	2,25	17,52	5E-07
	SD (x ₁)	8,93	4,49	1,99	9E-02
	VSD (x ₃)	20,59	4,49	4,58	3E-03
	VSE (x ₄)	22,93	4,49	5,10	1E-03
	VA (x ₅)	-24,92	4,49	-5,54	9E-04
	TM (x ₈)	45,15	4,49	10,05	2E-05
	BG (x ₁₀)	-8,93	4,49	-1,99	9E-02
BPS	Média	7,57	2,96	2,56	4E-02
	VSE (x ₄)	11,50	5,91	1,94	9E-02
	pH (x ₆)	-15,10	5,91	-2,55	4E-02
BPF	Média	42,53	2,51	16,93	6E-07
	VSD (x ₃)	23,72	5,02	4,72	2E-03
	VSE (x ₄)	32,06	5,02	6,38	4E-04
	pH (x ₆)	-9,82	5,02	-1,96	9E-02
	AS (x ₇)	11,56	5,02	2,30	5E-02
	TM (x ₈)	47,02	5,02	9,36	3E-05

BPAF	Média	42,37	2,50	16,93	6E-07
	SE (x_2)	-9,638	5,00	-1,93	1E-01
	VSD (x_3)	21,56	5,00	4,31	4E-03
	VSE (x_4)	23,69	5,00	4,73	2E-03
	VA (x_5)	-24,21	5,00	-4,84	2E-03
	TM (x_8)	47,41	5,00	9,48	3E-05
BZP	Média	5,19	2,32	2,24	6E-02
	SE (x_2)	9,40	4,63	2,03	8E-02
	VA (x_5)	-9,11	4,63	-1,97	9E-02
	SD (x_1)	8,62	4,63	1,86	1E-01
	TM (x_8)	8,63	4,63	1,86	1E-01

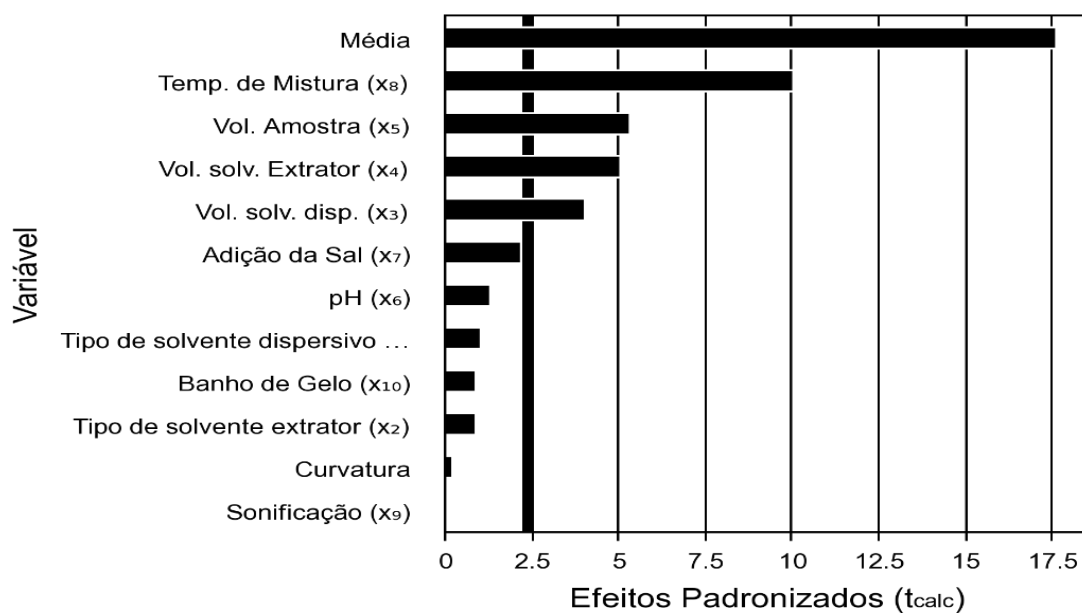
Tempo de Mistura com Vortex (TM); Solvente Dispersivo (SD); Solvente Extrator (SE); Volume Solvente Dispersivo (SD); Volume Solvente Extrator (VSE); Volume da Amostra (VA); Adição de Sal (AS).

3.1.1 Efeitos das variáveis independentes sobre a recuperação de cada composto-alvo

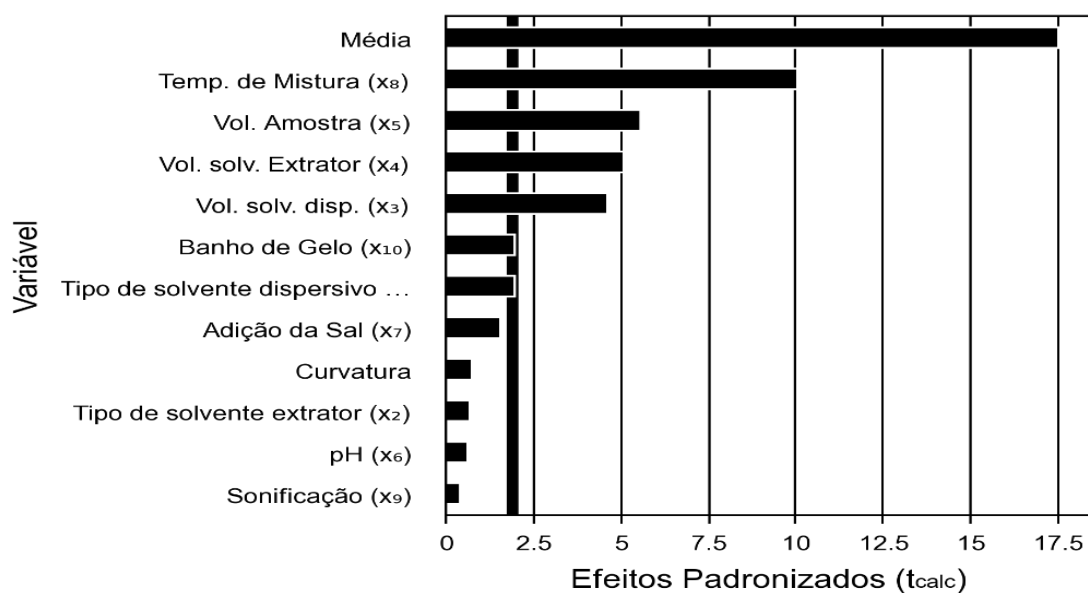
✓ BPA

Sob as condições experimentais aplicadas, volumes maiores de solvente dispersivo (VSD) resultaram em melhor recuperação do analito BPA (1000 μ L foi melhor do que 200 μ L de VSD). Adicionalmente, volumes maiores de solvente extrator resultaram em melhor recuperação do analito (1000 μ L foi melhor do que 200 μ L de VSE). Por outro lado, volumes menores de amostra (VA) resultaram em melhor recuperação de BPA (5 mL foi melhor do que 10 mL de VA). Períodos mais longos de mistura (TM) resultaram em recuperação superior (30 segundos foi melhor do que não aplicar nenhum tempo a mistura) (Figura 14).

Figura 12 - Diagrama de Pareto dos Efeitos Padronizados PB16 - BPA

✓ **BPA_{d16}**

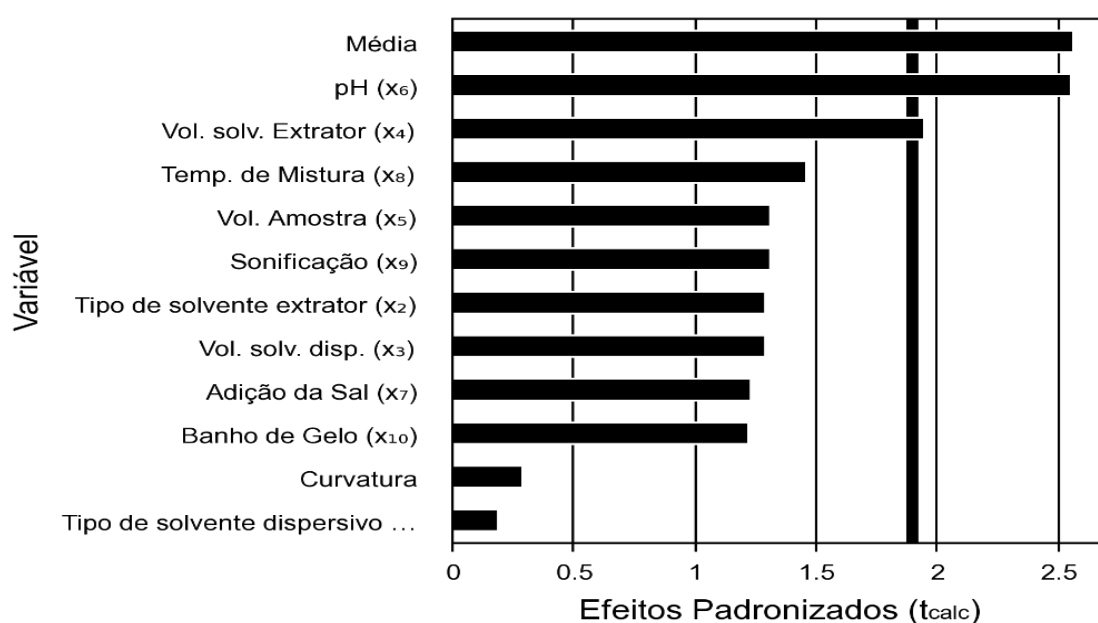
Os resultados em termos de recuperação do padrão deuterado BPA_{d16} foram similares aos observados para BPA. Entretanto, para BPA_{d16} os resultados sugerem o uso de acetonitrila como solvente dispersivo (SD) e nenhum uso de banho de gelo (BG) (Figura 15).

Figura 13 - Diagrama de Pareto dos Efeitos Padronizados PB16 - BPA_{d16}

✓ **BPS**

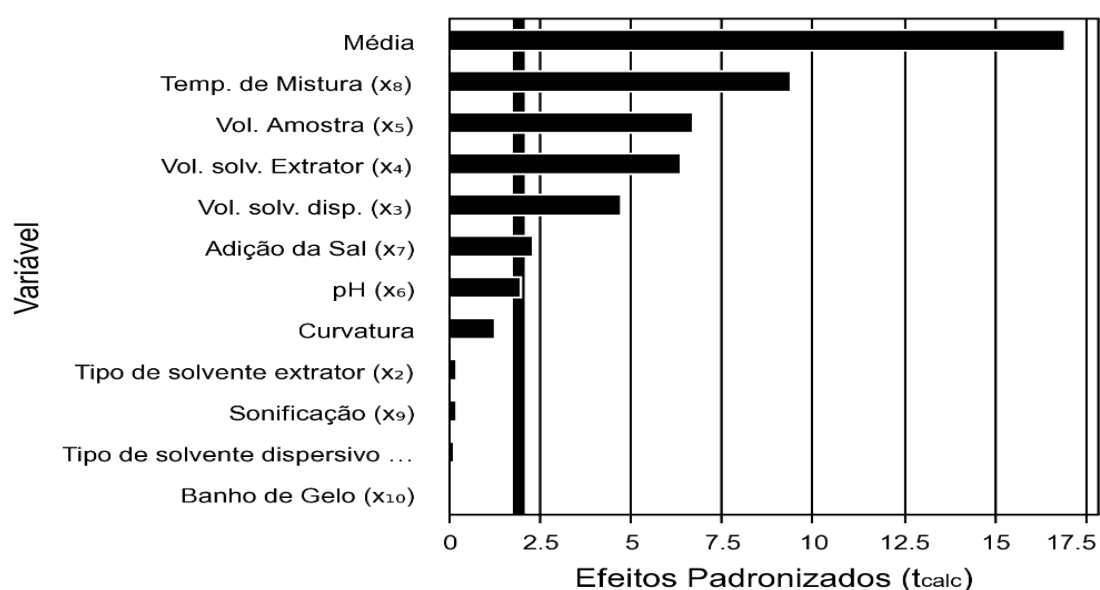
De forma semelhante ao observado para BPA e BPA_{d16}, volume maior de solvente extrator (VSE) resultou em melhor recuperação (1000 µL foi melhor do que 200 µL de VSE). Adicionalmente, pH ácido resultou em melhor recuperação do que pH básico (pH 4 foi melhor do que pH 11) (Figura 16).

Figura 14 - Diagrama de Pareto dos Efeitos Padronizados PB16 - BPS

✓ **BPF**

De forma similar ao efeito observado para BPA, BPA_{d16} e BPS, volume maior de solvente extrator (VSE) resultou em melhor recuperação (1000 µL foi melhor do que 200 µL de VSE) e volume maior de solvente dispersivo (VSD), igualmente resultou em melhor recuperação de BPF (1000 µL foi melhor do que 200 µL de VSD). O pH ácido resultou em melhor recuperação do que o pH básico (pH 4 foi melhor do que pH 11). Tempo de mistura (TM) mais longo resultou em melhor recuperação. A adição de sal (10%) resultou em melhor recuperação de BPF (Figura 17).

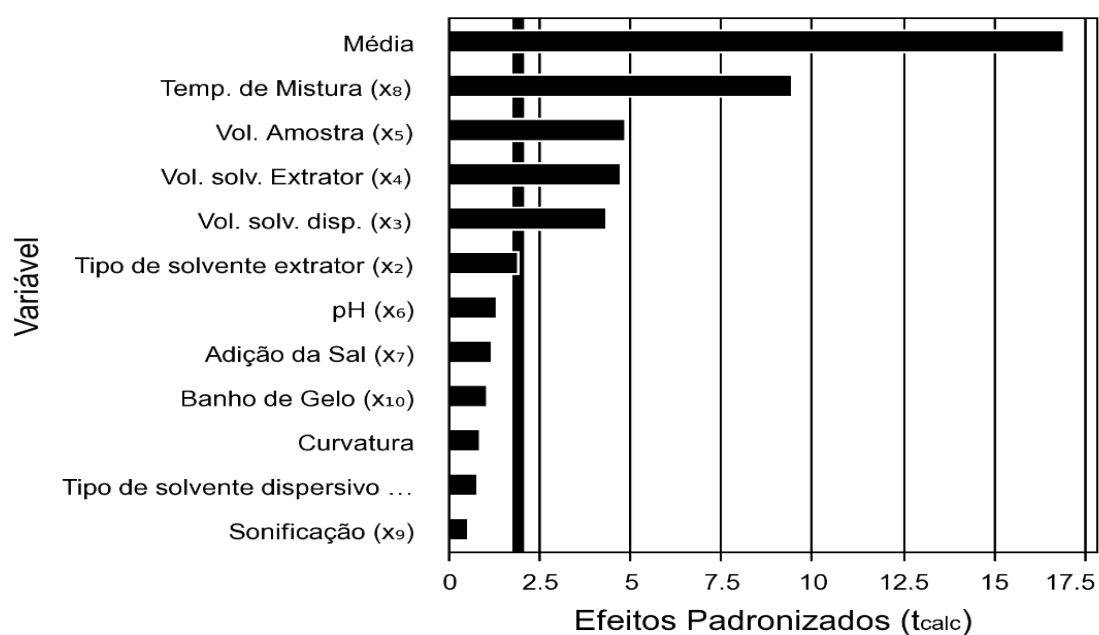
Figura 15 - Diagrama de Pareto dos Efeitos Padronizados PB16 - BPF



✓ BPAF

Acompanhando o comportamento dos demais analitos (BPA, BPA_{d16}, BPS e BPF), o efeito positivo do volume de solvente extrator (VSE) resultou em melhor resposta (1000 μ L foi melhor do que 200 μ L), assim como volumes maiores de solvente dispersivo (VSD) demonstraram recuperações superiores de BPAF (1000 μ L foi melhor do que 200 μ L). Adicionalmente, o efeito negativo do volume de amostra (VA), gerou melhor recuperação (5 mL foi melhor do que 10 mL de VA). Tempos mais longo de mistura (TM) foram determinantes para melhores respostas, da mesma forma a recomendação do uso de diclorometano como solvente extrator (SE) (Figura 18).

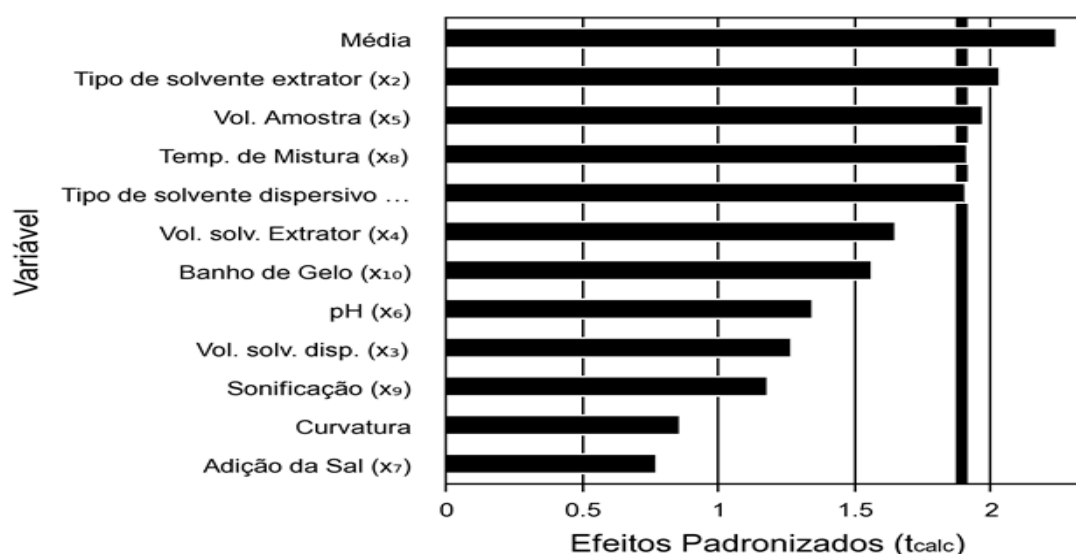
Figura 16 - Diagrama de Pareto dos Efeitos Padronizados PB16 - BPAF



✓ BZP

Sob as condições experimentais aplicadas, o melhor solvente dispersivo (SD) foi a acetonitrila e o diclorometano o melhor solvente extrator (SE); os volumes aplicados de solvente dispersivo (VSD) e de solvente extrator (VSE) não apresentaram efeitos significativos sobre a taxa de recuperação de BZP; entretanto, menor volume de amostra (VA) resultou em melhor recuperação desse analito (5 mL foi melhor do que 10mL de VA). Recuperações superiores foram alcançadas com efeito positivo do tempo de mistura (TM) (30 segundos de mistura foi melhor do que nenhum tempo de mistura) (Figura 19).

Figura 17 - Diagrama de Pareto dos Efeitos Padronizados PB16 - BZP



As variáveis independentes não mencionadas acima para cada uma das substâncias-alvo (BPA, BPA_{d16}, BPS, BPF, BPAF, BZP) foram aquelas que não exerceram influência significativa nos resultados quando comparados com os melhores resultados do PB16, em nível de confiança de 90%.

Assim, as variáveis escolhidas como as mais relevantes para o método MELLD nas condições propostas pelo delineamento experimental PB16 foram: (a) tempo de mistura em vórtex (TM), que foi uma variável relevante para recuperação de 5 dentre os 6 substâncias-alvo investigados (incluindo o padrão deuterado BPA_{d16}); (b) volume de solvente dispersivo (VSD), que foi uma variável relevante para 5 dentre os 6 analitos; (c) volume de solvente extrator (VSE), que foi relevante para 5 dentre os 6 analitos; (d) volume da amostra (VA), que foi relevante para 4 dentre os 6 analitos. De acordo com o PB16, banho de gelo e sonicação são irrelevantes.

3.2 Delineamento Experimental PB12 – Etapa 2

Com o objetivo de estabelecer as condições experimentais que abranjam as melhores taxas de recuperação para todas as substâncias-alvo ao mesmo tempo, um novo PB foi elaborado, com vistas ao aumento da taxa de recuperação (REC%), particularmente para os compostos BPS e BZP, que apresentaram as taxas mais baixas de recuperação (63.3% e 54.3% respectivamente) no experimento anterior (PB16 – Etapa 1).

Nesta Etapa 2, as variáveis mais relevantes foram fixadas: volume do solvente dispersivo (VSD) e volume do solvente extrator (VSE), ambos fixados em 1000 µL cada, assim como o Volume da Amostra (VA) fixado em 5 mL. Em algumas corridas (ensaios) o solvente dispersivo (SD) e o do solvente extrator (SE) foram alterados, em busca de melhores resultados. Novos níveis de pH e de tempo de mistura por vórtex (TM) (a despeito da relevância observada no PB16) foram testados na busca de resultados ainda melhores, assim como a relevância da adição de sal (AS) foi analisada uma vez mais em novas concentrações.

O delineamento PB12 foi elaborado sob condições apresentadas na Tabela 3, com 5 variáveis independentes e 15 ensaios, incluindo triplicata no ponto central. As Tabelas 8 e 9 mostram os principais resultados quanto às taxas de recuperação dos analitos pelo método de MELLD e seus efeitos.

Tabela 8 - Recuperação do composto-alvo obtido em diferentes ensaios do delineamento PB-Etapa 2 (PB12).

Ensaio	BPA (%)	BPA _{d16} (%)	BPS (%)	BPF (%)	BPAF (%)	BZP (%)
1	101,9	99,9	85,1	126,2	127,4	47,3
2	93,2	91,5	33,2	120,9	108,6	16,2
3	73,3	69,4	6,2	56,4	109,5	26,7
4	105,1	102,2	33,4	136,8	125,2	84,0
5	104,2	103,4	33,2	140,9	119,9	35,6
6	97,4	91,9	85,6	121,1	123,9	83,4
7	88,0	82,1	8,5	76,0	108,8	71,8
8	84,9	82,1	3,4	66,7	106,2	75,3
9	85,4	81,0	4,4	63,2	103,9	72,2
10	97,1	93,8	81,1	118,3	119	78,6
11	70,9	66,7	6,6	55,4	100,7	64,1
12	63,6	58,9	2,8	33,5	97,8	76,2
13	107	102,4	54,3	127,4	119,6	52,6
14	111,8	108,4	51,8	138,2	120	53,4
15	111,1	107,5	51,4	140,6	124,3	53,4

Em negrito, os melhores resultados.

Os melhores resultados em termos de recuperação dos analitos foram obtidos com os ensaios 6 e 10 (ensaios em negrito na Tabela 8), com as melhores recuperações conjuntas, especialmente para BPS (85.6% no ensaio 6 e 81.1% no ensaio 10) e BZP (83.4% no ensaio 6 e 78.6% no ensaio 10), comparados com as recuperações obtidas no experimento PB16 - Etapa 1. Adicionalmente, os ensaios 6 e 10 alcançaram os critérios de excelência, conforme recomendado pelas agências e documentos (AOAC, 2011; EPA, 1992; INMETRO, 2003). As condições experimentais estabelecidas nos ensaios 6 e 10 foram:

✓ **Ensaio 6**

Solvente Dispersivo (SD): acetonitrila; solvente extrator (SE): diclorometano; pH: 4.0; sem adição de sal (AS); tempo de mistura com vórtex (TM): 60 segundos.

✓ **Ensaio 10**

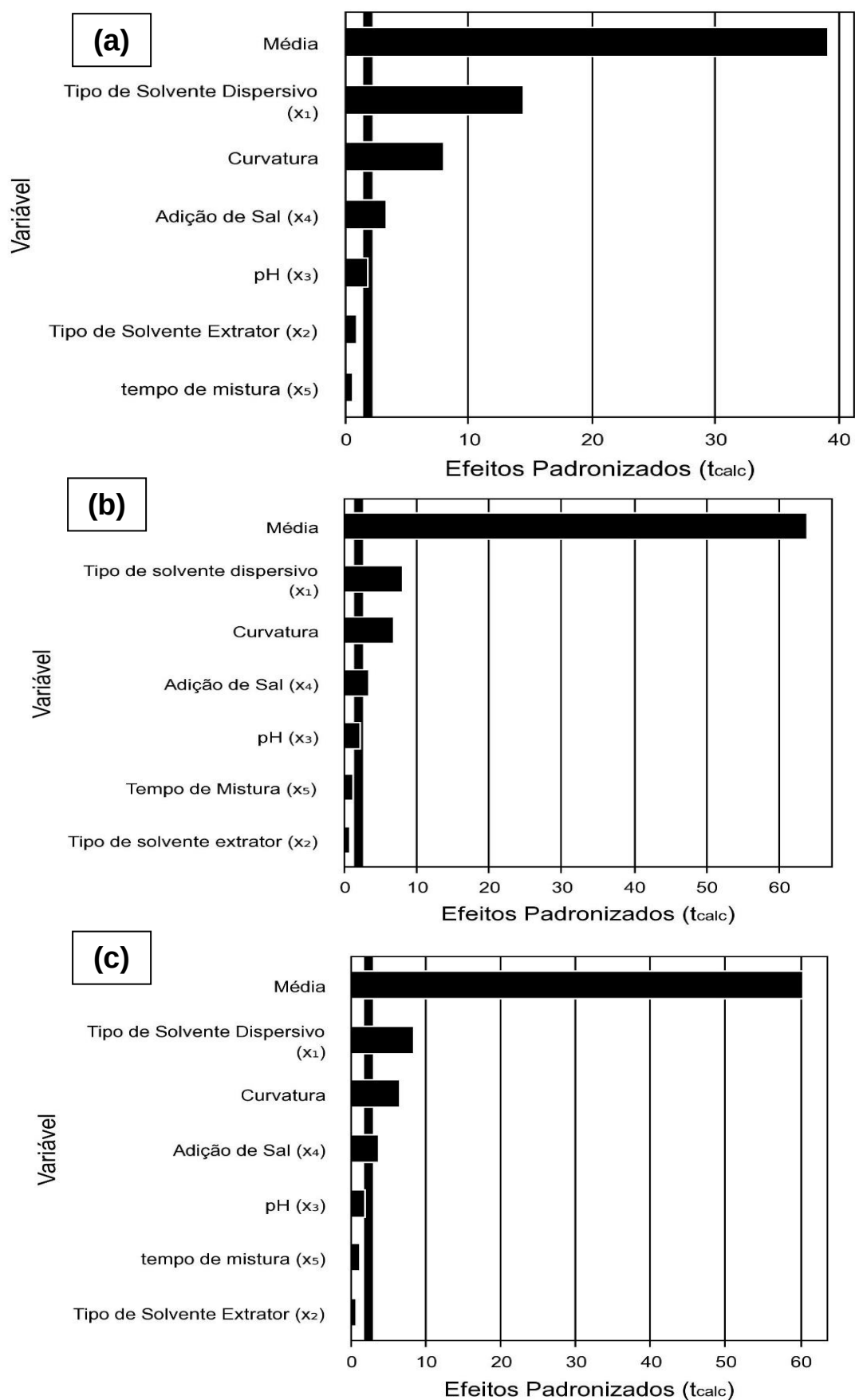
Solvente dispersivo (SD): acetonitrila; solvente extrator (SE): clorofórmio; pH: 2.0; sem adição de sal (AS); tempo de mistura no vórtex (TM): 60 segundos.

3.2.1 Efeitos das variáveis sobre as taxas de recuperação de cada substância-alvo

✓ **BPA, BPAd₁₆ e BPF**

O solvente dispersivo (SD) que resultou na melhor recuperação foi a acetonitrila. Quando o pH ácido era mais alto, a recuperação foi superior (ou seja, o pH 4.0 foi melhor do que o pH 2.0). Em geral, a adição de sal (10%) obteve melhor resultado para a recuperação destes 3 analitos (Figura 20).

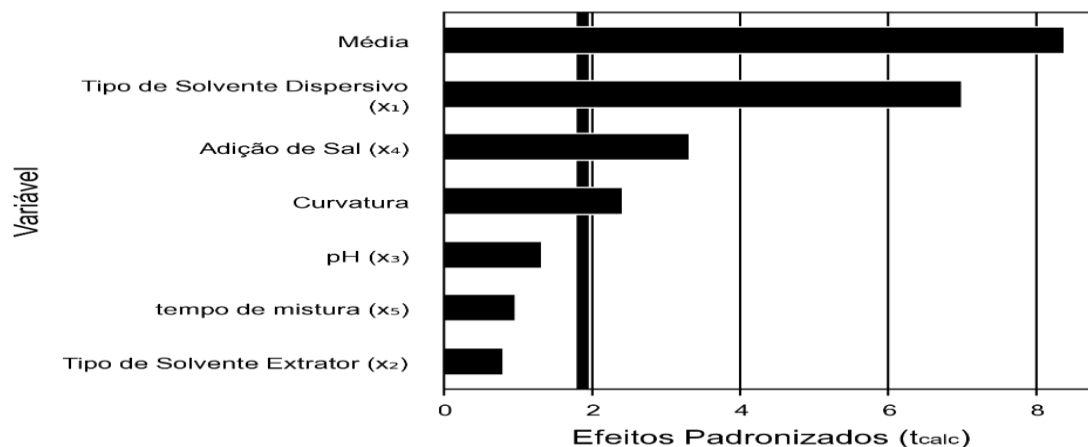
Figura 18 - Diagrama de Pareto dos Efeitos Padronizados PB12 – BPA (a), BPAd₁₆ (b) e BPF (c)



✓ **BPS**

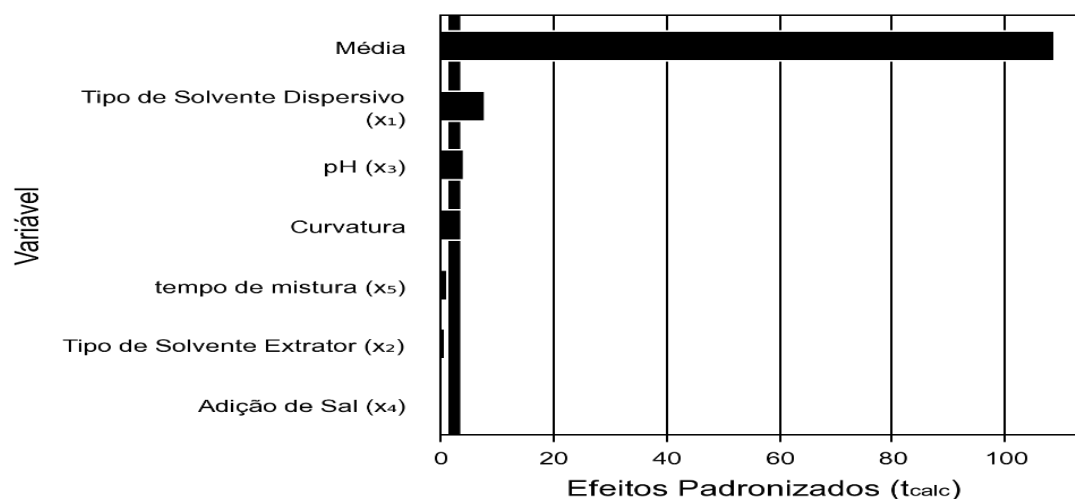
O solvente dispersivo (SD) que apresentou maior influência em termos de aumento da recuperação foi a acetonitrila. O efeito negativo da adição de sal (AS) também demonstraram melhores respostas para BPS (Figura 21).

Figura 19 - Diagrama de Pareto dos Efeitos Padronizados PB12 – BPS

✓ **BPAF**

A acetonitrila também foi indicado pela ferramenta de triagem, como o melhor solvente dispersivo (SD) para o BPAF, assim com o uso de um pH mais elevado na faixa ácida (pH 4,0 resultou em melhor recuperação do que o pH 2,0) (Figura 22).

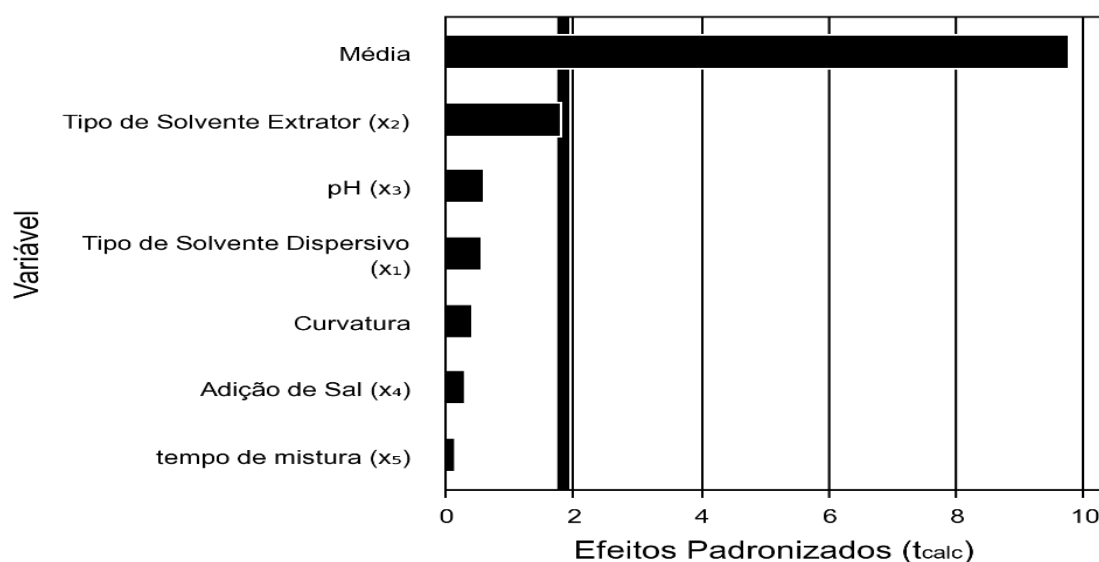
Figura 20 - Diagrama de Pareto dos Efeitos Padronizados PB12 – BPAF



✓ **BZP**

O Solvente Dispersivo (SD) que apresentou maior influência para uma recuperação superior foi o Metanol (Figura 23).

Figura 21 - Diagrama de Pareto dos Efeitos Padronizados PB12 – BZP



As demais variáveis não mencionadas acima não exerceram influência significativa nos resultados de recuperação das substâncias-alvo, nas condições experimentais propostas pelo delineamento PB12 (Etapa 2) em um nível de confiança de 95%. Sob tais condições, as diferenças em termos das recuperações obtidas com 30 ou 60 segundos (TM) foram estatisticamente não significativas.

A adição de sal (AS) foi uma variável independente com efeitos positivos na recuperação de BPA, BPF e BPAF. Entretanto, ela teve um efeito fortemente negativo sobre a recuperação do BPS. Assim, tendo em mente a qualidade geral dos resultados em termos de recuperação simultânea das diferentes substâncias-alvo, foi decidido que na etapa seguinte, a variável adição de sal seria removida do processo de otimização da extração conjunta (e não da individual).

Tabela 9 - Efeitos das variáveis independentes relevantes: Delineamento PB12 (Etapa 2).

Composto-alvo	Variável	Efeito	Erro Padrão	t calc	Valor p
BPA	Média	88,75	1,39	63,88	4,01E-12
	Curvatura	42,43	6,21	6,83	1,34E-04
	SD (x_1)	22,13	2,78	7,97	4,50E-05
	pH (x_3)	6,03	2,78	2,17	6,17E-02
	AS (x_4)	9,43	2,78	3,40	9,43E-03
BPA _{dl6}	Média	85,24	1,41	60,33	6,33E-12
	Curvatura	41,72	6,32	6,60	1,69E-04
	SD (x_1)	23,75	2,83	8,40	3,06E-05
	pH (x_3)	5,38	2,83	1,91	9,32E-02
	AS (x_4)	10,28	2,83	3,64	6,60E-03
BPS	Média	31,96	3,82	8,38	0,00
	Curvatura	41,08	17,06	2,41	4,27E-02
	SD (x_1)	53,28	7,63	6,98	1,15E-04
	AS (x_4)	-25,22	7,63	-3,30	1,08E-02
BPF	Média	92,95	2,37	39,17	1,99E-10
	Curvatura	84,90	10,61	8,00	4,37E-05
	SD (x_1)	68,83	4,75	14,50	5,01E-07
	pH (x_3)	8,50	4,75	1,79	1,11E-01
	AS (x_4)	15,60	4,75	3,29	1,11E-02
BPAF	Média	112,58	1,04	108,64	5,76E-14
	Curvatura	17,45	4,63	3,77	5,50E-03
	SD (x_1)	16,18	2,07	7,81	5,20E-05
	pH (x_3)	8,52	2,07	4,11	3,39E-03
BZP	Média	60,95	6,25	9,76	4,39E-06
	SD (x_1)	-6,87	12,49	-0,55	5,96E-01

Solvente Dispersivo (SD); Adição de Sal (AS).

Vale a pena destacar que as variáveis relevantes obtidas a partir do delineamento PB12 (Etapa 2), podem ser consideradas como de relevância secundária, com menos relevância, se comparadas as variáveis fixadas no delineamento PB16 (Etapa 1). Portanto, há algum grau de liberdade em termos de escolha das condições teste a serem aplicadas durante as rotinas diárias de um laboratório. Devido a tal requisito, as substâncias químicas com toxicidade

mais baixa e custo inferior, assim como a opção de não adição de sal e a manutenção do pH 4.0, que requer um consumo inferior de ácido do que o pH 2.0, devem ser as condições preferidas.

Por meio da aplicação da informação obtida a partir dos delineamentos experimentais PB16 (Etapa 1) e PB12 (Etapa 2), as condições básicas para a MELLD foram estabelecidas conforme se segue: solvente extrator (SE): diclorometano; solvente dispersivo (SD): acetonitrila; volume de amostra (VA): 5 mL; pH: 4; sem adição de sal (AS); sem sonificação (SONIC); sem banho de gelo (BG). As Figuras 24 e 25 apresentam os cromatogramas com as melhores condições definidas após o PB12. Foi observado um aumento na área dos cromatogramas após aplicação do MEELD, se comparado aos padrões injetados inicialmente na concentração de $25 \mu\text{g L}^{-1}$, o que mostra um acompanhamento coerente do fator de concentração da microtécnica.

Figura 22 - Cromatograma: Padrão (BPA e BPS) versus melhores condições alcançadas pela MELLD com base no PB12.

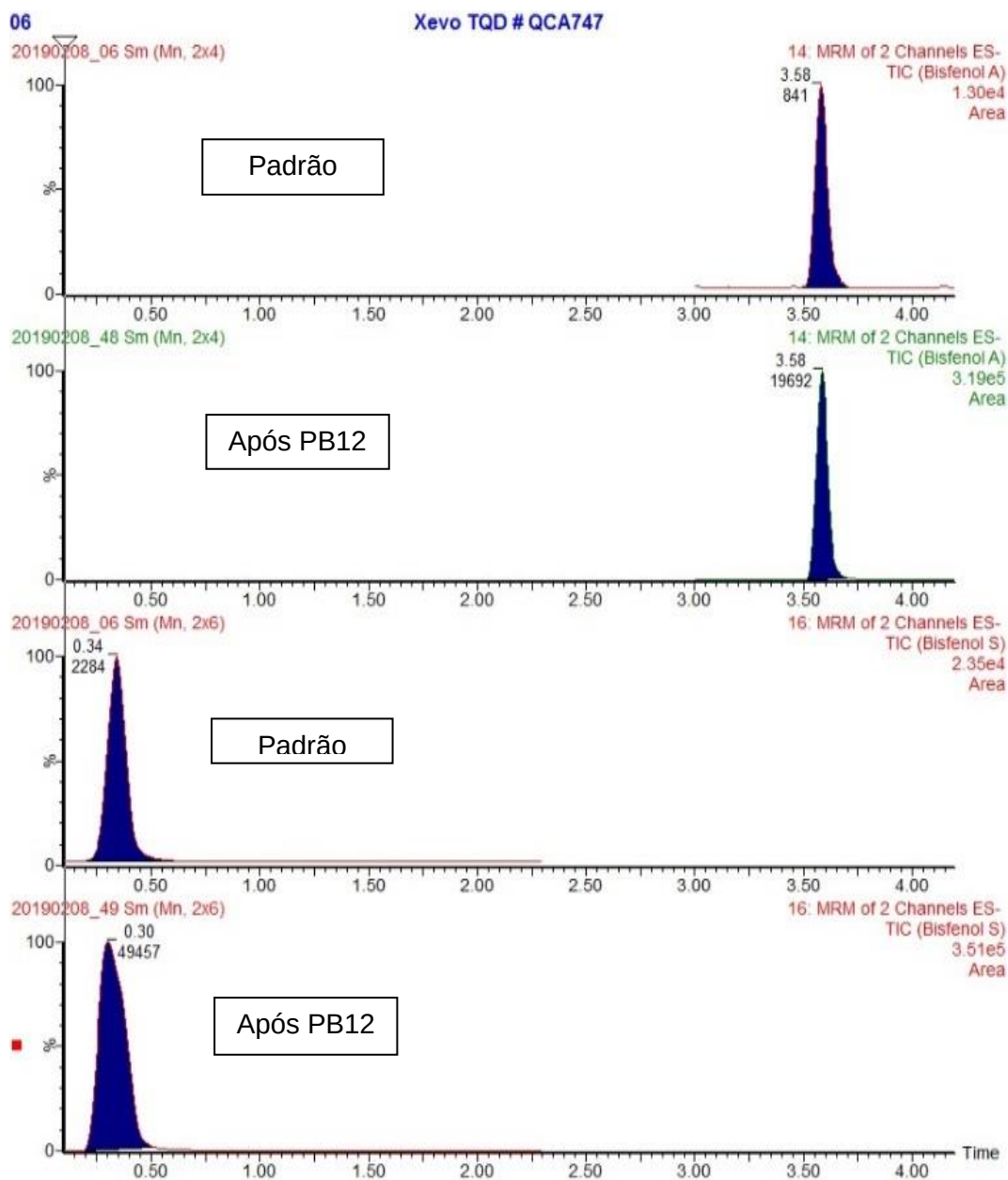
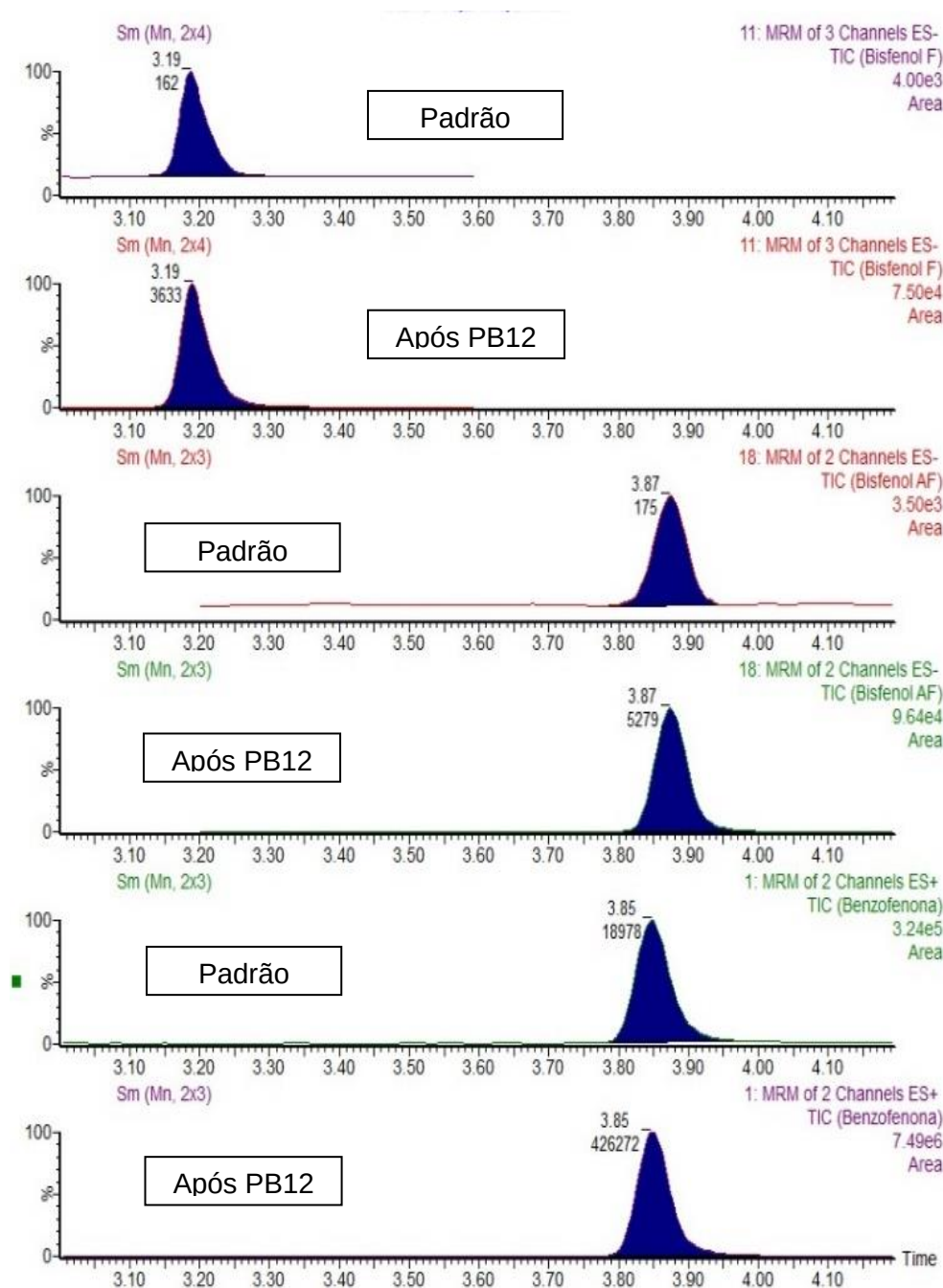


Figura 23 - Cromatograma: Padrão (BPF, BPS e BZP) versus melhores condições alcançadas pela DLLME com base no PB12.



Fonte: Autor, 2019

3.3 Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) - Etapa 3

Para otimizar as condições das variáveis independentes mais relevantes PB16, um DCCR foi aplicado. Tal abordagem baseia-se no desenho experimental racional, que permite a variação simultânea nos níveis de todos os fatores experimentais. A presente etapa (Etapa 3) tem por objetivo verificar a influência entre variáveis, encontrar um modelo que descreva as melhores

condições para recuperação conjunta das substâncias-alvo e obter superfície de resposta que forneça uma descrição visual/gráfica do modelo. Os resultados de recuperação com a aplicação do DCCR encontram-se na Tabela 10.

Tabela 10 - Resultados de Recuperação dos 6 substâncias-alvo após aplicação do DCCR.

Ensaio	BPA (%)	BPA _{d16} (%)	BPS (%)	BPF (%)	BPAF (%)	BZP (%)
1	81,6	89,3	55,7	78,6	84,1	54,7
2	80,5	85,9	48,6	80,9	81,5	56,5
3	84,3	90,5	79,8	87,2	82,6	61,7
4	84,4	90,7	78,3	86,6	82,8	74,0
5	83,3	89,5	81,1	85,7	80,4	60,1
6	86,0	93,2	84,1	87,4	82,2	29,1
7	85,8	91,8	96,3	92,4	83,5	1,5
8	65,9	70,2	88,9	70,8	64,8	0,8
9	83,0	89,2	100,5	89,4	82,6	86,0
10	82,6	88,7	100,2	87,6	79,4	23,6
11	77,5	82,4	40,6	72,1	77,9	5,4
12	82,6	86,4	108,0	87,6	80,6	19,0
13	61,3	65,5	43,3	54,1	69,0	12,2
14	79,3	86,0	103,8	86,0	78,5	1,1
15	79,0	81,8	97,8	84,6	81,3	32,7
16	80,2	84,6	99,3	85,2	80,8	30,9
17	79,0	85,2	95,7	84,9	80,6	30,0

*Em negrito, melhor recuperação do conjunto de compostos-alvo.

A melhor recuperação global para os 6 analitos foi obtida com o ensaio 9 (em negrito na Tabela 10), com as melhores taxas de recuperação para BPS (100.5%) e BZP (86%), quando comparadas com as melhores recuperações obtidas no delineamento PB16 – Etapa 1 (63% e 54%, respectivamente). Entretanto, em uma perspectiva global, a diferença entre DCCR e PB12 foi relativamente pequena. Assim, foi possível concluir que o PB12 já representa um nível elevado de otimização. Os outros analitos mantiveram as recuperações excelentes, obtidas nas etapas anteriores. O ensaio 9 foi realizado sob as seguintes condições experimentais (Tabela 10):

✓ Ensaio 9

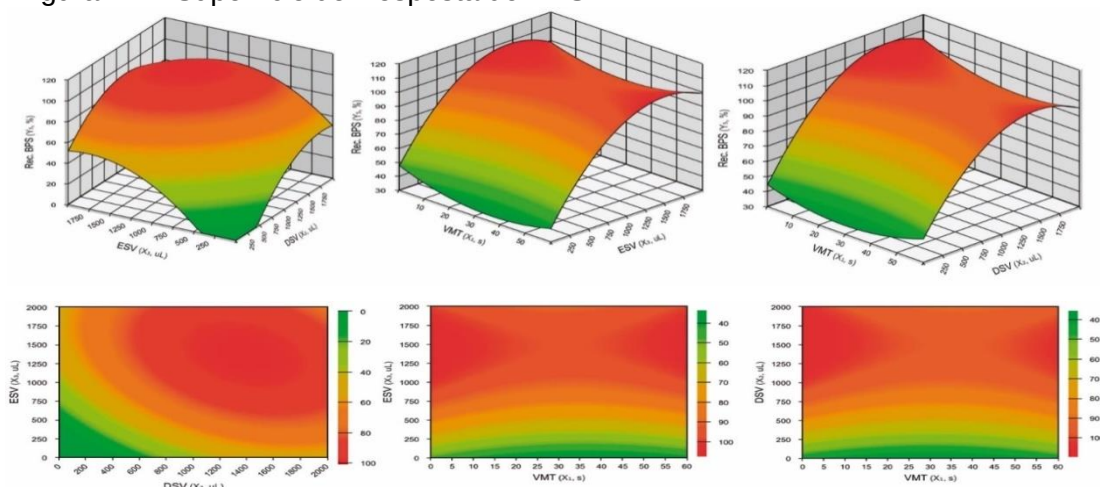
Solvente Extrator (SE): Diclorometano; Solvente Dispersivo (SD): Acetonitrila; Volume do Solvente Extrator (VSE): 1000 μ L; Volume do Solvente Dispersivo (VSD): 1000 μ L; Volume da Amostra (VA): 5 mL; pH: 4.0; Sem Adição de Sal (AS); Tempo de Mistura por Vórtex (TM): 5 segundos; Sem Sonicação (SONIC) e Sem Banho de Gelo (BG).

Os principais efeitos, efeitos de interação e efeitos quadráticos foram otimizados e avaliados para cada substância-alvo neste delineamento experimental (DCCR). Para encontrar os efeitos e as interações mais importantes, Análise de Variância (ANOVA) foi conduzida.

O resultado mais relevante com relação à superfície de resposta obtida com esta abordagem pode ser observado para o composto BPS (Figura 11). Um valor- p menor do que 0.05 na Tabela de ANOVA indica significância estatística de um efeito num nível de confiança de 95%. Um valor- p da falta de ajuste (*Lack of Fit LOF p-value*) de 0.08 significa que a LOF não foi significativa. A qualidade do ajuste (*fit*) da equação do modelo polinomial foi expressa pelo coeficiente de determinação ($R^2 = 0.937$). Na próxima etapa do delineamento experimental, um modelo da superfície de resposta foi desenvolvido considerando-se todas as interações significativas no delineamento DCCR. A análise dos dados forneceu a expressão semiempírica abaixo (Eq. 4) da recuperação de BPS:

$$\text{BPS rec (\%)} = 97,69 + 13,70 \text{ VSD} - 9,34 \text{ VSD}^2 + 13,89 \text{ VSE} - 9,61 \text{ VSE}^2 \quad (R^2 = 93,7\%) \quad (\text{Eq. 4})$$

Figura 24 - Superfície de Resposta do BPS.



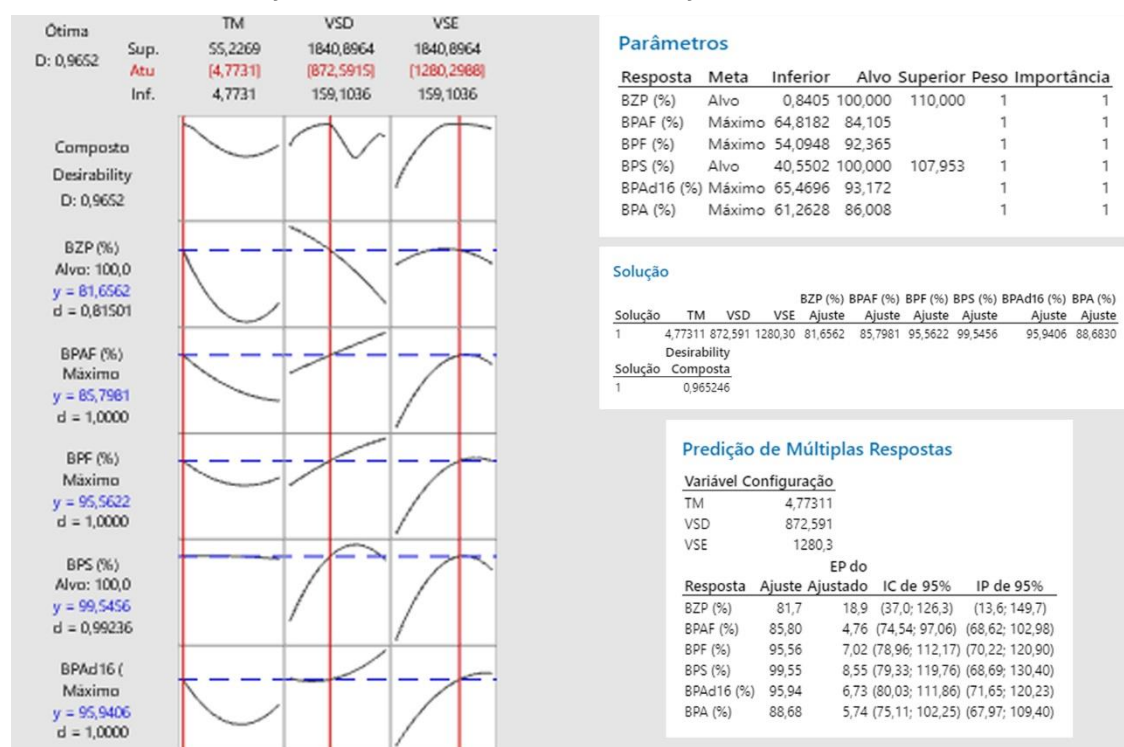
3.3.1 Otimização do DCCR

A Etapa final foi encontrar a condição das variáveis (volume do solvente extrator, volume do solvente dispersor e tempo de mistura no vórtex) que maximizam a recuperação global (%) do conjunto de compostos-alvo.

A função de desejabilidade é utilizada para encontrar as condições ótimas, nas quais, a recuperação da substância-alvo por extração é possível, de acordo com uma meta definida. Assim, a meta para BPS e BZP, que apresentam maior variabilidade de dados quando as variáveis mudam foi de 100% de recuperação.

Para BPA, BPAd₁₆, BPF e BPAF, o critério foi obter o máximo de recuperação. As respostas aferidas foram transformadas em escala de desejabilidade, que varia do extremo de completamente indesejável (0) ao outro extremo de completamente desejável (1.0). O valor previsto e os gráficos de desejabilidade para os parâmetros testados encontram-se na Figura 27.

Figura 25 - Otimização da Resposta através da função desejabilidade



Tempo de mistura no Vórtex (TM); Volume Solvente Dispersivo (VSD); Volume Solvente Extrator (VSE).

Fonte: Autor, 2019

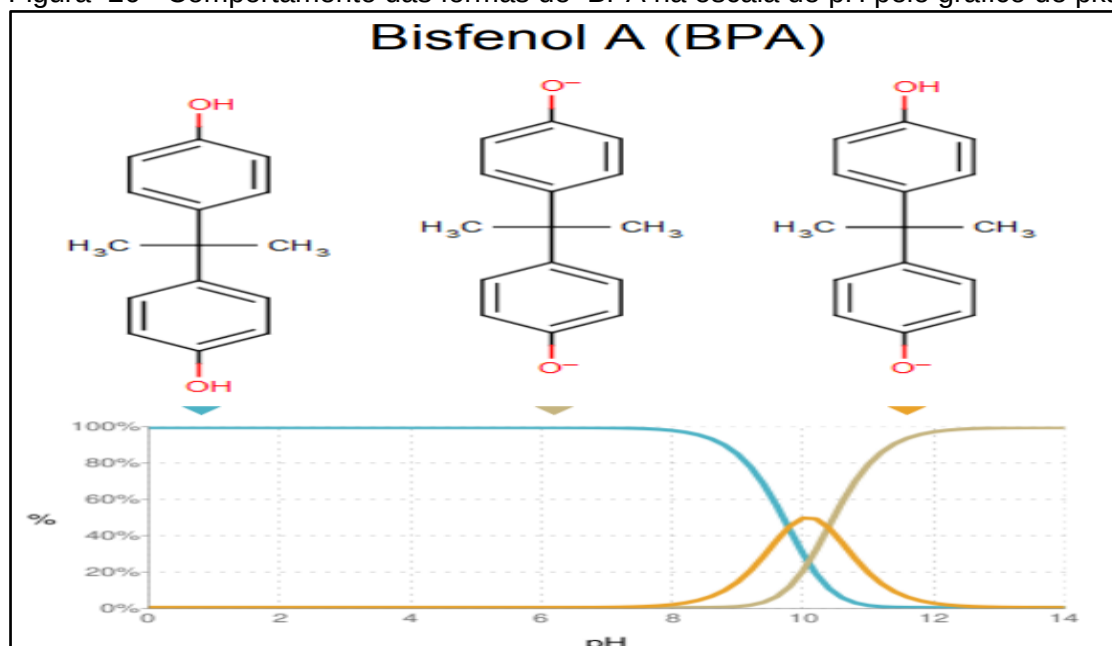
Os valores ótimos para as variáveis testadas foram estabelecidas em: 872 μ l de solvente dispersivo (Acetonitrila), 1280 μ l de solvente de extração (diclorometano) e 5 segundos de tempo de mistura em vórtex, em adição às variáveis fixadas, solvente extrator (ES): diclorometano; solvente dispersivo (SD): acetonitrila; volume da amostra (VA): 5 mL; pH: 4.0; sem adição de sal (SA); sem sonicação (SONIC) e sem banho de Gelo (IB). Tais condições otimizadas foram usadas para a validação do método e análise das amostras reais.

A recuperação prevista obtida utilizando-se tais parâmetros para cada substância-alvo foram: BPA (88,6%); BPA_{d16} (95,94%); BPS (99,55%); BPF (95,56%); BPAF (85,8%); BZP (81,7%). A desejabilidade composta foi 0,965, o que mostra que os resultados do DCCR se ajustam à abordagem preditiva. Todos os valores obtidos alcançaram os valores-alvo na faixa de 70-120% em termos de recuperação dos analitos.

3.4 Aplicação do método a amostras reais complexas

Cinco diferentes matrizes aquosas reais e complexas foram amostradas: (EBM) esgoto bruto municipal e (ETM) esgoto tratado de uma estação de tratamento de esgotos municipais constituída por tratamento preliminar, primário e secundário (biológico) da cidade do Rio de Janeiro; (EBC) esgoto bruto e (ETC) esgoto tratado de uma planta condominial de tratamento de esgotos domésticos na zona oeste do Rio de Janeiro, com tratamento preliminar e primário e; (ABG) água superficial de um ponto amostral da Baía de Guanabara, Rio de Janeiro. As amostras foram inicialmente utilizadas para avaliar a eficácia do método para amostras de matrizes aquosas reais e complexas com características distintas, tais como carbono orgânico dissolvido (COD) e salinidade, para as quais é esperado o efeito matriz (Tabela 11). Já o pH, em todas as amostras manteve-se na faixa neutra, favorecendo assim a manutenção predominante na forma orgânica (não ionizada), da maioria dos analitos de interesse como pode-se constatar no gráfico de pKa do BPA (Figura 17). Dessa forma, a correção do pH para valor determinado pelo DoE (pH=4), possibilita, quase que total, a protonação das moléculas ionizadas das amostras.

Figura 26 - Comportamento das formas de BPA na escala de pH pelo gráfico de pka.



Fonte: Adaptado de Beraldo, 2012

Tabela 11- Carbono orgânico dissolvido (COD) e salinidade em 5 amostras reais complexas utilizadas para validar o método de extração sob as condições definidas.

Amostra	COD (mg.L ⁻¹)	pH	Salinidade (‰)
EBM	511,5	6,8	3,0
ETM	243,3	7,3	2,0
ABG	264,0	6,5	23,0
EBC	280,7*	6,2	2,0
ETC	264,6*	6,6	3,5

*Valores de COD similares para EBC e ETC indicam que a planta de tratamento condominial de esgotos não está funcionando adequadamente.

As taxas de recuperação variaram de 83% a 121% para BPA; de 76% a 91% para BPS; de 89,2% a 98,3% para BPF; de 60,4% a 92,3% para BPAF; de 81,5% a 98,6% para BZP. Esses resultados indicam que a abordagem de otimização do processo foi bem sucedida quando aplicada a amostras de matrizes aquosas reais e complexas, se comparadas aos valores definidos nos guias nacionais e internacionais (AOAC, 2011; EPA, 1992; INMETRO, 2003). González e Herrador (2007) orientam que intervalos de 40 a 120%, com precisão de $\pm 30\%$ são considerados aceitáveis tendo em vista a complexidade analítica e da amostra.

Os resultados do efeito matriz foram satisfatórios, mostrando variações em torno de 20% (Tabela 12), apesar das características distintas das amostras, ilustradas pelas diferenças em carga orgânica e salinidade.

Tabela 12 - Efeito Matriz (EM%) e taxa de recuperação (REC%) para BPA, BPS, BPF, BPAF, BZP em diferentes matrizes, a partir da concentração de $1\mu\text{g.L}^{-1}$ (n=3).

Analito	Amostra	EM%	RSD%	REC%	RSD%
BPA	EBM	99	11	121	7
	ETM	109	4	95	3
	ABG	115	8	83	11
	EBC	64	9	108	19
	ETC	76	5	103	6
BPS	EBM	192	14	91	6
	ETM	119	1	76	4
	ABG	53	14	91	19
	EBC	95	14	88	9
	ETC	76	14	92	5
BPF	EBM	8,1	13,5	89,2	6,3
	ETM	109,7	1,2	91,6	12,8
	ABG	115,7	4,6	89,9	13,9
	EBC	56,8	2,4	98,3	5,1
	ETC	50,1	10,2	96,4	11,2
BPAF	EBM	49,9	9,8	91,8	6,2
	ETM	114,7	6,3	60,4	2,1
	ABG	123,9	7,2	83,6	4,9
	EBC	59	7,9	92,3	1,9
	ETC	62,7	6,1	81,7	8
BZP	EBM	132,7	2,5	98,6	7,4
	ETM	130,3	15,6	25,3*	13
	ABG	134,8	5,8	15,9*	14,1
	EBC	95,2	6,4	86,2	17,2
	ETC	130,1	14,1	81,5	7,7

Esgoto Bruto Municipal (EBM); Esgoto Tratado Municipal (ETM); Água superficial Baía de Guanabara (ABG); Esgoto Bruto Condominial (EBC); Esgoto Tratado Condominial (ETC).

*Recuperações inferiores aos orientados pelas principais guias nacionais e internacionais.

A recuperação do BPA de amostras de esgoto municipal bruto e tratado (EBM e ETM respectivamente) de uma estação de tratamento de esgotos não apresentou efeito matriz; entretanto, tal efeito foi observado para amostras de esgoto municipal bruto (EBC) e tratado (ETC) de uma planta condominial de tratamento de esgotos sendo que a recuperação obtida foi de 64% e 76%, respectivamente. Um leve efeito de matriz foi observado para água superficial (ABG) na recuperação do composto BPA. Caldas et al (2016) obteve resultado similar utilizando microextração líquido-líquido dispersiva baseada em líquido iônico (*ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction* ou IL-DLLME) para BPA em águas superficiais (CALDAS *et al.*, 2016). Parrilla Vásquez et al. (2013) não encontraram efeito matriz significativo na recuperação de algumas substâncias farmacêuticas em amostras de esgoto tratado utilizando a MELLD (PARRILLA VÁZQUEZ *et al.*, 2013a).

Tais resultados podem ser justificados pelas grandes diferenças de vazão dos dois sistemas e possível inibição gerada pela interação hidrofóbica de BPA, interferindo com a distribuição sólido-líquido do analito (TERNES *et al.*, 2004).

Esse fenômeno pode também contribuir para o aumento do sinal observado para BPS (192%), tendo em vista que esse composto tem um comportamento mais hidrofílico entre os bisfenóis, o qual pode ter favorecido sua solubilidade em matrizes com baixas concentrações de sólidos suspensos. Na amostra com salinidade relativamente alta (ABG), um forte sinal de supressão foi observado para BPS. Tal comportamento foi também observado nos testes de otimização experimental realizados, o que enfatiza a importância de adicionar o padrão deuterado para atenuar o efeito gerado pelas características da amostra (CALDAS *et al.*, 2016).

Supressão dos sinais de BPF e BPAF foi observada nas amostras de EMB. Para BPAF e BZP nas amostras de esgoto na saída da planta de tratamento condominial, os parâmetros de recuperação não se ajustaram, provavelmente devido à presença de interferentes não identificados na matriz complexa. O mesmo ocorreu com BZP na amostra de água superficial (ABG).

Os valores próximos de carbono orgânico dissolvido (COD) nas amostras EBC e ETC sugerem que o esgoto que entra na planta de tratamento de esgoto condominial não está sendo tratado (Tabela 11), provavelmente devido ao mal funcionamento da referida planta, o que também explicaria o efeito matriz similar em ambos os tipos de amostras.

Em linhas gerais, BZP apresentou leve efeito matriz (enriquecimento de sinal), com exceção das amostras de EBC. Negreira et al (2009) também identificou efeito de matriz, em níveis similares, para amostras de esgoto bruto e tratado, na análise de derivados de benzofenona.

Dessa forma a utilização do padrão interno (BPA_{d16}) é importante para compensar possíveis efeitos na matriz, assim como supressão ou enriquecimento de sinal do analito, haja vista o comportamento distinto de cada substância-alvo, em cada amostra (ROCHA *et al.*, 2016a).

A validação dos parâmetros proposta, por meio da técnica de MELLDD, atendeu aos critérios estabelecidos pelos manuais nacionais e internacionais de metodologias analíticas de validação, com exceção das amostras ETM e ABG, no quesito recuperação, para o analito BZP (AOAC, 2011; EPA, 1992; INMETRO, 2003). A linearidade foi enquadrada de acordo com o teste *lack of fit* ($p > 0.05$) e o coeficiente de determinação ($R^2 > 0.99$) (Tabela 14). O método também apresentou precisão, em termos de repetitividade, com desvio padrão relativo (DRP < 20%). O limite de detecção (LD) foi calculado pela expressão $3 \times S/R$ (sinal de ruído) e o limite de quantificação (LQ) foi definido como o valor de concentração mais baixo da curva de calibração pelo método visual (Tabela 13) (ICH, 2005; RIBANI *et al.*, 2004). Esses parâmetros foram próximos aos estudos de Marube (2018) realizados com água superficial e água de torneira utilizando LC-MS/MS (LD: 0.17 – 0,8 $\mu\text{g L}^{-1}$). Assim pode-se constatar que o presente trabalho alcançou bons resultados para matrizes mais complexas e de alta variabilidade de composição, como águas residuais de um sistema de tratamento condominial e amostras de uma estação tratamento de esgoto municipal com uma vazão média de 2.500 L.s^{-1} .

Tabela 13 - Parâmetros de qualidade do método proposto para estudos de recuperação (MELLDD-UPLC-MS / MS).

Analito	Faixa Linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Fator	MLD (ng L^{-1})	MLQ (ng L^{-1})
BPA	0,50 - 100	0,1	0,5	25	4	20
	25,0 - 200	-	-	-	-	-
BPS	0,50 - 50	0,1	0,5	25	4	20
	25,0 - 200	-	-	-	-	-
BPF	1,00 - 100	0,5	1,0	25	20	40
BPAF	0,10 - 25,0	0,05	0,1	25	2	4
BZP	1,0 - 50,0	0,5	1,0	25	20	40

Tabela 14 - Parâmetros estatísticos das curvas analíticas

Analito	Equação	R ²	n ^(a)	ANOVA <i>Lack-of-fit</i>	
				F value	p-value
BPA	$y = 0,0682x - 0,0344$	0,9993	7	2,034	0,12
	$y = 0,0721x - 0,3236$	0,9994	6	1,642	0,227
BPS	$y = 0,1778x - 0,0092$	0,9997	6	1,567	0,246
	$y = 0,1747x - 1,8420$	0,9994	6	2,316	0,117
BPF	$y = 0,0216x - 0,0067$	0,9985	7	1,388	0,288
BPAF	$y = 0,7322x + 0,0085$	0,9998	6	1,178	0,369
BZP	$y = 1,4431x - 0,4474$	0,9994	7	2,470	0,084

(a) Concentration levels in calibration curve

A Tabela 15 mostra a ocorrência das substâncias-alvo nas cinco matrizes reais complexas. A técnica otimizada de MELLD tornou possível detectar todos os 5 analitos de interesse (BPA, BPS, BPAF, BPF, BZP) nos 5 tipos de amostra (EBM, ETM, ABG, EBC e ETC). BPA foi encontrado na faixa de 0,054 a 150 µg.L⁻¹; BPS na faixa de 0,024 a 18,2 µg.L⁻¹; BPF na faixa de 0,048 a 0,091 µg.L⁻¹; BPAF na faixa de 0,005 a 0,027 µg.L⁻¹ e; BZP na faixa de 0,402 a 0,923 µg.L⁻¹.

Tabela 15 - Ocorrência de BPA, BPS, BPF, BPAF e BZP em matrizes reais complexas (n = 3) utilizando MELLTD como método de extração.

Substância	Matriz	Concentração ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
BPA	EBM ^a	150,0 $\pm$ 1,69
	ETM	0,103 $\pm$ 0,003
	ABG	0,054 $\pm$ 0,002
	EBC	0,173 $\pm$ 0,013
	ETC	0,342 $\pm$ 0,025
BPS	EBM ^a	18,2 $\pm$ 0,113
	ETM	0,024 $\pm$ 0,008
	ABG	< LQ
	EBC	0,382 $\pm$ 0,005
	ETC	0,329 $\pm$ 0,017
BPF	EBM	0,091 $\pm$ 0,005
	ETM	< LQ
	ABG	0,048 $\pm$ 0,007
	EBC	< LQ
	ETC	< LQ
BPAF	EBM	0,005 $\pm$ 0,001
	ETM	0,016 $\pm$ 0,003
	ABG	0,027 $\pm$ 0,014
	EBC	0,017 $\pm$ 0,005
	ETC	0,009 $\pm$ 0,002
BZP	EBM	0,923 $\pm$ 0,035
	ETM	0,923 $\pm$ 0,043
	ABG	0,666 $\pm$ 0,083
	EBC	0,402 $\pm$ 0,008
	ETC	0,450 $\pm$ 0,061

^(a)Injeção direta; < LQ = Detectado, mas não quantificado. Esgoto Bruto Municipal (EBM); Esgoto Tratado Municipal (ETM); Água superficial Baía de Guanabara (ABG); Esgoto Bruto Condominial (EBC); Esgoto Tratado Condominial (ETC).

A injeção direta de amostras de EBM foi necessária, tendo em vista as altas concentrações encontradas para BPA e BPS nessas amostras, excedendo inclusive o faixa linear da curva analítica. Assim, curvas com concentrações mais altas (25 – 200 $\mu\text{g L}^{-1}$) tiveram que ser construídas para quantificação dos compostos BPA e BPS.

Nota-se que as concentrações de BPA reportadas pela literatura para amostras de efluente municipal apresentam grande variabilidade.(AL-RIFAI; GABELISH; SCHÄFER, 2007; TORO-VÉLEZ *et al.*, 2016). Os resultados obtidos para BPA nas amostras ETM seguiram a mesma ordem de grandeza, da média encontrada em plantas de tratamento chinesas (0,231 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 0,175 $\mu\text{g.L}^{-1}$), diferentemente dos valores alcançados na Índia (5,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$) e Itália (0,310 – 0,500 $\mu\text{g.L}^{-1}$) (BERTANZA *et al.*, 2011; KARTHIKRAJ; KANNAN, 2017; SUN, X. *et al.*, 2018). No Brasil, Froehner

(2011) quantificou $0,02 \mu\text{g.L}^{-1}$ de BPA em amostra de efluente tratado de uma estação de tratamento em Curitiba, PR, valor bem abaixo dos apresentados pelo panorama mundial.

Altas concentrações de BPA e BPS ($150 \mu\text{g L}^{-1}$ e $18,2 \mu\text{g L}^{-1}$) foram encontradas nas amostras de EBM. O BPA segue a mesma tendência do trabalho de Froehner (2011) em Curitiba ($84,11 \mu\text{g L}^{-1}$) e da faixa apontado por Melcer e Klecka (2011) ($0,100 - 100 \mu\text{g L}^{-1}$). Já o BPS não acompanhou o mesmo comportamento de ocorrência em amostras de esgoto bruto chinês ($0,002 - 1,15 \mu\text{g L}^{-1}$) (QIU *et al.*, 2019). Valores mais altos de BPS podem ser esperados, tendo em vista o aumento do emprego dessa substância como aditivo plástico, em substituição ao uso de BPA e também pelo comportamento mais hidrofílico do BPS ($\text{Log}_{\text{KOW}}=1,65$), o que propicia a sua presença na parte solúvel do esgoto como indicado no estudo de balanço de massa de Sun *et al* (2017). Seguindo esta linha $7,2 \mu\text{g L}^{-1}$ de BPS foram quantificados no Rio Adyar, na Índia (YAMAZAKI *et al.*, 2015b).

As substâncias análogas BPF e BPAF seguiram níveis de concentração similares aos reportados pela literatura para amostras de águas residuais ($0,6 - 36,7 \text{ ng L}^{-1}$ e $0,901 - 29,8 \text{ ng L}^{-1}$, respectivamente).

No estudo de Yamazaki (2015a) na Baía de Tóquio (BPA: $0,431 \mu\text{g L}^{-1}$, BPS: $0,015 \mu\text{g L}^{-1}$ e BPF: $1,47 \mu\text{g L}^{-1}$) percebe-se níveis de BPS próximos aos da ABG, porém é notável uma diferença considerável nas concentrações de BPA e principalmente BPF, que alcançou valor máximo de $1,47 \mu\text{g L}^{-1}$, quando comparamos com os da ABG (BPA: $0,054 \mu\text{g L}^{-1}$ e BPF: $0,048 \mu\text{g L}^{-1}$). Uma possível justificativa para a quantificação desses analitos em corpos hídricos, como as baías é a descarga de esgoto tratado, que infelizmente ainda apresenta esses contaminantes em sua composição.

Os resultados alcançados para os analitos do estudo, em amostras de esgoto condominial são de extrema importância para pesquisas futuras, pois não há trabalhos que indicam a ocorrência ou o comportamento desses contaminantes nesse tipo de matriz. Além disso, os valores indicam um possível acúmulo das substâncias no sistema, porém há a necessidade de um estudo mais prolongado para a confirmação desta tendência.

A quantificação de benzofenona nas amostras de esgoto municipal e condominial não apresentou diferença significativa, em termos de tratamento, apresentando assim possível persistência ou pseudo-persistência do analito nessas matrizes. Os valores obtidos para a benzofenona, no presente estudo ($0,666 - 0,923 \mu\text{g L}^{-1}$) seguem a média das concentrações de efluentes chineses ($0,621 - 0,951 \mu\text{g L}^{-1}$) (TSUI *et al.*, 2019; WU *et al.*, 2018) e também de derivados de benzofenona

encontradas no lodo de estações de tratamento de efluente (TSUI *et al.*, 2019; WU *et al.*, 2018). Loraine e Pettigrove (2006) quantificaram altos valores dessa substância ($0,84 - 4,4 \mu\text{g L}^{-1}$) no esgoto bruto da estação de tratamento em San Diego, EUA, assim como Almeida *et al.* (2013) que em Portugal registraram concentrações superiores a $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ($2,2 - 2,5 \mu\text{g L}^{-1}$) no mesmo tipo de matriz.

Nota-se também a presença de benzofenona nas amostras de esgoto condominial (EBC e ETC), essa ocorrência é justificada pelo aumento de uso de filtros solares associado às áreas de lazer, como piscinas em condomínios e hotéis. Esses produtos quando aplicados na pele e em seguida entram em contato com a umidade são possivelmente liberados durante a natação ou banho (JEON; CHUNG; RYU, 2006). Ye *et al.* (2011) analisaram benzofenona em águas de piscina e encontraram uma alta concentração de $18,8 \mu\text{g L}^{-1}$, o que pode indicar uma forte tendência da liberação dessa substância em matrizes aquosas.

4 CONCLUSÕES

A associação da metodologia de extração MELLD para preparo de amostras com a cromatografia de ultra eficiência (UPLC-MS/MS) atendeu os requisitos de validação adotados e permitiu o alcance de altos padrões analíticos, além de agilidade, minimizando ao mesmo tempo, o uso de grandes quantidades de solventes e eliminando a necessidade de gastos com cartuchos (*cartridges*) e disposição final de cartuchos usados, necessários no método SPE mais amplamente utilizado.

A otimização da MELLD por meio da abordagem estatística de Desenho Experimental (DoE) para otimização de processos aliada a função de desejabilidade permitiram a seleção de condições, que resultaram na melhor recuperação de matrizes reais complexas para detecção e quantificação dos compostos-alvo BPA (108%), BPS (92%), BPF (98,3%), BPAF (92,3%) e BZP (98,6%), ou seja, valores que se ajustaram dentro das faixas de recuperação estabelecidas pelas agências nacionais e internacionais (qual seja, 70% a 120%).

Desta forma, o método MELLD permitiu a quantificação de BPA, BPS, BPF em todas as amostras reais complexas estudadas.

Para BPAF e BZP, as amostras ETM não se enquadraram nos padrões de recuperação, provavelmente devido à presença de interferentes não identificados. Para as amostras EBM, devido às altas concentrações de BPA e BPS, a aplicação da MELLD não foi necessária.

Uma das principais vantagens de aplicação da técnica de extração proposta é o baixo custo análise realizada, pelo fato de a MELLD dispensar uso de cartuchos e demandar volumes inferiores de solventes. Além disso, por tratar-se de um método de extração mais rápido, reduz o tempo de mão de obra, item relevante em uma planilha de custos.

Tais aspectos positivos possibilitam a condução de análises cromatográficas de um número maior de amostras, em um menor espaço de tempo e a custo inferior, com eficiência e relativa simplicidade.

Em conclusão, o método MELLD pode ser considerado mais sustentável e uma procedimento de preparo de amostras mais economicamente viável, quando comparado com o método mais amplamente utilizado, como no caso da técnica de extração em fase sólida.

5 RECOMENDAÇÕES

- ✓ Propor um estudo de otimização com o uso de líquidos iônicos como solvente de extração da MELLD, sendo estes mais viáveis ambientalmente e menos tóxicos;
- ✓ Ampliar o escopo da técnica otimizada para outros possíveis contaminantes emergentes presentes em águas residuais;
- ✓ Possibilitar a combinação da MELLD com ensaios de avaliação de estrogenicidade, por meio do enquadramento do extrato final do preparo de amostra;
- ✓ Ampliar o fator de concentração da MELLD para assim torná-la mais competitiva, neste quesito, frente a EFS.

REFERÊNCIAS

- AL-RIFAI, Jawad H.; GABELISH, Candace L.; SCHÄFER, Andrea I. Occurrence of pharmaceutically active and non-steroidal estrogenic compounds in three different wastewater recycling schemes in Australia. *Chemosphere*, v. 69, n. 5, p. 803–815, 1 out. 2007. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653507005966>>. Acesso em: 22 set. 2019.
- ALMEIDA, C. *et al.* Determination of trace levels of benzophenone-type ultra-violet filters in real matrices by bar adsorptive micro-extraction using selective sorbent phases. *Journal of Chromatography A*, v. 1311, p. 1–10, 11 out. 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967313012193>>. Acesso em: 6 abr. 2020.
- ALSHANA, Usama *et al.* DISPERSIVE LIQUID-LIQUID MICROEXTRACTION BASED ON SOLIDIFICATION OF FLOATING ORGANIC DROP COMBINED WITH COUNTER-ELECTROOSMOTIC FLOW NORMAL STACKING MODE IN CAPILLARY ELECTROPHORESIS FOR THE DETERMINATION OF BISPHENOL A IN WATER AND URINE SAMPLES. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, v. 36, n. 20, p. 2855–2870, 14 dez. 2013. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10826076.2012.725700>>. Acesso em: 31 out. 2018.
- AMIN, Mohammad Mehdi; EBRAHIM, Karim; POURSAFA, Parinaz. Development of a dispersive liquid–liquid microextraction (DLLME) method coupled with GC/MS as a simple and valid method for simultaneous determination of phthalate metabolites in plasma. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, v. 97, n. 14–15, p. 1362–1377, 8 dez. 2017. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/03067319.2017.1422497>>. Acesso em: 27 out. 2018.
- ANDRADY, Anthony L.; NEAL, Mike A. Applications and societal benefits of plastics. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 364, n. 1526, p. 1977–1984, 2009.
- AOAC. Annex I: Validation Study Protocols. p. 1–27, 2011.
- APHA - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. *Standard Methods for*

Examination of Water and Wastewater. 22nd. Ed. ed. [S.l.]: American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, 2012.

ARISTIZABAL-CIRO, Carolina *et al.* Monitoring pharmaceuticals and personal care products in reservoir water used for drinking water supply. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 24, n. 8, p. 7335–7347, 2017.

B. K. MATUSZEWSKI, *; M. L. CONSTANZER, And; CHAVEZ-ENG, C. M. Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC–MS/MS. 2003. Disponível em:

<<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac020361s>>. Acesso em: 30 out. 2018.

BAKER, David R.; KASPRZYK-HORDERN, Barbara. Critical evaluation of methodology commonly used in sample collection, storage and preparation for the analysis of pharmaceuticals and illicit drugs in surface water and wastewater by solid phase extraction and liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1218, n. 44, p. 8036–8059, 4 nov. 2011. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967311013604>>. Acesso em: 3 jun. 2018.

BALÁZS, Adrienn *et al.* Hormonal activity, cytotoxicity and developmental toxicity of UV filters. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 131, p. 45–53, 2016.

BARADIE, Bilal; SHOICHET, Molly S. Novel fluoro-terpolymers for coatings applications. *Macromolecules*, v. 38, n. 13, p. 5560–5568, 2005.

BECERRIL BRAVO, Jose Elias. Contaminantes emergentes en el agua. *Revista Digital Universitaria*, v. 10, n. 8, p. 1–7, 2009. Disponível em:

<<http://www.revista.unam.mx/vol.10/num8/art54/int54.htm>>.

BENIJTS, Tom *et al.* Countering matrix effects in environmental liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry water analysis for endocrine disrupting chemicals. *Journal of Chromatography A*, v. 1029, n. 1–2, p. 153–159, 12 mar. 2004. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0021967303023148>>. Acesso em: 18 mar. 2020.

BERIJANI, Sana *et al.* Dispersive liquid–liquid microextraction combined with gas chromatography–flame photometric detection: Very simple, rapid and sensitive method for the determination of organophosphorus pesticides in water. *Journal of Chromatography A*, v. 1123, n. 1, p. 1–9, 4 ago. 2006. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967306009411>>. Acesso em:

27 out. 2018.

BERTANZA, Giorgio *et al.* Effect of biological and chemical oxidation on the removal of estrogenic compounds (NP and BPA) from wastewater: An integrated assessment procedure. *Water Research*, v. 45, n. 8, p. 2473–2484, 1 abr. 2011. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135411000418>>. Acesso em: 5 abr. 2020.

BILA, Daniele Maia; DEZOTTI, Márcia. *Desreguladores endócrinos no meio ambiente: Efeitos e consequências*. *Química Nova*. [S.l: s.n.], 2007

BLAIR, Benjamin *et al.* Evaluating the degradation, sorption, and negative mass balances of pharmaceuticals and personal care products during wastewater treatment. *Chemosphere*, v. 134, p. 395–401, 1 set. 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653515004245>>. Acesso em: 22 set. 2019.

BOX, G. E. P.; WILSON, K. B. On the Experimental Attainment of Optimum Conditions. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, v. 13, n. 1, p. 1–38, 1951.

CABADO, Ana G. *et al.* Determination of bisphenol A diglycidyl ether, novolac glycidyl ether and their derivatives migrated from can coatings into foodstuff by UPLC-MS/MS. *European Food Research and Technology*, v. 235, n. 2, p. 231–244, 2008.

CALDAS, Sergiane Souza *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.

CALDAS, Sergiane Souza *et al.* Talanta Multi-residue method for determination of 58 pesticides, pharmaceuticals and personal care products in water using solvent demulsification dispersive liquid – liquid microextraction combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta*, v. 146, p. 676–688, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2015.06.047>>.

CALDAS, Sergiane Souza; DISSERTAÇÃO. Otimização E Validação De Métodos Empregando Dllme, Spe, Hplc-Dad E Lc-Esi-MS / MS Para Determinação De. p. 145, 2009.

CAMPANALE, Claudia *et al.* A Detailed Review Study on Potential Effects of Microplastics and Additives of Concern on Human Health. 2020.

CAMPILLO, Natalia *et al.* Ten years of dispersive liquid–liquid microextraction and derived techniques. *Applied Spectroscopy Reviews*, v. 52, n. 4, p. 267–415, 2017.

ČESEN, Marjeta *et al.* The occurrence and source identification of bisphenol compounds in wastewaters. *Science of The Total Environment*, v. 616–617, p. 744–752, 1 mar. 2018. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969717329650>>. Acesso em: 27 out. 2018.

CETESB - ANA. Guia nacional de coleta e preservação de amostras: água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos. *COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO - CETESB; AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS.*, p. 326, 2011.

CHÁVEZ-MORENO, Carmin A. *et al.* Optimization of solid-phase extraction of parabens and benzophenones in water samples using a combination of Plakett-Burman and Box-Behnken designs. *Journal of Separation Science*, v. 41, n. 24, p. 4488–4497, 1 dez. 2018. Disponível em:

<<http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.201800796>>. Acesso em: 24 ago. 2019.

CHEN, Da *et al.* Bisphenol Analogues Other Than BPA: Environmental Occurrence, Human Exposure, and Toxicity—A Review. *Environmental Science & Technology*, v. 50, n. 11, p. 5438–5453, 7 jun. 2016. Disponível em:

<<http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.est.5b05387>>. Acesso em: 4 jun. 2018.

CHEN, Wei *et al.* Simultaneous determination of 20 trace organic chemicals in waters by solid-phase extraction (SPE) with triple-quadrupole mass spectrometer (QqQ-MS) and hybrid quadrupole Orbitrap high resolution MS (Q-Orbitrap-HRMS). *Chemosphere*, v. 163, p. 99–107, 1 nov. 2016. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004565351630978X>>. Acesso em: 11 set. 2019.

CHRISTA S. MCARDELL, * *et al.* Occurrence and Fate of Macrolide Antibiotics in Wastewater Treatment Plants and in the Glatt Valley Watershed, Switzerland. 2003. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es034368i>>. Acesso em: 22 set. 2019.

CLARK, Earl. Sulfolane and Sulfones. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2000. . Disponível em:

<<http://doi.wiley.com/10.1002/0471238961.1921120603120118.a01>>. Acesso em: 27 out. 2018.

CMAQ. U.S. Environmental Protection Agency. *Www.Cmaq-Model.Org*, p. 1–22, 2011.

COMTOIS-MAROTTE, Simon *et al.* Analysis of emerging contaminants in water and solid samples using high resolution mass spectrometry with a Q Exactive orbital ion trap and estrogenic activity with YES-assay. *Chemosphere*, v. 166, p. 400–411, 2017.

DANOVARO, Roberto *et al.* Sunscreens cause coral bleaching by promoting viral infections. *Environmental Health Perspectives*, v. 116, n. 4, p. 441–447, 2008.

DANZL, Erica *et al.* Biodegradation of bisphenol A, bisphenol F and bisphenol S in seawater. *International journal of environmental research and public health*, v. 6, n. 4, p. 1472–84, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19440529>>. Acesso em: 27 out. 2018.

DE SÁ SALOMÃO, André Luís; MARQUES, Marcia. Estrogenicity and Genotoxicity Detection in Different Contaminated Waters. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, v. 21, n. 7, p. 1793–1809, 3 out. 2015. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10807039.2014.987027>>. Acesso em: 22 set. 2019.

DERRINGER, George; SUICH, Ronald. Simultaneous Optimization of Several Response Variables. *Journal of Quality Technology*, v. 12, n. 4, p. 214–219, 1980.

DOERGE, Daniel R. *et al.* Distribution of bisphenol A into tissues of adult, neonatal, and fetal Sprague-Dawley rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 255, n. 3, p. 261–270, 15 set. 2011.

EGGEN, Rik I.L. *et al.* Reducing the discharge of micropollutants in the aquatic environment: The benefits of upgrading wastewater treatment plants. *Environmental Science and Technology*, v. 48, n. 14, p. 7683–7689, 2014.

ELADAK, Soria *et al.* A new chapter in the bisphenol a story: Bisphenol S and bisphenol F are not safe alternatives to this compound. *Fertility and Sterility*. [S.l: s.n.], 2015

EPA. *GUIDANCE FOR METHODS DEVELOPMENT AND METHODS VALIDATION FOR THE RCRA PROGRAM*. . [S.l: s.n.], 1992. Disponível em: <<https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-10/documents/methdev.pdf>>. Acesso em: 30 out. 2018.

FLINT, Shelby *et al.* Bisphenol A exposure, effects, and policy: A wildlife perspective. *Journal of Environmental Management*, v. 104, p. 19–34, 15 ago. 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301479712001405>>. Acesso em:

29 out. 2018.

FROEHNER, Sandro *et al.* Removal capacity of caffeine, hormones, and bisphenol by aerobic and anaerobic sewage treatment. *Water, Air, and Soil Pollution*, v. 216, n. 1–4, p. 463–471, 2011.

FUKAZAWA, Hitoshi *et al.* Formation of Chlorinated Derivatives of Bisphenol A in Waste Paper Recycling Plants and Their Estrogenic Activities. v. 48, n. 3, p. 242–249, 2002.

GAGO-FERRERO, Pablo *et al.* Fully automated determination of nine ultraviolet filters and transformation products in natural waters and wastewaters by on-line solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1294, p. 106–116, 2013.

GAGO-FERRERO, Pablo *et al.* Wide-scope target screening of >2000 emerging contaminants in wastewater samples with UPLC-Q-ToF-HRMS/MS and smart evaluation of its performance through the validation of 195 selected representative analytes. *Journal of Hazardous Materials*, n. November, 2019.

GARCÍA-CÓRCOLES, M. T. *et al.* Chromatographic Methods for the Determination of Emerging Contaminants in Natural Water and Wastewater Samples: A Review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, v. 49, n. 2, p. 160–186, 4 mar. 2019. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408347.2018.1496010>>. Acesso em: 24 ago. 2019.

GIULIVO, Monica *et al.* Human exposure to endocrine disrupting compounds: Their role in reproductive systems, metabolic syndrome and breast cancer. A review. *Environmental Research*, v. 151, p. 251–264, 2016.

GROS, Meritxell; PETROVIĆ, Mira; BARCELÓ, Damià. Tracing pharmaceutical residues of different therapeutic classes in environmental waters by using liquid chromatography/quadrupole-linear ion trap mass spectrometry and automated library searching. *Analytical Chemistry*, v. 81, n. 3, p. 898–912, 2009.

GROS, Meritxell; RODRÍGUEZ-MOZAZ, Sara; BARCELÓ, Damià. Rapid analysis of multiclass antibiotic residues and some of their metabolites in hospital, urban wastewater and river water by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-linear ion trap tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1292, p. 173–188, 31 maio 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002196731300037X>>. Acesso em: 22 set. 2019.

GUAN, Jin *et al.* Simultaneous determination of 12 pharmaceuticals in water samples by ultrasound-assisted dispersive liquid – liquid microextraction coupled with ultra-high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00216-016-9913-1>>.

GUERRA, P. *et al.* Bisphenol-A removal in various wastewater treatment processes: Operational conditions, mass balance, and optimization. *Journal of Environmental Management*, v. 152, p. 192–200, 1 abr. 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301479715000602?via%3Dihub>>. Acesso em: 29 out. 2018.

GUSTAVO GONZÁLEZ, A.; ÁNGELES HERRADOR, M. A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 26, n. 3, p. 227–238, 1 mar. 2007. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0165993607000118>>. Acesso em: 2 abr. 2020.

HAMADA, M.; WU, C. F. J. Analysis of Designed Experiments with Complex Aliasing. *Journal of Quality Technology*, v. 24, n. 3, p. 130–137, 1992.

HARRIS, D. C. *Análise Química Quantitativa*. 5ª edição ed. Rio de Janeiro: [s.n.], 2003.

HERMABESSIERE, Ludovic *et al.* Occurrence and effects of plastic additives on marine environments and organisms: A review. *Chemosphere*, v. 182, p. 781–793, 2017.

ICH. ICH Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures : Text and Methodology. *International Conference on Harmonization*, v. 1994, n. November 1996, p. 17, 2005.

IKE, M *et al.* Biodegradation of a variety of bisphenols under aerobic and anaerobic conditions. *Water science and technology : a journal of the International Association on Water Pollution Research*, v. 53, n. 6, p. 153–9, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16749452>>. Acesso em: 27 out. 2018.

INMETRO. Orientação Sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos - DOQ-CGCRE-008. *Instituto Nacional de Metrologia e Normalização e Qualidade Industrial*, p. 25, 2003.

JAKRISHAN; KUMAR, Praveen. Tandem mass spectrometry. *Journal of Neonatology*, v. 19, n. 2, p. 180–183, 2005.

JEON, Hee-Kyung; CHUNG, Yong; RYU, Jae-Chun. Simultaneous determination of

benzophenone-type UV filters in water and soil by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1131, n. 1–2, p. 192–202, 27 out. 2006. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967306013823#bib11>>.

Acesso em: 6 abr. 2020.

KABIR, Eva Rahman; RAHMAN, Monica Sharfin; RAHMAN, Imon. A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 40, n. 1, p. 241–258, 1 jul. 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1382668915300120>>. Acesso em: 28 out. 2018.

KAMEDA, Yutaka; KIMURA, Kumiko; MIYAZAKI, Motonobu. Occurrence and profiles of organic sun-blocking agents in surface waters and sediments in Japanese rivers and lakes. *Environmental Pollution*, v. 159, n. 6, p. 1570–1576, 1 jun. 2011. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749111001308>>. Acesso em: 6 abr. 2020.

KARTHIKRAJ, Rajendiran; KANNAN, Kurunthachalam. Mass loading and removal of benzotriazoles, benzothiazoles, benzophenones, and bisphenols in Indian sewage treatment plants. *Chemosphere*, v. 181, p. 216–223, 1 ago. 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653517306112>>. Acesso em: 5 abr. 2020.

KASPRZYK-HORDERN, Barbara; DINSDALE, Richard M.; GUWY, Alan J. The removal of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs during wastewater treatment and its impact on the quality of receiving waters. *Water Research*, v. 43, n. 2, p. 363–380, 2009.

KHODADOUST, Saeid; HADJMOHAMMADI, Mohammadreza. Determination of N-methylcarbamate insecticides in water samples using dispersive liquid-liquid microextraction and HPLC with the aid of experimental design and desirability function. *Analytica Chimica Acta*, v. 699, n. 1, p. 113–119, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2011.04.011>>.

KONNO, Yousuke *et al.* Synthesis and properties of fluorine-containing polyethers with pendant hydroxyl groups by the polyaddition of bis(epoxide)s with diols. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, v. 42, n. 10, p. 2543–2550, 2004.

LANÇAS, Fernando Mauro. *Extração em fase sólida (SPE)*. São Carlos: [s.n.], 2004.

LIAO, Chunyang *et al.* Bisphenol Analogues in Sediments from Industrialized Areas in

the United States, Japan, and Korea: Spatial and Temporal Distributions.

Environmental Science & Technology, v. 46, n. 21, p. 11558–11565, nov. 2012.

LIAO, Chunyang; LIU, Fang; KANNAN, Kurunthachalam. Bisphenol S, a New Bisphenol Analogue, in Paper Products and Currency Bills and Its Association with Bisphenol A Residues. *Environmental Science & Technology*, v. 46, n. 12, p. 6515–6522, 19 jun. 2012. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/10.1021/es300876n>>. Acesso em: 27 out. 2018.

LITHNER, Delilah; LARSSON, Ake; DAVE, Göran. Environmental and health hazard ranking and assessment of plastic polymers based on chemical composition. *Science of the Total Environment*, v. 409, n. 18, p. 3309–3324, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.04.038>>.

LIU, Yanhua *et al.* Occurrence, distribution and sources of bisphenol analogues in a shallow Chinese freshwater lake (Taihu Lake): Implications for ecological and human health risk. *Science of The Total Environment*, v. 599–600, p. 1090–1098, 1 dez. 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969717311695?via%3Dihub>>. Acesso em: 9 out. 2018.

LORAIN, Gregory A.; PETTIGROVE, Mark E. Seasonal variations in concentrations of pharmaceuticals and personal care products in drinking water and reclaimed wastewater in Southern California. *Environmental Science and Technology*, v. 40, n. 3, p. 687–695, 2006.

LUO, Yunlong *et al.* A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. *Science of the Total Environment*, v. 473–474, p. 619–641, 2014.

MAN, Yu Bon *et al.* Fate of bisphenol A, perfluorooctanoic acid and perfluorooctanesulfonate in two different types of sewage treatment works in Hong Kong. *Chemosphere*, v. 190, p. 358–367, 2018.

MANDRAH, Kapil *et al.* Occurrence and estrogenic potency of eight bisphenol analogs in sewage sludge from the U.S. EPA targeted national sewage sludge survey. *Chemosphere*, v. 119, p. 318–328, 2015.

MARUBE, L.C. *et al.* Multi-residue method for determination of thirty-five pesticides, pharmaceuticals and personal care products in water using ionic liquid-dispersive liquid-liquid microextraction combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 29, n. 6, p. 1349–1359,

2018.

MELCER, Henryk; KLEČKA, Gary. Treatment of Wastewaters Containing Bisphenol A: State of the Science Review. *Water Environment Research*, v. 83, n. 7, p. 650–666, 2011.

MOLINS-DELGADO, Daniel; DÍAZ-CRUZ, M. Silvia; BARCELÓ, Damià. Ecological risk assessment associated to the removal of endocrine-disrupting parabens and benzophenone-4 in wastewater treatment. *Journal of Hazardous Materials*, v. 310, p. 143–151, 2016.

MOMPELAT, S.; LE BOT, B.; THOMAS, O. Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water. *Environment International*, v. 35, n. 5, p. 803–814, 1 jul. 2009. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0160412008002225?via%3Dihub>>. Acesso em: 22 set. 2019.

MOREIRA, Bruna Juliana; YOKOYA, Jennifer Michiko Chauca; GAITANI, Cristiane Masetto. DLLME fundamentos, aplicações, inovações análise biológica. *Scientia Chromatographica*, v. 6, n. 3, p. 186–204, 2014.

MOREMAN, John *et al.* Acute Toxicity, Teratogenic, and Estrogenic Effects of Bisphenol A and Its Alternative Replacements Bisphenol S, Bisphenol F, and Bisphenol AF in Zebra fish Embryo-Larvae. p. 12796–12805, 2017.

MOUSAVI, Leila; TAMIJI, Zahra; KHOSHAYAND, Mohammad Reza. Applications and opportunities of experimental design for the dispersive liquid–liquid microextraction method – A review. *Talanta*, v. 190, p. 335–356, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.08.002>>.

NEGREIRA, N. *et al.* Solid-phase extraction followed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of hydroxylated benzophenone UV absorbers in environmental water samples. *Analytica Chimica Acta*, v. 654, n. 2, p. 162–170, 10 nov. 2009. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267009013014>>. Acesso em: 6 abr. 2020.

PARRILLA VÁZQUEZ, M. M. *et al.* Ultrasound-assisted ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction coupled with liquid chromatography-quadrupole-linear ion trap-mass spectrometry for simultaneous analysis of pharmaceuticals in wastewaters. *Journal of Chromatography A*, v. 1291, p. 19–26, 2013a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2013.03.066>>.

- PARRILLA VÁZQUEZ, M. M. *et al.* Ultrasound-assisted ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction coupled with liquid chromatography-quadrupole-linear ion trap-mass spectrometry for simultaneous analysis of pharmaceuticals in wastewaters. *Journal of Chromatography A*, v. 1291, p. 19–26, 24 maio 2013b. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967313005347>>. Acesso em: 30 ago. 2018.
- PAVLOVIĆ, Dragana Mutavdžić *et al.* Sample preparation in analysis of pharmaceuticals. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, v. 26, n. 11, p. 1062–1075, 2007.
- PETROVIĆ, Mira; GONZALEZ, Susana; BARCELÓ, Damià. Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 22, n. 10, p. 685–696, 1 nov. 2003a. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993603011051>>. Acesso em: 22 set. 2019.
- PETROVIĆ, Mira; GONZALEZ, Susana; BARCELÓ, Damià. Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 22, n. 10, p. 685–696, 1 nov. 2003b. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0165993603011051>>. Acesso em: 22 set. 2019.
- PHOA, Frederick K.H.; WONG, Weng Kee; XU, Hongquan. The need of considering the interactions in the analysis of screening designs. *Journal of Chemometrics*, v. 23, n. 10, p. 545–553, 2009.
- PLACKETT, R. L.; BURMAN, J. P. The Design of Optimum Multifactorial Experiments. *Biometrika*, v. 33, n. 4, p. 305, jun. 1946.
- PUGAJEVA, Iveta *et al.* Determination of pharmaceutical residues in wastewater using high performance liquid chromatography coupled to quadrupole-Orbitrap mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 133, p. 64–74, 30 jan. 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708516310895>>. Acesso em: 1 out. 2018.
- QIU, Wenhui *et al.* The occurrence, potential toxicity, and toxicity mechanism of bisphenol S, a substitute of bisphenol A: A critical review of recent progress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 173, p. 192–202, 30 maio 2019. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651319300958?via%3Dihub>>. Acesso em: 16 maio 2019.

REZAEI, Mohammad *et al.* Determination of organic compounds in water using dispersive liquid–liquid microextraction. *Journal of Chromatography A*, v. 1116, n. 1–2, p. 1–9, 26 maio 2006. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967306005280>>. Acesso em: 27 out. 2018.

RIBANI, Marcelo *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, v. 27, n. 5, p. 771–780, out. 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422004000500017&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 16 set. 2018.

ROCHA, Bruno Alves *et al.* A fast method for bisphenol A and six analogues (S, F, Z, P, AF, AP) determination in urine samples based on dispersive liquid-liquid microextraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta*, v. 154, p. 511–519, jul. 2016a. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914016302260>>.

ROCHA, Bruno Alves *et al.* A fast method for bisphenol A and six analogues (S, F, Z, P, AF, AP) determination in urine samples based on dispersive liquid-liquid microextraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta*, v. 154, p. 511–519, 1 jul. 2016b. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914016302260>>. Acesso em: 3 out. 2018.

ROCHA, Bruno Alves; DE OLIVEIRA, Anderson Rodrigo Moraes; BARBOSA, Fernando. A fast and simple air-assisted liquid-liquid microextraction procedure for the simultaneous determination of bisphenols, parabens, benzophenones, triclosan, and triclocarban in human urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta*, v. 183, p. 94–101, 1 jun. 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914018301607>>. Acesso em: 23 ago. 2019.

ROCHESTER, Johanna R.; BOLDEN, Ashley L. Bisphenol S and F: A systematic review and comparison of the hormonal activity of bisphenol a substitutes. *Environmental Health Perspectives*, v. 123, n. 7, p. 643–650, 2015.

RODRIGUES, Maria Isabel; IEMMA, Antonio Francisco. *Experimental design and process optimization*. 1. ed. New York: CRC Press, 2014.

RYU, Yeonsuk *et al.* Determination of endocrine disrupting chemicals in water samples by dispersive liquid-liquid microextraction combined with liquid chromatography-fluorescence detection. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, v. 42, n. 2, p. 77–82, 2012.

SANTOS, Julia M. *et al.* Differential BPA levels in sewage wastewater effluents from metro Detroit communities. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 188, n. 10, p. 585, 23 out. 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10661-016-5593-8>>. Acesso em: 29 out. 2018.

SARAJI, Mohammad; BOROUJENI, Malihe Khalili. *Recent developments in dispersive liquid-liquid microextraction Microextraction Techniques*. [S.l: s.n.], 2014. v. 406.

SCHNEIDER, Samantha L.; LIM, Henry W. Review of environmental effects of oxybenzone and other sunscreen active ingredients. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 80, n. 1, p. 266–271, 2019.

SCOGNAMIGLIO, Viviana *et al.* Analytical tools monitoring endocrine disrupting chemicals. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, v. 80, p. 555–567, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2016.04.014>>.

STARLING, Maria Clara V.M.; AMORIM, Camila C.; LEÃO, Mônica Maria D. Occurrence, control and fate of contaminants of emerging concern in environmental compartments in Brazil. *Journal of Hazardous Materials*, v. 372, p. 17–36, jun. 2019.

STEENE, Jet C Van De; LAMBERT, Willy E. Comparison of Matrix Effects in HPLC-MS / MS and UPLC-MS / MS Analysis of Nine Basic Pharmaceuticals in Surface Waters. 2008.

STRAUB, Jürg Oliver. Reduction in the environmental exposure of pharmaceuticals through diagnostics, Personalised Healthcare and other approaches. A mini review and discussion paper. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, v. 3, p. 1–7, 1 jun. 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352554115300103>>. Acesso em: 22 set. 2019.

SUN, Qian *et al.* Fate and mass balance of bisphenol analogues in wastewater treatment plants in Xiamen City, China. *Environmental Pollution*, v. 225, p. 542–549, 1 jun. 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749116327592>>. Acesso em: 5 abr. 2020.

SUN, X. *et al.* Determination of nine bisphenols in sewage and sludge using dummy

molecularly imprinted solid-phase extraction coupled with liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1552, p. 10–16, 2018.

TERNES, Thomas A. *et al.* A rapid method to measure the solid–water distribution coefficient (K_d) for pharmaceuticals and musk fragrances in sewage sludge. *Water Research*, v. 38, n. 19, p. 4075–4084, nov. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15491655>>. Acesso em: 30 mar. 2019.

TEUTEN, Emma L. *et al.* Potential for plastics to transport hydrophobic contaminants. *Environmental Science and Technology*, v. 41, n. 22, p. 7759–7764, 2007.

TEUTEN, Emma L. *et al.* Transport and release of chemicals from plastics to the environment and to wildlife. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 364, n. 1526, p. 2027–2045, 2009.

THOMAS, Kevin; SCHLABACH, Martin. *Screening program 2013*. [S.l.: s.n.], 2014.

TORO-VÉLEZ, A.F. *et al.* BPA and NP removal from municipal wastewater by tropical horizontal subsurface constructed wetlands. *Science of The Total Environment*, v. 542, p. 93–101, 15 jan. 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969715308159>>. Acesso em: 5 abr. 2020.

TSUI, Mirabelle M.P. *et al.* Organic ultraviolet (UV) filters in the South China sea coastal region: Environmental occurrence, toxicological effects and risk assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 181, n. March, p. 26–33, 2019.

ULLAH, Asad *et al.* Bisphenol A and its analogs bisphenol B, bisphenol F, and bisphenol S: Comparative in vitro and in vivo studies on the sperms and testicular tissues of rats. *Chemosphere*, v. 209, p. 508–516, 2018.

UTSUNOMIYA, Hidekazu *et al.* Cytotoxicity of benzophenone-3, an organic ultraviolet filter, caused by increased intracellular Zn²⁺ levels in rat thymocytes. *Chemico-Biological Interactions*, v. 298, p. 52–56, 25 jan. 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009279718311050?via%3Dihub>>. Acesso em: 24 ago. 2019.

VAGHAR-LAHIJANI, Gholamreza *et al.* Extraction and Determination of Two Antidepressant Drugs in Human Plasma by Dispersive Liquid–Liquid Microextraction–HPLC. *Journal of Analytical Chemistry*, v. 73, n. 2, p. 145–151, 2018. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1134/S1061934818020144>>.

VÄLITALO, Pia *et al.* Estrogenic activity in Finnish municipal wastewater effluents.

Water Research, v. 88, p. 740–749, 2016.

VAN DE STEENE, Jet C.; LAMBERT, Willy E. Validation of a solid-phase extraction and liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometric method for the determination of nine basic pharmaceuticals in wastewater and surface water samples. *Journal of Chromatography A*, v. 1182, n. 2, p. 153–160, 29 fev. 2008. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967308000356>>. Acesso em: 4 set. 2019.

VANDENBERG, Laura N. *et al.* Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reproductive Toxicology*, v. 24, n. 2, p. 139–177, 1 ago. 2007. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0890623807002377?via%3Dihub>>. Acesso em: 27 out. 2018.

VELA-SORIA, F. *et al.* A multiclass method for the analysis of endocrine disrupting chemicals in human urine samples. Sample treatment by dispersive liquid–liquid microextraction. *Talanta*, v. 129, p. 209–218, 1 nov. 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914014003919>>. Acesso em: 27 out. 2018.

VERA CANDIOTI, Luciana *et al.* Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. *Talanta*, v. 124, p. 123–138, 15 jun. 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914014000459>>. Acesso em: 18 mar. 2020.

WANG, Yu; WANG, Yuzhen; LIU, Huilin. A novel fluorescence and SPE adsorption nanomaterials of molecularly imprinted polymers based on quantum dot-grafted covalent organic frameworks for the high selectivity and sensitivity detection of ferulic acid. *Nanomaterials*, v. 9, n. 2, 2019.

WANG, Zhonghe *et al.* Simultaneous identification and quantification of bisphenol A and 12 bisphenol analogues in environmental samples using precolumn derivatization and ultra high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, n. January, p. 1–10, 2018.

WICK, Arne; FINK, Guido; TERNES, Thomas A. Comparison of electrospray ionization and atmospheric pressure chemical ionization for multi-residue analysis of biocides, UV-filters and benzothiazoles in aqueous matrices and activated sludge by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1217, n. 14, p. 2088–2103, 2010.

WU, Ming-hong *et al.* Pollution patterns and underlying relationships of benzophenone-type UV-filters in wastewater treatment plants and their receiving surface water.

Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 152, p. 98–103, 15 maio 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651318300459>>. Acesso em: 6 abr. 2020.

XIA, Jia; XIANG, Bingren; ZHANG, Wei. Determination of metacrate in water samples using dispersive liquid–liquid microextraction and HPLC with the aid of response surface methodology and experimental design. *Analytica Chimica Acta*, v. 625, n. 1, p. 28–34, 5 set. 2008. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267008013226>>. Acesso em: 22 set. 2019.

XIAO, Changyun *et al.* Hazards of bisphenol A (BPA) exposure: A systematic review of plant toxicology studies. *Journal of Hazardous Materials*, p. 121488, 2019.

YAMAZAKI, Eriko *et al.* Bisphenol A and other bisphenol analogues including BPS and BPF in surface water samples from Japan, China, Korea and India. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 122, p. 565–572, 2015a.

YAMAZAKI, Eriko *et al.* Bisphenol A and other bisphenol analogues including BPS and BPF in surface water samples from Japan, China, Korea and India. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 122, p. 565–572, 1 dez. 2015b. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651315301056>>. Acesso em: 9 set. 2019.

YANG, Yunjia *et al.* Simultaneous determination of seven bisphenols in environmental water and solid samples by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1328, p. 26–34, 2014.

YE, Lei *et al.* Orthogonal array design for the optimization of ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction of benzophenone-type UV filters. *Journal of Separation Science*, v. 34, n. 6, p. 700–706, 2011.

ZANG, Xiao Huan *et al.* Developments of dispersive liquid-liquid microextraction technique. *Fenxi Huaxue/ Chinese Journal of Analytical Chemistry*, v. 37, n. 2, p. 161–168, 2009. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1872-2040\(08\)60082-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1872-2040(08)60082-1)>.

ZGOŁA-GRZEŚKOWIAK, Agnieszka; GRZEŚKOWIAK, Tomasz. Dispersive liquid-liquid microextraction. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, v. 30, n. 9, p. 1382–1399, 2011.

ZHANG, Yin Feng *et al.* Bisphenol A alternatives bisphenol S and bisphenol F interfere

with thyroid hormone signaling pathway in vitro and in vivo. *Environmental Pollution*, v. 237, p. 1072–1079, 2018.

ZHANG, Yufeng; LEE, Hian Kee. Determination of ultraviolet filters in water samples by vortex-assisted dispersive liquid–liquid microextraction followed by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1249, p. 25–31, 3 ago. 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967312008850>>. Acesso em: 23 mar. 2020.

ZHAO, Pengfei *et al.* Solid-phase extraction combined with dispersive liquid-liquid microextraction and chiral liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the simultaneous enantioselective determination of representative proton-pump inhibitors in water samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00216-016-9753-z>>.

ZIV-GAL, Ayelet; FLAWS, Jodi A. Evidence for bisphenol A-induced female infertility: a review (2007–2016). *Fertility and Sterility*, v. 106, n. 4, p. 827–856, 2016.

ZOU, Yinyan *et al.* Determination of bisphenol A diglycidyl ether, novolac glycidyl ether and their derivatives migrated from can coatings into foodstuff by UPLC-MS/MS. *European Food Research and Technology*, v. 235, n. 2, p. 231–244, 2012.