

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA**

**CARINA DE FÁTIMA NASCIMENTO**

**Desenvolvimento de procedimentos analíticos explorando  
microextração líquido-líquido em fluxo para a determinação de  
espécies de interesse em águas e leite**

**Piracicaba**

**2018**



**CARINA DE FÁTIMA NASCIMENTO**

**Desenvolvimento de procedimentos analíticos explorando  
microextração líquido-líquido em fluxo para a determinação de  
espécies de interesse em águas e leite**

**Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011**

**Tese apresentada ao Centro de Energia  
Nuclear na Agricultura da Universidade de  
São Paulo para obtenção do título de Doutor  
em Ciências**

**Área de Concentração: Química na  
Agricultura e no Ambiente**

**Orientador: Prof. Dr. Fábio Rodrigo  
Piovezani Rocha**

**Piracicaba**

**2018**

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

**Técnica de Biblioteca - CENA/USP**

Nascimento, Carina de Fátima

Desenvolvimento de procedimentos analíticos explorando microextração líquido-líquido em fluxo para a determinação de espécies de interesse em águas e leite / Carina de Fátima Nascimento; orientador Fábio Rodrigo Piovezani Rocha. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2018.

122 p. : il.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Adulteração de alimentos 2. Análise em fluxo 3. Análise por injeção sequencial  
4. Espectrometria 5. Química verde 6. Separação líquido-líquido  
I. Título

CDU (543.068.3 + 543.42) : 543.3

**Elaborada por:**

Marília Ribeiro Garcia Henyei

CRB-8/3631

Resolução CFB Nº 184 de 29 de setembro de 2017

*A Deus, pelo dom da vida, por tudo que tenho e  
pela pessoa que sou.*

*Aos meus pais, Vicente e Conceição, pelo amor sem limites,  
dedicação e incentivo durante todo esse tempo.*

*Aos meus irmãos, Patrícia e Gustavo, pela sinceridade  
e por toda amizade.*

*Aos meus sobrinhos Ana Clara e Davi  
pelos momentos de alegria.*

*Dedico!*



*Ao meu esposo, José Marcos Leite,  
dedico esse trabalho pelo  
carinho, compreensão, apoio e  
paciência em cada instante  
Ao meu anjinho Gabriel, que neste  
último ano veio para me ensinar  
o verdadeiro sentido da vida.*

*Dedico!*



*Ao meu orientador, Fábio, pelo incentivo,  
orientação e por compartilhar  
suas experiências e conhecimentos.*

*Dedico!*



## AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar oportunidade de chegar até aqui e estar comigo a todo tempo;

Aos meus queridos pais Vicente Paulo do Nascimento e Conceição Aparecida Nascimento, aos meus irmãos Patrícia Nascimento Gomes e Gustavo Henrique Nascimento, aos meus sobrinhos lindos Ana Clara e Davi, por todo apoio, carinho, dedicação e por estarem sempre presentes em todos os momentos;

Ao meu querido esposo José Marcos todo carinho, amor, incentivo e por sempre estar presente nos momentos que precisei;

A toda minha família e principalmente aos meus avôs Joaquim (*in memoriam*) e Maria Conceição, pelo apoio, incentivo e por estarem sempre presentes;

Ao querido Prof. Fábio, pela orientação e amizade;

Aos amigos de laboratório: Sâmara, Maria Soledad, Milton, Pedro, Anna Flávia, Mariana e Thiago pela convivência agradável. Em especial à Sâmara, Anna Flávia, Mariana e ao Milton e Thiago pelas sugestões na Tese;

À Universidade de São Paulo e ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura pela infraestrutura e apoio institucional oferecido para a realização desta Tese;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelos auxílios e bolsa;

Aos pesquisadores do Laboratório de Química Analítica "*Henrique Bergamin Filho*": Prof. Boaventura F. Reis, Prof. Francisco J. Krug, Prof. Elias A. G. Zagatto e Prof<sup>a</sup>. Maria Fernanda Giné pela convivência;

Aos funcionários do Laboratório de Química Analítica: Sheila Perdigão, Fátima Patreze, Iolanda Rufini (Tatinha), Cláudia M. F. Correia e Liz Mary Bueno, pelos apoios em laboratório e pessoais;

Aos funcionários da Pós-Graduação, Cleide, Liene, Marcos e Magali pelo apoio;

À Professora Wanessa pelo apoio e discussões sobre o trabalho;

Ao amigo Marcos Brasil, por toda a ajuda;

Ao Professor Valdemar Luiz Tornisielo e ao técnico Rodrigo Pimpinato do Laboratório de Ecotoxicologia pela disponibilização do HPLC utilizado na avaliação de exatidão dos procedimentos propostos;

À Marília da Seção Técnica de Biblioteca por ser sempre tão prestativa;

A todos os outros funcionários deste Centro que, de forma direta e indireta, também tiveram contribuições;

Aos meus amigos do CENA: Lidiane, Andressa, Manoel, Oziel, Tuanne, Felisberto, Claudinéia, Bruno e Ticiane;

A todos os amigos que fiz em Piracicaba;

A todas as pessoas que contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada a todos!

## RESUMO

NASCIMENTO, C. F. **Desenvolvimento de procedimentos analíticos explorando microextração líquido-líquido em fluxo para a determinação de espécies de interesse em águas e leite.** 2018. 122 p. Tese (Doutorado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2018.

Três procedimentos analíticos envolvendo microextração líquido-líquido (MELL) em fluxo foram desenvolvidos para as determinações de formaldeído em leite, detergentes aniônicos em águas de rios e bisfenol A (BPA) em águas de torneira. Microextração líquido-líquido dispersiva (MELLD) foi empregada no primeiro e no segundo procedimentos. O primeiro procedimento foi conduzido em um sistema fluxo-batelada no qual a quantificação espectrofotométrica era realizada diretamente na câmara de mistura/reação, através do acoplamento de fibras ópticas. No segundo, foi explorada a estratégia *lab-in-syringe*, em que a formação do par iônico entre os detergentes aniônicos e corante catiônico azul de metileno, bem como MELLD ocorriam no interior da seringa, sendo os analitos quantificados na fase orgânica por espectrofotometria. O terceiro procedimento envolveu MELL em sistema de análises por injeção sequencial (SIA), baseada na formação de um filme de 1-octanol na parede da bobina de extração. O extrato foi eluído com etanol e a quantificação de BPA foi realizada por espectrofluorimetria. As linearidades das curvas analíticas, os limites de detecção e os limites de quantificação ao nível de 95% de confiança foram: 0,5-5,0 mg L<sup>-1</sup>, 100 e 300 µg L<sup>-1</sup> para formaldeído, 0,03-0,5 mg L<sup>-1</sup>, 9,0 e 29,0 µg L<sup>-1</sup> para detergentes, e 5,0 - 100 µg L<sup>-1</sup>, 1,8 µg L<sup>-1</sup> e 5,4 µg L<sup>-1</sup> para BPA. Os procedimentos desenvolvidos não apresentaram efeitos de matriz, e as recuperações se situaram entre 91 e 112%. A precisão e exatidão do procedimento foram concordantes com os procedimentos de referência, ao nível de 95% de confiança. Todos os procedimentos apresentaram coeficientes de variação menores do que 3,5% (n=10), frequência de amostragem de 10-17 h<sup>-1</sup>, consumiram apenas 30-40 µL de solventes orgânicos e geraram 2,7-6,7 mL de resíduos por determinação.

Palavras-chave: Análises em fluxo. Microextração líquido-líquido dispersiva. Formaldeído. Detergentes aniônicos. Bisfenol A. Leite. Águas naturais.



## ABSTRACT

NASCIMENTO, C.F. Development of analytical procedures exploiting flow-based liquid-liquid microextraction for the determination of species of interest in waters and milk. 2018. 122 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2018.

Three analytical procedures involving flow-based liquid-liquid microextraction (LLME) were developed for the determinations of formaldehyde in milk, anionic detergents in river waters, and bisphenol A (BPA) in tap waters. The first and second procedures involved dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) and spectrophotometric detection. The first one was carried out in a flow-batch system, in which the spectrophotometric quantification was performed directly in the mixing/reaction chamber by coupling optical fibers. The second one exploited the lab-in-syringe strategy, in which the ion-pair formation between the anionic detergents and the methylene blue cationic dye, as well as DLLME, were carried out inside the syringe. The third procedure involved LLME in a sequential injection system based on the formation of a 1-octanol film on the inner wall of the extraction coil. The extract was eluted with ethanol and BPA was quantified by spectrofluorimetry. Linear response ranges, detection and quantification limits estimated at the 95% confidence level were: 0.5-5.0 mg L<sup>-1</sup>, 100 and 300 µg L<sup>-1</sup> for formaldehyde; 0.03-0.5 mg L<sup>-1</sup>, 9.0 and 29.0 µg L<sup>-1</sup> for detergents, and 5.0-100 µg L<sup>-1</sup>, 1.8 and 5.4 µg L<sup>-1</sup> for BPA. Matrix effects were not observed for the assayed samples and recoveries ranged from 91 to 112%. Accuracy and precision of the results agreed with those attained by reference procedures at the 95% confidence level. All procedures yielded coefficients of variation lower than 3.5% (n = 10), sampling rates within 10 and 17 h<sup>-1</sup>, consumed only 30-40 µL of organic solvents, and generated 2.7-6.7 mL of waste by determination.

Keywords: Flow analysis. Dispersive liquid-liquid microextraction. Formaldehyde. Anionic detergents, Bisphenol A. Milk. Natural waters.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1- Módulo de análises de um sistema SFB .....	30
Figura 1.2- Módulo de análises de um sistema SIA. ....	31
Figura 3.1- Vista em corte da câmara de mistura e extração.....	41
Figura 3.2- Sistema fluxo-batelada para MELLD em linha .....	43
Figura 3.3- Efeito da concentração de TCA no tratamento das amostras de leite.....	46
Figura 3.4- Efeito do número pulsos na derivação química de formaldeído.....	47
Figura 3.5- Efeito da temperatura na derivação química do formaldeído .....	48
Figura 3.6- Efeito do tempo de reação para derivação química do formaldeído.....	48
Figura 3.7- Efeito do solvente dispersor para MELLD .....	49
Figura 3.8- Efeito do volume de líquido iônico na MELLD .....	50
Figura 3.9- Avaliação do tempo para a separação de fases .....	51
Figura 3.10- Resposta analítica obtida na MELLD em fluxo.....	51
Figura 4.1- Diagrama de fluxos do sistema <i>lab-in-syringe</i> .....	63
Figura 4.2- Efeito do número de ciclos de amostragem.....	66
Figura 4.3- Efeito do volume de mistura extratora (clorofórmio+acetonitrila).....	68
Figura 4.4- Efeito do volume de solução de MB para a formação do par iônico .....	69
Figura 4.5- Efeito do tempo para separação das fases (orgânica e aquosa) .....	70
Figura 5.1- Estrutura molecular do BPA .....	81
Figura 5.2- Diagrama do módulo de análises para a determinação de BPA .....	84
Figura 5.3- Espectro de excitação de fluorescência do BPA.....	87
Figura 5.4- Espectro de emissão de fluorescência do BPA.....	87
Figura 5.5- Representação esquemática do processo de MELL para a formação de filme.89	
Figura 5.6- Efeito dos solventes extratores empregados na MELL .....	91
Figura 5.7- Efeito do eluente sobre a MELL e detecção fluorimétrica de BPA.....	92
Figura 5.8- Efeito do volume de solvente extrator para a MELL do BPA.....	93
Figura 5.9- Efeito do volume de etanol para a remoção do extrato.....	93
Figura 5.10- Efeito do volume de amostra para MELL de BPA.....	94
Figura 5.11- Efeito da vazão da amostra na MELL em filme de 1-octanol .....	95
Figura 5.12- Efeito do comprimento da bobina de reação para a MELL do BPA .....	96
Figura 5.13- Cromatograma do BPA na fase orgânica após MELL com 1-octanol .....	101



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1- Extratores utilizados para MEGSO .....	27
Tabela 3.1- Etapas para a realização da MELLD em fluxo .....	43
Tabela 3.2- Recuperações de formaldeído adicionado em diferentes amostras de leite .....	52
Tabela 3.3- Avaliação de exatidão do procedimento na determinação de formaldeído .....	53
Tabela 3.4- Características analíticas para a determinação de formaldeído .....	55
Tabela 4.1- Rotina analítica do sistema <i>lab-in-syringe</i> .....	64
Tabela 4.2- Recuperação de SDS adicionado em diferentes amostras de águas.....	71
Tabela 4.3- Respostas analítica para diferentes detergentes aniônicos .....	72
Tabela 4.4- Efeito de concomitantes na determinação de detergentes aniônicos.....	73
Tabela 4.5- Valores médios para a determinação de surfactantes aniônicos .....	74
Tabela 4.6- Características analíticas dos procedimentos .....	76
Tabela 5.1- Rotina do sistema SIA para a determinação de BPA em águas de torneira.....	85
Tabela 5.2- Características analíticas nos dois comprimentos de onda exc. do BPA .....	97
Tabela 5.3- Estudo de adição e recuperação em amostras de água de torneira.....	98
Tabela 5.4- Espécies interferentes na determinação de BPA em água de torneira .....	99
Tabela 5.5- Concentrações de BPA utilizando os procedimentos proposto e referência.....	100
Tabela 5.6- Características analíticas de procedimentos para a determinação de BPA.....	104



**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Official Methods of Analysis</i>
APHA	<i>American Public Health Association</i>
BPA	Bisfenol A
CG	Cromatografia a gás (do inglês <i>Gas chromatography</i> )
CG-DCE	Cromatografia gasosa com detecção por captura de elétrons (do inglês <i>Gas chromatography with electron capture detection</i> )
CG-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (do inglês <i>Gas chromatography coupled to mass spectrometry</i> )
CL-MS/MS	Cromatografia a líquido acoplada espectrometria de massas em tandem (do inglês <i>Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry</i> )
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CV	Coefficiente de variação
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazina
EFS	Extração em fase sólida
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
ELL	Extração líquido-líquido
FIA	Análise por injeção em fluxo (do inglês <i>Flow injection analysis</i> )
HPLC	Cromatografia a líquido de alta eficiência (do inglês <i>High performance liquid chromatography</i> )
ICP-OES	Espectrometria de emissão óptica em plasma acoplado indutivamente (do inglês <i>Inductively coupled plasma optical emission spectrometry</i> )
LAS	Alquilbenzeno sulfonato (do inglês <i>Alkylbenzene sulfonate</i> )

LC-ESI-MS/MS	Cromatografia líquida com fonte de ionização por eletronebulização acoplada à espectrometria de massas sequencial (do inglês <i>Liquid chromatography tandem mass spectrometry with electrospray ionization</i> )
LI	Líquidos iônicos
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MB	Azul de metileno (do inglês <i>Methylene blue</i> )
MEFL	Microextração em fase líquida
MEFS	Microextração em fase sólida
MEGSO	Microextração com gota solidificada
MEGSU	Microextração com gota suspensa
MELL	Microextração líquido-líquido
MELLD	Microextração líquido-líquido dispersiva
SDBS	Dodecilbenzenosulfonato de sódio (do inglês <i>Sodium dodecylbenzenesulfonate</i> )
SDS	Dodecilssulfato de sódio (do inglês <i>Sodium dodecylsulfate</i> )
SFB	Sistema fluxo-batelada
SIA	Análise por injeção sequencial (do inglês <i>Sequential injection analysis</i> )
SLES	Lauril éter sulfato (do inglês <i>Lauryl ether sulfate</i> )
TCA	Ácido tricloroacético (do inglês <i>Trichloroacetic acid</i> )
UHT	Temperatura ultra alta (do inglês <i>Ultra High Temperature</i> )
USEPA	<i>United States Environmental Protection Agency</i>

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>25</b>
<b>1.1.</b>	Técnicas de pré-concentração	25
1.1.1.	Extração líquido-líquido e em fase sólida	25
1.1.2.	Microextração em fase líquida, com gota suspensa e gota solidificada	26
1.1.3.	Microextração líquido-líquido dispersiva	28
<b>1.2.</b>	<b>MELL em sistemas de análises em fluxo</b>	<b>29</b>
1.2.1.	Sistemas fluxo-batelada	29
1.2.2.	Análise por injeção sequencial	31
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>34</b>
<b>3.</b>	<b>Determinação espectrofotométrica de formaldeído em leite explorando microextração líquido-líquido dispersiva em sistema com fluxo pulsado</b>	<b>35</b>
	Resumo	35
	Abstract	36
<b>3.1.</b>	<b>Introdução</b>	<b>37</b>
3.1.1.	Formaldeído em leite	38
<b>3.2.</b>	<b>Materiais e Métodos</b>	<b>40</b>
3.2.1.	Reagentes e soluções	40
3.2.2.	Equipamentos	40
3.2.3.	Procedimento proposto	42
3.2.4.	<i>Clean-up</i> das amostras de leite	44
3.2.5.	Procedimento de referência	44
<b>3.3.</b>	<b>Resultados e Discussão</b>	<b>44</b>
3.3.1.	Aspectos gerais	44
3.3.2.	Otimização do procedimento	46
3.3.3.	Características analíticas	51
3.3.4.	Avaliação de seletividade e aplicação analítica	53
<b>3.4.</b>	<b>Conclusões</b>	<b>56</b>

<b>4. Microextração líquido-líquido dispersiva em sistema <i>lab-in-syringe</i> para a determinação de surfactantes aniônicos em águas de rios</b>	<b>57</b>
Resumo	57
Abstract	58
<b>4.1. Introdução</b>	<b>59</b>
<b>4.2. Materiais e Métodos</b>	<b>62</b>
4.2.1. Reagentes e soluções	62
4.2.2. Equipamentos e acessórios	62
4.2.3. Procedimento proposto	63
4.2.4. Procedimento de referência	64
<b>4.3. Resultados e Discussão</b>	<b>65</b>
4.3.1. Aspectos gerais	65
4.3.2. Otimização	66
4.3.3. Características analíticas	70
4.3.4. Efeito de espécies concomitantes	72
4.3.5. Análise de amostras de águas de rios e características analíticas do procedimento	73
<b>4.4. Conclusões</b>	<b>77</b>
<b>5. Determinação espectrofluorimétrica de bisfenol A em águas de torneira explorando microextração líquido-líquido com formação de filme de solvente extrator em sistema de análises por injeção sequencial</b>	<b>78</b>
Resumo	78
Abstract	79
<b>5.1. Introdução</b>	<b>80</b>
<b>5.2. Materiais e Métodos</b>	<b>83</b>
5.2.1. Reagentes e soluções	83
5.2.2. Equipamentos	84
5.2.3. Procedimento proposto	85
5.2.4. Procedimento de referência	86

<b>5.3. Resultados e Discussão</b>	<b>86</b>
5.3.1. Aspectos gerais	86
5.3.2. Otimização da extração	89
5.3.2.1. Seleção dos solventes	89
5.3.2.2. Efeitos dos volumes e vazões	92
5.3.2.3. Bobina de extração	95
5.3.3. Características analíticas	96
5.3.4. Avaliação de seletividade na determinação de BPA em águas de torneira	98
5.3.5. Aplicações analíticas	100
5.3.6. Comparação com outros procedimentos analíticos	102
<b>5.4. Conclusões</b>	<b>105</b>
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>106</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>108</b>



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Técnicas de pré-concentração

#### 1.1.1. Extração líquido-líquido e em fase sólida

As técnicas de separação e pré-concentração mais usuais são as extrações líquido-líquido (ELL) e em fase sólida (EFS), geralmente exploradas no preparo de amostras com matrizes complexas e/ou visando a determinação de espécies em baixas concentrações. Essas técnicas são empregadas para concentrar o analito e/ou para melhorar a seletividade, isolando o analito de espécies interferentes da matriz [1,2].

A ELL baseia-se na partição do analito (ou de um derivado formado a partir desse) entre dois líquidos imiscíveis, sendo um a fase aquosa, geralmente contendo o analito, e uma fase orgânica [1,3]. As principais etapas para a realização da ELL são: (1) adição do solvente extrator à amostra em um recipiente adequado para a separação das fases, (2) agitação (mecânica ou manual) para aumentar a contato entre solvente e a amostra, a fim de favorecer a partição do analito, (3) intervalo de repouso para a separação das fases e (4) isolamentos das fases aquosa e orgânica [1-3].

A EFS é outra técnica muito empregada no pré-tratamento das amostras devido a facilidade de utilização e a possibilidade de alcançar altos fatores de enriquecimento. A extração acontece quando a amostra é colocada em contato com a fase sólida, em que ocorre a passagem por um cartucho contendo material adsorvente. Assim, a retenção do analito de interesse e, eventualmente, de compostos interferentes. Após a remoção dos interferentes pela lavagem do adsorvente, outro solvente é empregado para dessorção do analito de interesse [4]. Quando conduzidas em batelada, essas técnicas são morosas, sujeitas as diversas etapas e a erros sistemáticos, além de consumirem quantidades elevadas de solventes orgânicos [2].

A microextração líquido-líquido (MELL) é uma alternativa para superar os inconvenientes dos procedimentos de extração convencionais, simplificando o processo de extração, a ELL é realizada em extrações sucessivas para melhorar a eficiência, enquanto a MELL é realizada em uma única etapa de extração. A MELL apresenta diversas variantes, como a microextração em fase líquida (MEFL)[5], a microextração com gota solidificada (MEGSO) [6], a microextração com gota suspensa (MEGSU) [7], a microextração líquido-líquido dispersiva (MELLD)[8] e a MELL com formação de filme com solvente orgânico [9].

### 1.1.2. Microextração em fase líquida, com gota suspensa e gota solidificada

A MEFL e MEGSU foram propostas em 1990 e são largamente aplicadas no preparo de amostras [5,7]. A MEFL apresenta características atraentes como rapidez, simplicidade, alta eficiência de extração, versatilidade e baixo consumo de solventes, sendo ambientalmente amigável [5,10].

A MEFL geralmente utiliza um tubo capilar de sílica fundida com a extremidade recoberta com um filme fino de um polímero ou de um sólido adsorvente. A quantidade do analito extraída é dependente da afinidade da fase extratora em relação à matriz. Quanto maior a afinidade, maior será a quantidade extraída [5,10].

Um dos primeiros estudos envolvendo a MEFL foi para a determinação de metanfetamina em amostras de urina [10]. Nesse estudo, foi utilizado o 1-octanol imobilizado nos poros de uma membrana de polipropileno. O analito foi extraído da amostra (fase doadora) para o 1-octanol e conduzido para fase receptora, constituída por 25  $\mu\text{L}$  de uma solução ácida, posteriormente analisada por eletroforese capilar [10]. Outros exemplos de aplicação da MEFL incluem a determinação de parabenos em amostras de água [11], de corante Sudan em alimentos [12] e de cocaína em cabelo [13].

Em 1996, Jeannot e Cantwell [14] propuseram um procedimento no qual uma pequena gota (*ca.* 8  $\mu\text{L}$ ) de um solvente orgânico imiscível em água (*e.g.* n-octanol) foi inserida na extremidade de uma sonda de Teflon<sup>®</sup>, em seguida imersa numa solução aquosa de amostra. A mistura foi então agitada até o equilíbrio, a sonda foi removida, e com uma microsseringa, uma alíquota de 1  $\mu\text{L}$  da fase orgânica foi injetada num cromatógrafo a gás (CG) para a determinação de cafeína em águas [14]. Esta técnica, denominada MEGSU, se tornou atrativa devido à mínima exposição a solventes tóxicos e ao curto intervalo de tempo requerido para a extração [14,15]. Porém, há algumas limitações, entre elas que a técnica não é apropriada para amostras complexas e a gota apresenta pouca estabilidade mecânica, podendo ser perdida durante a extração [6,7].

Buscando superar as limitações da MEGSU, foi desenvolvido um método de microextração em fase líquida simples, rápido e de baixo custo, baseado na solidificação de uma gota orgânica suspensa, denominado microextração com gota solidificada (MEGSO)[15,16]. O solvente extrator deve apresentar alguns requisitos, como densidade menor que aquela da água, imiscibilidade em solução aquosa e temperatura de fusão próxima à temperatura ambiente (na faixa de 10-30°C). Exemplos de extratores que atendem a estes requisitos são apresentados na Tabela 1.1 [6,7]. Aplicações desses solventes

incluem 1-undecanol para a determinação de bisfenol A (BPA) em amostras de urina e de águas [16] e de alumínio em águas [17], 1-dodecanol na determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos [18] e 2-dodecanol, na determinação de compostos orgânicos halogenados [19] em águas.

Tabela 1.1- Extratores usualmente utilizados em MEGSO [6,7]

<b>Solvente</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Densidade</b>
<b>Extrator</b>	<b>de fusão (°C)</b>	<b>de ebulição (°C)</b>	<b>(g mL<sup>-1</sup>)</b>
1-undecanol	13-15	243	0,83
1-dodecanol	22-24	259	0,83
2-dodecanol	17-18	249	0,80
<i>n</i> -hexadecano	18	287	0,77
1-bromo-hexadecano	17-18	190	0,99
1,10-diclorodecano	14-16	167	0,99
1-cloro-octadecano	20-23	157	0,85

Na MEGSO, um volume na ordem de  $\mu\text{L}$  do solvente orgânico com baixa temperatura de fusão é adicionado em amostras aquosas. Pequenas gotículas do solvente são formadas mediante processos de agitação (*e.g.* vórtex ou ultrassom) e dispersas na amostra; posteriormente, centrifugação permite aglomerar novamente as gotículas. A amostra e o solvente são acondicionados em banho de gelo para a solidificação do solvente orgânico, que facilita a separação da fase orgânica [15,16].

Outra variante da MELL é a microextração com formação de filme de solvente orgânico nas paredes de tubo hidrofóbico. Uma camada fina de solvente extrator é formada nas paredes do tubo, por causa da afinidade do solvente extrator com o material do tubo, devido interações hidrofóbicas. A formação do filme aumenta significativamente a área superficial e a eficiência de partição do analito evitando, assim, a necessidade de segmentação e separação de fases [9]. Para remoção do filme, após a extração do analito, é empregado um solvente eluente adequado (*e.g.* etanol, acetonitrila ou metanol) [9].

### 1.1.3. Microextração líquido-líquido dispersiva

A MELLD foi introduzida em 2006 por Rezaee e colaboradores [20]. Consiste na rápida adição de uma mistura de dois solventes miscíveis, um extrator e um dispersor, a uma solução aquosa da amostra visando a extração do analito para a fase orgânica [21]. Na introdução da fase extratora é produzida uma elevada turbulência, causando a dispersão de pequenas gotículas de extrator por toda a amostra. Como consequência, tem-se o aumento na área de contato entre o extrator e a amostra, favorecendo a transferência de fases [21-23]. A MELLD é uma técnica simples, rápida, de baixo custo e que possibilita alcançar altos fatores de enriquecimento e de recuperação [20,21,24,25].

Os solventes (extrator e dispersor) devem atender a alguns requisitos para maximizar a eficiência de extração [20,21]. O extrator deve apresentar alta capacidade de extração, densidade diferente da água e baixa solubilidade em meio aquoso. Os extratores mais empregados em MELLD são ciclohexano, tolueno, xileno, acetato de etila, tetracloreto de carbono, clorofórmio, clorobenzeno, dissulfeto de carbono, tetracloroetileno e líquidos iônicos (LI) [21,26]. Os LI geralmente são menos prejudiciais ao meio ambiente, podendo substituir os solventes orgânicos empregados como extratores na MELLD [27]. Eles possuem propriedades físico-químicas únicas, tais como baixa pressão de vapor à temperatura ambiente e alta estabilidade térmica [26,28]. Algumas aplicações dos LI como extratores consistem na determinação de pesticidas em solos [29], sulfonamidas em águas [30] e formaldeído em águas residuais e detergentes [24] e em bebidas [26],

Por outro lado, o solvente dispersor deve ser mutuamente miscível na amostra aquosa e no solvente extrator, a fim de dispersar as gotículas de extrator por toda a fase aquosa. São utilizados como dispersantes: metanol, etanol, acetona e acetonitrila [21]. A MELLD é uma técnica que está de acordo com as novas tendências, que buscam procedimentos que sejam menos agressivos ao meio ambiente, utilizem mínimas quantidades de solventes orgânicos e, conseqüentemente, apresentem baixa geração de resíduos [31]. Algumas aplicações incluem a extração de pesticidas organofosforados [22], cádmio [23], formaldeído [24] e selênio [25] em amostras de água, além de formaldeído em cervejas e sucos de frutas [26].

Algumas técnicas analíticas são normalmente empregadas na determinação dos analito juntamente com as técnicas de MELLD como a eletroforese capilar [16], a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *High performance liquid chromatography*) [18], a cromatografia gasosa (CG) [19] e a espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES) [17].

Apesar das vantagens mencionadas anteriormente, a MELLD apresenta alguns inconvenientes, como o alto tempo de extração devido às diversas etapas envolvidas (*i.e.* agitação, centrifugação, separação de fases e baixa precisão (diretamente relacionada à reprodutibilidade na injeção da mistura extratora)) e uso de sistemas abertos, podendo causar perdas dos solventes por evaporação, bem como contaminação da amostra e exposição do analista a solventes tóxicos. Esses inconvenientes podem ser solucionados explorando as microextrações em sistemas FIA (do inglês *Flow Injection Analysis*), que também proporcionam a melhoria da frequência de amostragem e da precisão. Além disso, todas as etapas são realizadas em sistema fechado, que diminui riscos de contaminação, perdas do analito e exposição do analista [1,32].

## **1.2. MELL em sistemas de análises em fluxo**

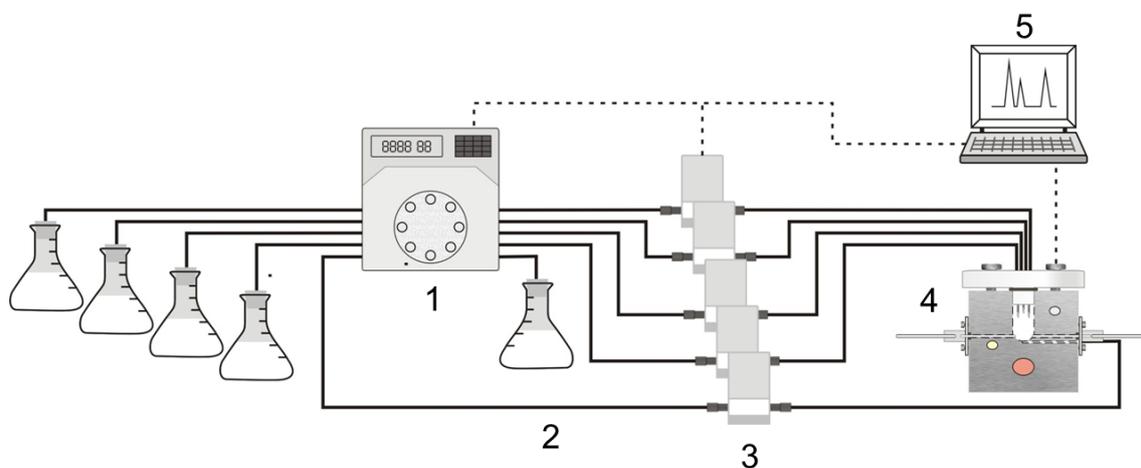
A automação das técnicas de MELL tende a superar as deficiências dos procedimentos em batelada como alto consumo de solventes e reagentes e exposição do analista [1]. As principais modalidades dos sistemas de análises em fluxo para a mecanização de técnicas de MELL são os sistemas fluxo-batelada (SFB) e SIA (do inglês *sequential injection analysis*). Mais recentemente, têm sido explorados os sistemas *lab-in-syringe* [7]. Essas modalidades foram exploradas nesta Tese e serão descritas nos itens seguintes.

### *1.2.1. Sistemas fluxo-batelada*

O SFB foi proposto em 1999 por Honorato e colaboradores [33], que propuseram um sistema automático para viabilizar a realização de titulações para determinação da acidez em vinhos brancos. Este sistema foi denominado analisador fluxo batelada (do inglês *flow-batch analyser (FBA)*). Os SFB [33,34] agregam características benéficas dos sistemas de análises em fluxo (transporte de amostra e reagentes, temporização reprodutível e o monitoramento do sinal analítico transiente) e dos analisadores discretos (diluição, adição de reagentes, aquecimento, agitação e a detecção podem ser feitas no próprio recipiente). São sistemas híbridos constituídos pelos principais componentes dos analisadores em fluxo convencionais, conforme a Figura 1.1.

- Sistema de propulsão, como bombas peristálticas, solenoide e tipo seringa;
- Sistema de transporte das soluções, amostras e reagentes, geralmente constituídos de tubos de até 2,0 mm de diâmetro interno;
- Válvulas solenoide e bombas solenoides, que possibilitam a amostragem precisa de volumes de soluções da ordem de microlitros para a câmara de mistura/reação;
- Uma câmara de mistura/reação, em que são adicionadas alíquotas dos fluidos (*e.g.* amostra, reagentes e outras soluções) para que ocorram as misturas, reações e extrações;
- Sistema de detecção para a quantificação do analito de interesse presente na amostra (*e.g.* fluorescência ou espectrometria);
- Sistema de controle, realizado com auxílio de um computador, para acionamento das válvulas e sistema de propulsão e para a aquisição de dados [34].

Figura 1.1- Módulo de análises de um SFB composto por: sistema de propulsão (bomba peristáltica) (1); sistema de transporte (tubos de polietileno) (2); sistema de multicomutação (minibombas solenoide) (3); câmara de mistura e reação e sistema de detecção (4) e sistema de controle (5)



A câmara de mistura e reação indicada na Figura 1.1 é o principal componente de um SFB [34], pois nela podem-se realizar misturas de amostras e reagentes e também MELL do analito. Em algumas aplicações, a detecção é realizada na própria câmara de mistura/reação [34], por exemplo, utilizando cabos de fibras ópticas.

Esse aparato garante características intrínsecas de um sistema FIA aos SFB como baixo consumo de amostras e reagentes, alta frequência de amostragem, baixo custo de montagem, facilidade na automação, além de elevada precisão e menor manipulação de reagentes e amostras, menor geração de resíduos e diminuição de erros sistemáticos

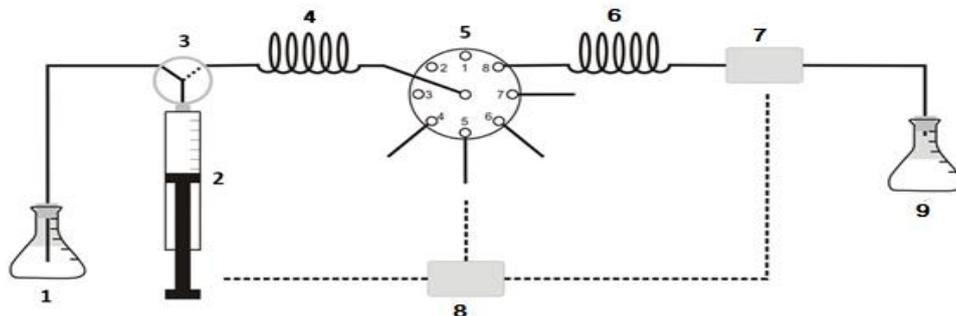
e da exposição do analista [34,35]. Os SFB têm sido empregados em diversas aplicações, como para titulações [36], implementação do método das adições de padrão (*e.g.* determinação de cloro) [37], *screening* de amostras (*e.g.* triagem da dureza da água, com a quantificação de cálcio e magnésio) [38].

### 1.2.2. Análise por injeção sequencial

Os primeiros trabalhos de SIA foram realizados por Ruzicka e Marshall em 1990 [39], com intuito de simplificar o sistema FIA e superar alguns de seus inconvenientes, como a necessidade de uma nova configuração para determinações distintas. Essa modalidade também evita a necessidade do fluxo carregador contínuo, diminui o número de dispositivos e torna o sistema mais compacto [39]. Desta forma, o SIA foi desenvolvido para aumentar a robustez e facilitar o monitoramento *on-line* dos processos industriais em que é exigida a calibração frequente [39].

A Figura 1.2 mostra os principais componentes de um sistema SIA que, assim como um sistema FIA, envolve injeção da amostra e reagentes, temporização reprodutível, alta reprodutibilidade e dispersão controlada [40,41].

Figura 1.2- Módulo de análises de um sistema SIA composto por: solução transportadora (1); sistema de propulsão (bomba tipo seringa) (2); válvula solenoide (3); bobina coletora (4); válvula seletora multiporta (5); reator (6); sistema de detecção (7); sistema de controle (microcomputador) (8) e descarte (9)



O componente principal de um sistema SIA é a válvula seletora multiportas, que possibilita a comunicação entre as portas periféricas e a porta central, *e.g.* para inserir ou dispensar fluídos ou acoplar dispositivos (*e.g.* mini-colunas, câmaras de mistura/reacção e cela de detecção). A porta central está conectada a uma bobina coletora, responsável por armazenar alíquotas de amostra e reagentes que são aspirados através das diferentes portas, sem entrar em contato com o sistema de propulsão e, posteriormente, são encaminhadas para um reator, revertendo-se o sentido do fluxo. Outro componente importante é o sistema de propulsão, que normalmente consiste de uma bomba tipo seringa ou alternativamente, de uma bomba peristáltica. A válvula seletora e o sistema de propulsão são controlados por um microcomputador, de forma que as alíquotas dos diferentes fluídos são amostradas de forma bastante reprodutível e com vazões que podem ser controladas dependendo da necessidade. Em SIA, pode-se também alterar o sentido de bombeamento (bomba propulsora bidirecional), visando melhorar a mistura entre amostra e reagentes, que ocorre exclusivamente por dispersão nas interfaces, por se tratar de um sistema em linha única [40-42].

Para a otimização de procedimentos para análises em sistema SIA, algumas condições físicas devem ser consideradas como comprimento, geometria, material e diâmetro do reator ou bobina de reacção/extracção. Também deve ser considerada a concentração e volume dos reagentes e o tempo de reacção/extracção. Quando é necessário realizar a mistura de dois ou mais reagentes, pode ser empregada uma câmara de mistura e reacção [40-44].

O sistema SIA foi explorado para a realização da MELL que emprega a formação de um filme de um solvente orgânico em uma bobina de extracção constituída de Teflon<sup>®</sup> (wetting film approach). Para a realização deste tipo de extracção são necessários alguns requisitos como: o emprego de um solvente orgânico imiscível (*e.g.* clorofórmio, benzeno, 1-octanol) em solução aquosa [9]. A eficiência de partição do analito é influenciada por vários fatores como: o solvente, o material de confecção da bobina e suas dimensões (*e.g.* comprimento e diâmetro) [32]. A escolha do solvente orgânico para formação do filme e do material da bobina de extracção deve ser feita respeitando a maior afinidade com o material do tubo. Esse filme formado na parede é responsável pela transferência do analito de interesse por difusão radial [32]. Este procedimento foi avaliado na extracção de azul de bromotimol em filme de clorofórmio, benzeno, tolueno e outros solventes em bobina de extracção constituída de Teflon<sup>®</sup> [9].

Outra modalidade em que o sistema SIA pode ser explorado é a estratégia *lab-in-syringe*, em que a seringa não é apenas empregada como sistema de propulsão, mas também como recipiente para a realização de reações e extrações. Volumes de amostra, reagentes e solventes são amostrados com precisão, devido ao uso de bombas tipo seringa. O sistema *lab-in-syringe* é um tipo de SFB [34]. Para implementação deste sistema, a seringa é acoplada diretamente à válvula seletora, permitindo a amostragem sequencial de diferentes fluidos (*e.g.* amostra e reagentes). Por se tratar de um sistema fechado, riscos de contaminação da amostra e dos reagentes, bem como a exposição do analista são minimizados [45]. Esse sistema foi utilizado na determinação de alumínio em amostra de águas do mar [46], na determinação de surfactantes aniônicos [47] e Cr(VI) [48] em águas naturais e de cafeína em bebidas [49].

Outra forma de extração explorada em sistema *lab-in-syringe* é a extração em ponto nuvem, conforme demonstrado em um procedimento baseado na formação de um par iônico entre o complexo antimônio-iodeto e  $H^+$ , seguido por extração com surfactante Triton X-114 [50]. Nesse sistema, também foram realizados estudos de MEGSU para a determinação de amônio em águas superficiais, com adaptações para que as detecção espectrofotométricas ocorressem diretamente na gota de solvente, após a extração [51].

## 2- OBJETIVOS

O objetivo geral desta tese foi o desenvolvimento de procedimentos analíticos explorando microextração líquido-líquido em fluxo para a determinação de espécies de interesse em águas e leite. Os objetivos específicos incluem:

- Desenvolvimento um procedimento explorando MELLD empregando um líquido iônico como solvente extrator e metanol como dispersor em um analisador de fluxo-batelada para a determinação espectrofotométrica de formaldeído em leite;
- Emprego da MELLD em um sistema *lab-in-syringe* sem o uso de agitação mecânica para determinação espectrofotométrica de detergentes aniônicos em águas de rios pelo método do azul de metileno;
- Determinação de BPA em água da torneira explorando a MELL com formação de filme de solvente orgânico nas paredes de uma bobina de extração em sistema SIA com detecção espectrofluorimétrica.

### **3 - Determinação espectrofotométrica de formaldeído em leite explorando microextração líquido-líquido dispersiva em sistema com fluxo pulsado<sup>(1)</sup>**

#### **Resumo**

O formaldeído é empregado na fraude de leite, a fim de diminuir a contagem de bactérias e aumentar a vida útil do produto. O procedimento proposto explorou a microextração líquido-líquido dispersiva em um sistema de fluxo-batelada com microbombas solenoide para a determinação do formaldeído em leite. O fluxo pulsado inerente aos dispositivos de propulsão de fluidos foi explorado pela primeira vez para melhorar a dispersão do extrator na fase aquosa. A reação de Hantzsch foi utilizada para a derivação química de formaldeído a 3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidina, que foi extraída com o líquido iônico cloridrato de tri-hexil-tetradecil-fosfônio, com metanol como solvente dispersor. A câmara de fluxo-batelada, construída em aço inoxidável, foi aquecida resistivamente (50 °C) para acelerar a reação de derivação. As medições espectrofotométricas foram realizadas na fase orgânica diretamente na câmara de fluxo-batelada utilizando cabos de fibra óptica acoplados à fonte de radiação e a um espectrômetro multicanal. O limite de detecção e o coeficiente de variação foram estimados em 100 µg L<sup>-1</sup> e 3,1% (n = 10), respectivamente, com resposta linear de 0,5 a 5,0 mg L<sup>-1</sup>. As recuperações em amostras de leite variaram de 91% a 106%, indicando a ausência de efeitos de matriz. Precisão e exatidão foram avaliadas pelos testes *F* e *t* pareado e os resultados obtidos pelo procedimento proposto foram concordantes com os obtidos pelo procedimento de referência ao nível de 95% de confiança. O procedimento proposto permite 10 extrações por hora, com consumo de reagente minimizado (136 µL de líquido iônico e 3,5 µL de acetilacetona) e baixa geração de resíduos (6,7 mL) em comparação a outros trabalhos.

Palavras chave: Análises em fluxo. Sistema fluxo-batelada. Microextração líquido-líquido dispersiva. Formaldeído. Leite.

---

<sup>1</sup> NASCIMENTO, C.F.; BRASIL, M.A.S.; COSTA, S.P.F.; PINTO, P.C.A.G.; SARAIVA, M.L.M.S.F.; ROCHA, F.R.P. Exploitation of pulsed flows for on-line dispersive liquid-liquid microextraction: spectrophotometric determination of formaldehyde in milk. *Talanta*, Amstersdam, v.144, p.1889-1194, 2015.

**Abstract**

Formaldehyde is used for milk adulteration in order to diminish the bacteria count and increase the product shelf life. The proposed procedure exploited dispersive liquid–liquid microextraction in a flow-batch system for the determination of formaldehyde in milk. The pulsed flows inherent to solenoid micropumps were exploited for the first time to improve the dispersion of the extractant in the aqueous phase. The Hantzsch reaction was used for the derivatization of formaldehyde to 3,5-diacetyl-1,4-dihidrolutidine, which was extracted with the ionic liquid trihexyltetradecyl-phosphonium chloride with methanol as disperser. The flow-batch chamber was made of stainless steel with the facility for resistive heating to speed up the derivatization reaction. Spectrophotometric measurements were carried out in the organic phase directly at the flow-batch chamber, by using optical fibers coupled to the light source and a multichannel spectrometer. The limit of detection and coefficient of variation were  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  and 3.1% (n=10), respectively, with a linear response from 0.5 to  $5.0 \text{ mg L}^{-1}$ . Recoveries of formaldehyde spiked to milk samples ranged from 91% to 106%, thus indicating the absence of matrix effects. Accuracy was assessed by the F- and paired t-tests, and the results agreed with those obtained by the reference procedures at the 95% confidence level. The proposed procedure allows for 10 extractions per hour, with minimized reagent consumption (136  $\mu\text{L}$  of the ionic liquid and 3.5  $\mu\text{L}$  acetylacetone) and generation of only 6.7 mL waste per determination.

**Keywords:** Flow analysis. Flow-batch system. Dispersive liquid-liquid microextraction. Formaldehyde. Milk.

### 3.1. Introdução

O leite é um alimento importante na dieta humana, pois contém nutrientes essenciais à saúde, tais como vitaminas (hidrossolúveis do complexo B e C e lipossolúveis, A, D e E), gorduras, proteínas (especialmente caseína) e carboidratos (*e.g.* lactose) [52]. Também é rico em minerais (principalmente cálcio, fósforo, potássio, magnésio e zinco), que são essenciais para o desenvolvimento das estruturas óssea e dentária. Devido ao valor nutricional, o leite é muito valorizado no mercado, o que o torna alvo de adulterações [53].

As adulterações podem causar prejuízos econômicos, pois diminuem o potencial de exportação. Quando a fraude do leite é descoberta, esse é descartado, gerando um grande impacto na agroindústria devido ao desperdício. Por exemplo, em um episódio de fraude de leite por formaldeído, em 2013, mais de 300 mil litros de leite foram descartados [54]. Esse é um aspecto crítico, especialmente no Brasil, que se destaca no cenário mundial como o 4º maior produtor de leite [55]. As fraudes trazem ainda problemas sociais e de segurança alimentar, gerando produtos de baixa qualidade, podendo apresentar riscos à saúde dos consumidores [53,56].

Os principais episódios de adulterações de leite produzido no país estão ligados ao mascaramento das condições microbiológicas do produto, devido à falta de condições de higiene dos locais de coleta e armazenamento e de saúde do rebanho (*e.g.* animais com mastite subclínica não tem o leite descartado) [57]. Também envolvem a diluição do leite e adição de produtos de baixa qualidade com objetivo de substituir as substâncias componentes, aumentar o volume e, conseqüentemente, os ganhos econômicos [56].

Dentre as principais análises de controle de qualidade de leite estão as microbiológicas e a avaliação dos sólidos presentes, sendo avaliados os teores de proteínas e de gorduras, que definem a remuneração ao fornecedor [58]. A legislação estabelece o teor de proteína em 2,9 % (m/m) [59]. A adulteração é realizada pela adição de compostos ricos em nitrogênio, tais como ureia e melamina, seguida da diluição do leite com água ou soro de leite, aumentando o volume do produto final [60].

Na adulteração do teor de gordura, têm sido empregados gordura animal e óleos vegetais, com a adição de surfactantes aniônicos que são utilizados na emulsificação [61,62]. Na tentativa de aumentar a vida útil do produto, têm sido adicionados compostos que retardam o processo de deterioração, tais como hipoclorito, dicromato, ácido salicílico, peróxido de hidrogênio e formaldeído [63,64]. Algumas dessas espécies são tóxicas e seu monitoramento é essencial no controle de qualidade.

A Polícia Federal brasileira relatou dois escândalos de fraudes no leite, sendo o primeiro em 2007, denominado de Operação Ouro Branco, em que foram encontrados cloreto de sódio, hidróxido de sódio, carbonatos, sacarose e peróxido de hidrogênio para mascarar a acidez, controlar o desenvolvimento microbiano e aumentar o volume [65]. Na operação, denominada Leite Compensado, em 2013, foram encontrados ureia e formaldeído [66].

### 3.1.1. Formaldeído em leite

O formaldeído é adicionado aos alimentos devido às suas propriedades antissépticas; sua adição gera um aspecto agradável e inodoro nos produtos [67]. Na indústria, o formaldeído é empregado na fabricação de diversos produtos, tais como tintas, esmaltes, laminados de móveis e fluidos para limpeza [68]. No entanto, o formaldeído pode apresentar efeitos tóxicos para os seres humanos, incluindo irritação dos olhos e do trato respiratório, dor de cabeça, náuseas, sonolência, reações alérgicas na pele, doenças crônicas e, em casos mais graves, pode levar à morte [68,69]. O formaldeído é classificado como cancerígeno aos seres humanos pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer [70,71]. A ingestão diária aceitável (IDA) de formaldeído foi estabelecida pela USEPA em  $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$  de massa corpórea [72].

A adição de formaldeído inibe o crescimento microbiano, o que contribui para aumentar a vida útil dos alimentos, incluindo o leite. No Brasil, em um estudo realizado em 2011, análises de 100 amostras de leite UHT (do inglês *Ultra High Temperature*) indicaram a presença de formaldeído em 44% das amostras. Os testes foram baseados na oxidação do formaldeído por iodeto de mercúrio em meio alcalino, com formação de um complexo violeta [53].

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), não autorizam o emprego de substâncias químicas para a preservação do leite [53,73]. No entanto, agências americanas como a USEPA (*United States Environmental Protection Agency*) adotam limites máximos de  $2,5 \text{ mg kg}^{-1}$  de formaldeído como conservante em alimentos [68]. Assim, o monitoramento de alimentos nos quais o formaldeído pode estar presente é necessário, exigindo procedimentos rápidos e simples.

O procedimento oficial adotado pela AOAC (do inglês *Association Official Methods of Analysis*) para a determinação de formaldeído em alimentos é baseado em uma reação colorimétrica, em que os destilados das amostras acidificadas com ácido sulfúrico produzem uma coloração roxa na presença do reagente ácido 1,8-dihidroxi-naftaleno-3,6-dissulfônico. No entanto, esse procedimento é susceptível a erros sistemáticos devido às diversas etapas envolvidas [74].

Alguns procedimentos para a determinação de formaldeído em leite são baseados em HPLC [75,76], espectrofotometria em sistema FIA [77] e qualitativamente com papel indicador colorimétrico e reagente de Schiff [78]. A HPLC requer preparação de amostras com sucessivas extrações com hexano e demais etapas em que pode ocorrer a perda do analito [75]. Outro procedimento empregando a HPLC utiliza no preparo de amostra a ELL com partição sob baixa temperatura, em que uma mistura de acetonitrila e 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) é adicionada ao leite. Após a agitação e centrifugação, ocorre a separação de fases, com a precipitação das proteínas; com o resfriamento, ocorre a separação da fase contendo acetonitrila e o produto formado entre o formaldeído e DNPH; após a filtração, o formaldeído é determinado por HPLC-UV, com detecção em 360 nm [76].

A determinação espectrofotométrica do formaldeído emprega, por exemplo, a derivação química com a fucsina em meio ácido formando um composto violeta. Entretanto, esse procedimento apresenta baixa detectabilidade, não atendendo aos limites estabelecidos [77]. O teste qualitativo empregando o reagente de Schiff imobilizado em papel resulta em uma coloração azul-púrpura na presença de formaldeído, podendo ser visualizada a olho nu. No entanto, este reagente apresenta baixa seletividade, pois pode reagir com outros aldeídos [78].

Outros procedimentos envolvendo a espectroscopia no infravermelho médio com refletância total atenuada [65] e cromatografia a gás acoplada espectrometria de massas (CG-MS) [64] foram empregados para a determinação de formaldeído em leite. No procedimento baseado em espectroscopia de infravermelho não foi necessário nenhum tipo de reagente e nem preparo de amostra, porém a faixa linear não engloba os limites estabelecidos pela legislação, chegando a ser da ordem de  $\text{g L}^{-1}$  [65]. A CG-MS apresenta baixos limites de detecção, porém necessita de várias etapas, envolvendo derivação química e microextração em fase sólida (MEFS) [64].

Outros procedimentos para a determinação de formaldeído em diferentes amostras podem ser adaptados para análise do leite após o tratamento adequado. Entre esses, podem ser citados aqueles que envolvem reação com acetoacetato de metila na presença de amônia [24], com a determinação do produto por espectrofotometria na região do UV (375 nm). Por outro lado, a reação de Hantzsch emprega acetilacetona em meio de acetato de amônio, formando um composto de coloração amarela, que pode ser medido por espectrofotometria na região do visível (412 nm) [79] ou por fluorescência [80].

Neste cenário, esta etapa da Tese teve como objetivo desenvolver um procedimento ambientalmente amigável, explorando microextração líquido-líquido dispersiva empregando um líquido iônico como solvente extrator e metanol como dispersor em um analisador de fluxo-

batelada. Na câmara de fluxo-batelada, ocorreram a derivação química do analito, a MELLD, a separação das fases e a determinação espectrofotométrica de formaldeído no leite. O fluxo pulsado característico das microbombas solenoide, foi explorado pela primeira vez para a dispersão do extrator em MELLD, visando melhor precisão e maior eficiência de extração.

### **3.2. Materiais e Métodos**

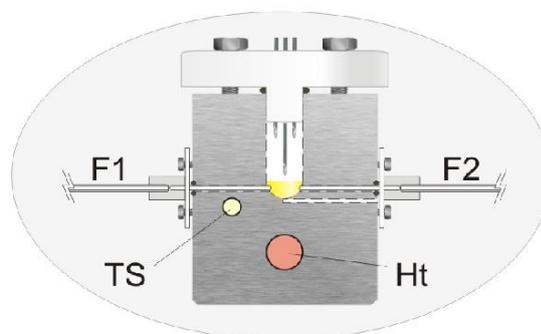
#### *3.2.1. Reagentes e soluções*

Todas as soluções foram preparadas a partir de reagentes de qualidade analítica e água ultrapura, com resistividade  $> 18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ , a  $25,0 \text{ }^\circ\text{C}$ . A solução estoque de formaldeído foi preparada solubilizando  $0,1000 \text{ g}$  de formaldeído em  $100 \text{ mL}$  de água. As soluções de referência ( $0,5\text{-}5,0 \text{ mg L}^{-1}$ ) foram preparadas diariamente pela diluição da solução estoque em ácido tricloroacético (TCA)  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (Merck, Alemanha). Acetilacetona  $2,0\%$  (v/v) (Sigma Aldrich, EUA) e acetato de amônio  $15\%$  (m/v) (Merck) foram empregados na reação de derivação química do formaldeído. O líquido iônico cloridrato de tri-hexil-tetradecil-fosfônio (Sigma Aldrich) foi utilizado como solvente extrator e o metanol (Merck) como solvente dispersor para MELLD, numa proporção de  $3:8$  (v/v). Etanol hidratado (Merck) e água foram utilizados para a lavagem da câmara de fluxo-batelada.

#### *3.2.2. Equipamentos*

O SFB foi baseado em uma câmara cilíndrica, construída no laboratório [81], conforme Figura 3.1.

Figura 3.1- Vista em corte da câmara de fluxo-batelada, construída em aço inoxidável 316 com as seguintes especificações: 57 mm de altura, 50 mm de diâmetro e uma massa de 944 g. TS: sensor de temperatura; Ht: resistor de potência; F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub>: cabos de fibra óptica; tubo central utilizado para a adição da mistura extratora. Adaptada da referência 81



A câmara de fluxo-batelada foi construída em aço inoxidável 316, com as seguintes especificações: 57 mm de altura, 50 mm de diâmetro (1,4 mL de volume útil) e uma massa de 944 g [81]. A câmara permite o aquecimento resistivo com temperatura controlada até 80 °C, com precisão de  $\pm 1^{\circ}\text{C}$ .

Foram utilizadas cinco micro bombas de solenoide (Biochem Valve Inc., Boo EUA) que dispensam os seguintes volumes: 21, 22, 10, 22 e 17  $\mu\text{L}$  por pulso (indicadas como P1 a P5). Foram também utilizadas linhas de transmissão de tubos de Teflon<sup>®</sup> de 0,75 mm e conectores constituídos de acrílico. Uma bomba peristáltica (Ismatec IPC, Suíça, modelo CP 78017-10), equipada com um tubo de Tygon<sup>®</sup> e uma válvula solenoide de pinçamento (NResearch 161P021, EUA) foram utilizadas para drenagem da câmara.

Os dispositivos ativos foram controlados por um microcomputador Pentium I equipado com uma interface paralela, através do circuito de compatibilização de corrente, baseado no circuito integrado ULN2803 [82]. O *software* de controle foi desenvolvido em Microsoft Visual Basic 6.0.

As medições foram realizadas com um espectrofotômetro multicanal CCD (Ocean Optics, EUA, modelo USB2000), com aquisição de dados pelo *software* fornecido pelo fabricante. Fibras ópticas (núcleo de 1000  $\mu\text{m}$ ) foram acopladas na câmara de fluxo-batelada para transmissão de radiação a partir de uma lâmpada de tungstênio-halogênio (Ocean Optics, modelo HL-2000) e ao espectrômetro USB2000. No interior da câmara, guias de onda de vidro foram utilizados para direcionar o feixe de radiação.

Uma centrífuga (Quimis, Brasil) foi utilizada no preparo das amostras.

### 3.2.3. Procedimento proposto

O SFB mostrado na Figura 3.2 foi operado de acordo com a rotina descrita na Tabela 3.1. Inicialmente, a câmara é aquecida até a temperatura de  $(50 \pm 1)$  °C. As microbombas solenoide P1 e P2 foram sequencialmente acionadas para a inserção da amostra (etapa 1) e do reagente derivatizante (etapa 2) na câmara. O tempo para a reação de derivação foi de 30 s (etapa 3) antes da introdução da mistura extratora para MELLD (etapa 4). O acionamento das micro bombas foi, então, interrompido por 45 s para permitir a separação das fases orgânica e aquosa (etapa 5); por ser menos denso que a água, o líquido iônico permanece na parte superior da câmara. Na etapa 6, após a separação de fases, a mistura extratora foi dispensada para a parte inferior até atingir o volume de observação da câmara (*i.e.* posição adequada para a detecção espectrofotométrica), enquanto a fase aquosa é drenada para descarte acionando a válvula de pinçamento (V, Figura 3.2). Com a vazão utilizada para a drenagem ( $2,5 \text{ mL min}^{-1}$ ), foram necessários 22 s para esse processo. A detecção espectrofotométricas foram realizadas na fase orgânica em 420 nm (etapa 7). O escoamento da fase orgânica e a lavagem da câmara, sequencialmente com etanol e água, foram realizados nas etapas 8-10. Embora gerados em quantidades reduzidas, os resíduos foram armazenados e posteriormente encaminhados à Seção Técnica de Gerenciamento e Tratamento de Resíduos do CENA.

Figura 3.2- Sistema fluxo-batelada para MELLD em linha: P1-P5: microbombas solenoide; A: amostra de leite tratada; R: Reagente derivatizante - acetilacetona 2,0% (v/v) e acetato de amônio 15% (m/v); E: mistura de extratora cloridrato de tri-hexil-tetradecil-fosfônio (extrator): metanol (dispersor) 3:8 (v/v); W1: etanol 92% (v/v); W2: água; CM: câmara de mistura/reação (detalhes na figura inserida e na Figura 2.1); F1, F2: fibras ópticas; Ts: sensor de temperatura; Ht: barra de aquecimento; V: válvula pinçamento de três vias; P: bomba peristáltica; W: descarte; C: confluência.

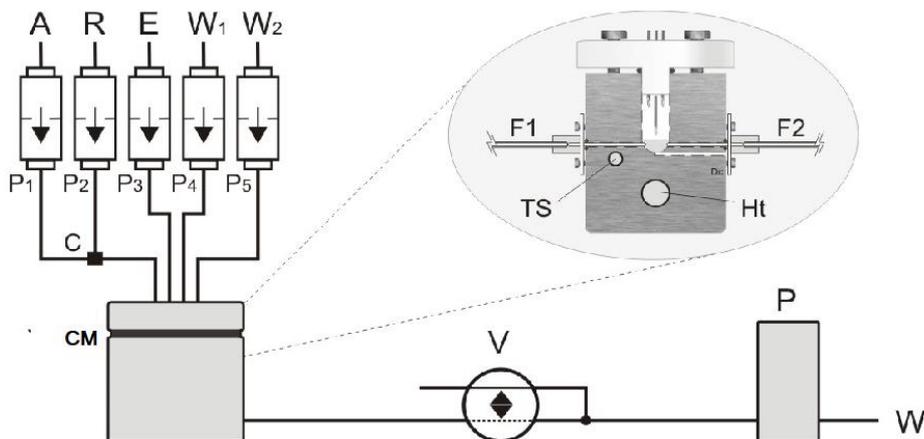


Tabela 3.1- Etapas para a realização da MELLD em sistema fluxo-batelada

Etapa	Dispositivos	Função	Nº de pulsos	Volume total (µL)
1	P1	Inserção da amostra	32	672
2	P2	Inserção do reagente	8	176
3		Derivação química (30 s)	—	—
4	P3	Inserção da mistura extratora	50	500
5	—	Tempo separação de fases (45 s)	—	—
6	V	Drenagem da fase aquosa (22 s)	—	—
7	—	Leitura	—	—
8	V	Drenagem da fase orgânica	—	—
9	P4, V	Limpeza da câmara com etanol	60	1320
10	P5, V	Limpeza da câmara com água	80	1360

#### 3.2.4. *Clean-up das amostras de leite*

As 5 amostras líquidas de leite (integral, desnatado e semi-desnatado) e duas amostras de leite em pó foram obtidas no comércio local e, preferencialmente, analisadas no mesmo dia. O leite em pó foi preparado de acordo com as instruções da embalagem. Todas as amostras foram fortificadas com 1,00, 2,00 ou 4,00 mg L<sup>-1</sup> de formaldeído para avaliar os efeitos da matriz (4 amostras) e a exatidão (5 amostras).

Para a precipitação de proteínas, adicionou-se 1,0 mL de solução de TCA 0,2 mol L<sup>-1</sup> a 1,0 mL de cada amostra de leite [83]. As misturas foram agitadas manualmente e centrifugadas durante 5 min; a fase aquosa foi filtrada duas vezes através de membranas de acetato de celulose de 0,45 µm (Merck, Milipore) acopladas a seringas. As amostras foram analisadas após esse tratamento.

#### 3.2.5. *Procedimento de referência*

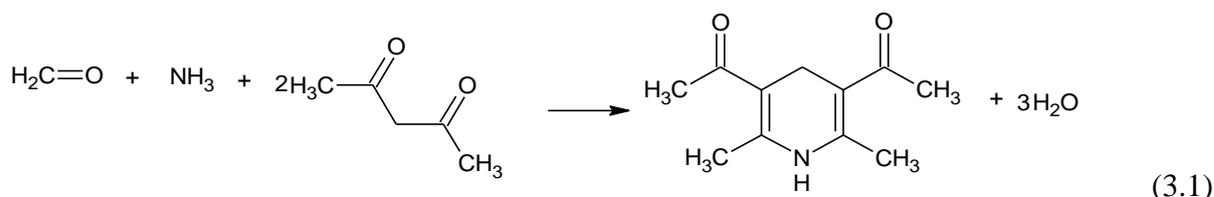
O procedimento de referência baseou-se na detecção fluorimétrica do composto formado após derivação química com acetilacetona em meio amoniacal, com excitação e emissão em 410 e 510 nm, respectivamente [80]. Após tratamento das amostras com TCA [83] para precipitação das proteínas, as amostras foram centrifugadas e filtradas duas vezes para remoção do precipitado. Uma amostra de leite integral isenta de formaldeído foi utilizada para a compatibilização de matriz na construção da curva de calibração.

### **3.3. Resultados e Discussão**

#### 3.3.1. *Aspectos gerais*

O SFB proposto visava superar as desvantagens associadas à MELLD em batelada, tais como a injeção reprodutiva da mistura extratora e a separação das fases orgânica e aquosa, sem o emprego de um separador de fases. Microbombas solenoide, que geram fluxos pulsados, foram utilizadas pela primeira vez para a dispersão do extrator na fase aquosa em MELLD.

A reação de Hantzsch, que envolve a ciclização de formaldeído com acetilcetona em meio de acetato de amônio (Equação 3.1) foi empregada para a derivação química do analito, pois é seletiva para o formaldeído. A reação leva à formação de um composto de coloração amarela (3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidina) [24] e, para melhorar a sensibilidade, explorou-se a pré-concentração do produto na fase orgânica.

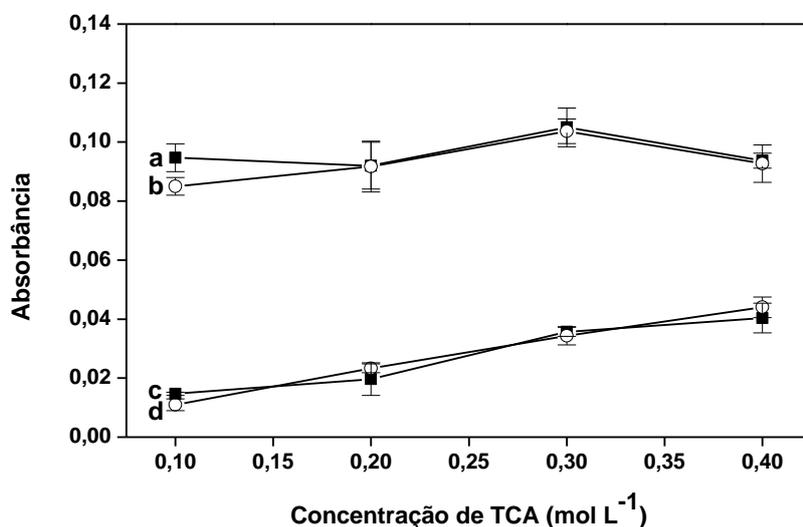


A reação de ciclização é relativamente lenta, sendo necessário um excesso de acetilcetona ou aquecimento da mistura reacional para favorecer a formação do produto [84]. Assim, a câmara de fluxo-batelada foi construída em aço inox, com aquecimento resistivo e um sensor de temperatura podendo, portanto, ser utilizada para aquecimento da mistura reacional. Guias de onda e fibras ópticas foram acopladas à câmara para a detecção espectrofotométrica, conforme a Figura 3.2 [81], evitando, assim, a necessidade de isolamento da fase orgânica e as desvantagens inerentes.

O *clean-up* das amostras de leite foi necessário para evitar o espalhamento da radiação proveniente da fonte e para evitar efeitos da matriz. A precipitação de proteínas não foi realizada no sistema fluxo-batelada, devido a alguns inconvenientes, tais como: (i) dificuldade na separação de fases do leite; a proteína precipitada no fundo da câmara seria de difícil remoção, podendo dificultar a medição espectrofotométrica e (ii) o entupimento da saída da câmara. Portanto, o tratamento das amostras de leite foi realizado antes do processamento da amostra no sistema de análises em fluxo.

Conforme a Figura 3.3, a concentração do agente precipitante TCA de  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (concentração final na amostra de  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) foi suficiente, apresentando respostas analíticas que concordaram com as obtidas na ausência da amostra. O aumento da concentração de TCA ocasionou também o aumento do sinal do branco (Figura 3.3, c e d). Desta forma, a menor concentração de TCA que apresentou resposta semelhante na ausência e presença de amostra foi selecionada para estudos posteriores.

Figura 3.3- Efeito da concentração de TCA no tratamento das amostras. Os valores de absorbância foram obtidos na presença (a e c) e ausência de leite (b e d) na ausência (c e d) e presença (a e b) de 10 mg L<sup>-1</sup> de formaldeído. As barras de erro referem-se às estimativas de desvios-padrão (n = 3)

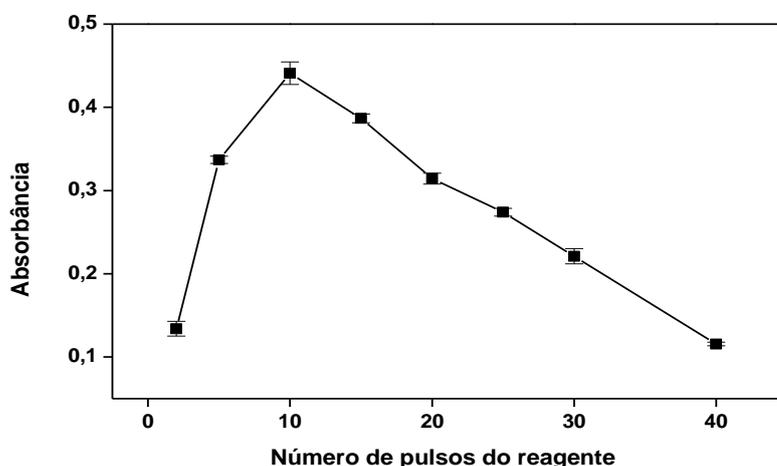


### 3.3.2. Otimização do procedimento

A otimização da MELLD em sistema fluxo-batelada ocorreu de forma univariada, de modo a se obter as melhores condições das variáveis que afetam a derivação química do analito e a extração do produto para a fase orgânica, tais como: volume do reagente cromogênico, temperatura, tempo de reação e extração, volume do solvente extrator e solvente utilizado como dispersor.

Os experimentos iniciais referem-se à formação da 3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidina e foram realizados sem a etapa de extração do produto. A primeira variável avaliada foi o número de pulsos de amostra e reagente na derivação química do analito (Figura 3.4). Em relação a outros estudos anteriores [80] foi empregada concentração de acetilacetona 10 vezes maior (2,0% v/v) visando alcançar a concentração ótima de reagente com a mínima diluição da amostra. O efeito do número de pulsos do reagente é mostrado na Figura 3.4, sendo que o somatório de pulsos de amostra e reagente foi fixada em 50 pulsos.

Figura 3.4- Efeito do número pulsos de reagente na derivação química de formaldeído (concentração de  $10 \text{ mg L}^{-1}$ ), mantendo constante o total de 50 pulsos (amostra + reagente). As barras de erro referem-se às estimativas de desvios-padrão ( $n = 3$ )



A melhor resposta foi obtida com 10 pulsos de reagente para 40 pulsos de amostra. Isto correspondente a, pelo menos, um excesso molar de 80 vezes de acetilacetona, o que pode ser justificado pelo efeito sobre a velocidade de reação. Como a reação de derivação é lenta e o tempo de residência é curto (*ca.* 30 s), o efeito do excesso de acetilacetona sob a formação do produto torna-se evidente; esta estratégia foi também explorada na determinação de glicerol livre em biodiesel, também envolvendo a reação de Hantzsch [84].

A partir de 10 pulsos de reagente, conforme a Figura 3.4, a absorbância diminui linearmente devido à diluição da amostra pelo reagente. Esta relação volumétrica foi utilizada para estudos adicionais, mas com um total de 40 pulsos (32 de amostra e 8 de reagente) em vez de 50, considerando o volume útil da câmara de fluxo-batelada e as demais etapas da MELLD.

Foram também avaliados os efeitos da temperatura dentro da câmara de reação/extração e do tempo de reação, variáveis importantes para a derivação química do formaldeído, ainda sem a etapa de extração. Como esperado, o sinal analítico aumentou com o aumento da temperatura (Figura 3.5) e do tempo de reação (Figura 3.6). Em ambos os casos, o valor do branco analítico aumentou ligeiramente. Os resultados indicaram que o estado estacionário é atingido quando a temperatura da câmara é maior do que  $45 \text{ }^\circ\text{C}$  empregando o tempo de reação de 60 s. No entanto, foi escolhida a temperatura de  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ , pois garante a maior extensão da reação e o tempo de reação selecionado foi de 30 s, como compromisso entre a sensibilidade e a frequência de amostragem.

Figura 3.5- Efeito da temperatura na derivação química do formaldeído com tempo de reação de 60 s sobre os sinais (a) analítico (10 mg L<sup>-1</sup> de formaldeído) e (b) branco. As barras de erro referem-se às estimativas de desvios-padrão (n = 3)

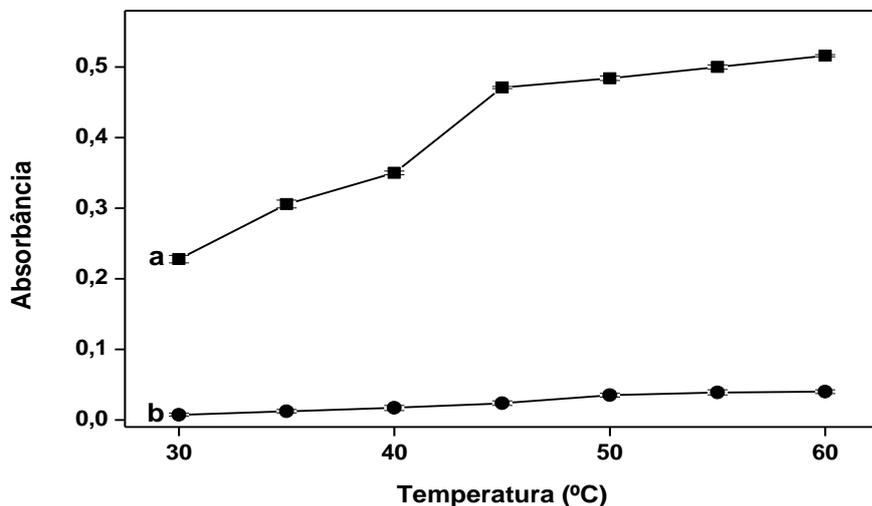
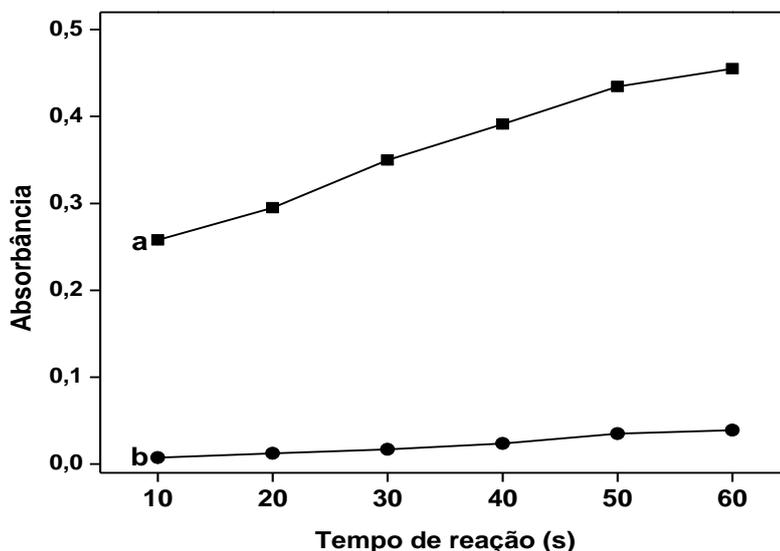


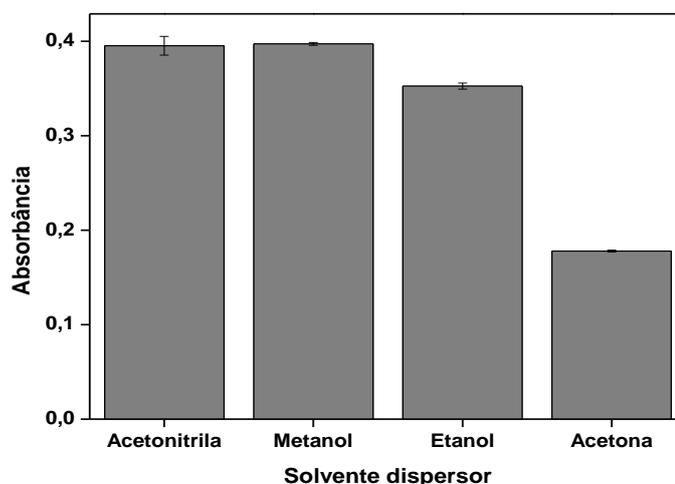
Figura 3.6- Efeito do tempo de reação para derivação química do formaldeído com temperatura de 50 °C sobre os sinais (a) analítico (10 mg L<sup>-1</sup> de formaldeído) e (b) branco. As barras de erro referem-se às estimativas de desvios-padrão (n = 3)



As etapas seguintes da otimização são referentes à MELLD, que tiveram por objetivo melhorar a eficiência de extração. As variáveis foram: o tipo de solvente dispersor, o volume do solvente extrator (LI) e o tempo de extração e separação de fases. Foram avaliados quatro solventes dispersores (acetonitrila, metanol, etanol e acetona) devido à solubilidade mútua na

amostra aquosa e no LI. A função do solvente dispersor é promover a formação de pequenas gotículas de extrator por toda a fase aquosa [21]. Conforme a Figura 3.7, a acetonitrila e o metanol proporcionaram melhores resultados em relação à eficiência de extração, o que indica que gotas menores do extrator são formadas com esses solventes, podendo atingir uma maior área superficial. Esta propriedade depende de vários parâmetros físico-químicos, incluindo: viscosidade, densidade, tensão superficial do solvente e interações moleculares com a água e com o extrator [21]. Como a limpeza da câmara era realizada sequencialmente com etanol e água, foram necessárias mais etapas quando se utilizou a acetonitrila como solvente dispersor, em relação ao metanol (2 e 5 ciclos de lavagem considerando o metanol e a acetonitrila como dispersantes, respectivamente). Outras vantagens do emprego do metanol em relação à acetonitrila são menores toxicidade e custo.

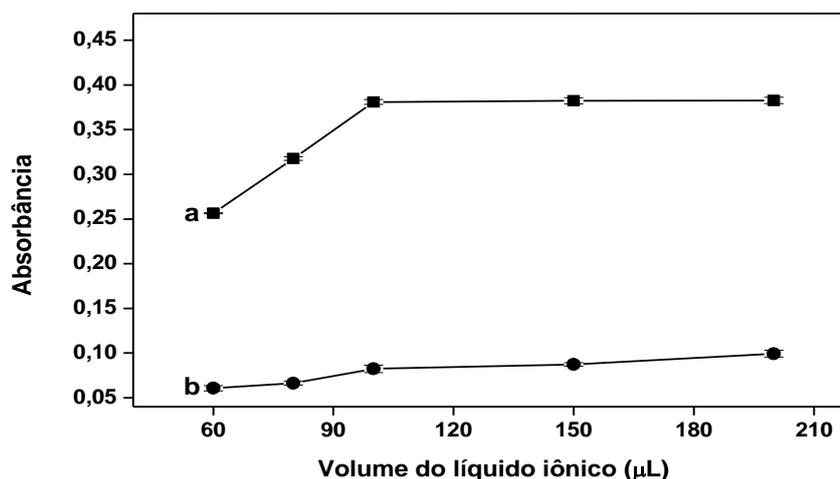
Figura 3.7- Efeito do solvente dispersor sobre a MELLD, com formaldeído 2,5 mg L<sup>-1</sup>. As barras de erro referem-se às estimativas de desvios-padrão (n = 3)



O LI cloridrato de tri-hexil-tetradecil-fosfônio foi selecionado como extrator, considerando a solubilidade relativamente baixa em água e a partição favorável da 3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidina, conforme avaliado em experimentos preliminares. Dentre outros solventes usualmente empregados como extratores (*e.g.* hexano, clorofórmio e tetracloreto de carbono), os LIs são considerados menos tóxicos [27]. De acordo com estudos ecotoxicológicos, o cloridrato de tri-hexil-tetradecil-fosfônio apresenta baixa toxicidade (EC50 = 7,10 mg L<sup>-1</sup> para bactérias *Vibrio fischeri* em um ensaio de 15 min) [85]. Esse LI também apresenta custo relativamente baixo, *ca.* 33% menor em relação a outros LI que poderiam ser

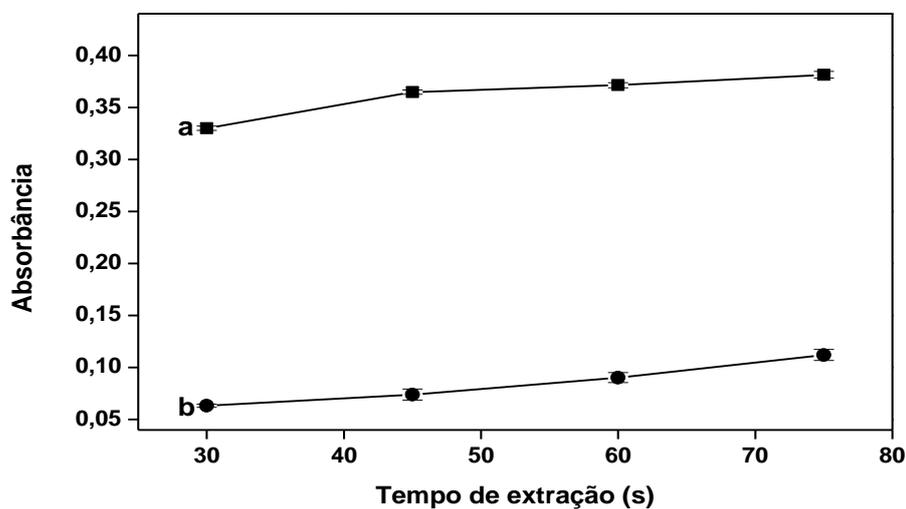
usados, *e.g.* 1-hexil-3-metilimidazólio. Para a avaliação do efeito do volume do solvente extrator, foi fixado 400  $\mu\text{L}$  de solvente dispersor (metanol). Como demonstrado na Figura 3.8, a eficiência de extração aumentou até o volume de 100  $\mu\text{L}$  do LI. No entanto, quando se utilizou amostras de leite, foi necessário o emprego de 150  $\mu\text{L}$  do extrator, devido à turbidez observada na interface com a amostra aquosa, provavelmente causada pela extração da gordura presente nas amostras. Com um maior volume do extrator, as determinações espectrofotométricas puderam ser realizadas fora da interface, evitando, assim, o efeito do espalhamento de radiação.

Figura 3.8- Efeito do volume de líquido iônico na MELLD sobre os sinais (a) analítico (2,5  $\text{mg L}^{-1}$  de formaldeído) e (b) branco. As barras de erro referem-se às estimativas de desvios-padrão ( $n = 3$ )



Como a densidade do LI ( $0,895 \text{ g mL}^{-1}$ ) é menor do que a da água, o extrato contendo o analito permanece na parte superior da fase aquosa. Buscando uma melhor eficiência da extração, a mistura extratora (extrator + dispersor) foi adicionada na parte inferior da câmara fluxo-batelada por meio de um tubo de polietileno posicionado imediatamente acima da região para detecção da fase orgânica, como pode ser visualizado na Figura 3.1. O objetivo foi obter uma melhor dispersão do extrator por toda a amostra aquosa. O aquecimento utilizado na etapa de derivação do analito também favoreceu a dispersão do solvente extrator [86]. Após a adição da mistura extratora, foi necessário um intervalo de tempo para a separação de fases por diferença de densidade (45 s, conforme Figura 3.9).

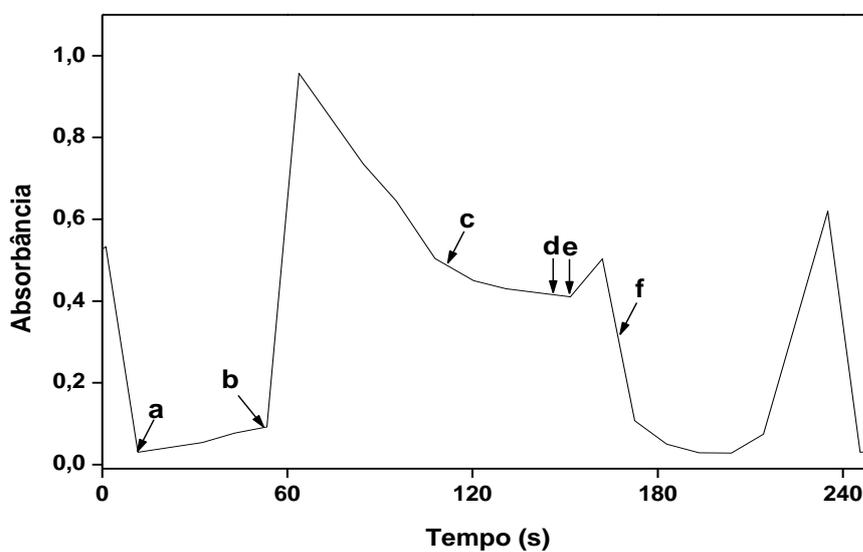
Figura 3.9- Avaliação do tempo necessário para a separação de fases após adição da mistura extratora sobre os sinais (a) analítico ( $2,5 \text{ mg L}^{-1}$  de formaldeído) e (b) branco. As barras de erro referem-se às estimativas de desvios-padrão ( $n = 3$ )



### 3.3.3. Características analíticas

A Figura 3.10 mostra o sinal de absorbância obtido com a extração do produto da reação de Hantzsch em função do tempo, nas condições otimizadas.

Figura 3.10- Resposta analítica obtida pela MELLD com  $2,5 \text{ mg L}^{-1}$  de formaldeído: (a) adição do reagente de Hantzsch; (b) adição do extrator; (c) drenagem da fase aquosa; (d) ponto de medição; (e) drenagem da fase orgânica e (f) início da limpeza da câmara fluxo-batelada



Da comparação entre os valores em b (referente ao produto antes da extração) e d (medição após a extração), pode ser deduzido um fator de enriquecimento de 4,6. Isto é ligeiramente inferior à razão dos volumes das fases aquosa e orgânica, estimada em 5,6, indicando que 82% do produto são extraídos para a fase orgânica nas condições utilizadas no procedimento. Nessa estimativa, considerou-se que o produto mostra a mesma absorvidade molar nas fases aquosa e orgânica.

Nas condições otimizadas, resposta linear foi observada na faixa de 0,5 a 5,0 mg L<sup>-1</sup> de formaldeído, descrita pela equação  $A = (0,088 \pm 0,005) + (0,116 \pm 0,004) CF$  ( $r = 0,998$ ), em que A é a absorbância e CF é a concentração de formaldeído em mg L<sup>-1</sup>. Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) de formaldeído no leite foram estimados em 100 e 300 µg L<sup>-1</sup>, respectivamente, em nível de confiança de 95%.

A frequência de amostragem foi de 10 determinações por hora e foi gerado 6,7 mL de resíduos por determinação. Os consumos de LI e de metanol por determinação foram de 136 e 364 µL, respectivamente. Os coeficientes de variação (CV) foram estimados em 3,1% e 1,2% (n = 10) para uma amostra de leite integral com e sem MELLD, respectivamente.

As recuperações obtidas em 4 amostras de leite (integral, desnatado, semi-desnatado e em pó) foram de 91 a 106% como descrito na Tabela 3.2. Curvas de calibração obtidas na ausência [ $A = (0,088 \pm 0,005) + (0,116 \pm 0,003) CF$  ( $r=0,997$ )] e na presença [ $A = (0,089 \pm 0,004) + (0,119 \pm 0,002) CF$  ( $r=0,996$ )] de uma amostra de leite integral apresentaram coeficientes angulares concordantes. Estes resultados indicam a ausência de efeitos da matriz no procedimento proposto.

Tabela 3.2- Recuperações de formaldeído adicionado em diferentes amostras de leite (n=3)

Amostra	Formaldeído (mg L <sup>-1</sup> )		Recuperação (%)
	Adicionado	Encontrado	
Leite em pó	1,00	0,99±0,04	99±4
	4,00	3,92±0,04	98±1
Integral UHT	1,00	0,95±0,04	95±4
	4,00	3,87±0,08	97±2
Desnatado UHT	1,00	0,97±0,04	97±4
	4,00	3,64±0,09	91±2
Pasteurizado semi-desnatado	1,00	1,06±0,04	106±4
	4,00	3,85±0,07	96±2

### 3.3.4. Avaliação de seletividade e aplicação analítica

A reação de Hantzsch proporciona boa seletividade para o formaldeído, pois outros aldeídos e cetonas não são reativos [87] e os íons inorgânicos presentes nas amostras (*e.g.*  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$ ) não afetam a formação do produto nas concentrações usuais [88].

Para a avaliação de exatidão, o procedimento desenvolvido foi aplicado a amostras de leite adicionadas de formaldeído, sendo os resultados comparados com os obtidos pelo procedimento de referência [80] (Tabela 3.3). As variâncias foram avaliadas pelo teste *F*, sendo os resultados concordantes com o procedimento de referência, considerando 95% de confiança. Os valores médios foram comparados por meio de um teste *t* pareado (95% de confiança), permitindo concluir que os resultados obtidos pelo procedimento proposto são concordantes com aqueles obtidos com o procedimento de referência [80].

Tabela 3.3- Avaliação de exatidão do procedimento proposto e de referência. Valores médios e desvios-padrão ( $n = 3$ ) para a determinação de formaldeído em amostras de leite após a adição de  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$

Amostra	Formaldeído ( $\text{mg L}^{-1}$ )		
	Proposto	Referência [80]	Fcalculado
Leite em pó 1	2,15±0,08	2,22±0,05	2,56
Leite integral UHT	1,95±0,07	2,02±0,07	1,00
Leite em pó 2	1,92±0,06	1,94±0,02	9,00
Leite pasteurizado semi-desnatado	2,04±0,06	2,07±0,04	2,25
Desnatado UHT	1,98±0,07	1,96±0,05	1,96

Valor de F crítico (95% de confiança) = 19,0

Características analíticas de outros procedimentos para a determinação de formaldeído em leite são apresentadas na Tabela 3.4. O procedimento proposto apresenta diversas vantagens em comparação a outros procedimentos descritos anteriormente [75,77], incluindo menor consumo de solvente ( $136 \mu\text{L}$  do LI em comparação com  $16 \text{ mL}$  de hexano [75]), menor

toxicidade do solvente extrator e baixa geração de resíduos (4,0 mL por determinação). O procedimento cromatográfico [75] envolve tratamento de amostra complexo e demorado, com sucessivas extrações com hexano, lavagem do extrato com água e evaporação do solvente com nitrogênio, sendo moroso, exaustivo e aumentando os riscos de contaminação e de perdas do analito. Outro procedimento empregando HPLC-UV [76] também requer um moroso preparo de amostra com ELL com partição a baixa temperatura, centrifugação e filtração, além de alto consumo de acetonitrila (*ca.* 12 mL por determinação).

Um procedimento envolvendo análises em fluxo foi empregado para a determinação de formaldeído, peróxido de hidrogênio, dicromato e bicarbonato em leite [77]. Para a determinação do formaldeído, empregou-se a reação com fucsina e sulfito de sódio em meio ácido, porém a sensibilidade é muito baixa, na ordem de  $0,1 \text{ g L}^{-1}$ , inadequada para a determinação desta substância, que pode apresentar efeitos tóxicos em concentrações muito inferiores. Outro estudo envolvendo espectrometria no infravermelho com reflexão total atenuada também apresenta detectabilidade inadequada (LD estimado em  $5 \text{ g L}^{-1}$ ) [65], muito superior aos limites estabelecidos pelas agências reguladoras. Os procedimentos que exploram CG-MS [64] e HPLC-UV [76] apresentam os melhores limites de detecção *ca.* 8 e 16 vezes menores que o procedimento proposto, respectivamente. Entretanto, o procedimento que envolve CG-MS requer um preparo de amostra muito demorado, envolvendo a derivação química com o cloridrato de *o*-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzil) e MEFS [64]; além disso, apresenta baixas recuperações (em torno de 68%) e altos valores de CV (na ordem de 15%). No procedimento que emprega a técnica de HPLC [75] o CV não foi citado. No procedimento proposto, o CV foi estimado em 3,3%, indicando melhor reprodutibilidade em relação aos procedimentos empregando CG-MS [64] e HPLC-UV [76].

O procedimento que emprega papel indicador colorimétrico é simples e não necessita de nenhum preparo de amostra, utilizando apenas papel de filtro impregnado com o reagente de Schiff, que apresenta coloração azul-púrpura na presença de formaldeído [78]. No entanto, a informação obtida é apenas qualitativa e a detectabilidade pode não ser adequada para amostras adulteradas com baixas concentrações de formaldeído, nas quais os efeitos tóxicos já podem se manifestar.

Tabela 3.4- Características analíticas de procedimentos para a determinação de formaldeído em leite

Técnica	Preparo da amostra	LD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Faixa linear ( $\text{mg L}^{-1}$ )	CV (%)	Recuperação (%)	Referência
CG-MS	SPME em <i>headspace</i> após derivação química com cloridrato de o-(2,3,4,5,6-pentafluoro-benzil)-hidroxilamina	12,2*	0,005– 1,0*	1,4– 15	68–128	64
Infravermelho com reflexão total atenuada	—	—	(5- 100)x10 <sup>3</sup>	—	—	65
HPLC-UV	Sucessivas extrações com hexano e evaporação do solvente com nitrogênio	—	0,005-0,1	—	89,9-96,9	75
HPLC-UV	ELL após derivação química com 2,4 DNPH, centrifugação e filtração	6,0	0,01-0,4	3,8	100,1-104,3	76
FIA	TCA/centrifugação e filtração	—	100-600	2,46	—	77
Indicador colorimétrico	—	—	1,0-100*	—	—	78
FIA com MELLD	TCA/centrifugação e filtração	100	0,5–5,0	3,3	91–106	Este trabalho

\*Limites expressos em  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (LD) e  $\text{mg kg}^{-1}$  (faixa linear)

### 3.4. Conclusões

O procedimento proposto foi aplicado com sucesso à rápida determinação de formaldeído em leite. O fluxo pulsado proporcionou uma melhor dispersão do extrator por toda a amostra, o processamento das amostras em sistema fluxo-batelada favoreceu a separação de fases e a detecção do analito na fase orgânica, no interior da câmara. O processamento das amostras em um sistema fechado impediu a contaminação, bem como evitou a perda do analito, o que é importante especialmente no caso de analitos voláteis, como o formaldeído.

A derivação química do analito em uma câmara aquecida e fechada também é atraente, devido à reação química envolvida ser relativamente lenta e por se tratar de um analito volátil. A preparação da amostra é mais simples e rápida em relação a outros procedimentos, requerendo apenas a precipitação proteica utilizando TCA. O emprego de um extrator menos tóxico, o menor consumo de reagentes e a baixa geração de resíduos contribuiram para um procedimento amigável ao meio ambiente. O procedimento proposto é, então, uma alternativa atraente para detectar fraudes em leite pela adição de formaldeído.

#### 4. Microextração líquido-líquido dispersiva em sistema *lab-in-syringe* para a determinação de surfactantes aniônicos em águas de rios

##### Resumo

Microextração líquido-líquido dispersiva foi explorada para a determinação de detergentes aniônicos em um sistema *lab-in-syringe*. O procedimento baseou-se na extração do par iônico formado entre o corante azul de metileno e os detergentes aniônicos, utilizando clorofórmio como extrator. O dodecil sulfato de sódio (SDS) foi utilizado como modelo de detergente aniônico e uma mistura de clorofórmio e acetonitrila (2:3 v/v) foi utilizada para a extração. Resposta linear ( $r = 0,998$ ) foi observada na faixa de 0,03 a 0,5 mg L<sup>-1</sup> de SDS e os limites de detecção e quantificação foram de 9,0 e 29,0 µg L<sup>-1</sup>, respectivamente. O coeficiente de variação foi de 2,7% (n = 10) e as recuperações de SDS adicionado em amostras de águas de rios variaram de 91 a 104%, indicando a ausência de efeitos de matriz. Resultados para amostras de águas de rios obtidos pelo procedimento proposto foram concordantes com aqueles obtidos pelo procedimento de referência, ao nível de 95% de confiança. Foram consumidos 40 µL de clorofórmio e 60 µL de acetonitrila por determinação, foram realizadas 17 determinações por hora e gerados 2,8 mL de resíduos por determinação. O procedimento proposto é uma alternativa rápida, simples e ambientalmente amigável para a determinação de surfactantes aniônicos em águas dos rios.

Palavras chave: Análise por injeção sequencial. Sistema *lab-in-syringe*. Detergentes aniônicos. Águas de rios.

**Abstract**

Dispersive liquid-liquid microextraction was exploited for the determination of anionic detergents in a lab-in-syringe system. The procedure was based on extraction of the ion-pair formed between the methylene blue dye and the anionic detergents from river water samples. Sodium dodecyl sulfate (SDS) was used as a model of anionic detergent. The extractive mixture was chloroform and acetonitrile (2:3 v/v). A linear response ( $r=0.998$ ) was observed from 0.03 to 0.5 mg L<sup>-1</sup> SDS and the limits of detection and quantification were 9.0 and 29.0 µg L<sup>-1</sup>, respectively. Coefficient of variation was estimated at 2.7% ( $n = 10$ ), with recoveries of SDS spiked to river water samples from 91 to 104%, thus indicating the absence of matrix effects. Results for river water samples agreed with the obtained by the reference procedure at the 95% confidence level. Consumptions of chloroform and acetonitrile were only 40 and 60 µL per determination, respectively; the sampling rate was 17 determinations per hour and 2.8 mL of residues were generated by determination. The proposed procedure is a fast, simple, and environmentally friendly alternative for the determination of SDS in river waters.

**Keywords:** Sequential injection analysis. Lab-in-syringe system. Anionic detergents. River waters.

#### 4.1. Introdução

Os detergentes, também conhecidos como agentes tensoativos ou surfactantes, são compostos orgânicos constituídos de moléculas anfifílicas compostas por uma região apolar (hidrofóbica) e outra polar (hidrofílica) [89,90]. A região apolar é formada por longas cadeias carbônicas, com cerca de 10 a 20 átomos de carbono. Já a parte polar é responsável pela solubilidade em água. Os detergentes apresentam capacidade de formar micelas, de reduzir a tensão superficial, habilidades dispersantes, além de formarem filmes nas interfaces de fluidos imiscíveis, tais como óleo e água. Neste caso, a parte polar se associa à água através de ligações de hidrogênio, enquanto a parte apolar liga-se às gorduras por meio de interações de van der Waals [89,90].

Na área industrial, os detergentes são empregados como dispersantes, emulsificantes, espessantes e floculantes, estando presentes na formulação de diversos produtos, tais como xampus, óleos industriais, tintas e cosméticos [89,91]. Na área agrícola, são empregados na produção de herbicidas e pesticidas, com a função de adjuvantes, principalmente para reduzir a tensão superficial da água e aumentar a eficiência do produto, pois facilita a absorção pela planta [92]. Devido ao alto consumo industrial e doméstico, é possível encontrar detergentes em efluentes municipais e corpos hídricos receptores, sendo a formação de espuma o principal indicativo da presença dessas substâncias.

Os detergentes são classificados em aniônicos, catiônicos, não iônicos e anfóteros, de acordo com a carga da região hidrofílica [89,91]. Os detergentes aniônicos são os principais componentes das formulações para uso industrial, doméstico e agrícola, correspondendo a *ca.* 75% [92]. Alguns detergentes, que não apresentam ramificações nas cadeias carbônicas, são biodegradáveis, mediante ação de bactérias e fungos, minimizando assim o impacto ambiental [93]. A Alemanha, em 1964, foi o primeiro país a proibir a comercialização de detergentes com biodegradabilidade inferior a 80%. Outros países, tais como Estados Unidos, Reino Unido, França, Japão e Itália criaram leis semelhantes; no Brasil, as primeiras leis passaram a vigorar a partir de 1982 [92]. No entanto, existem vários fatores nos ambientes receptores que podem interferir no processo de biodegradação, como a formação de sais insolúveis de cálcio e magnésio, alta concentração de oxigênio dissolvido, interações com detergentes catiônicos e variação do pH durante o processo de degradação [93,94].

A determinação de detergentes aniônicos em águas é extremamente importante, por ser um indicativo de contaminação ambiental. Devido à ineficiência dos processos de tratamento de efluentes e ao aporte abundante de resíduos, esses poluentes podem ser encontrados em águas residuais e naturais. Um dos principais problemas ambientais causados por esses

contaminantes é a formação de espumas, que reduzem as trocas gasosas entre a atmosfera e a superfície da água, através da formação de uma camada de detergente; assim, a oxigenação é restrita e pode causar a morte de peixes e outros organismos [94]. O Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) estabeleceu o limite de  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  de detergentes aniônicos em águas naturais para consumo humano [95].

O procedimento recomendado pela *American Public Health Association* (APHA) [96] para a determinação espectrofotométrica de detergentes aniônicos em águas é baseado no método do azul de metileno (MB, *do inglês methylene blue*). Esse método consiste na formação de par iônico entre o detergente aniônico e o corante catiônico (MB) na fase aquosa, posteriormente extraído para a fase orgânica, usualmente constituída por clorofórmio.

Um par iônico é formado entre duas espécies de cargas opostas, devido à atração eletrostática, sendo que o grau de pareamento também depende das interações íons-solvente [97]. Em solventes polares, as interações de solvatação são favorecidas em relação às forças de pareamento iônico. Assim, a formação dos pares iônicos ocorre preferencialmente em solventes que apresentam baixas constantes dielétricas ( $\epsilon_r$ ), tais como solventes orgânicos (*e.g.* clorofórmio  $\epsilon_r = 4,8$ ). A alta constante dielétrica da água (78,5) desfavorece a formação de pares iônicos [98,99], mas esse processo é necessário para a extração do par iônico para o meio orgânico, visto que a partição dos íons isolados neste meio não é favorável.

O método do MB geralmente utiliza os detergentes aniônicos dodecil sulfato de sódio (SDS) ou alquilbenzeno sulfonato (LAS) para a calibração. O SDS, também denominado lauril sulfato de sódio, é usualmente empregado nas formulações de cosméticos e de detergentes de uso geral [89,96]. Os sabões, sais alcalinos de ácidos carboxílicos, não são determinados pelo método do MB [96].

O procedimento de referência baseado no método do MB envolve sucessivas extrações com clorofórmio [96]. Dessa forma, é susceptível a erros sistemáticos, além de ser exaustivo, moroso e consumir grande quantidade de clorofórmio (*ca.* 50 mL por determinação) [96]. Além disso, ocorre alta exposição do analista ao solvente tóxico e geração de volume significativo de resíduos (*ca.* 225 mL por determinação) [96]. Buscando alternativas mais limpas, vários outros procedimentos foram desenvolvidos.

Procedimentos envolvendo cromatografia gasosa e líquida e quantificação por espectrometria de massas (CG-MS) [100] e espectrometria de massas em tandem (CL-MS/MS) [101] foram empregados para a determinação de traços de detergentes em sedimentos marinhos [100] e para a determinação em detergentes comercial [101]. Esses procedimentos necessitam do preparo das amostras por ELL ou EFS [100,101]. Outros

procedimentos envolvendo cromatografia a gás também foram empregados para a quantificação de LAS em águas [102]; no entanto, esse procedimento é limitado pela baixa volatilidade dos compostos.

Fluorescência molecular foi empregada para a determinação de detergentes aniônicos (utilizando SDS como modelo) em águas empregando a formação do par iônico com o corante safranina T [103]. São necessários 4,0 mL de clorofórmio para cada extração. Mais recentemente, vêm sendo explorados aplicativos para a medida de imagens digitais com *smartphone*, que empregam *softwares* de análises de cores, com conversão dos dados em valores de RGB [99]. Esses procedimentos apresentam alta sensibilidade, na ordem de  $\mu\text{g L}^{-1}$ , e baixo consumo de solvente orgânico (*ca.* 100  $\mu\text{L}$ ), porém são necessárias diversas etapas na extração, tais como agitação e centrifugação, que podem estar sujeitas a erros sistemáticos.

Dentre as várias técnicas analíticas utilizadas para a determinação de detergentes aniônicos, a mais empregada é a espectrofotometria com base no método do MB. No entanto, algumas alterações têm sido realizadas para tornar o procedimento mais limpo, especialmente diminuindo as quantidades de solvente orgânico e de reagente [104,105].

Análises em fluxo têm sido empregadas para automatizar o método do MB e minimizar os inconvenientes das ELL, tais como diminuir etapas, melhorar a reprodutibilidade, diminuir o tempo de análise e reduzir drasticamente o consumo de solvente extrator (de mL para  $\mu\text{L}$ ). Geralmente, esses procedimentos envolvem segmentação e separação de fases [106-108], mas procedimentos alternativos, que evitam essas etapas, também têm sido propostos [109].

Um procedimento envolvendo MELLD em SIA foi desenvolvido para a determinação de detergentes aniônicos [110]. Os reagentes foram aspirados para uma bobina de extração, sendo necessário 400  $\mu\text{L}$  de clorofórmio; posteriormente, as fases aquosa e orgânica foram encaminhadas para uma câmara cônica, ocorrendo a separação das fases para posterior determinação espectrofotométrica. Outro procedimento envolvendo SIA explorou a estratégia *lab-in-syringe*, em que a extração e a separação das fases ocorreram dentro da seringa utilizada para a propulsão dos fluídos, com auxílio de agitação magnética [47]. O volume mínimo de clorofórmio para evitar a fragmentação até a leitura da fase orgânica foi de 200  $\mu\text{L}$ .

Esta etapa da Tese teve como objetivo explorar a MELLD em um sistema *lab-in-syringe* sem o uso de agitação mecânica. Adicionalmente, buscou-se reduzir de forma significativa o consumo de reagentes, principalmente de clorofórmio, e simplificar o procedimento, de modo que todas as etapas, como formação do par iônico, dispersão do solvente extrator, extração do par iônico e separação de fases fossem realizadas no interior da seringa. Como aplicação, foi

proposta a determinação espectrofotométrica de detergentes aniônicos em águas de rios pelo método do azul de metileno.

## **4.2. Materiais e Métodos**

### *4.2.1. Reagentes e soluções*

Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura (resistividade  $> 18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$  a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Uma solução estoque de MB foi preparada dissolvendo-se 0,05 g de 3,7-bis (dimetilamino fenotiazina), (Merck, Alemanha), 2,83 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (Merck) e 0,68 mL de ácido sulfúrico (Merck) concentrado em 100 mL de água. Detergentes aniônicos, fornecidos pela Merck, SDS, lauril éter sulfato (SLES) e dodecil benzeno sulfonato de sódio (SBDS) foram utilizados para avaliação da resposta analítica. As soluções estoque foram preparadas dissolvendo-se 0,100 g dos detergentes em 100 mL de água. As soluções de referência de SDS (0,03 a  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ ) foram preparadas diariamente pela diluição do estoque em água. Foram empregados clorofórmio (Merck) como solvente extrator e acetonitrila e etanol anidro (Merck) como solventes dispersores.

### *4.2.2. Equipamentos e acessórios*

O procedimento em fluxo foi baseado em um sistema SIA comercialmente disponível (FIALab<sup>®</sup> 3500, FIALab<sup>®</sup> Instruments Inc., EUA) equipado com uma seringa de 2,5 mL e uma válvula de seletora de oito portas. Devido à maior densidade do solvente extrator em relação à água, a seringa foi posicionada de cabeça para baixo. Linhas de transmissão foram feitas de Teflon<sup>®</sup>, com 0,75 mm de diâmetro interno. O sistema de detecção foi um espectrofotômetro CCD multicanal (modelo USB4000, Ocean Optics, EUA), com uma lâmpada de tungstênio-halogênio (LS-1, Ocean Optics) e fibras ópticas (núcleo de 1000  $\mu\text{m}$ ) para transporte de radiação. A cela de detecção foi composta por um tubo de vidro de 5,0 cm de comprimento e 4,0 mm de diâmetro interno, encaixado em um suporte de cubeta (CUV-UV, Ocean Optics) e posicionado perpendicularmente ao feixe de radiação. O controle do sistema e a aquisição de dados foram realizados pelo software FIALab<sup>®</sup> 5.9.

#### 4.2.3. Procedimento proposto

O sistema *lab-in-syringe* é apresentado na Figura 4.1 e foi operado de acordo com a rotina descrita na Tabela 4.1. Inicialmente foram aspirados para a seringa 33  $\mu\text{L}$  de mistura extratora (clorofórmio e acetonitrila ou clorofórmio e etanol) na proporção 2:3 (v/v), seguidos de 33  $\mu\text{L}$  de MB e 400  $\mu\text{L}$  da amostra. As etapas 1-3 foram repetidas 3 vezes, sendo o volume total das alíquotas; 100  $\mu\text{L}$  da mistura extratora, 100  $\mu\text{L}$  de MB e 1200  $\mu\text{L}$  de amostra; a vazão empregada foi de 150  $\mu\text{L s}^{-1}$ . O tempo de extração do par iônico dentro da seringa foi de 5 s. Para as determinações espectrofotométricas, a vazão foi alterada para 5  $\mu\text{L s}^{-1}$ , visando evitar a fragmentação da fase orgânica. As determinações espectrofotométricas foram realizadas em 655 nm e corrigidas com base no sinal de referência medido em 790 nm, comprimento de onda em que o par iônico não absorve radiação. Após as determinações, a fase aquosa foi descartada e a seringa foi limpa sequencialmente com etanol e água.

Figura 4.1- Diagrama de fluxos do sistema *lab-in-syringe*. SP: bomba tipo seringa, V: válvula solenoide de 3 vias, LS: lâmpada de tungstênio-halogênio, a: fibras ópticas, b: cela de detecção, D: detector (espectrômetro CCD), MB: solução de azul de metileno, E: etanol; ME: mistura extratora (clorofórmio e acetonitrila), A: amostra, SV: válvula seletora de 8 portas, Descarte: recipiente de descarte

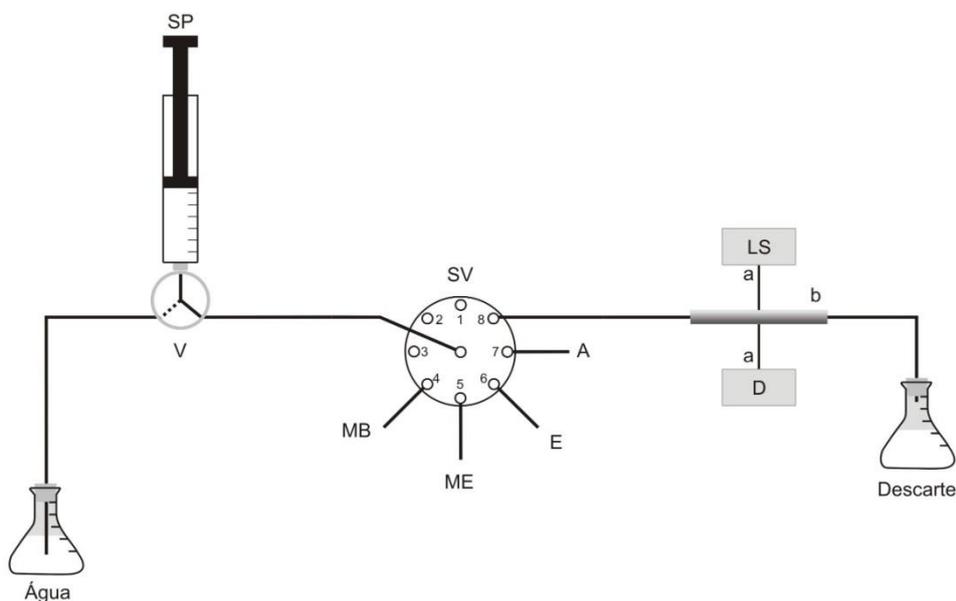


Tabela 4.1- Rotina analítica do sistema *lab-in-syringe* para a determinação de detergentes aniônicos em águas de rios

Etapa	Ação	Porta	Volume ( $\mu\text{L}$ )	Vazão ( $\mu\text{L s}^{-1}$ )
1*	Aspiração da mistura extratora	5	33**	150
2*	Aspiração do MB	4	33**	150
3*	Aspiração da amostra	7	400**	150
4	Tempo de extração (5 s)	—	—	—
5	Dispensa da fase orgânica	8	500	5
6	Detecção espectrofotométrica	—	—	—
7	Dispensa da fase aquosa	8	900	150
8	Limpeza da seringa (etanol)	6	700	150
9	Limpeza da seringa (água)	—	700	150

\* Etapas repetidas 3 vezes; \*\*Volume das alíquotas em cada repetição

As amostras de águas foram coletadas em diferentes rios do Estado de São Paulo (cidades de Piracicaba, Itu, Campinas e distrito de Souzas-Campinas) de acordo com o procedimento recomendado pela APHA [96]. Essas foram filtradas através de membranas de acetato de celulose de  $0,45 \mu\text{m}$ , armazenadas em frascos de vidro sob refrigeração a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  e estabilizadas à temperatura ambiente imediatamente antes das análises.

#### 4.2.4. Procedimento de referência

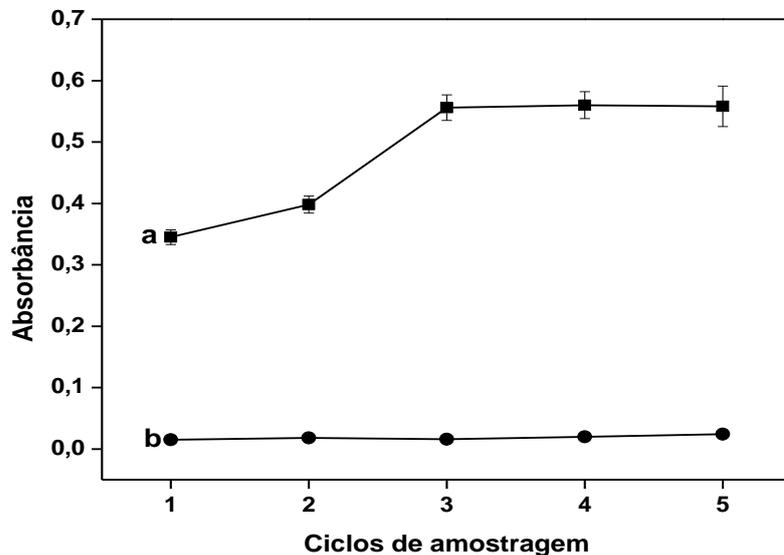
O procedimento de referência para a avaliação de exatidão foi aquele recomendado pela APHA [96] com algumas adaptações. Resumidamente, adicionou-se 8,0 mL de amostra, 3,2 mL de clorofórmio e 2,0 mL de solução de MB ( $0,05 \text{ g L}^{-1}$ ) em tubos de vidro de 15,0 mL. A mistura foi submetida à agitação por vórtex durante 5 min e, posteriormente, centrifugada durante 5 min a 1700 rpm. A fase aquosa foi separada da fase orgânica, que foi lavada com 4,0 mL de solução de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  ( $0,36 \text{ mol L}^{-1}$ ) por agitação manual durante 30 s,



#### 4.3.2. Otimização

O sistema de *lab-in-syringe* (Figura 4.1) foi otimizado pelo método univariado, buscando maiores eficiência de extração e frequência de amostragem, além de melhor precisão. Os valores dos brancos analíticos medidos em todos os experimentos foram sempre maiores a 0,15, devido à solubilidade de MB em clorofórmio [47]. O primeiro parâmetro a ser avaliado foi o número de ciclos de amostragem, ou seja, número de alíquotas das fases aquosa (amostra e reagente) e orgânica (etapas 1 a 3). Nesse experimento, os volumes totais foram mantidos constantes, visando uma melhor comparação entre os resultados. De acordo com a Figura 4.2, verifica-se aumento de 38% na resposta analítica com 3 ciclos de amostragem em comparação a 1 ciclo, indicando aumento na eficiência de extração devido ao aumento da área superficial. Acima de 3 ciclos, não foram observadas diferenças significativas na magnitude do sinal analítico, sendo essa condição adotada para os outros estudos.

Figura 4.2- Efeito do número de ciclos de amostragem sobre os sinais (a) analítico (0,5 mg L<sup>-1</sup> de SDS) e (b) branco. As barras de erro referem-se às estimativas de desvios-padrão (n = 3)



A MELLD tende a melhorar a eficiência de extração, uma vez que o extrator será disperso na amostra aquosa na forma de pequenas gotículas, aumentando assim a área superficial [21]. Apenas o clorofórmio foi avaliado como extrator visando obter resultados comparáveis aos obtidos pelo procedimento de referência [96] para a determinação de detergentes aniônicos, visto que se espera que a partição dos pares iônicos formados com

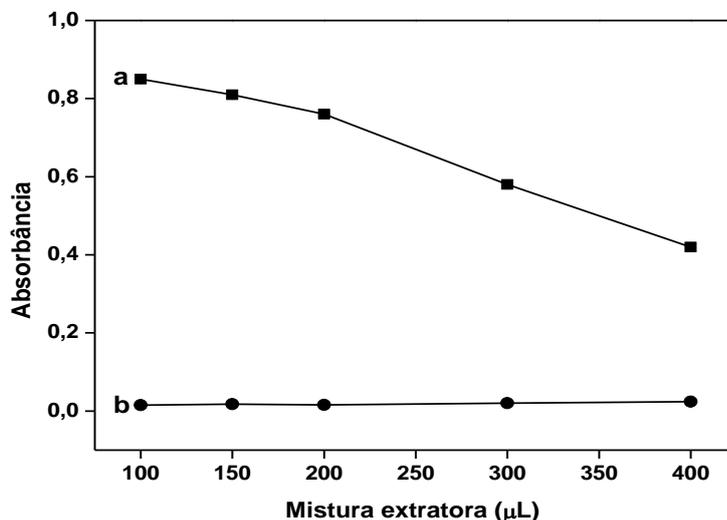
diferentes surfactantes seja distinta em diferentes solventes. Além disso, outros solventes, como o n-hexanol, não podem ser usados devido à alta solubilidade do MB [47] com consequente efeito sobre os valores de branco analítico.

Foram avaliadas duas proporções da mistura extratora, com solventes extrator e dispersor nas proporções 1:4 e 2:3 (v/v), respectivamente, mantendo o volume da mistura em 150  $\mu\text{L}$ . Para as determinações espectrofotométricas, foi necessário um volume superior a 40  $\mu\text{L}$  do solvente extrator, pois com quantidades menores não eram possíveis realizar as determinações. Essa quantidade mínima pode ser ajustada aumentando a proporção de solvente extrator na mistura com o dispersor ou mantendo a mesma proporção e aumentando o volume da mistura extratora. Foi observado que uma melhor eficiência de extração ocorreu com a maior proporção de solvente extrator, com aumento de 40% na magnitude do sinal.

O efeito do volume da mistura extratora foi avaliado para maximizar a eficiência de extração, bem como minimizar a quantidade de solvente orgânico (Figura 4.3). A melhor resposta analítica foi obtida com volume total da mistura extratora de 100  $\mu\text{L}$ . Abaixo de 100  $\mu\text{L}$  da mistura extratora, não foi possível fazer a detecção devido ao baixo volume de solvente extrator. Acima deste volume, de acordo com a Figura 4.3, foi observada diminuição do sinal analítico, devido à diluição do par iônico. Por exemplo, um decréscimo de mais de 50% no sinal analítico foi observado com 400  $\mu\text{L}$  de mistura extratora em relação ao volume de 100  $\mu\text{L}$ .

O solvente dispersor deve ser miscível tanto na fase aquosa, como na fase orgânica e, idealmente, promover a formação de pequenas gotículas do solvente extrator ao ser injetado na fase aquosa [112,113]. Quando se utiliza o clorofórmio como solvente extrator na MELLD, os principais solventes dispersores são a acetonitrila, o metanol, o etanol e a acetona [112,113]. As melhores respostas foram obtidas utilizando acetonitrila e etanol, que geraram fases orgânicas translúcidas. Com acetona, não houve separação de fases (*i.e.* geração de uma fase única contendo água, clorofórmio e acetona), enquanto metanol causou turbidez na fase orgânica (provavelmente devido à dispersão de gotículas de água nesta fase).

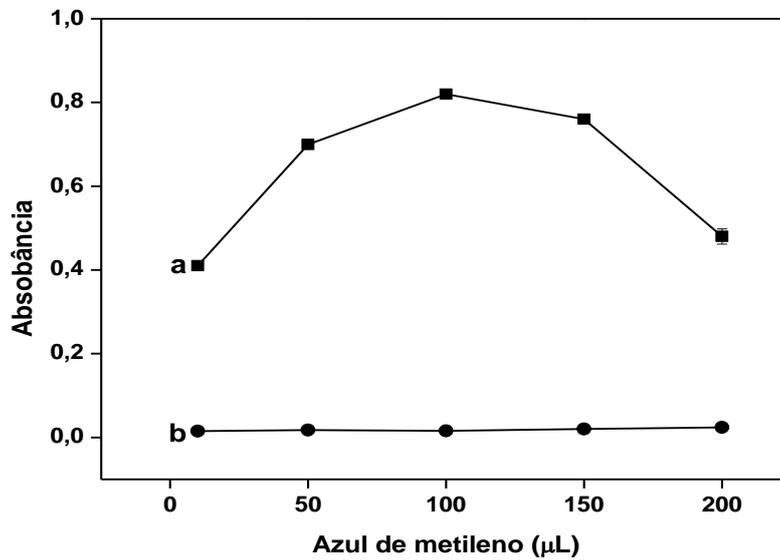
Figura 4.3- Efeito do volume de mistura extratora (clorofórmio+acetonitrila) na proporção de 2:3 (v/v) sobre os sinais (a) analítico (0,5 mg L<sup>-1</sup> de SDS) e (b) branco. As barras de erro referem-se às estimativas de desvios-padrão (n = 3)



De acordo com a literatura após a extração, a mistura clorofórmio-acetonitrila forma um volume de fase orgânica (*i.e.* clorofórmio) maior em relação à mistura clorofórmio-etanol [113]. Isso se deve à solubilização parcial do clorofórmio no meio aquoso contendo etanol. Entretanto, comparando-se as curvas de calibração obtidas com etanol ( $A = 0,18 + 0,89C_{SDS}$  e  $r = 0,997$ ) e acetonitrila ( $A = 0,17 + 1,12 C_{SDS}$  e  $r = 0,998$ ) como dispersores, a acetonitrila propiciou sensibilidade 20% superior em relação ao etanol. Isso se deve provavelmente à formação de menores gotículas de clorofórmio com acetonitrila como dispersor, com conseqüente aumento na área superficial e eficiência de extração. Além disso, tem-se uma maior quantidade de clorofórmio para a extração, devido ao efeito do dispersor sobre a solubilidade, conforme discutido anteriormente. Deve-se também considerar que, com a solubilização do clorofórmio na fase aquosa é pronunciada (mais etanol do que com acetonitrila), a solubilidade do par iônico pode aumentar nesse meio, levando à diminuição do coeficiente de partição e, portanto, da eficiência de extração.

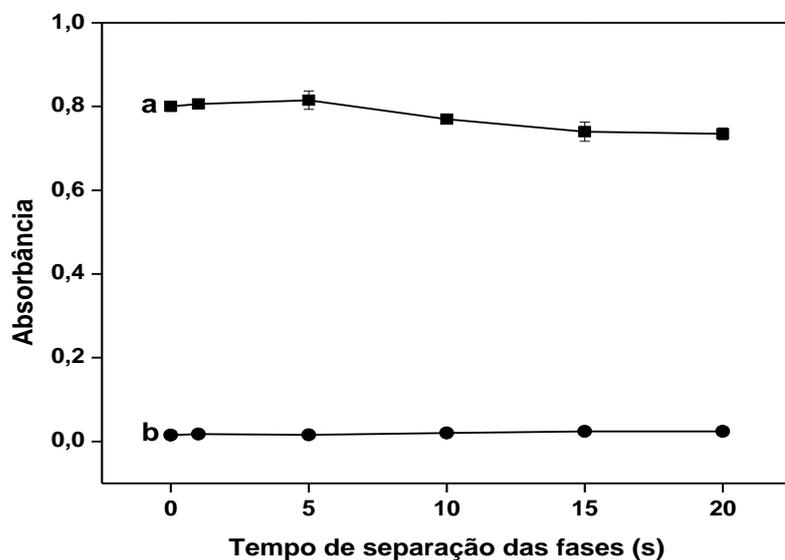
O efeito do volume da solução de MB foi avaliado mantendo-se constantes os volumes totais de amostra em 1200 µL da mistura extratora em 100 µL. De acordo com a Figura 4.4, a melhor resposta foi obtida com o volume de 100 µL da solução do corante catiônico MB. Abaixo desse volume a quantidade de MB não foi suficiente para a formação do par iônico e, acima desse volume, o excesso de reagente pode levar à formação de agregados mais solúveis em meio aquoso, desfavorecendo a extração dos surfactantes para a fase orgânica.

Figura 4.4- Efeito do volume de solução de azul de metileno para a formação do par iônico sobre os sinais (a) analítico ( $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de SDS) e (b) branco. As barras de erro referem-se às estimativas de desvios-padrão ( $n = 3$ )



O tempo para a separação das fases por diferença de densidade foi avaliado, de modo a assegurar que a fase orgânica apresentasse volume suficiente para as determinações espectrofotométricas, pois foi utilizado apenas  $40 \mu\text{L}$  de clorofórmio na mistura extratora. Foi observado que a separação de fases é muito rápida e que, imediatamente após a dispersão da mistura extratora, a maior parte da fase orgânica já se encontrava na parte inferior da seringa. Entretanto, foi estabelecido um tempo de 5 s para garantir que o volume de fase orgânica fosse suficiente para a detecção.

Figura 4.5- Efeito do tempo para a separação das fases orgânica e aquosa por diferença de densidade. Sinais: (a) analítico ( $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de SDS) e (b) branco. As barras de erro referem-se às estimativas de desvios-padrão ( $n = 3$ )



#### 4.3.3. Características analíticas

Após a otimização das variáveis experimentais, foi obtida resposta linear ( $r = 0,998$ ) de  $0,03$  a  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de SDS em água, de acordo com a equação  $A = 0,175 + 1,12 C_{\text{SDS}} (\text{mg L}^{-1})$ . A faixa linear inclui o limite de  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ , estabelecido pelo CONAMA [95] e, assim, o procedimento apresenta sensibilidade adequada para a determinação de detergentes aniônicos em amostras de águas doces.

Os limites de detecção e quantificação foram estimados em  $9,0$  e  $29,0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente, a um nível de 95% de confiança. O coeficiente de variação foi estimado em 2,7% ( $n=10$ ). O procedimento proposto destaca-se pela alta repetibilidade e reprodutibilidade, aspectos bastante desejáveis para análises de rotina. O procedimento proposto consome apenas  $50 \text{ } \mu\text{g}$  de MB,  $40 \text{ } \mu\text{L}$  de clorofórmio e  $60 \text{ } \mu\text{L}$  de acetonitrila por determinação.

A frequência de amostragem foi de 17 determinações por hora e foi gerado  $2,8 \text{ mL}$  de resíduo por determinação. O tratamento do efluente pode ser realizado separando-se a fase aquosa, que pode ser tratada por processos oxidativos avançados [114]. O clorofórmio pode ser purificado por destilação e reutilizado [114]. Foram realizados estudos de adição e recuperação de SDS em amostras de águas de rios. Conforme Tabela 4.2, as recuperações estão entre 91 e 104%, o que indica a ausência de efeitos de matriz.

Tabela 4.2- Recuperações de SDS adicionado em diferentes amostras de água. Os resultados correspondem as determinações em triplicata

Amostra	SDS (mg L <sup>-1</sup> )		Recuperação (%)
	Adicionado	Encontrado	
1	0,05	0,045±0,003	91±7
	0,1	0,099±0,006	99±6
2	0,05	0,046±0,002	92±5
	0,1	0,102±0,004	102±4
3	0,05	0,048±0,003	95±6
	0,1	0,099±0,005	99±5
4	0,05	0,049±0,002	97±5
	0,1	0,104±0,006	104±6
5	0,05	0,048±0,005	95±7
	0,1	0,097±0,006	97±6

As respostas analíticas aos detergentes aniônicos SDBS e SLES foram lineares ( $r=0,996$ ) nos intervalos 0,1-1,5 mg L<sup>-1</sup> e 0,25-3,0 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. Essas faixas de resposta linear também atendem ao limite estabelecido pelo CONAMA (0,5 mg L<sup>-1</sup>) [95]. Entretanto, para estes detergentes aniônicos, a sensibilidade foi 70 % inferior à obtida para SDS, assim como usual em procedimentos para a determinação de surfactantes aniônicos pelo método do MB. Foi realizada uma comparação das respostas analíticas obtidas com um procedimento descrito na literatura para determinação de detergentes aniônicos (Tabela 4.3). Para todos os surfactantes, a sensibilidade foi maior em relação ao procedimento descrito na literatura [109], sendo 67% maior para o SDS, 17% para o SDBS e 43% para o SLES. Entretanto, as diferenças em relação às respostas analíticas para diferentes surfactantes foram mais significativas no procedimento proposto, o que pode ser mais crítico para a aplicação a amostras de águas, utilizando SDS como surfactante modelo (*i.e.* as concentrações dos demais surfactantes seriam subestimadas). O procedimento proposto e o da literatura [109] não responderam ao dodecanoato de sódio (sabão), em concordância com o procedimento de referência [96].

Tabela 4.3- Respostas analíticas do procedimento da literatura [109] e proposto para diferentes detergentes aniônicos

Surfactante aniônico	Faixa linear (mg L <sup>-1</sup> )	R	Equação da reta, C <sub>SDS</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	Referência
SDS	0,05 - 2,00	0,999	$A = 0,266 + 0,365 C_{SDS}$	
SDBS	0,25 - 2,00	0,997	$A = 0,258 + 0,265 C_{SDBS}$	109
SLES	0,50 - 8,00	0,997	$A = 0,254 + 0,107 C_{SLES}$	
SDS	0,03 - 0,50	0,998	$A = 0,175 + 1,119 C_{SDS}$	Este trabalho
SDBS	0,1-1,50	0,996	$A = 0,123 + 0,321 C_{SDBS}$	
SLES	0,25-3,00	0,997	$A = 0,079 + 0,187 C_{SLES}$	

#### 4.3.4. Efeito de espécies concomitantes

O efeito de algumas espécies potencialmente interferentes foi avaliado no procedimento proposto, em concentrações acima das usualmente encontradas em águas de rios (Tabela 4.4). O ácido húmico foi empregado como espécie modelo para matéria orgânica. Outras espécies aniônicas presentes nas amostras podem formar pares iônicos com o corante catiônico (MB), causando interferências positivas [109]. Por outro lado, espécies catiônicas podem causar interferências negativas, pois competem com o corante [47] e, caso haja a extração de pares iônicos, não haverá aumento proporcional de absorbância na fase orgânica. As espécies neutras podem causar interferência espectral (por exemplo, matéria orgânica) no caso da extração para a fase orgânica [109]. As espécies interferentes avaliadas causaram interferências pouco significativas, com variação abaixo de 8%. Em outros procedimentos a seletividade empregando a MELL [109] e MELLD [47] foi semelhante.

Tabela 4.4- Efeito de espécies concomitantes sobre a determinação de detergentes aniônicos aplicando-se o procedimento proposto

Espécie	Concentração (mg L <sup>-1</sup> )	Varição de sinal (%)
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	100	+3
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>		+6
Cl <sup>-</sup>		+7
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>		+8
HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	500	+3
Na <sup>+</sup>		+3
Mg <sup>2+</sup>		+6
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>		-3
K <sup>+</sup>		+5
Ca <sup>2+</sup>		+7
SiO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	250	+5
Fe <sup>3+</sup>		+8
Triton X-100	10	+1
Ácido húmico		+7

#### 4.3.5. Análise de amostras de águas de rios e características analíticas do procedimento

O procedimento proposto foi empregado determinação de surfactantes aniônicos (com resultados expressos como concentração de SDS) em cinco amostras de águas naturais coletadas em diferentes rios (Tabela 4.5). As variâncias dos resultados foram avaliadas pelo teste *F*, sendo concordantes com o procedimento de referência com 95 % de confiança. Por meio de um teste *t* pareado, foi também avaliado que os resultados obtidos pelo procedimento proposto são concordantes com aqueles obtidos com o procedimento de referência em batelada [96] com nível de confiança de 95%.

Tabela 4.5- Valores médios e desvios padrão (n = 3) para a determinação de SDS em águas de rios pelos procedimentos proposto e de referência [96]

Amostra	SDS (mg L <sup>-1</sup> )		
	Proposto	Referência	Fcalculado
1	0,310±0,007	0,29±0,01	0,29
2	0,330±0,005	0,320±0,005	1,00
3	0,31±0,01	0,30±0,01	2,08
4	0,31±0,01	0,310±0,005	6,76
5	0,280±0,007	0,27±0,01	0,60

Valor de F crítico (95% de confiança) = 19,0

As características analíticas do procedimento proposto foram comparadas com aquelas de outros procedimentos para a determinação de surfactantes aniônicos em fluxo (Tabela 4.6). Em alguns procedimentos [106,110,115-117], a faixa linear está acima do limite estabelecido pela legislação brasileira para águas para consumo humano. Os menores LD foram obtidos nos trabalhos [47,107,118] e no procedimento proposto (9,0 µg L<sup>-1</sup>), todos abaixo de 10 µg L<sup>-1</sup>. A maioria dos procedimentos apresentou CV abaixo de 4,0%, indicando que os procedimentos apresentam boa precisão. Em comparação aos procedimentos citados, o procedimento proposto possibilitou redução do volume de clorofórmio em 17,5 [107], 27 [115], 44 [106] e 125 [116] vezes.

Em relação aos outros procedimentos que empregam SIA [47,110], o procedimento proposto consumiu o menor volume de clorofórmio (ca. 7 a 5 vezes menos). No primeiro caso, o volume de 300 µL foi necessário para a separação de fases no interior de uma câmara [110]. No segundo caso, 200 µL foi o menor volume necessário para a leitura espectrofotométrica, pois alíquota do solvente sofre fragmentação no percurso até a cela de detecção[47].

Em relação ao outro procedimento que explora a estratégia *lab-in-syringe* [47], o procedimento proposto apresentou diversas vantagens, como melhora na frequência de amostragem (17 versus 10 determinações por hora), menor consumo de clorofórmio (40 versus 200  $\mu\text{L}$ ) e maior fator de pré-concentração (30 versus 18,5), enquanto os coeficientes de variação foram próximos (2,7 e 3,0%). A necessidade de um aparato adicional para agitação magnética é um inconveniente para análises de rotina e a precisão pode ser afetada caso a agitação não ocorra de forma regular. Esse dispositivo pode também comprometer o esvaziamento da seringa (devido ao volume da barra magnética), além da formação de filme de solvente ou adsorção do MB na superfície do polímero que recobre a barra magnética, aumentando o risco de contaminação. O emprego de 60  $\mu\text{L}$  de solvente dispersor (acetonitrila) e o aumento da vazão na etapa de dispersão mistura extratora substituíram a agitação magnética na dispersão do clorofórmio.

Tabela 4.6- Características analíticas de procedimentos em fluxo para a determinação de surfactantes aniônicos em águas com base no método do azul de metileno

Modalidade	Faixa linear (mg L <sup>-1</sup> )	LD (µg L <sup>-1</sup> )	CV(%)	CHCl <sub>3</sub> (µL)	F.A (h <sup>-1</sup> )	Referência
SIA	0,025–0,3	7,0	3,0	200	10	47
FIA	<360	4000	1,5	1770	80	106
MCFA	0,2–1,7	8,0	5,9	700	40	107
MCFA	0,05–2,0	20	1,5	44	18	109
SIA	1,0-10	500	5,0	300	5,0	110
FIA	<6,0	—	4,6	1080	10	115
FIA Contínuo	< 1,0	14,5	3,8	5000	—	116
FIA	70–700	3500	1,8	—	50	117
FIA–SPE	0,004–0,035	3,0	—	—	2,0	118
FIA reverso	0,03–0,280	15	2,4	50	240	119
FIA	0,02–5,0	—	—	—	—	120
SIA	0,03-0,5	9,0	2,7	40	17	procedimento proposto

FIA: Análises por injeção em fluxo; SIA: Sistema de análises por injeção sequencial; MCFA: Sistema de Análise em Fluxo por Multicomutação; FA: Frequência de amostragem.

#### 4.4. Conclusões

O procedimento proposto permitiu a implementação da MELLD em sistema *lab-in-syringe*, ocorrendo na seringa todas as etapas como a formação do par iônico, dispersão do solvente orgânico, extração do par iônico em clorofórmio e separação de fases. Para a estratégia empregada foram necessários apenas 40  $\mu\text{L}$  de clorofórmio por determinação e isso reduziu significativamente a geração de efluentes. Assim, o procedimento proposto é uma alternativa mais limpa para a determinação de detergentes aniônicos em águas de rios em relação a outros procedimentos em fluxo e, principalmente, aos procedimentos em batelada.

As características analíticas apresentadas no procedimento proposto foram superiores ou comparáveis com as apresentadas por outros procedimentos descritos na literatura. Tais características são adequadas para o monitoramento de detergentes aniônicos em águas doces, pois atendem ao limite estabelecido pela legislação.

## **5- Determinação espectrofluorimétrica de bisfenol A em águas de torneira explorando microextração líquido-líquido com formação de filme de solvente extrator em sistema de análises por injeção sequencial<sup>(2)</sup>**

### **Resumo**

Bisfenol A (BPA) é um poluente emergente que apresenta efeitos estrogênicos em humanos e tem sido encontrado em concentrações relativamente altas ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) em águas de torneira em alguns países, requerendo, assim, procedimentos rápidos e confiáveis para seu monitoramento. Nesta etapa da Tese, microextração líquido-líquido em fluxo foi explorada para a pré-concentração e separação de BPA, visando à determinação com base na fluorescência nativa do analito, que aumenta significativamente em meio orgânico. A extração foi realizada em um sistema de análise por injeção sequencial, através de um filme de solvente extrator (1-octanol) reprodutivelmente formado nas paredes do tubo, seguido da remoção dessa fase por um eluente adequado (etanol). Dessa forma, o fator de enriquecimento foi de 15,5, com apenas 1,5 mL de amostra e 30  $\mu\text{L}$  do solvente extrator. Observou-se resposta linear de 5,0 a 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ , com um limite de detecção de 1,8  $\mu\text{g L}^{-1}$ , frequência de amostragem de 10 determinações por hora e coeficiente de variação de 2,3% ( $n = 10$ ). O procedimento foi aplicado com sucesso em amostras de águas de torneira e os resultados concordaram com os obtidos pelo método cromatográfico de referência com 95% de confiança.

Palavras chave: Análise por injeção sequencial. Bisfenol A. Poluentes emergentes. Águas de torneira. Microextração líquido-líquido.

---

<sup>2</sup> NASCIMENTO, C.F.; ROCHA, F.R.P. Spectrofluorimetric determination of bisphenol A in tap waters by exploiting liquid-liquid microextraction in a sequential injection system. *Microchemical Journal*, Amsterdam, v.137, p. 429–434, 2018.

**Abstract**

Bisphenol A (BPA) is an emerging pollutant with estrogenic effects for humans. Relatively high concentrations ( $\mu\text{g L}^{-1}$  range) of BPA have been found in tap waters in some countries, thus requiring fast and reliable procedures for its monitoring. In this work, flow-based liquid-liquid microextraction was explored for separation and preconcentration of BPA, aiming at the determination based on its native fluorescence, which significantly increases in organic media. Extraction was carried out in a sequential injection analysis system by means of a film of the extractor (1-octanol) reproducibly formed on the tube walls (wetting film approach), followed by removal of this phase by a suitable eluent (ethanol). Enrichment factor of 15.5 was achieved with only 1.5 mL of sample and 30  $\mu\text{L}$  of the extractor solvent. A linear response was observed from 5.0 to 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  with a detection limit of 1.8  $\mu\text{g L}^{-1}$ , sampling rate of 10 extractions per hour and coefficient of variation of 2.3% ( $n = 10$ ). The procedure was successfully applied to tap water samples and the results agreed with those obtained by the HPLC reference method at the 95% confidence level.

**Keywords:** Sequential injection analysis. Bisphenol A. Emerging pollutants. Tap Waters. Liquid-liquid microextraction.

## 5.1. Introdução

A água é essencial à vida, mas pode ser um veículo de contaminação por agentes químicos e biológicos; por isso, a preocupação com a sua qualidade é crescente. O tratamento da água para consumo iniciou-se apenas no século XX e, assim, muitas doenças foram controladas tais como a cólera e a febre tifóide [121]. O tratamento da água para abastecimento envolve diversas etapas, como decantação, filtração, ajuste de pH e fluoretação, que têm como objeto a eliminação da matéria orgânica e dos microorganismos [121]. No entanto, o crescimento populacional e o desenvolvimento industrial nas últimas décadas trouxeram como consequência o comprometimento das águas de abastecimento, devido ao elevado consumo e consequente aumento na geração de esgoto. A falta de tratamento e de planejamento para reintrodução do esgoto tratado no ambiente causa sérios impactos aos afluentes [122].

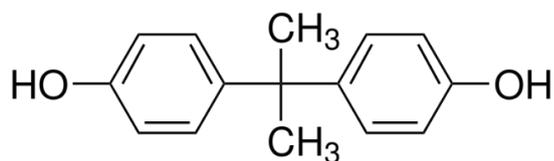
Outro fator preocupante ocasionado pelo crescimento populacional e pelo padrão de consumo da sociedade atual é o aumento do consumo de produtos de limpeza, higiene, cosméticos, alimentos, bebidas e fármacos. A maioria dos produtos farmacêuticos, tais como antibióticos, anticoncepcionais, hormônios e analgésicos são parcialmente metabolizados pelo organismo e eliminados na urina. Outras substâncias são eliminadas e descartadas no ambiente em sua forma original, como a cafeína (principalmente devido ao consumo constante de café, chás e refrigerantes) e bisfenol A (BPA), proveniente de embalagens de alimentos e bebidas. Isso pode causar risco à saúde pública pois, em sua grande maioria, são substâncias sintéticas de difícil degradação. Essas substâncias são denominadas contaminantes emergentes e algumas delas (*e.g.* BPA) atuam como interferentes endócrinos [123].

Os interferentes endócrinos podem produzir efeitos tóxicos mesmo em baixas concentrações, podendo ocasionar danos à saúde humana, animal e aos ecossistemas aquáticos [124]. Essas substâncias apresentam diferentes mecanismos de ação no organismo como, por exemplo, a mimetização de hormônios naturais, o que pode provocar alterações nas funções biológicas do organismo, ocasionando aumento da produção de hormônios ou agir bloqueando-os, por exemplo [125].

O órgão que regulamenta os critérios para potabilidade da água no Brasil é o CONAMA. A Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011 [95], referente ao descarte de efluentes, ainda não dispõe de limites sobre os interferentes endócrinos [126]. Estudos realizados no Brasil em 1999 já indicavam que as águas naturais brasileiras apresentavam maior contaminação por alguns contaminantes emergentes (*e.g.* estrógenos) em relação à Europa [127].

O BPA, cuja estrutura química é mostrada na Figura 5.1, é um polifenol empregado na produção de resinas epóxi e de policarbonatos e sua produção global chega a 4 bilhões de toneladas por ano [128].

Figura 5.1- Estrutura molecular do BPA



As resinas epóxi são usadas no revestimento de enlatados e cubas para armazenamento de vinhos [129]. O policarbonato é o principal constituinte de mamadeiras e garrafas para o armazenamento de água e leite [124,129]. Outras aplicações das resinas epóxi são na produção de policloreto de vinila (PVC), retardantes de chama, preparação de selantes, de poliuretano, de poliamida e de resinas dentárias [130]. Com a RDC nº 41 de 16 de setembro de 2011, a ANVISA proibiu o uso do BPA na fabricação de mamadeiras nacionais e importação de mamadeiras que contenham esse componente [131]. A polimerização incompleta na fabricação das embalagens, bem como o aquecimento dos recipientes, podem ocasionar a lixiviação de BPA para a água e alimentos [132].

O BPA pode causar efeitos adversos à saúde humana, como aumento da incidência de doenças crônico-degenerativas, como as cardiovasculares, diabetes mellitus e anormalidades hepáticas [16]. Também é capaz de alterar as funções imunes, afetar o desenvolvimento, o crescimento e a reprodução de animais [133,134]. Devido às suas propriedades estrogênicas, mesmo em concentrações na ordem de  $\text{ng L}^{-1}$ , o BPA pode provocar o desenvolvimento de câncer de próstata em homens [135]. Estudos mostram que a exposição a altas concentrações de BPA ocasionou danos à reprodução e afetou o desenvolvimento celular em ratos e peixes [136].

O BPA foi encontrado em águas superficiais em concentrações entre 1,1 e 3,6  $\mu\text{L}^{-1}$  [137], em águas de mar (3,5  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) [138] e em águas de torneiras (concentrações entre 6,0 e 30  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) [135]. Em alimentos enlatados, tais como frutas e legumes [139], peixes [140,141], mel [142], leite em pó e refrigerantes [143], BPA foi encontrado em concentrações abaixo de 0,002  $\text{mg kg}^{-1}$  [143], portanto abaixo do limite de 0,6  $\text{mg kg}^{-1}$  estabelecido pelas agências reguladoras europeias [141] e brasileira [130].

Os procedimentos para a determinação do BPA são geralmente baseados em HPLC [137,138,143,144] utilizando detecção por fluorescência ou espectrometria de massas. Esta técnica é adequada para a determinação de BPA na maioria das amostras, pois apresenta limites de detecção da ordem de  $\text{ng L}^{-1}$ . No entanto, apresenta algumas desvantagens, como o alto tempo de separação (*ca.* 15 min) e o alto consumo de solventes utilizados na fase móvel (*e.g.* 12 mL de acetonitrila por determinação) [144].

CG-MS também foi empregada na quantificação de BPA em diversas matrizes, porém é necessária a derivação química, devido à baixa volatilidade do analito [124,145]. Outras técnicas utilizadas para a determinação do BPA exploram ensaios imunoenzimáticos (ELISA) [146,147], quimiluminescência [148], imunoenensaio de fluorescência [149] e imunoenensaio de polarização de fluorescência [150]. Estas técnicas apresentam limite de detecção na ordem de  $\mu\text{g L}^{-1}$  [147] e  $\text{ng L}^{-1}$  [149]. Apesar da alta sensibilidade, estes procedimentos requerem alto tempo de execução (*ca.* 24 h) [149] e apresentam baixa precisão, com CV acima de 12% em alguns procedimentos [146].

O BPA é naturalmente fluorescente, com máximos de excitação em 220 e 275 nm e emissão em 305 nm, porém apresenta baixa intensidade de emissão de fluorescência em meio aquoso [128,135]. A intensidade de fluorescência é significativamente maior em solventes orgânicos, como metanol, etanol e acetonitrila. Por exemplo, a intensidade de fluorescência é aproximadamente 107 e 34 vezes maior em metanol e etanol, em relação àquela observada em meio aquoso, respectivamente [128]. Assim, procedimentos que envolvem ELL tendem a aumentar significativamente a intensidade de fluorescência devido ao efeito conjunto da pré-concentração e extração do analito para o meio orgânico [133,138,144]. Assim a pré-concentração explorando a MELLD e a MELL utilizando o 1-octanol [133,144] e o éter dietílico [138] como solventes extratores foram exploradas para a determinação de BPA.

Os sistemas FIA vêm sendo explorados para a determinação de BPA, especialmente em busca de alternativas mais limpas (*e.g.* com menor consumo de solventes e reagentes), assim como menores tempos de análises e exposição do analista. Neste sentido, um sistema fluxo batelada (SFB) foi desenvolvido para a determinação de BPA em frascos e sacos plásticos e em mamadeiras [151]. Entretanto, este procedimento envolve 21 etapas em sua rotina de execução, e um preparo de amostra muito moroso, incluindo lavagem, agitação e extração assistida por radiação micro-ondas (60 min a 90 °C) para lixiviação do BPA para a fase aquosa. Um procedimento envolvendo sensor de quimiluminescência em FIA foi empregado na determinação de BPA, utilizando polímero de superfície com partículas magnéticas com  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , como elemento de reconhecimento [152]. Esse procedimento apresenta alta sensibilidade e LD de  $0,713 \mu\text{g L}^{-1}$ . No entanto, o procedimento é moroso, envolvendo muitas etapas, como a preparação do  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e revestimento das nanopartículas com ácido oleico.

A formação do complexo de inclusão com  $\beta$ -ciclodextrina também foi explorada em sistema FIA para a determinação de BPA em água de torneira [135]. Essa estratégia aumentou a intensidade de fluorescência em *ca.* de 14 vezes. No entanto, este procedimento exigiu uma etapa adicional para eliminação de alguns interferentes, como  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{CO}_3^{2-}$ , que absorvem radiação próxima ao máximos de excitação e emissão do analito. Outro procedimento empregou o sistema FIA com multicomutação e determinações fluorimétricas diretas, após a retenção da amostra em um suporte sólido, contendo sílica funcionalizada com C18, para a determinação de BPA em leite. Foram necessárias a precipitação de proteínas com TCA, centrifugação e filtração e *clean-up* da fase aquosa por EFS para a remoção de interferentes (*e.g.* gordura) [153].

A MELL em fluxo possibilita a redução do tempo de extração, além de eliminar algumas etapas (como agitação e centrifugação) em relação aos procedimentos em batelada, melhorar a precisão e diminuir a exposição do analista a solventes tóxicos. Nesse sentido, esta meta da Tese teve o objetivo de desenvolver um procedimento analítico simples, rápido e preciso para a determinação de BPA em águas de torneira, explorando a MELL em sistema SIA com detecção espectrofluorimétrica.

## 5.2. Materiais e Métodos

### 5.2.1. Reagentes e soluções

Todas as soluções foram preparadas com reagentes de grau analítico, sem nenhuma purificação prévia. Solução estoque de BPA (Sigma-Aldrich, EUA) foi preparada dissolvendo-

se 0,1 g do reagente em 100 mL de metanol (Merck, Alemanha) e armazenada em frascos de vidro sob refrigeração a 4,0 °C. As soluções de referência (5,0 a 100 µg L<sup>-1</sup>) foram preparadas diariamente por diluições dessa solução em água ultrapura (resistividade > 18,2 MΩ cm a 25,0 °C). Para a MELL, foram investigados como extratores 1-octanol, 1-undecanol e 1-dodecanol (Sigma-Aldrich). Para a remoção do extrato da bobina de extração, foram avaliados acetonitrila, etanol e metanol (Merck). Etanol também foi empregado na etapa de limpeza.

### 5.2.2. Equipamentos

Foi empregado um sistema SIA comercial (FIALab<sup>®</sup> 3500, FIALab<sup>®</sup> Instruments Inc., EUA), equipado com uma válvula seletora de 8 portas e uma bomba tipo seringa com capacidade para 2,5 mL, com a seringa posicionada de forma invertida. Foi utilizado o *software* de controle da válvula e da bomba tipo seringa desenvolvido pelo próprio fabricante. Os tubos de transmissão e a bobina de extração foram constituídos de polietileno com 0,75 mm de diâmetro interno. As determinações foram realizadas com um espectrofluorímetro (Varian, Eclipse), equipado com uma cubeta de fluxo de quartzo com volume de 40 µL. Os comprimentos de onda selecionados foram 217 e 275 nm para excitação e 305 nm para emissão. As fendas de excitação e emissão foram ajustadas para resultar em resolução de 10 e 20 nm, respectivamente.

Para o procedimento de referência, foi utilizando um HPLC (1200 series, Agilent Technologies) com detecção por fluorescência. Foi utilizada uma coluna C18 (Kromasil 100-5C18; 250 mm x 4,6 mm x 5,0 µm), inserida em um forno com temperatura controlada a 27 °C.

### 5.2.3. Procedimento proposto

O sistema SIA (Figura 5.2) foi operado de acordo com a rotina descrita na Tabela 5.1.

Figura 5.2- Diagrama do módulo de análises para a determinação de BPA em águas de torneira. SP: bomba tipo seringa, V: válvula solenoide de 4 vias, EC: bobina de extração de polietileno, MV: válvula rotatória de 8 portas, D: detector (espectrofluorímetro), ES: solvente extrator (1-octanol), A: amostra, E: etanol, W: descarte

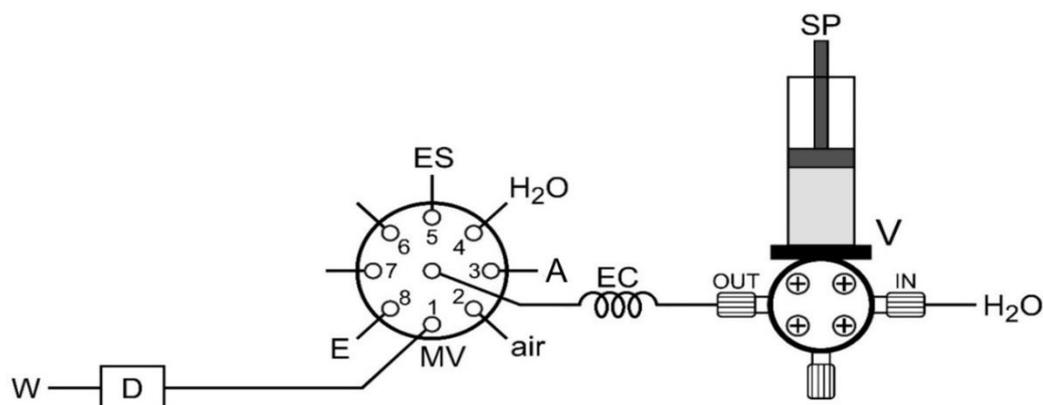


Tabela 5.1- Rotina do sistema SIA para a determinação de BPA em águas de torneira

Etapa	Ação	Porta	Volume ( $\mu\text{L}$ )	Vazão ( $\mu\text{L s}^{-1}$ )
1	Aspiração do extrator	5	30	10
2	Aspiração da amostra	3	1500	10
3	Aspiração do ar	2	350	10
4	Aspiração do eluyente	8	150	10
5	Aspiração do ar	2	100	10
5	Detecção espectrofluorimétrica	1	2130	50
7	Limpeza da bobina e da seringa com etanol	8	500	150
8	Limpeza da bobina e da seringa com água	V-IN	500	150

Primeiramente, foram aspiradas alíquotas do solvente extrator, amostra e ar para a bobina de extração (EC); em seguida, 150  $\mu\text{L}$  de etanol foram aspirados por todo o comprimento da bobina. Nas etapas 1-4, a vazão foi mantida em 10  $\mu\text{L s}^{-1}$ . Após a extração, a fase orgânica foi dispensada para detecção espectrofluorimétrica com uma vazão de 50  $\mu\text{L s}^{-1}$ , sendo a amostra aquosa utilizada como transportador. Após a leitura, foi realizada a limpeza da bobina de extração e da seringa, sequencialmente com etanol e água.

As amostras de águas de torneira foram coletadas em diferentes cidades dos Estados de São Paulo (Piracicaba, Americana e Rio Claro) e de Minas Gerais (Lavras e Lambari) no período de julho e agosto de 2017. As amostras foram filtradas em membranas de acetato celulose com porosidade de 0,45  $\mu\text{m}$  e armazenadas em frascos de vidro sob refrigeração a 4,0  $^{\circ}\text{C}$ . Antes das análises, as amostras foram estabilizadas à temperatura ambiente.

#### 5.2.4. Procedimento de referência

Antes das determinações por HPLC foi necessária a pré-concentração do analito, empregando MELL com o solvente extrator 1-octanol [144]. Volumes de 15 mL de amostra e 100  $\mu\text{L}$  de 1-octanol foram transferidos para um tubo de vidro de 20 mL, a mistura foi agitada por 2 min em vórtex e centrifugada por 1 min a 1700 rpm para separação das fases. Devido à diferença de densidade, após a separação de fases, a fase orgânica permaneceu na parte superior do tubo; assim, uma alíquota de 50  $\mu\text{L}$  foi retirada e diluída em 200  $\mu\text{L}$  de acetonitrila para injeção no HPLC. A fase móvel foi constituída de acetonitrila (80%) e água (20%), a uma vazão de 1,0  $\text{mL min}^{-1}$ . O volume de amostra injetado foi de 30  $\mu\text{L}$  e o BPA apresentou tempo de retenção de aproximadamente 3 min.

### 5.3. Resultados e Discussão

#### 5.3.1. Aspectos gerais

O BPA apresenta solubilidade em água de 0,1 g em 100 mL a 25  $^{\circ}\text{C}$  e dois hidrogênios ionizáveis ( $\text{pK}_{\text{a}1}= 9,8$  e  $\text{pK}_{\text{a}2}= 10,4$ ). Assim, o BPA se apresenta, geralmente, em sua forma neutra em amostras de água [16]. Nas Figuras 5.3 e 5.4, são apresentados os espectros de excitação e emissão de fluorescência de uma solução de BPA 1,0  $\text{mg L}^{-1}$  em meio etanólico.

Figura 5.3- Espectro de excitação de fluorescência da solução de BPA 1,0 mg L<sup>-1</sup> em etanol: máximos de excitação em 217 nm e em 275 nm

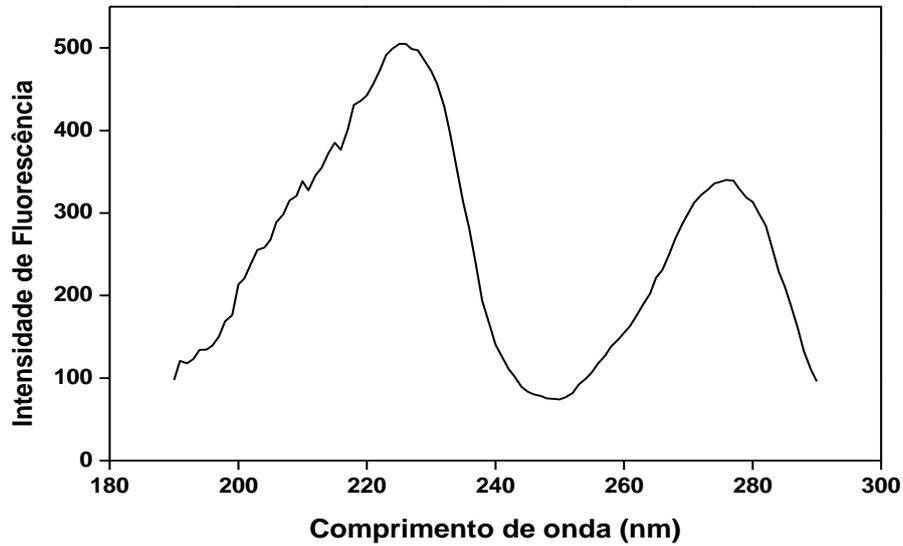
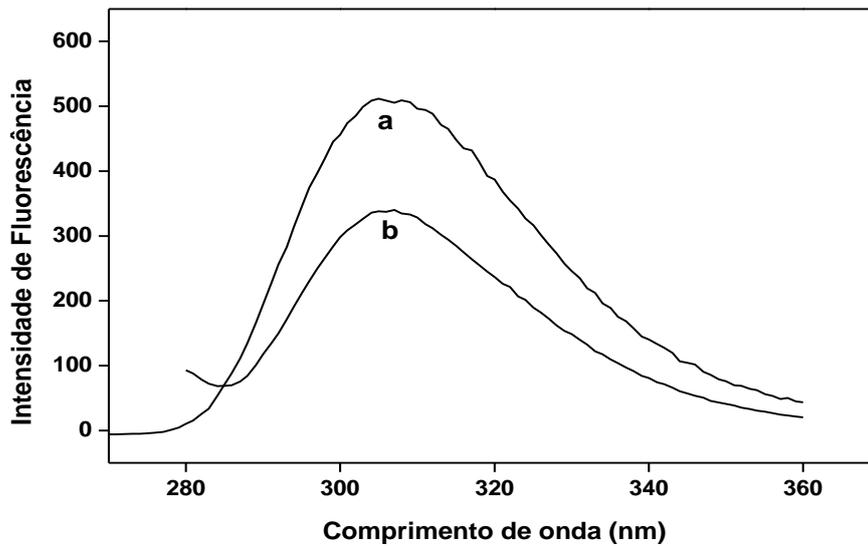


Figura 5.4- Espectros de emissão de fluorescência da solução de BPA 1,0 mg L<sup>-1</sup> em etanol com excitação em 217 nm (a) ou 275 nm (b)

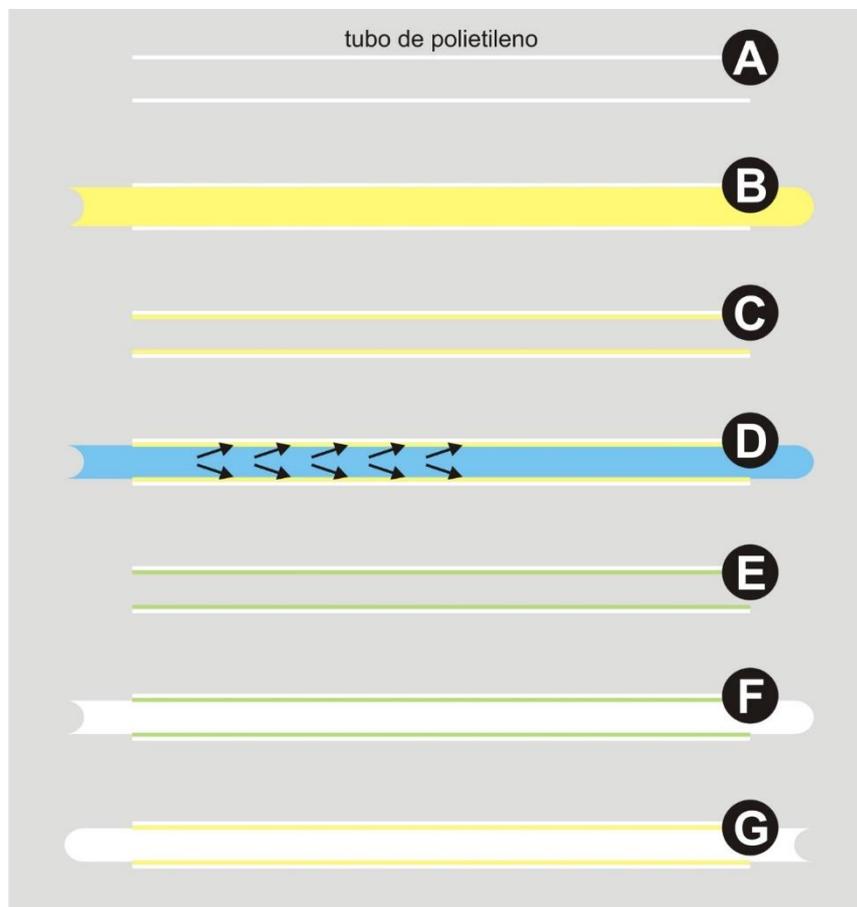


Inicialmente, a proposta do trabalho era a realização da MEGSO em sistema *lab-in-syringe* explorando solventes de baixa temperatura de fusão (*e.g.* 1-undecanol e 1-dodecanol) e uma bobina de extração resfriada para a solidificação do solvente. No entanto, esta estratégia não foi muito promissora, pois, quando se empregava uma bobina de extração com 0,75 mm diâmetro interno, ocorria entupimento, devido à solidificação do solvente, mesmo quando utilizado em pequenas quantidades. Com uma bobina de extração com diâmetro interno maior (1,5 mm), era necessária uma grande quantidade de solvente para remoção do extrator solidificado na parede da bobina de extração. Assim, foram propostas novas estratégias empregando a MELL utilizando solventes extratores, sem a necessidade de solidificação.

A MELL com formação de um filme de solvente orgânico na parede da bobina de extração (em inglês, denominada *wetting film extraction*) é uma estratégia interessante devido ao baixo consumo de solvente orgânico e por não necessitar de segmentador ou separador de fases [9]. Assim, o procedimento de MELL proposto para a determinação de BPA baseou-se na formação de um filme de solvente (1-octanol) na parede de uma bobina de extração polimérica. À medida que amostra era aspirada, o BPA era extraído para o filme de solvente formado na parede da bobina de extração. O extrato foi, então, eluído por um solvente apropriado (etanol) e a alíquota foi diretamente encaminhada para a detecção fluorimétrica. A partição do BPA para o 1-octanol é um processo termodinamicamente favorável, de acordo com o coeficiente de partição octanol-água ( $\log K_{ow}$ ) que se encontra na faixa de 3,3-4,4 [154].

O sistema SIA foi utilizado para aspiração dos solventes e da amostra para extração do BPA na bobina de extração e, também, para a propulsão do extrato para a detecção espectrofluorimétrica. Os processos de formação do filme de extrator, extração e remoção do extrato para a detecção são esquematicamente representados na Figura 5.5.

Figura 5.5- Representação esquemática da ELL por formação do filme de solvente em um tubo polimérico (e.g. polietileno): (A) bobina vazia, (B) aspiração do solvente extrator, (C) formação do filme de solvente extrator, (D) aspiração da amostra e extração do BPA, (E) remoção da amostra com ar, (F) aspiração do eluente e (G) dispensa do extrato para leitura



A etapa A indica a bobina vazia em que ocorre a aspiração do solvente extrator (etapa B), para a formação do filme na parede na bobina (etapa C). A etapa D representa a aspiração da amostra e a extração do analito para o filme do extrator, sendo que o excesso de amostra é armazenado no interior da seringa. Posteriormente, aspira-se ar para transportar a amostra remanescente para dentro da seringa (etapa E). Para a remoção do extrato (*i.e.* filme contendo o analito extraído), foi empregado um eluente (etanol), aspirado por todo o comprimento da bobina extratora. A alíquota de ar aspirada na etapa E evita a diluição do eluente pela amostra. Visando minimizar o volume necessário de solvente e, conseqüentemente, a diluição da amostra, ar foi empregado para transportar o etanol por toda a bobina extratora, cujo volume interno é de 250  $\mu\text{L}$  (etapa F). Posteriormente, o extrato foi dispensado para as determinações espectrofluorimétricas (etapa G).

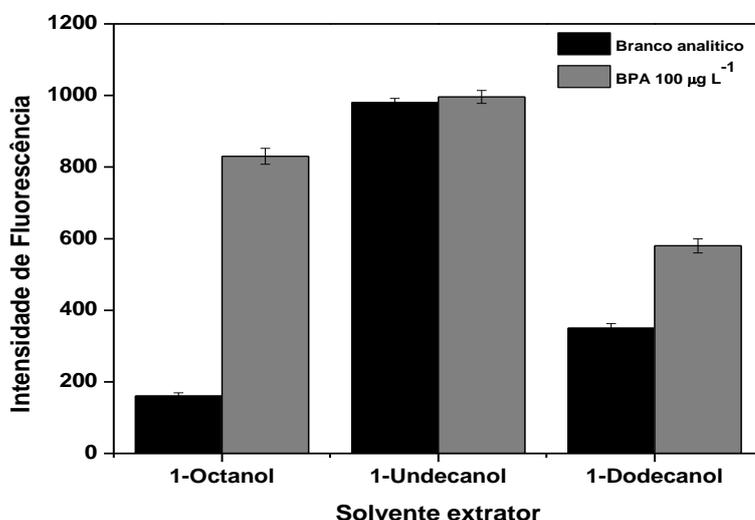
A amostra aquosa foi empregada como transportador e uma alíquota de ar permaneceu entre a amostra e o eluato, minimizando efeitos de dispersão. Após a detecção, foi realizada a limpeza da bobina e da seringa, sequencialmente com etanol e água, para remover resíduos do solvente extrator e de etanol, respectivamente. Os solventes utilizados na extração de BPA e solubilização do extrato, assim como os respectivos volumes e vazões, foram otimizados visando a maior eficiência de extração.

### *5.3.2. Otimização da extração*

#### *5.3.2.1. Seleção dos solventes*

Para ser empregado como extrator, é necessário que o solvente atenda a alguns requisitos, como baixas volatilidade e solubilidade em água e alta eficiência de extração [16,128]. Os solventes orgânicos avaliados como extratores foram álcoois de cadeia longa: 1-octanol, 1-undecanol e 1-dodecanol. A escolha dos solventes 1-dodecanol e 1-undecanol teve relação com o emprego da técnica de MEGSO, conforme discutido anteriormente. Estudos anteriores demonstraram que estes solventes apresentam alta eficiência de extração do BPA [15,16]. Além disso, procedimentos envolvendo MELL em batelada têm utilizado 1-octanol como solvente extrator. Outros solventes, como n-hexano, ciclohexano, diclorometano e 1,2-diclorometano, que geralmente são empregados como extratores, não foram avaliados pois, de acordo com estudos anteriores, apresentam baixa eficiência de extração do BPA [133]. Conforme a Figura 5.6, o 1-octanol apresentou a maior diferença entre a intensidade de fluorescência do BPA e o sinal de branco analítico.

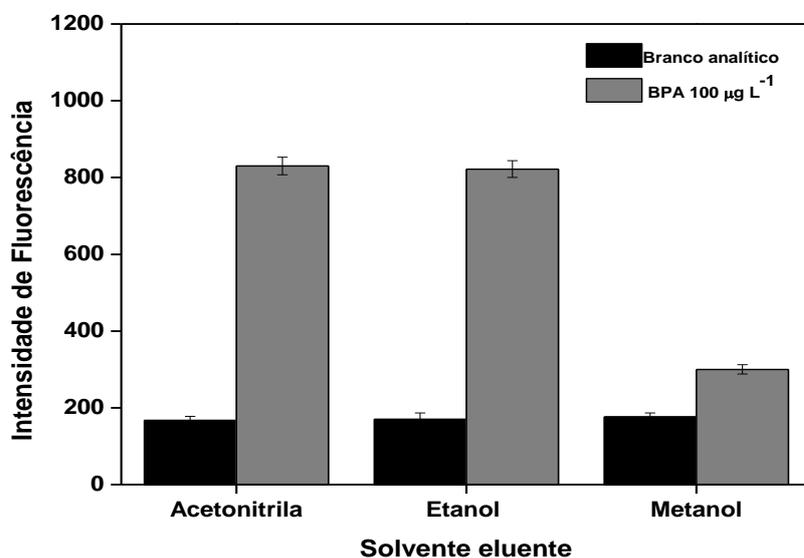
Figura 5.6- Efeito dos solventes extratores empregados na MELL. As barras de erro referem-se às estimativas de desvios-padrão (n = 3)



Os solventes 1-dodecanol e 1-undecanol apresentaram baixa diferença entre a intensidade de fluorescência do BPA e o sinal do branco analítico. O 1-undecanol foi particularmente inadequado devido ao elevado valor de branco analítico, provavelmente causado por contaminação do solvente, já que este foi utilizado sem nenhuma etapa de purificação. Outra vantagem do uso do 1-octanol é a baixa temperatura de fusão (*ca.* -16 °C), enquanto o 1-undecanol e o 1-dodecanol apresentam temperaturas de fusão de 15 e 23 °C, respectivamente [15]. Em dias mais frios, o uso de extratores com baixas temperaturas de fusão exigiria o controle da temperatura do laboratório, bem como da temperatura da amostra. Por exemplo, quando se utilizou o 1-dodecanol como extrator, a solidificação do solvente ocorria no primeiro contato com a amostra. Devido à variação de temperatura ao longo do dia, era necessário o condicionamento das soluções de referência e dos reagentes em banho aquecido, com temperatura acima de 25 °C, para evitar a solidificação do solvente no interior da bobina. A solidificação do extrator ao entrar em contato com a amostra também pode afetar a eficiência de extração do BPA.

O eluente empregado para remover o 1-octanol da parede da bobina de extração deve ser solúvel no solvente extrator e favorecer a emissão de fluorescência do BPA. Os solventes avaliados foram acetonitrila, etanol e metanol. Conforme a Figura 5.7, os solventes que apresentaram as melhores respostas foram o etanol e a acetonitrila; o etanol foi escolhido por ser menos tóxico, de menor custo e apresentar diferença em relação à intensidade de fluorescência com acetonitrila de apenas 2,4%.

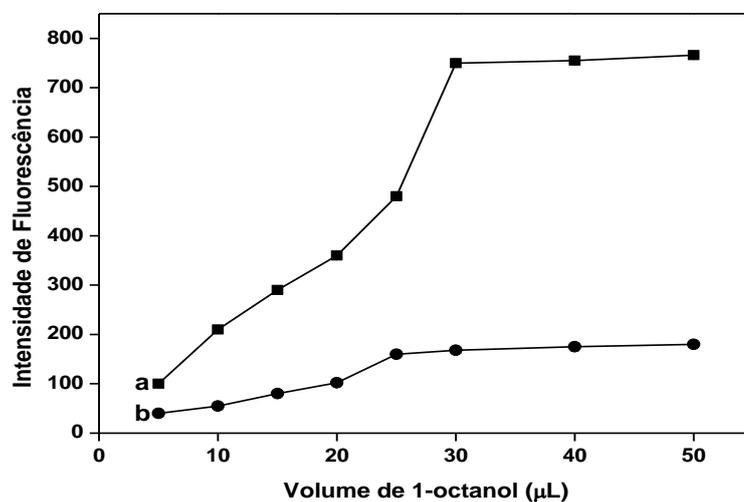
Figura 5.7- Efeito do eluente para a remoção do 1-octanol da bobina de extração. As barras de erro referem-se às estimativas de desvios-padrão (n = 3)



### 5.3.2.2. Efeitos dos volumes e vazões

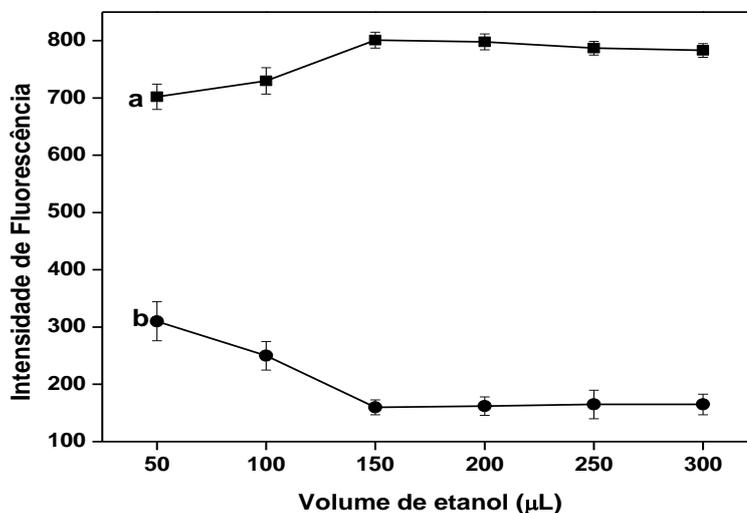
Foram avaliados os efeitos dos volumes e vazão da amostra e reagentes com solução 100 µg L<sup>-1</sup> de BPA. Os volumes do solvente extrator (Figura 5.8) e eluente (Figura 5.9) foram otimizados buscando minimizar o consumo, bem como os valores de branco analítico. De acordo com a Figura 5.8, 30 µL de 1-octanol foi suficiente para a formação do filme na bobina de extração. Volumes inferiores apresentaram baixa eficiência de extração, *e.g.* intensidade de fluorescência 40% menor utilizando 25 µL de 1-octanol; volumes superiores a 30 µL não afetaram significativamente a eficiência de extração.

Figura 5.8- Efeito do volume de solvente extrator para a MELL do BPA sobre os sinais (a) analítico ( $100 \mu\text{g L}^{-1}$  de BPA) e (b) branco. As barras de erro referem-se às estimativas de desvios-padrão ( $n = 3$ ).



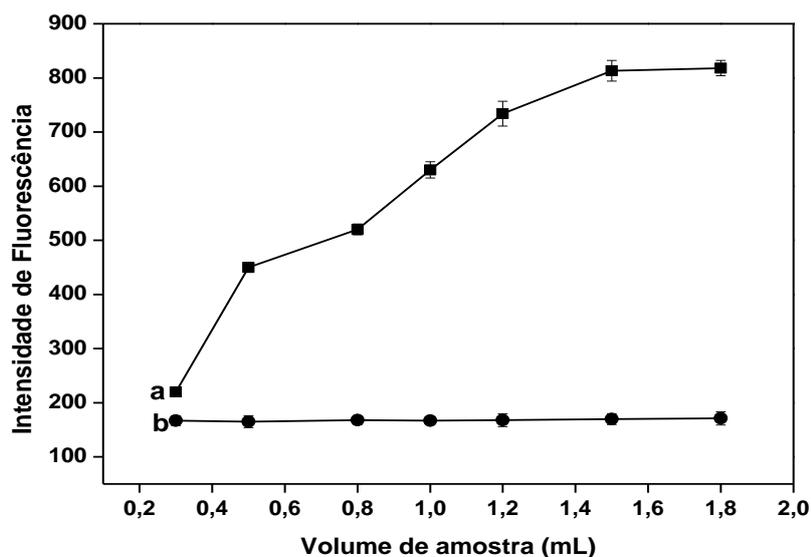
De acordo com a Figura 5.9, o volume de etanol que apresentou melhor resposta foi  $150 \mu\text{L}$ . Volumes superiores não apresentaram diferenças significativas, enquanto em volumes inferiores o sinal do branco analítico foi mais alto, em função do espalhamento de radiação causado pela turvação da fase orgânica, devido ao solvente extrator em maior proporção (Figura 5.9).

Figura 5.9- Efeito do volume de etanol para a remoção do filme contendo BPA da parede da bobina de extração após MELL: (a) sinal analítico ( $100 \mu\text{g L}^{-1}$  de BPA) e (b) branco. As barras de erro referem-se às estimativas de desvios-padrão ( $n = 3$ )



O efeito do volume de amostra (Figura 5.10) foi avaliado visando aumento do sinal analítico. Devido à limitação de volume da seringa (2,5 mL), este parâmetro pôde ser avaliado até 1,8 mL, considerando os volumes de 1-octanol, etanol e de ar necessários para transportar a amostra até a seringa. Conforme esperado, a intensidade de fluorescência aumentou com o volume da amostra. Como a intensidade do sinal de branco analítico permaneceu constante, essa é uma alternativa viável para aumento de sensibilidade. O volume de 1,5 mL de amostra foi escolhido para estudos posteriores, devido à pequena diferença em relação ao maior volume avaliado de 1,8 mL. Além de não utilizar solventes tóxicos, o baixo volume de efluente também caracteriza o procedimento como uma alternativa limpa para a determinação de BPA.

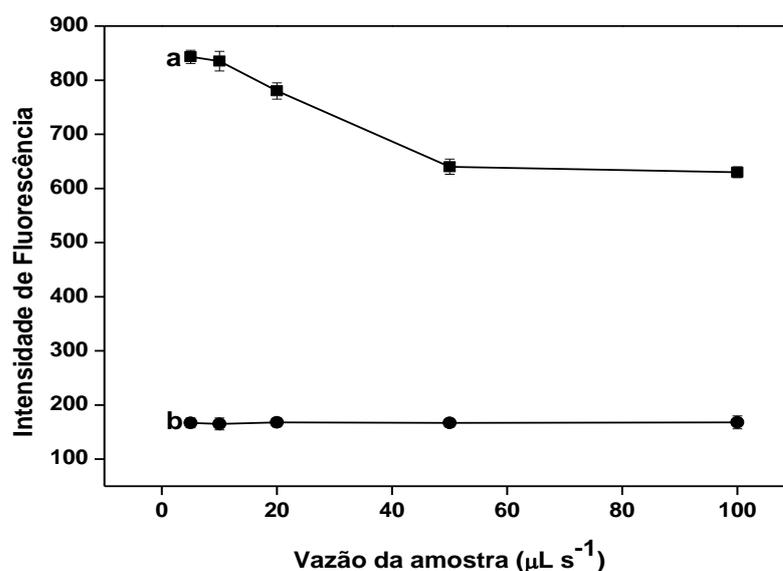
Figura 5.10- Efeito do volume de amostra para MELL de BPA sobre os sinais (a) analítico ( $100 \mu\text{g L}^{-1}$  de BPA) e (b) branco. As barras de erro referem-se às estimativas de desvios-padrão ( $n = 3$ )



A vazão da amostra é importante, pois determina o tempo de contato entre a solução aquosa contendo BPA e o solvente extrator. De acordo com a Figura 5.11, houve uma diminuição na intensidade de fluorescência para vazões superiores a  $10 \mu\text{L s}^{-1}$ . Esse resultado evidencia que o processo de partição é relativamente lento e, portanto, prejudicado pelo menor tempo de contato entre amostra e solvente extrator. Além disso, em vazões superiores (acima de  $10 \mu\text{L s}^{-1}$ ) ocorreu parcial arraste do 1-octanol retido da parede da bobina de extração para o interior da seringa. Este efeito pôde ser observado visualmente pois,

devido à imiscibilidade e diferença de densidade, ocorreu a separação de fases dentro da seringa, com formação de pequenas gotículas na superfície da fase aquosa. A vazão de  $10 \mu\text{L s}^{-1}$  foi então utilizada na aspiração da amostra visando maximizar a resposta analítica. A mesma vazão foi utilizada na aspiração do extrator, ar e etanol, de modo a evitar a segmentação do solvente extrator ou da alíquota de ar e favorecer a dissolução do extrato. Para dispensar o etanol contendo o extrato para leitura, foi necessário o uso de uma vazão maior ( $50 \mu\text{L s}^{-1}$ ), pois a vazão de  $10 \mu\text{L s}^{-1}$  foi insuficiente para a remoção de bolhas de ar do interior da cela de detecção. Para a etapa de limpeza com etanol e água, foi também empregada uma vazão mais alta ( $150 \mu\text{L s}^{-1}$ ), que foi eficiente para a remoção de resíduos do solvente extrator.

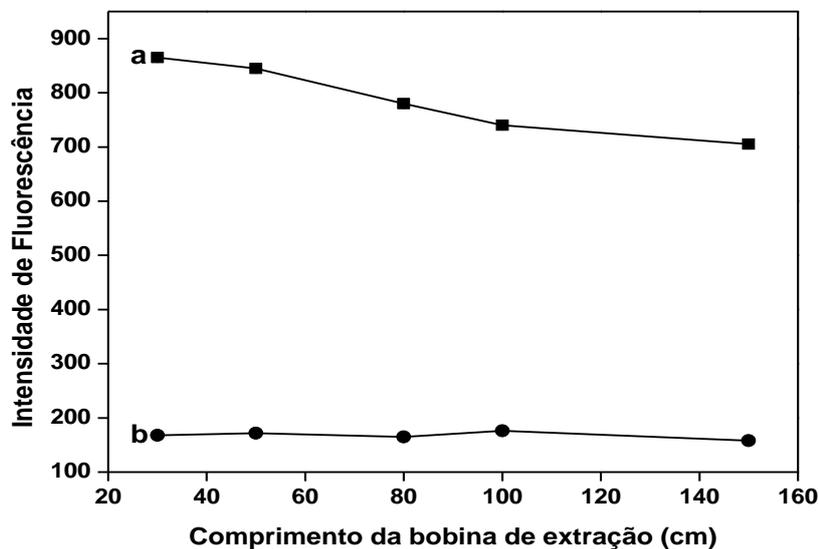
Figura 5.11- Efeito da vazão da amostra na determinação de BPA explorando a MELL. Os sinais (a) analítico ( $100 \mu\text{g L}^{-1}$  de BPA) e (b) branco. As barras de erro referem-se às estimativas de desvios-padrão ( $n = 3$ )



### 5.3.2.3. Bobina de extração

Foram avaliadas bobinas de extração de polietileno e de Teflon<sup>®</sup>, não sendo observadas diferenças significativas entre as intensidades de fluorescência. Assim, foram utilizados tubos de polietileno, devido ao menor custo e maior disponibilidade. O comprimento da bobina foi avaliado entre 30 e 150 cm, conforme Figura 5.12, sendo que o menor comprimento corresponde à distância entre a válvula rotatória e a entrada da seringa.

Figura 5.12- Efeito do comprimento da bobina de reação para a MELL do BPA sobre os sinais (a) analítico ( $100 \mu\text{g L}^{-1}$  de BPA) e (b) branco. As barras de erro referem-se às estimativas de desvios-padrão ( $n = 3$ )



Como o volume de etanol selecionado ( $150 \mu\text{L}$ ) é insuficiente para preencher bobinas acima de 30 cm, foi empregado ar como transportador para assegurar que o etanol percorresse toda extensão da bobina, viabilizando a eluição do extrato da parede de toda a bobina extratora. Os comprimentos de 30 e 50 cm não apresentaram diferenças significativas em relação à intensidade de fluorescência (diferença menor que 4%). O comprimento escolhido foi de 50 cm para evitar que o 1-octanol entrasse dentro da seringa. Bobinas maiores resultaram em queda significativa de sinal, pois o volume de eluente é insuficiente para remover o filme de solvente em toda bobina extratora.

### 5.3.3. Características analíticas

O procedimento proposto para a determinação de BPA em água de torneira apresentou resposta linear de  $5,0$  a  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ , conforme as curvas de calibração descritas na Tabela 5.2. De acordo com os coeficientes angulares, o comprimento de onda de excitação de BPA em 217 nm resultou em sensibilidade *ca.* 2,15 vezes maior em relação ao comprimento de onda de 275 nm. Os LD e LQ, estimados ao nível de confiança 95%, também refletem a maior sensibilidade observada com excitação em 217 nm. Esse aumento de sensibilidade é maior que o esperado considerando os espectros de excitação na Figura 5.3.

Tabela 5.2- Características analíticas estimadas nos dois comprimentos de onda de excitação máxima do BPA

Comprimento de onda de excitação (nm)	Curva de calibração	r	LD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LQ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
217	$F = (-8,834 \pm 0,018) + (6,217 \pm 0,096) C_{\text{BPA}}$	0,998	1,8	5,4
275	$F = (70,360 \pm 3,188) + (2,879 \pm 0,065) C_{\text{BPA}}$	0,997	3,1	9,4

F: Intensidade de Fluorescência;  $C_{\text{BPA}}$ : concentração de BPA ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )

O CV foi estimado em 2,3% para 10 determinações empregando 217 nm como comprimento de onda de excitação. Um fator de enriquecimento de 15,5 foi estimado comparando-se as curvas de analíticas preparadas obtidas em fase orgânica após extração do BPA (Tabela 5.2) e meio aquoso ( $F = 0,0164 + 0,4018 C_{\text{BPA}}$ ), sem extração. Um fator de pré-concentração de 3,6 foi obtido comparando as curvas de calibração em meio etanólico após extração e na ausência de extração ( $y = 16,880 + 1,739 C_{\text{BPA}}$ ). A diferença entre os fatores de enriquecimento e de pré-concentração deve-se ao ganho de sensibilidade propiciado pela transferência do BPA da fase aquosa para o meio orgânico. A partir do fator de pré-concentração e da razão volumétrica entre amostra e eluato ( $1,5/0,18 = 8,3$ ), estima-se que 43% do BPA foi extraído da amostra para 1-octanol.

No procedimento proposto, foi obtida uma frequência de amostragem de 10 determinações por hora e a geração de resíduos foi de 2,7 mL por determinação. O consumo de solventes orgânicos foi de apenas 30  $\mu\text{L}$  de 1-octanol e 650  $\mu\text{L}$  de etanol por determinação, já considerando a etapa de limpeza. Mesmo com a geração de efluentes em baixas quantidades, as fases aquosa e orgânica podem ser tratadas por processos oxidativos avançados [114].

Um estudo de adição e recuperação foi realizado para avaliar a ocorrência de efeitos de matriz. As recuperações para BPA em águas de torneira situaram-se na faixa de 96 e 112%, com adição de 25 ou 50  $\mu\text{g L}^{-1}$  de BPA, conforme Tabela 5.3. Esses resultados indicam a ausência de efeitos de matriz.

Tabela 5.3- Estudo de adição e recuperação em diferentes amostras de água de torneira (n=3)

Amostra	BPA ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )		Recuperação (%)
	Adicionada	Encontrado	
1	25,0	24,8	99 $\pm$ 3
	50,0	53,0	106 $\pm$ 5
2	25,0	26,3	105 $\pm$ 2
	50,0	54,0	108 $\pm$ 4
3	25,0	24,5	98 $\pm$ 3
	50,0	48,0	96 $\pm$ 2
4	25,0	27,0	108 $\pm$ 3
	50,0	56,0	112 $\pm$ 1
5	25,0	24,3	97 $\pm$ 5
	50,0	50,5	101 $\pm$ 4

#### 5.3.4. Avaliação de seletividade na determinação de BPA em águas de torneira

O efeito de espécies potencialmente interferentes foi avaliado no procedimento proposto, em valores acima dos encontrados em águas da torneira (Tabela 5.4).

Tabela 5.4- Efeito de espécies potencialmente interferentes na determinação de BPA em água de torneira com excitação em 217 nm

Espécie	Concentração (mg L <sup>-1</sup> )	Interferência (%)
Na <sup>+</sup>		+6
Mg <sup>2+</sup>		+4
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>		-2
K <sup>+</sup>	100	+1
Ca <sup>2+</sup>		+4
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>		+7
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>		+8
CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>		+7
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	10	+8
Fe <sup>3+</sup>		+8
Cl <sup>-</sup>		+5

Além das espécies citadas, o ácido húmico foi utilizado como espécie modelo de carbono orgânico e não causou interferência até a concentração de 0,5 mg L<sup>-1</sup>. As outras espécies avaliadas não causaram interferências significativas, com variação de sinal analítico inferior a 8%, empregando a excitação no comprimento de onda de 217 nm. Considerando os estudos realizados com excitação em 275 nm, apenas o Fe<sup>3+</sup> causou interferência, porém em concentrações acima de 10 mg L<sup>-1</sup>; as demais substâncias não apresentaram interferência em concentrações de até 100 mg L<sup>-1</sup>. Houve menor interferência quando foi empregada excitação em 275 nm, o que era esperado pela menor absorção de radiação por espécies interferentes nesse comprimento de onda [128].

Outros fenóis, como nonifenol e octifenol, causaram interferência em concentrações acima de 10 µg L<sup>-1</sup>, considerando comprimento de onda de excitação em 217 nm e de 50 µg L<sup>-1</sup> considerando excitação em 275 nm. Esta interferência é devida aos comprimentos de excitação e emissão dos fenóis (nonifenol e octifenol) situarem-se próximos aos do BPA, *i.e.*, na faixa 218 e 277 nm (excitação) e 300 nm (emissão) [163]. Interferências foram também observadas em procedimentos fluorimétricos para a determinação de BPA [135] sendo os limites toleráveis 80 e 100 µg L<sup>-1</sup> para o octilfenol e nonilfenol, respectivamente. Esses

inferiores no procedimento proposto devido a estas espécies serem extraídas e concentradas na extração com 1-octanol. A determinação conjunta das 3 espécies por LC–MS/MS foi também proposta [155].

### 5.3.5. Aplicações analíticas

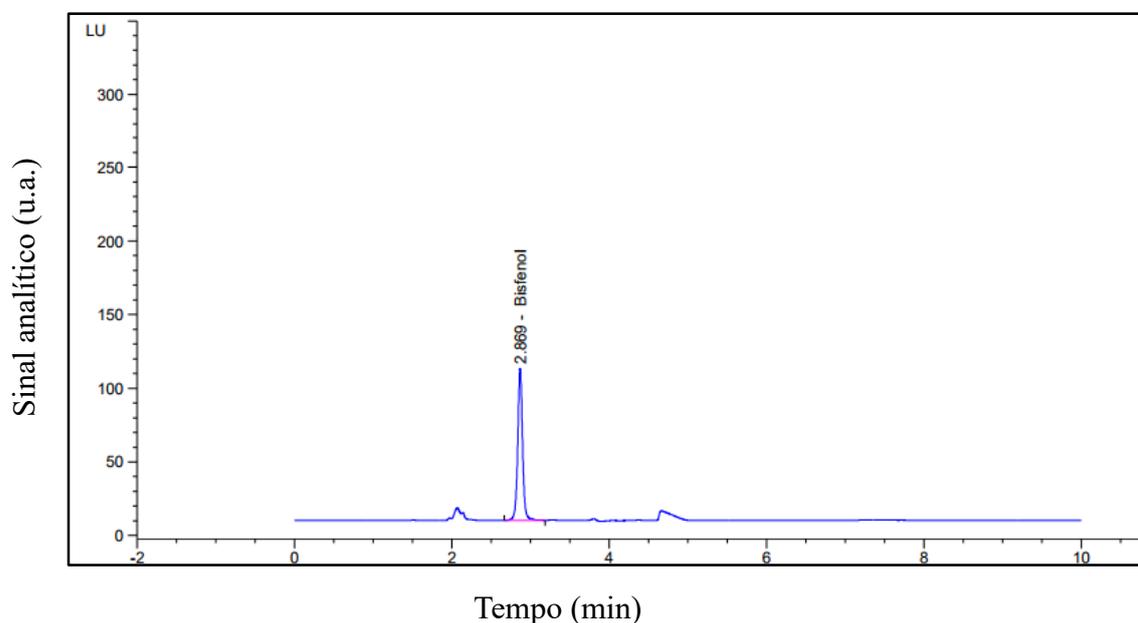
Foram analisadas diferentes amostras coletadas em cidades dos Estados de Minas Gerais e São Paulo. Os resultados obtidos pelos procedimentos proposto e de referência são apresentados na Tabela 5.5. Um cromatograma ilustrativo dos resultados obtidos pelo procedimento de referência (HPLC com detecção fluorimétrica) [144] é apresentado na Figura 5.13. As variâncias dos resultados foram avaliadas pelo teste *F*, sendo os resultados concordantes com o procedimento de referência a 95 % de confiança. Por meio de um teste *t* pareado, foi também avaliado em que os resultados obtidos pelo procedimento proposto são concordantes com aqueles obtidos com o procedimento de referência [144] com nível de confiança de 95%.

Tabela 5.5- Concentrações de BPA em amostras de águas de torneira determinadas pelos procedimentos proposto e de referência (HPLC) [144]

Amostra	BPA ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )		
	Proposto	Referência	Fcalculado
1	$8,7 \pm 0,5$	$7,9 \pm 0,2$	6,25
2	$6,7 \pm 0,2$	$7,1 \pm 0,2$	1,0
3	$7,3 \pm 0,2$	$6,5 \pm 0,3$	0,4
4	$13,4 \pm 0,3$	$12,4 \pm 0,3$	1,0
5	$8,2 \pm 0,4$	$7,3 \pm 0,2$	4,0

Valor de F crítico (95% de confiança) = 19,0

Figura 5.13- Cromatograma do BPA na fase orgânica após MELL com 1-octanol empregando a fase móvel acetonitrila e água (80:20 v/v) e detecção por fluorescência



As concentrações encontradas nas amostras foram de até  $13,4 \mu\text{g L}^{-1}$ . As amostras que apresentaram as maiores concentrações de BPA foram coletadas no Estado de São Paulo, que é considerado o maior polo industrial do Brasil. Por outro lado, as amostras que apresentaram as menores concentrações de BPA foram coletadas no interior de Minas Gerais onde não há tantas indústrias; porém, o tratamento de esgoto é quase inexistente.

As amostras foram coletadas nos meses de julho e agosto, que é um período de estiagem nas regiões em que as amostras foram coletadas, contribuindo para a acumulação do BPA em águas de rios [156]. Esse contaminante ocorre em águas de torneira por meio da ineficiência do tratamento convencional das águas para abastecimento, que elimina apenas 8% do BPA [123].

Em estudos realizados no Brasil, em amostras de águas de torneira foram encontradas concentrações de até  $30 \mu\text{g L}^{-1}$  de BPA [135]. A maior parte dos estudos com águas de rios é referente ao Estado de São Paulo, em que foram encontradas concentrações de BPA na ordem de  $0,005$  a  $1,760 \mu\text{g L}^{-1}$  [156],  $0,025$  a  $0,085 \mu\text{g L}^{-1}$  [157],  $0,119$  a  $11,7 \mu\text{g L}^{-1}$  [158] e  $5,6$  a  $295 \mu\text{g L}^{-1}$  [159]. No Estado do Maranhão, as concentrações de BPA encontradas foram da ordem de  $1,11$  e  $3,61 \mu\text{g L}^{-1}$  em água superficial e de abastecimento, respectivamente [137].

Em amostras de água mineral, foi encontrado BPA na concentração de  $0,46 \mu\text{g L}^{-1}$ . A contaminação de águas minerais é, possivelmente, proveniente da migração do BPA de garrafas de polietileno [124]. Em estudos realizados na Espanha, foram encontradas concentrações de BPA na ordem de  $3,5 \mu\text{g L}^{-1}$  em águas de mar [138] e na Alemanha (*ca.*  $21 \mu\text{g L}^{-1}$ ) em água de rios, porém a região onde as amostras foram coletadas se localizava próxima a uma estação de tratamento de esgoto (ETE) [160].

As discrepâncias em relação às concentrações de BPA em água da torneira de diferentes países [135,148] são provavelmente decorrentes do tipo de tratamento de água e esgoto, porque o BPA não é removido pelos tratamentos convencionais [161,162]. Também devem ser considerados o controle com relação ao uso de polímeros contendo BPA em embalagens de alimentos e bebidas e o tipo de tubulação utilizada no transporte de águas de abastecimento

#### 5.3.6. Comparação com outros procedimentos analíticos

Outros procedimentos para a determinação de BPA, mostrados na Tabela 5.6, empregam ELL e EFS para pré-concentração. Os procedimentos baseados em técnicas de separação cromatográfica, como HPLC [137,138,143,144] e GC-MS [124,145] e cromatografia líquida com ionização por *electrospray* e detecção por espectrometria de massas sequencial (LC-ESI-MS/MS) [133] apresentam alta sensibilidade para a determinação do BPA, da ordem de  $\text{ng L}^{-1}$  e  $\text{ng g}^{-1}$ . No entanto, como as extrações foram realizadas em batelada, a precisão das determinações foi variável, apresentando CV de até 14 %, enquanto no procedimento proposto foi de 2,3%.

O volume de solvente extrator do procedimento proposto (*ca.*  $30 \mu\text{L}$  de 1-octanol) é menor em relação aos procedimentos anteriormente descritos – por exemplo:  $90 \mu\text{L}$  de 1-undecanol [16],  $50$  e  $100 \mu\text{L}$  de 1-octanol [133,144] e  $2,5 \text{ mL}$  de éter dietílico [138]. O procedimento que emprega eletroforese capilar em amostras de urina [16] apresentou maior limite de detecção,  $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$ . Já os demais procedimentos que envolvem fluorescência [128] e HPLC [137,138,144] são mais sensíveis, com limites de detecção abaixo de  $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Para a remoção de 1-octanol na parede da bobina de extração, utilizou-se apenas  $150 \mu\text{L}$  de etanol. Em outros procedimentos foram utilizados volumes maiores, tais como:  $1,5 \text{ mL}$  de acetona para solubilizar a gota solidificada para posterior determinação [15] e  $1,0 \text{ mL}$  de acetonitrila para solubilização de 1-octanol [144] em MELL.

Além da maior geração de resíduos, o maior volume de solvente implica na diluição da espécie extraída. Para a EFS utilizam-se os cartuchos C18 que não podem ser reutilizados, elevando o custo por análise e a geração de resíduos.

Quando comparados aos procedimentos em fluxo, como o proposto neste trabalho, os procedimentos que empregam a técnica de HPLC consomem elevadas quantidades de solvente como fase móvel (*ca.* 15 mL de acetonitrila) e apresentam longo tempo de análise, em torno de 15 min para cada determinação [144]. Por exemplo, no procedimento de referência [144], ao fim de cada determinação, foram gerados *ca.* 35 mL de resíduo, considerando as etapas de extração e determinação de BPA. Em outros procedimentos para a determinação de BPA foram necessários 20 mL de água de rio [144] ou 30 mL de água do mar [133]. Estes valores geram grande quantidade de resíduos ao final de cada determinação (*e.g.* 45 mL por determinação) [133], sendo necessário um planejamento e a destinação correta dos mesmos. Todo o resíduo gerado neste trabalho foi armazenado em frascos devidamente identificados e encaminhado para o Laboratório de Tratamento de Resíduos Químicos do CENA, onde receberam os devidos tratamentos.

Tabela 5.6- Comparação com outros métodos para a determinação de BPA empregando ELL e EFS

Amostra	Técnica	LD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	CV (%)	Estratégias e solvente	Volume de solvente ( $\mu\text{L}$ )	Referências
Água de torneira	Fluorescência	1,8	2,3	MELL em SIA e 1-octanol	30	Este trabalho
Água e urina	Eletroforese capilar	0,8* e 2,5**	$\leq 1,9$	MELLD e 1-undecanol	90	16
Água de rio e mar	Fluorescência	0,07	-	MELL e éter dietílico	2500	128
Água do mar	LC-ESI-MS/MS	-	$< 10$	MELLD e 1-octanol	100	133
Água	HPLC-Fluorescência	0,46	12,8	EFS e acetonitrila	-	137
Água do mar	HPLC-UV	1,6	$< 14$	MELLD e decano	2,5	138
Alimentos	HPLC-FL	0,0021***	9,6	EFS, MELLD e MEGSO		143
Água	HPLC-FL	0,02	2,4	MELL e 1-octanol	50	144
Água	CG-MS	0,02	12	Microextração em tubo de polietersulfona	-	145

\* amostra de água ; \*\* amostra de urina; \*\*\* LD em  $\text{ng L}^{-1}$  HPLC-FL- Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência

#### 5.4. Conclusões

O procedimento proposto mostrou-se adequado para a determinação de BPA em águas de torneira, com alta precisão e baixo consumo de solventes orgânicos, tanto para extração quanto para remoção de BPA da parede da bobina de extração. O uso do sistema SIA conferiu características como módulo de análises compacto, robustez, versatilidade e baixa geração de resíduos.

A MELL por formação de filme de solvente na bobina de extração evitou o contato do solvente extrator com a seringa, reduzindo o volume de solvente para limpeza. A automação do MELL melhorou a precisão e o sistema fechado reduziu os riscos de contaminação de amostras e reagentes, assim como a exposição do analista.

O uso de 1-octanol apresentou as melhores respostas para a MELL em relação aos outros solventes, como 1-undecanol e 1-dodecanol. Outra vantagem do seu emprego é a não solidificação do 1-octanol em dias frios.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesta Tese, foram desenvolvidos três procedimentos analíticos explorando a MELL para as determinações de formaldeído em leite, detergentes aniônicos em águas de rios e BPA em águas de torneira. O primeiro e o segundo procedimentos empregaram uma variante da MELL, a MELLD em fluxo, que necessita de um solvente extrator e um solvente dispersor. O emprego dessa mistura promove a dispersão do solvente extrator em pequenas gotículas por toda a amostra, aumentando, assim, a área superficial e a eficiência de extração. Ambos procedimentos foram implementados em sistema fluxo-batelada, demonstrando o potencial destes sistemas para a implementar a MELL. O terceiro procedimento empregou a MELL com extração em filme de solvente orgânico em fluxo.

Para a determinação do formaldeído em leite, foi necessário o pré-tratamento da amostra com TCA para a precipitação das proteínas, agitação e centrifugação para a separação de fases aquosa e orgânica. A reação de derivação química do formaldeído e a MELLD ocorreram dentro da câmara de mistura e reação do sistema fluxo-batelada. Foi pioneiramente explorado neste procedimento o fluxo pulsado promovido pelas microbombas solenoide, para favorecer a dispersão da mistura extratora. A reação de derivação química empregou os reagentes acetilacetona em meio de acetato de amônio, reação seletiva para o formaldeído, formando um complexo de coloração amarela. Para a MELLD empregou o LI cloridrato de tri-hexil-tetradecil-fosfônio como extrator e metanol como solvente dispersor. Após a extração, a fase orgânica contendo o formaldeído permaneceu na parte superior e gorduras do leite na parte inferior do extrato. Com esse tipo de sistema as determinações podiam ser realizadas na própria câmara. O procedimento proposto não apresentou diferenças significativas em relação ao procedimento de referência, também não apresentou efeito de matriz de acordo com os valores das recuperações que foram de 91 a 106%. Esse procedimento apresentou boa precisão CV (3,1%, n=10), uma frequência de amostragem de 10 determinações por hora, consumiu baixa quantidade de LI (136 µL) e de solvente dispersor (364 µL) por determinação, com isso gerando baixa quantidade de resíduos (6,7 mL por determinação).

No segundo procedimento, foi empregado a MELLD em sistema *lab-in-syringe* para a determinação de detergentes aniônicos em águas de rios. Foi explorada a formação do par iônico entre o detergente aniônico (SDS) como modelo e um corante catiônico (MB), a extração do par iônico é favorecida em meio orgânico e clorofórmio foi empregado como solvente extrator. Para aumentar a partição do analito para fase orgânica foi empregado um solvente

dispersos (acetoneitrila). Todos os processos de (formação do par iônico, extração para a fase orgânica e separação de fases) ocorreram dentro da seringa. O procedimento proposto não apresentou diferenças significativas em relação ao procedimento de referência. Neste procedimento foi possível diminuir em 5 vezes o volume de clorofórmio (40  $\mu\text{L}$ ) em relação a outros procedimentos citados na literatura [47]. O procedimento apresentou também alta frequência de amostragem (17 determinações por hora), baixo CV (2,7% n=10) e baixa geração de resíduos (2,8 mL por determinação).

O último procedimento empregou a MELL em SIA com a formação de um filme de solvente orgânico em uma bobina de reação para a determinação de BPA em águas de torneira. O 1-octanol foi empregado como solvente de extrator devido à afinidade com o material da bobina, à medida em que era aspirado, o solvente formava um filme nas paredes da bobina. A extração ocorreu de forma radial e para remoção do filme foi empregado um solvente eluente (etanol). Após o eluente remover todo o filme contendo o eluato, ocorria a dispensa para as determinações espectrofluorimétricas. Não foi necessário o emprego de outro solvente como carregador, pois se empregou a própria amostra para esse fim. Foram consumidos *ca.* 30  $\mu\text{L}$  de 1-octanol e 150  $\mu\text{L}$  de etanol, a frequência de amostragem foi de 10 determinações por hora e o consumo de resíduos foi de 2,7 mL por determinação. O procedimento proposto também não apresentou diferenças significativas em relação ao procedimento de referência.

Os três procedimentos desenvolvidos atenderam ao objetivo principal desta Tese, pois foram rápidos, reprodutíveis e ambientalmente amigáveis, devido ao baixo consumo de solventes e reagentes e pela baixa geração de resíduos.

**REFERÊNCIAS**

1. SILVESTRE, C.I.C.; SANTOS, J.L.M.; LIMA, J.L.F.C.; ZAGATTO, E.A.G. Liquid–liquid extraction in flow analysis: A critical review. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 652, p. 54–65, 2009.
2. YANA, H.; WANGA, H. Recent development and applications of dispersive liquid–liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1295, p. 1-15, 2013.
3. QUEIROZ, S.C.N.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, p. 68-76, 2001.
4. BARRIONUEVO, W.R.; LANÇAS, F.M. Extração em fase sólida (SPE) e micro extração em fase sólida (SPME) de piretróides em água. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, p. 172-175, 2001.
5. OLIVEIRA, A.R.M.; MAGALHÃES, I.R.S.; SANTANA, F.J.M.; BONATO, P.S. Microextração em fase líquida (LPME): fundamentos da técnica e aplicações na análise de fármacos em fluidos biológicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, p. 637-644, 2008.
6. ZANJANIA, M.R.K.; YAMINIA, Y.; SHARIATIA, S.; JÖNSSON, J.Å. A new liquid-phase microextraction method based on solidification of floating organic drop. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 585, p. 286-293, 2007.
7. GHAMBARIAN, M.; YAMINI, Y.; ESRAFILI, A. Liquid-phase microextraction based on solidified floating drops of organic solvents. **Microchimica Acta**, Wien, v. 180, p. 519-535, 2013.
8. ALEXOVIČ, M.; HORSTKOTTE, B.; ŠRÁMKOVÁ, I.; SOLICH, P.; SABO, J. Automation of dispersive liquid-liquid microextraction and related techniques. Approaches based on flow, batch, flow-batch and in-syringe modes. **Trends in Analytical Chemistry**, Oxon, v. 86, p. 39-55, 2017.
9. LUO, Y.; AL-OTHMAN, R.; RUZICKA, J.; CHRISTIAN, G.D. Solvent extract ion-sequential injection without segmentation and phase separation based on the wetting film formed on a Teflon tube wall. **Analyst**, London, v. 121, p. 601-606, 1996.
10. MERIB, J.; CARASEK, E. Microextração em fase líquida suportada com fibra oca (HFLPME): Fundamentos e aplicações recentes. **Scientia Chromatographica**, São Carlos, v. 5, p. 249-262, 2013.
11. RAMOS-PAYANA, M.; MASPOCH, S.; LLOBERA, A. A simple and fast double-flow microfluidic device based liquid-phase microextraction (DF- $\mu$ LPME) for the determination of parabens in water samples. **Talanta**, Amsterdam, v. 165, p. 496–501, 2017.
12. SRICHAROEN, P.; LIMCHOOWONG, N.; TECHAWONGSTIEN, S.; CHANTHAI, S. New approach applying a pet fish air pump in liquid-phase microextraction for the determination of Sudan dyes in food samples by HPLC. **Journal of Separation Science**, Weinheim, v. 40, p. 3848-3856, 2017.

13. PEGO, A.M.F.; ROVERI, F.L.; KUNINARI, R.Y.; LEYTON, V.; MIZIARA, I.D.; YONAMINE, M. Determination of cocaine and its derivatives in hair samples by liquid phase microextraction (LPME) and gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS). **Forensic Science International**, Clare, v. 274, p. 83-90, 2017.
14. JEANNOT, M.A.; CANTWELL, F.F. Solvent microextraction into a single drop. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 68, p. 2236-2240, 1996.
15. MANSOUR, F.R.; DANIELSON, N.D. Solidification of floating organic droplet in dispersive liquid-liquid microextraction as a green analytical tool. **Talanta**, Amsterdam, v. 170, p. 22-35, 2017.
16. ALSHANA, U.; LUBBAS, I.; GÖĞER, N.G.; ÇOK, İ.; TAMER, U.; ERTAŞ, N. Dispersive liquid–liquid microextraction based on solidification of floating organic drop combined with counter-electroosmotic flow normal stacking mode in capillary electrophoresis for determination of bisphenol A in water and urine samples. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, Philadelphia, v. 30, p. 2855–2870, 2013.
17. REZAEI, M.; YAMINI, Y.; KHANCHI, A.; FARAJI, M.; SALEH, A. A simple and rapid new dispersive liquid–liquid microextraction based on solidification of floating organic drop combined with inductively coupled plasma-optical emission spectrometry for preconcentration and determination of aluminum in water samples. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 178, p. 766-770, 2010.
18. XU, H.; DING, Z.; LV, L.; SONG, D.; FENGA, Y.Q. A novel dispersive liquid–liquid microextraction based on solidification of floating organic droplet method for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous samples. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 636, p. 28-33, 2009.
19. LEONG, M.I.; HUANG, S.D. Dispersive liquid–liquid microextraction method based on solidification of floating organic drop combined with gas chromatography with electron-capture or mass spectrometry detection. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1211, p. 8-12, 2008.
20. REZAEI, M.; ASSADI, Y.; HOSSEINI, M.R.M.; AGHAEE, E.; AHAMADI, F.; BERIJANI, S. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid–liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1116, p. 1-9, 2006.
21. REZAEI, M.; YAMINI, Y.; FARAJI, M. Evolution of dispersive liquid–liquid microextraction method. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1217, p. 2342-2357, 2010.
22. BERIJANI, S.; ASSADI, Y.; ANBIA, M.; HOSSEINI, M.R.M.; AGHAEE, E. 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**, Amsterdam, v. 1123, p. 1-9, 2006.

23. JAHROMI, E.Z.; BIDARI, A.; ASSADI, Y.; HOSSEINI, M.R.M.; JAMALI, M.R. Dispersive liquid–liquid microextraction combined with graphite furnace atomic absorption spectrometry: Ultra trace determination of cadmium in water samples. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 585, p. 305-311, 2007.
24. ARVAND, M.; BOZORGZADEH, E.; SHARIATI, S.; ZANJANCHI, M.A. Ionic liquid-based dispersive liquid–liquid microextraction for the determination of formaldehyde in wastewaters and detergents. **Environmental Monitoring and Assessment**, Dordrecht, v. 184, p. 7597-7605, 2012.
25. BIDARI, A.; JAHROMI, E.Z.; ASSADI, Y.; HOSSEINI, M.R.M. Monitoring of selenium in water samples using dispersive liquid–liquid microextraction followed by iridium-modified tube graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Microchemical Journal**, Amsterdam, v. 87, p. 6-12, 2007.
26. XU, X.; SU, R.; ZHAO, X.; LIU, Z.; LI, D.; LI, X.; ZHANG, H.; WANG, Z. Determination of formaldehyde in beverages using microwave-assisted derivatization and ionic liquid-based dispersive liquid–liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography. **Talanta**, Amsterdam, v. 85, p. 2632-2638, 2011.
27. ZHANG, P.; HU, L.; LU, R.; ZHOU, W.; GAO, H. Application of ionic liquids for liquid–liquid microextraction. **Analytical Methods**, Cambridge, v. 5, p. 5376-5385, 2013.
28. TRUJILLO-RODRÍGUEZ, M.J.; ROCÍO-BAUTISTA, P.; PINO, V.; AFONSO, A.M. Ionic liquids in dispersive liquid-liquid microextraction. **Trends in Analytical Chemistry**, Oxford, v. 51, p. 87–106, 2013.
29. ASENSIO-RAMOS, M.; HERNÁNDEZ-BORGES, J.; BORGES-MIQUEL, T.M.; RODRÍGUEZ-DELGADO M.A. Ionic liquid-dispersive liquid–liquid microextraction for the simultaneous determination of pesticides and metabolites in soils using high-performance liquid chromatography and fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1218, p. 4808–4816, 2011.
30. TAO, Y.; LIU, J.F.; HU, X. L.; LI, H.C.; WANG, T.; JIANG, G.B. Hollow fiber supported ionic liquid membrane microextraction for determination of sulfonamides in environmental water samples by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1216, p. 6259–6266, 2009.
31. ROCHA, D.L.; BATISTA, A.D.; ROCHA, F.R.P.; DONATI, G.L.; NÓBREGA, J.A. Greening sample preparation in inorganic analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, Oxford, v. 45, p. 80-92, 2013.
32. FACCHIN, I.; PASQUINI, C. Extração líquido-líquido em sistemas de fluxo. **Química Nova**, São Paulo, v. 21, p. 60-68, 1998.
33. HONORATO, R.S.; ARAÚJO, M.C.U.; LIMA, R.A.C.; ZAGATTO, E.A.G.; LAPA, R.A.S.; JOSÉ L.F. COSTA LIMA, J.L.F. A flow-batch titrator exploiting a one-dimensional optimisation algorithm for end point search. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 396, p.91-97, 1999.

34. DINIZ, P.H.G.D.; ALMEIDA, L.F.; HARDING, D.P.; ARAÚJO, M.C.U. Flow-batch analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, Oxford, v. 35, p. 39-49, 2012.
35. ALMEIDA, L.F.; VALE, M.G.R.; DESSUY, M.B.; SILVA, M.M.; LIMA, R.S.; SANTOS, V.B.; DINIZ, P.H.D.; ARAÚJO, M.C.U. A flow-batch analyzer with piston propulsion applied to automatic preparation of calibration solutions for Mn determination in mineral waters by ET AAS. **Talanta**, Amsterdam, v.73, p. 906-912, 2007.
36. HONORATO, R.S.; ZAGATTO, E.A.G.; LIMA, R.A.C.; ARAÚJO, M.C.U. Prior assay as an approach to flow titrations. Spectrophotometric determination of iron in alloys and ores. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 416, p. 231–237, 2000
37. NASCIMENTO, V.B.; SELVA, T.M.G.; COELHO, E.C.S.; SANTOS, F.P.; ANTÔNIO, J.L.S.; SILVA, J.R.; GAIÃO, E.N.; ARAÚJO, M.C.U. Automatic determination of chlorine without standard solutions using a biamperometric flow-batch analysis system. **Talanta**, Amsterdam, v. 81, p. 609–613, 2010.
38. LIMA, R.A.C.; SANTOS, S.R.B.; COSTA, R.S.; MARCONE, G.P.S.; HONORATO, R.S.; NASCIMENTO, V.B.; ARAUJO, M.C.U. Hardness screening of water using a flow-batch photometric system. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 518, p. 25-30, 2004.
39. RUZICKA, J.; MARSHALL, G.D. Sequential injection: a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 237, p. 329-343, 1990.
40. MASINI, J.C. Demonstrando os fundamentos, potencialidades e limitações da análise por injeção sequencial. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, p. 704-708, 2008.
41. SANTOS, A.C.V.; MASINI, J.C. A análise por injeção sequencial (SIA): vinte anos em uma perspectiva brasileira. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, p. 1949-1956, 2010.
42. PASSOS, M.L.C.; SARAIVA, M.L.M.F.S.; LIMA, J.L.F.C.; KORN, M.G.A. Determination of metoprolol, acebutolol and propranolol in pharmaceutical formulations using the same SIA system. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 19, p. 563-568, 2008.
43. ANTHEMIDIS, A.N.; IOANNOU, K.G. On-line sequential injection dispersive liquid-liquid microextraction system for flame atomic absorption spectrometric determination of copper and lead in water samples. **Talanta**, Amsterdam, v. 79, p. 86–91, 2009.
44. ANDRUCH, V.; ACEBAL, C.C.; ŠKRLÍKOVÁ, J.; SKLENÁŘOVÁ, H.; SOLICH, P.; BALOGH, I.S.; BILLES, F.; KOCÚROVÁ L. Automated on-line dispersive liquid–liquid micro-extraction based on a sequential injection system. **Microchemical Journal**, Amsterdam, v. 100, p. 77–82, 2012.
45. MAYA, F.; HORSTKOTTE, B.; ESTELA, J.M.; CERDÁ, V. Lab in a syringe: Fully automated dispersive liquid-liquid microextraction with integrated spectrophotometric detection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 404, p. 909-9017, 2012.

46. HORSTKOTTE, B.; SUÁREZ, R.; SOLICH, P.; CERDÀ, V. In-syringe-stirring: a novel approach for magnetic stirring-assisted dispersive liquid-liquid microextraction. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 788, p. 52-56, 2013.
47. SUÁREZ, R.; HORSTKOTTE, B.; CERDÀ, V. In-syringe magnetic stirring-assisted dispersive liquid-liquid microextraction for automation and downscaling of methylene blue active substances assay. **Talanta**, Amsterdam, v. 130, p. 555-560, 2014.
48. HENRÍQUEZ, C.; HORSTKOTTE, B.; SOLICH, P.; CERDÀ, V. In-syringe magnetic-stirring-assisted liquid-liquid microextraction for the spectrophotometric determination of Cr(VI) in waters. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 405, p. 6761-6769, 2013.
49. FRIZZARIN, R.M.; MAYA, F.; ESTELA, J.M.; CERDÀ, V. Fully-automated in-syringe dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of caffeine in coffee beverages. **Food Chemistry**, Oxford, v. 212, p. 759-767, 2016.
50. FRIZZARIN, R.M.; PORTUGAL, L.A.; ESTELA, J.M.; ROCHA, F.R.P.; CERDÀ, V. On-line lab-in-syringe cloud point extraction for the spectrophotometric determination of antimony. **Talanta**, Amsterdam, v. 148, p. 694-699, 2016.
51. ŠRÁMKOV, I.; HORSTKOTTE, B.; SKLENÁŘOVÁ, H.; SOLICH, P.; KOLEV, S.D. A novel approach to lab-in-syringe head-space single-drop microextraction and on-drop sensing of ammonia. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 31, p. 132-144, 2016.
52. PANA, X.D.; WUA, P.; YANG, D.J.; WANGA, L.Y.; SHENA, X.H.; ZHU, C.Y. Simultaneous determination of melamine and cyanuric acid in dairy products by mixed-mode solid phase extraction and GC-MS. **Food Control**, Oxford, v. 30, p. 545-548, 2013.
53. SOUZA, S.S.; CRUZ, A.G.; WALTER, E.H.M.; FARIA, J.A.F.; CELEGHINI, R.M.S.; FERREIRA, M.M.C.; GRANATO, D.; SANT'ANA, A.S. Monitoring the authenticity of Brazilian UHT milk: A chemometric approach. **Food Chemistry**, Oxford, v. 124, p. 692-695, 2011.
54. BERTÃO, N.I. Adulteração do leite é comum e está espalhada pelo Brasil. **Veja**, São Paulo, 17 maio 2014. Disponível em: <<https://veja.abril.com.br/economia/adulteracao-do-leite-e-comum-e-esta-espalhada-pelo-brasil/>>. Acesso em: 10 out. 2017.
55. BRASIL. Ministério da Agricultura. **Ministério da Agricultura quer fomentar o consumo de leite**. Brasília, 2015. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2015/03/ministerio-da-agricultura-quer-fomentar-o-consumo-de-leite>>. Acesso em: 08 out. 2017.
56. NASCIMENTO, C.F.; SANTOS, P.M.; PEREIRA-FILHO, E.R.; ROCHA, F.R.P. Recent advances on determination of milk adulterants. **Food Chemistry**, Oxford, v. 221, p. 1232-1244, 2017.
57. FAGNANI, R. **Principais fraudes em leite**. Piracicaba: MilkPoint, 2016. Disponível em: <<https://www.milkpoint.com.br/industria/radar-tecnico/leite-fluido/principais-fraudes-em-leite-100551n.aspx>>. Acesso em: 08 out. 2017.

58. ABERNETHY, G.; HIGGS, K. Rapid detection of economic adulterants in fresh milk by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1288, p. 10-20, 2013.
59. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 51 de 04 de novembro de 2011. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 07 nov. 2011. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br>. Acesso em: 05 out. 2017.
60. LU, Y.; XIA, Y.; LIU, G.; PAN, M.; LI, M.; LEE, N.A.; WANG, S. A review of methods for detecting melamine in food samples. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, Philadelphia, v. 47, p. 51-66, 2016.
61. GARCIA, J.S.; SANVIDO, G.B.; SARAIVA, S.A.; ZACCA, J.J.; COSSO, R.S.; EBERLIN, M.N. Bovine milk powder adulteration with vegetable oils or fats revealed by MALDI-QTOF MS. **Food Chemistry**, Oxford, v. 131, p. 722-726, 2012.
62. BARUI, A.K.; SHARMA, R.; RAJPUT, Y.S. Detection of non-dairy fat in milk based on quantitative assay of anionic detergent using azure A dye. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 24, p. 44-47, 2012.
63. SOUZA, G.C.S.; SILVA, P.A.B.; LEOTÉRIO, D.M.S.; PAIM, A.P.S.; LAVORANTE, A.F. A multicommuted flow system for fast screening/sequential spectrophotometric determination of dichromate, salicylic acid, hydrogen peroxide and starch in milk samples. **Food Control**, Oxford, v. 46, p. 127-135, 2014.
64. JEONG, H.; CHUNG, H.; SONG, S.; KIM, C.; LEE, J.; KIM, Y. Validation and determination of the contents of acetaldehyde and formaldehyde in foods. **Toxicological Research**, London, v. 31, p. 273-278, 2015.
65. BOTELHO, B.G.; REIS, N.; OLIVEIRA, L.S.; SENA, M.M. Development and analytical validation of a screening method for simultaneous detection of five adulterants in raw milk using mid-infrared spectroscopy and PLS-DA. **Food Chemistry**, Oxford, v. 181, p. 31-37, 2015.
66. UOL. **Operação desmonta esquema de empresas que adulteravam leite no Sul**. São Paulo, 2014. Disponível em: <http://noticias.uol.com.br/cotidiano/ultimas-noticias/2013/05/08/operacao-desmonta-esquema-de-empresas-que-fraudavam-leite-no-sul.htm> >. Acesso em: 10 out. 2017.
67. XU, X.; SU, R.; ZHAO, X.; LIU, Z.; LI, D.; LI, X.; ZHANG, H.; WANG, Z. Determination of formaldehyde in beverages using microwave-assisted derivatization and ionic liquid-based dispersive liquid–liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography. **Talanta**, Amsterdam, v. 85, p. 2632–2638, 2011.
68. WAHED, P.; RAZZAQ, M.A.; DHARMAPURI, S.; CORRALES, M. Determination of formaldehyde in food and feed by an in-house validated HPLC method. **Food Chemistry**, Oxford, v. 202, p. 476-483, 2016.

69. WANG, T.; GAO, X.; TONG, J.; CHEN, L. Determination of formaldehyde in beer based on cloud point extraction using 2,4-dinitrophenylhydrazine as derivative reagent. **Food Chemistry**, Oxford, v. 131, p. 1577-1582, 2012.
70. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER - IARC. **Formaldehyde**. Lyon, France, 2006. (IARC Monographs, 100F). Disponível em: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100F/mono100F-29.pdf>. Acesso em: 17 out. 2017.
71. MONAKHOVA, Y.B.; JENDRAL, J.A.; LACHENMEIER, D.W. The margin of exposure to formaldehyde in alcoholic beverages. **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**, Zagreb, v. 63, p. 227-237, 2012.
72. ZHAO, X-Q.; ZHANG, Z-Q. Microwave-assisted on-line derivatization for sensitive flow injection fluorometric determination of formaldehyde in some foods. **Talanta**, Amsterdam, v. 80, p. 242-245, 2009.
73. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 51 de 19 de setembro de 2002. Aprova os Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, do Leite tipo B, do Leite tipo C, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 20 set. 2002. Disponível em: <https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/legislacoes/instrucao-normativa-51-de-18-09-2002,654.html>. Acesso em: 11 out. 2017.
74. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official method 931-08 Formaldehyde in food**. Formaldeído em alimentos (1931) Disponível em: [http://files.foodmate.com/2013/files\\_2990.html](http://files.foodmate.com/2013/files_2990.html). Acesso em: 10 out. 2017.
75. KAMINSKI, J.; ATWAL, A.S.; MAHADEVAN, S. High performance liquid chromatographic determination of the formaldehyde in milk. **Journal of Liquid Chromatography**, New York, v. 16, p. 521-526, 1993.
76. REZENDE, F.B.F.; CHEIBUB, A.M.S.S.; PEREIRA NETTO, A.D.; MARQUES, F.F.C. Determination of formaldehyde in bovine milk using a high sensitivity HPLC-UV method. **Microchemical Journal**, Amsterdam, v. 134, p. 383-389, 2017.
77. CERDAN, J.F.; PERIS-TORTAJADA, M.R.; PUCHADES, R.; MAQUIEIRA, A. Automation of the determination of hydrogen peroxide, dichromate, formaldehyde and bicarbonate in milk by flow injection analysis. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 344, p. 123-127, 1992.
78. MARTINS, G.B.C.; SUCUPIRA, R.R.; SUAREZ, P.A.Z. Papel indicador colorimétrico para detecção de formol em produtos lácteos e produtos de higiene pessoal. **Química Nova**, São Paulo, v. 40, p. 946-951, 2017.
79. BRANDÃO, P.F.; RAMOS, R.M.; VALENTE, I.M.; ALMEIDA, P.J.; CARRO, A.M.; LORENZO, R.A.; RODRIGUES, J.A. Gas-diffusion microextraction coupled with spectrophotometry for the determination of formaldehyde in cork agglomerates. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Berlin, v. 409, p. 2885-2892, 2017.

80. PINHEIRO, H.L.C.; ANDRADE, M.V.; PEREIRA, P.A.P.; ANDRADE, J.B. Spectrofluorimetric determination of formaldehyde in air after collection onto silica cartridges coated with Fluoral P. **Microchemical Journal**, Amsterdam, v. 78, p. 15-20, 2004
81. BRASIL, M.A.S.; REIS, B.F. Development of a microcontrolled flow-batch device with direct heating for analytical procedures that require a heating step for chemical reaction development. **Sensors and Actuators B-Chemical**, Lausanne, v. 226, p. 570–578, 2016.
82. RÓDENAS-TORRALBA, E.; ROCHA, F.R.P.; REIS, B.F.; MORALES-RUBIO, A.; DE LA GUARDIA, M. Evaluation of a multicommutated flow system for photometric environmental measurements. **Journal of Automated Methods and Management in Chemistry**, New York, v. 2006, p. 1-9, 2006.
83. HINDLE, E.J.; WHEELLOCK, J.V. Determination of nitrogen in trichloroacetic acid filtrates of milk using the Technicon Auto Analyzer. **Proceedings of the Nutrition Society**, Cambridge, v. 29, p. 89-90, 1970.
84. SILVA, S.G.; MORALES-RUBIO, A.; de la GUARDIA, M.; ROCHA, F.R.P. Sequential spectrofluorimetric determination of free and total glycerol in biodiesel in a multicommutated flow system. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 401, p. 365-371, 2011.
85. VENTURA, S.P.M.; MARQUES, C.S.; ROSATELLA, A.A.; AFONSO, C.A.M.; GONÇALVES, F.; COUTINHO, J.A.P. Toxicity assessment of various ionic liquid families towards *Vibrio Fischeri* marine bacteria. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, v. 76, p. 162–168, 2012.
86. BERTON, P.; MARTINI, E.M.; WUILLOUD, R.G. Development of an on-line temperature-assisted ionic liquid dispersive microextraction system for sensitive determination of vanadium in environmental and biological samples. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 176, p. 721-728, 2010.
87. DONG, S.; DASGUPTA, P.K. Fast fluorometric flow injection analysis of formaldehyde in atmospheric water. **Environmental Science & Technology**, Washington, DC, v. 21, p. 581-588, 1987.
88. HORSTKOTTE, B.; WERNER, E.; WIEDEMEIER, S.; ELSHOLZ, O.; CERDA, V.; LUTTMANN, R. At-line determination of formaldehyde in bioprocesses by sequential injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 559, p. 248–256, 2006.
89. PENTEADO, J.C.P.; EL SEOUD, O.A.; CARVALHO, L.R.F. Alquilbenzeno sulfonato linear: uma abordagem ambiental e analítica. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, p. 1038-1046, 2006.
90. SANTOS, V.M.; SANTOS, K.R.S.; CARVALHO, L.R.; SANT'ANNA, C.L. Efeitos dos surfactantes aniônicos LAS e LESS no desenvolvimento e na morfologia da cianobactéria planktothrix agardhii ccibt3125. **Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology**, Itajaí, v. 19, p. 1-5, 2015.
91. LLENADO, R.A.; NEUBECKER, T.A. Surfactants. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 55, p. 93-101, 1983.

92. MASTROTI, R.R.; SOUSA, E.C.P.M.; SOUZA, ABESSA, D.M.S.; SASS, V. Avaliação preliminar da biodegradabilidade de tensoativos aniônicos em água do mar. **Revista Brasileira de Oceanografia**, São Paulo, v. 46, p. 187-193, 1998.
93. SCOTT, J.M.; JONES, M.N. The biodegradation of surfactants in the Environment. **Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes**, Amsterdam, v. 1508, p. 235-251, 2000.
94. SAOUTER, E.; PITTINGER, C.; FEIJEL, T. Aquatic environmental impact of detergents: From simple to more sophisticated models. **Ecotoxicology Environmental Safety**, San Diego, v. 50, p. 153-159, 2001.
95. CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE – CONAMA. Resolução nº 257/2005. **Diário Oficial da União, Poder Executivo**, Brasília, DF, 30 jul. 1986. p. 11.356. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi>. Acesso em: 10 out. 2017.
96. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION - APHA. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 20. ed. Washington, DC: APHA, 1998.
97. MARCUS, Y.; HEFTER, G. Ion pairing. **Chemical Reviews**, Washington, DC, v. 106, p. 4585-4621, 2006.
98. LUND, M.; JAGODA-CWIKLIK, B.; WOODWARD, C.E.; VÁCHA, R.; JUNGWIRTH, P. Dielectric interpretation of specificity of ion pairing in water. **The Journal of Physical Chemistry Letters**, Washington, DC, v. 1, p. 300-303, 2010.
99. LIMA, M.J.A.; NASCIMENTO, C.F.; ROCHA, F.R.P. Feasible photometric measurements in liquid-liquid extraction by exploiting smartphone-based digital images. **Analytical Methods**, Cambridge, v. 9, p. 2220-2225, 2017.
100. OLIVER-RODRÍGUEZ, B.; ZAFRA-GÓMEZ, A.; CAMINO-SÁNCHEZ, F.J.; CONDE-GONZÁLEZ, J.E.; PÉREZ-TRUJILLO, J.P.; VÍLCHEZ, J.L. Multi-residue method for the analysis of commonly used commercial surfactants, homologues and ethoxymers, in marine sediments by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. **Microchemical Journal**, Amsterdam, v. 110, p. 158-168, 2018.
101. BERGÉ, A.; GIROUD, B.; WIEST, L.; DOMENJOUR, B.; GONZALEZ-OSPINA, A.; VULLIET, E. Development of a multiple-class analytical method based on the use of synthetic matrices for the simultaneous determination of commonly used commercial surfactants in wastewater by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1450, p. 64-75, 2016.
102. LUNAR, L.; RUBIO, S.; PÉREZ-BENDITO, D. Analysis of linear alkylbenzene sulfonate homologues in environmental water samples by mixed admicelle-based extraction and liquid chromatography/mass spectrometry. **Analyst**, London, v. 131, p. 835-841, 2006.
103. RUBIO-BARROSO, S.; RODRIGUEZ-GAMONAL, V.; POLO-DIEZ, L.M. Fluorimetric determination of anionic surfactants by extraction as safranin-T ion-pairs. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 206, p. 351-355, 1988.

104. KOGA, M.; YAMAMICHI, Y.; NOMOTO, Y.; IRIE, M.; TANIMURA, T.; YOSHINAGA, T. Rapid determination of anionic surfactants by improved spectrophotometric method using methylene blue. **Analytical Sciences**, Tokyo, v. 15, p. 563-568, 1999.
105. JURADO, E.; FERNÁNDEZ-SERRANO, M.; NÚÑEZ-OLEA, J.; LUZÓN, G.; LECHUGA, M. Simplified spectrophotometric method using methylene blue for determining anionic surfactants: applications to the study of primary biodegradation in anerobic screening tests. **Chemosphere**, Oxford, v. 65, p. 278-285, 2006.
106. KAWASE, J.; NAKAE, A.; YAMANAKA, M. Determination of anionic surfactants by flow injection analysis based on ion pair extraction. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 51, p. 1640-1642, 1979.
107. RODENAS-TORRALBA, E.; REIS, B.F.; MORALES-RUBIO, A.; DE LA GUARDIA, M. An environmentally friendly multicommutated alternative to the reference method for anionic surfactant determination in water. **Talanta**, Amsterdam, v. 66, p. 591-599, 2005.
108. YAN-YUN, H.; YOU-ZHAO, H.; LI-LI, Q.; LEI, W. On-line ion pair solid-phase extraction of electrokinetic multicommutation for determination of trace anion surfactants in pond water. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 536, p. 251-257, 2005.
109. PEREIRA, A.C.; ROCHA, F.R.P. A multicommutated flow system with liquid-liquid microextraction for determination of anionic surfactants in freshwaters. **Analytical Methods**, Cambridge, v. 5, p. 2104-2109, 2013.
110. BURAKHAM, R.; LAPANANTNOPPAKHUN, S.; JAKMUNEE, J.; GRUDPAN, K. Exploiting sequential injection analysis with lab-at-valve (LAV) approach for on-line liquid-liquid micro-extraction spectrophotometry. **Talanta**, Amsterdam, v. 68, p. 416-421, 2005.
111. BORGES, G.A.; SILVA, L.P.; PENIDO, J.A.; LEMOS, L.R.; MAGESTE, A.B.; RODRIGUES, G.D. A method for dye extraction using an aqueous two-phase system: Effect of co-occurrence of contaminants in textile industry wastewater. **Journal of Environmental Management**, London, v. 183, p. 196-203, 2016.
112. SERESHTI, H.; KARIMI, M.; SAMADI, S. Application of response surface method for optimization of dispersive liquid-liquid microextraction of water-soluble components of Rosa damascena Mill essential oil. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1216, p. 198-204, 2009.
113. REZAEI, M.; YAMINI, Y.; SHARIATI, S.; ESRAFILI, A.; SHAMSIPUR, M. Dispersive liquid-liquid microextraction combined with high-performance liquid chromatography-UV detection as a very simple, rapid and sensitive method for the determination of bisphenol A in water samples. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1216, p. 1511-1514, 2009.
114. NASCIMENTO, C.F.; BOTREL, B.M.C.; MONTEIRO, M.M.; SACZK, A.A.; MAGRIOTIS, Z.M.; PINTO, F.M.; LIMA, R.M.F. Treatment and quality analysis of the recovered solvents. **Journal of Advances in Chemistry**, Amritsar, v. 12, p. 4426-4433, 2016.

115. FAN, S.; FANG, Z. Two-step solvent extraction flow injection system for the determination of anionic surfactants by spectrophotometry. **Fresenius of Journal of Analytical Chemistry**, New York, v. 357, p. 416-419, 1997.
116. WYRWAS, B.; ZGOŁA-GRZEŚKOWIAK, A. Continuous flow methylene blue active substances method for the determination of anionic surfactants in river water and biodegradation test samples. **Journal of Surfactants and Detergents**, Heidelberg, v. 17, p. 191-198, 2014.
117. JING-FU, L.; GUI-BIN, J. Determination of anionic surfactants in detergents by microporous membrane liquid-liquid extraction and flow injection spectrophotometry. **Microchemical Journal**, Amsterdam, v. 68, p. 29-33, 2001.
118. HAI, L.T. Preconcentration and spectrophotometric determination of anionic surfactants in water by flow injection analysis and solid phase ion pair extraction. **Journal of Chemistry**, London, v. 43, p. 253-257, 2005.
119. AYDAN, T.; TAKEUCHI, M.; TANAKA, H. Spectrophotometric determination of anionic surfactant based on ion pair formation with methylene blue in reversed flow injection mode. **Journal of Flow Injection Analysis**, Fukuoka, v. 26, p. 133-137, 2009.
120. MOSKVIN, L.N.; SIMON, J.; LOFFLER, P.; MICHAILOV, N.V.; NICOLAEVNA D.N. Photometric determination of anionic surfactants with a flow-injection analyzer that includes a chromatomembrane cell for sample preconcentration by liquid-liquid solvent extraction. **Talanta**, Amsterdam, v. 43, p. 819-824, 1996.
121. ROCHA, C.M.B.M.; RODRIGUES, L.S.; COSTA, C.C.; OLIVEIRA, P.R.; SILVA, I.J.; JESUS, E.F.M.; ROLIM, R.G. Avaliação da qualidade da água e percepção higiênico-sanitária na área rural de Lavras, Minas Gerais, Brasil, 1999-2000. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 22, p. 1967-1978, 2006.
122. COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL – CETESB. **Relatório da qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo, 2005**. São Paulo, 2006. (Série Relatórios). Disponível em: [http://www.mpsp.mp.br/portal/page/portal/cao\\_urbanismo\\_e\\_meio\\_ambiente/biblioteca\\_virtual/bv\\_informativos\\_tecnicos/Relat%C3%B3rio%20Anual.pdf](http://www.mpsp.mp.br/portal/page/portal/cao_urbanismo_e_meio_ambiente/biblioteca_virtual/bv_informativos_tecnicos/Relat%C3%B3rio%20Anual.pdf). Acesso em: 10 nov. 2017.
123. GHISELLI, G.; JARDIM, W.F. Interferentes endócrinos no ambiente. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, p. 695-706, 2007.
124. MATTA, M.H.R.; PEREIRA, A.L.; MONTAGNER, E.; FORTUNATO, G.V. Bisphenol A (BPA) determination in mineral water by using CG/DCE – a new analysis methodology proposal. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 71, p. 624-629, 2012.
125. BIRKETT, J.W.; LESTER, J.N. **Endocrine disrupters in wastewater and sludge treatment processes**. Boca Raton: CRC Press, 2002.
126. CONTAMINANTES emergentes. **Revista de Química Industrial**, Rio de Janeiro, v. 81, n. 738, p. 4-13, 2013. Disponível em: <http://www.abq.org.br/rqi/2013/738/RQI-738-pagina4-Contaminantes-Emergentes.pdf>. Acesso em: 10 out. 2017.

127. TERNES, T.A.; STUMPF, M.; MUELLER, J.; HABERER, K.; WILKENA, R.D.; SERVOS, M. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants- I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. **The Science of the Total Environment**, Wiesbaden, v. 225, p. 81-90, 1999.
128. DEL OLMO, M.; ZAFRA, A.; JURADO, A.B.; VILCHEZ, J.L. Determination of bisphenol A (BPA) in the presence of phenol by first-derivative fluorescence following micro liquid-liquid extraction (MLLE). **Talanta**, Amsterdam, v. 50, p. 1141-1148, 2000.
129. AMIRIDOU, D.; VOUTSA, D. Alkylphenols and phthalates in bottled waters. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 185, p. 281–286, 2011.
130. BERNARDO, P.E.M.; NAVAS, S.A.; MURATA, L.T.F.; ALCÂNTARA, M.R.S. Bisfenol A: o uso em embalagens para alimentos, exposição e toxicidade – Uma revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 74, p. 1-11, 2015.
131. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. Resolução nº 41, de 16 de setembro de 2011. Dispõe sobre a proibição de uso de bisfenol A em mamadeiras destinadas a alimentação de lactentes e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, Seção 1, n. 180, p. 54, 18 set. 2011.
132. MARKEY, C.M.; MICHAELSON, C.L.; SONNENSCHNEIM, C.; SOTO, A.M. Alkylphenols and bisphenol A as environmental estrogens. **The Handbook of Environmental Chemistry**, v. 3, Part L. Endocrine Disruptors, Part I. Heidelberg: Springer-Verlag, 2001. p. 131-153.
133. SALGUEIRO-GONZÁLEZ, N.; CONCHA-GRAÑA, E.; TURNES-CAROU, I.; MUNIATEGUI-LORENZO, S.; LÓPEZ-MAHÍA, P.; PRADA-RODRÍGUEZ, D. Determination of alkylphenols and bisphenol A in seawater samples by dispersive liquid–liquid microextraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry for compliance with environmental quality standards (Directive 2008/105/EC) (Directive 2008/105/EC). **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1223, p. 1–8, 2012.
134. SALGUEIRO-GONZÁLEZ, N.; TURNES-CAROU, I.; VIÑAS-DIÉGUEZ, L.; MUNIATEGUI-LORENZO, S.; LÓPEZ-MAHÍA, P.; PRADA-RODRÍGUEZ, D. Occurrence of endocrine disrupting compounds in five estuaries of the northwest coast of Spain: Ecological and human health impact. **Chemosphere**, Oxford, v. 131, p. 241–247, 2015.
135. BATISTA, A.D.; ROCHA, F.R.P. A green flow-injection procedure for fluorimetric determination of bisphenol A in tap waters based on the inclusion complex with beta-cyclodextrin. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, Oxon, v. 93, p. 1402-1412, 2013.
136. YAMAGUCHI, A.; ISHIBASHI, H.; ARIZONO, K.; TOMINAGA, N. In vivo and in silico analyses of estrogenic potential of bisphenol analogs in medaka (*Oryzias latipes*) and common carp (*Cyprinus carpio*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, v. 120, p. 198–205, 2015.

137. MELO, S.M.; BRITO, N.M. Analysis and occurrence of endocrine disruptors in Brazilian water by HPLC-Fluorescence detection. **Water, Air, and Soil Pollution**, Dordrecht, v. 225, p. 1776-1783, 2014.
138. LÓPEZ-DARIAS, J.; GERMÁN-HERNÁNDEZ, M.; PINO, V.; AFONSO, A.M. Dispersive liquid-liquid microextraction versus single-drop microextraction for the determination of several endocrine-disrupting phenols from seawaters. **Talanta**, Amsterdam, v. 80, p. 1611-1618, 2010.
139. CUNHA, S.C.; FERNANDES, J.O. Assessment of bisphenol A and bisphenol B in canned vegetables and fruits by gas chromatography-mass spectrometry after QuEChERS and dispersive liquid-liquid microextraction. **Food Control**, Oxford, v. 33, p. 549–555, 2013.
140. CHEN, B.; HUANG, Y.; HE, M.; HU, B. Hollow fiber liquid-liquid-liquid microextraction combined with performance liquid chromatography-ultraviolet detection for the determination of various environmental estrogens in environmental and biological samples. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1305, p.17-26, 2013.
141. BRAUNRATH, R.; PODLIPNA, D.; PADLESÁK, S.; CICHNA-MARKL, M. Determination of bisphenol A in canned foods by immunoaffinity chromatography, HPLC, and fluorescence detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 53, p. 8911–8917, 2005.
142. INOUEA, K.; MURAYAMA, S.; TAKEBAB, K.; YOSHIMURA, Y.; NAKAZAWA, H. Contamination of xenoestrogens bisphenol A and F in honey: safety assessment and analytical method of these compounds in honey. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 16, p. 497–506, 2003.
143. SADEGHI, M.; NEMATIFAR, Z.; FATTAHI, N.; PIRSAHEB, M.; SHAMSIPUR, M. Determination of bisphenol A in food and environmental samples using combined solid-phase extraction–dispersive liquid–liquid microextraction with solidification of floating organic drop followed by HPLC. **Food Analytical Methods**, New York, v. 9, p. 1814-1824, 2016.
144. YIANTZI, E.; PSILLAKIS, E.; TYROVOLA, K.; KALOGERAKIS, N. Vortex-assisted liquid–liquid microextraction of octylphenol, nonylphenol and bisphenol-A. **Talanta**, Amsterdam, v. 80, p. 2057–2062, 2010.
145. ROS, O.; VALLEJO, A.; BLANCO-ZUBIAGUIRRE, L.; OLIVARES, M.; DELGADO, A.; ETXEBARRIA, N.; PRIETO, A. Microextraction with polyethersulfone for bisphenol-A, alkylphenols and hormones determination in water samples by means of gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis. **Talanta**, Amsterdam, v. 134, p. 247–255, 2015.
146. ZHOU, J.; ZHAO, S.; ZHANG, J. An indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for bisphenol-A based on the synthesis of a poly-L-lysine–haptén conjugate as a coating antigen. **Analytical Methods**, Cambridge, v. 5, p. 1570–1576, 2013.

147. FENGA, Y.; NING, B.; SUB, P.; WANG, H.; WANG, C.; CHENA, F.; GAOA, Z. An immunoassay for bisphenol A based on direct hapten conjugation to the polystyrene surface of microtiter plates. **Talanta**, Amsterdam, v. 80, p. 803–808, 2009.
148. HOU, C.; ZHAO, L.; GENG, F.; WANG, D.; GUO, L.H. Donor/acceptor nanoparticle pair-based singlet oxygen channeling homogenous chemiluminescence immunoassay for quantitative determination of bisphenol A. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 408, p. 8795–8804, 2016.
149. DU, L.; ZHANG, C.; WANG, L. Ultrasensitive time-resolved microplate fluorescence immunoassay for bisphenol A using a system composed on gold nanoparticles and a europium (III)-labeled streptavidin tracer. **Microchimica Acta**, Wien, v. 182, p. 539–544, 2015.
150. HUANG, P.; ZHAO, S.; EREMIN, S. A fluorescence polarization immunoassay method for detection of the bisphenol A residue in environmental water samples based on a monoclonal antibody and 4'(aminomethyl) fluorescein. **Analytical Methods**, Cambridge, v. 7, p. 4246-4251, 2015.
151. KOCHANA, J.; WAPIENNIK, K.; KOZAK, J.; KNIHNICKI, P.; POLLAP, A.; WOŹNIAKIEWICZ, M.; NOWAK, J.; KOŚCIELNIAK, P. Tyrosinase-based biosensor for determination of bisphenol A in a flow-batch system. **Talanta**, Amsterdam, v. 144, p. 163–170, 2015.
152. CAO, W.; CHAO, Y.; LIU, L.; LIU, Q.; PEI, M. Flow injection chemiluminescence sensor based on magnetic oil-based surface molecularly imprinted nanoparticles for determination of bisphenol A. **Sensors and Actuators B**, Lausanne, v. 204, p. 704–709, 2014.
153. MOLINA-GARCÍA, L.; CÓRDOVA, M.L.F.; RUIZ-MEDINA, A.; Analysis of Bisphenol A in milk by using a multicommutated fluorimetric sensor. **Talanta**, Amsterdam, v. 96, p. 195–201, 2012.
154. JEONG, Y.; CHOI, J.; LEE, L.S. Partitioning behavior of Bisphenol alternatives BPS and BPAF compared to BPA. **Environmental Science & Technology**, Washington, DC, v. 51, p. 3725–3732, 2017.
155. FERRER, E.; SANTONI, E.; VITTORI, S.; FONT, G.; MAÑES, J.; SAGRATINI, G. Simultaneous determination of bisphenol A, octylphenol, and nonylphenol by pressurised liquid extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry in powdered milk and infant formulas. **Food Chemistry**, Oxford, v. 126, p. 360–367, 2011.
156. SODRÉ, F.F.; MONTAGNER, C.C.; JARDIM, W.F. Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos em águas superficiais de Campinas (SP, Brasil). **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, Itajaí, v.2, p.187-196, 2007.
157. SODRÉ, F.F.; PESCARA, I.C.; JARDIM, W.F.J. Assessing selected estrogens and xenoestrogens in Brazilian surface water by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Microchemical Journal**, Amsterdam, v. 96, p.92-98, 2010.
158. RAIMUNDO, C.C.M. **Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos nas águas superficiais da bacia do rio Atibaia**. 2007. 126 p. Dissertação

(Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

159. BERALDO, D.A.S. **Desenvolvimento e avaliação de método analítico para análise de Bisfenol A e Nonifenol em águas superficiais da cidade de Americana, SP.** 2012. 79 p. Dissertação (Mestrado em Química Analítica e Inorgânica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

160. MONTAGNER, T.A. **Determinação de Bisfenol A em Água: Uma Investigação na Cidade de Campo Grande – MS.** 2010. 169 p. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2010.

161. GHISELLI, G. **Avaliação da qualidade da água destinada ao abastecimento público na região de Campinas:** ocorrência de determinação dos interferentes endócrinos (IE) produtos farmacêuticos e de higiene pessoal (PFHP). 2006. 190 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

162. SOUZA, R.R.; MARTINS, E.A.J.; OTOMO, J.I.; FURUSAWA, H.A.; PIRES, M.A.F. Determinação de plastificantes em água potável utilizando cromatografia gasosa e espectrometria de massas. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, p. 1453-1458, 2012.

163. BENMANSOUR, B.; STEPHAN, L.; CABON, J.Y.; DESCHAMPS, L.; GIAMARCHI, P. Spectroscopic properties and laser induced fluorescence determination of some endocrine disrupting compounds. **Journal of Fluorescence**, New York, v. 21, p. 843–850, 2011.