UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

PEDRO AUGUSTO DE FRANÇA SOUZA

Procedimento analítico para a determinação de ácido salicílico em águas naturais explorando pré-concentração na coluna em sistema de cromatografia por injeção sequencial

Piracicaba

2019

PEDRO AUGUSTO DE FRANÇA SOUZA

Procedimento analítico para a determinação de ácido salicílico em águas naturais explorando pré-concentração na coluna em sistema de cromatografia por injeção sequencial

Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

Dissertação apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente

Orientador: Prof. Dr. Fábio Rodrigo Piovezani Rocha

Piracicaba

2019

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)

Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Souza, Pedro Augusto de França
Procedimento analítico para a determinação de ácido salicílico em águas naturais explorando pré-concentração na coluna em sistema de cromatografia por injeção sequencial / Pedro Augusto de França Souza; orientador Fábio Rodrigo Piovezani Rocha. - - Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2019.
62 p. : il.

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

1. Análise em fluxo 2. Automação analítica 3. Cromatografia 4. Fármacos 5. Poluentes orgânicos emergentes 6. Química ambiental 7. Química analítica 8. Química verde I. Título

CDU 543.06 (661.744.5 + 628.1.032)

Elaborada por:
Marilia Ribeiro Garcia Henyei
CRB-8/3631
Resolução CFB Nº 184 de 29 de setembro de 2017

Em tempos obscuros, dedico este trabalho à ciência e à educação brasileira.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço aos Doutores que me mostraram o caminho da sabedoria, da cultura, do respeito e do amor desde criança: Aurora Mariana Garcia de França Souza e Samuel de Souza Neto.

À minha irmã, Maria Tereza de França Souza, por ser minha parceira, minha cúmplice e meu exemplo de vida, de luta e de prestígio.

À minha noiva, Gabriela Silva Altarugio, por ser, inúmeras vezes, minha razão de prosseguir com meus objetivos de vida e por me incentivar em diversos outros.

Ao meu orientador, Prof. Fábio Rodrigo Piovezani Rocha, por todo incentivo, pela confiança em mim, pelas conversas e apoios em momentos difíceis e, principalmente, por me tirar da inércia.

Ao meu grande amigo e parceiro de trabalhos, Milton Katsumi Sasaki, pelas conversas, pelo apoio, por acreditar mim, por toda ajuda nos experimentos e pelos conselhos.

Aos colegas do grupo: Anna Flávia e Sol, parceiras de disciplinas, bandeijão, reflexões e muitas risadas; Thiago, parceiro de prédio, de longas conversas sobre a vida e discussões científicas, e Samara e Mariana, parceiras de conversas no café e discussões científicas.

Aos colegas, funcionários e professores do Laboratório de Química Analítica “Henrique Bergamin Filho”: Manoel, Oziel, Lidiane, Andressa, Tuanne, Bruno, Pedro, Evellyn, Sheila, Fátima, Liz, Cláudia e Professores Zagatto, Boaventura e Chico, pelo auxílio e sugestões, tornando meu trabalho cada vez mais palpável, e pelos excelentes momentos de divertimento, sabedoria e apoio.

Aos professores Wanessa Melchert Mattos e Marcelo Eduardo Alves, pela confiança em mim como estagiário docente, pelo apoio em me fazer tomar a frente e explicar aos alunos os fenômenos químicos e pela vasta sabedoria adquirida durante as aulas e conversas. Sou imensamente grato.

Aos discentes da XVIII Turma de Ciência dos Alimentos da ESALQ, por testarem os meus limites e meus conhecimentos em cada aula e por me tornarem uma pessoa e professor melhor.

Aos Professores Boaventura F. Reis, José de Anchieta G. Neto e Ivanise Gaubeur, pelas sugestões no exame de qualificação.

Ao CENA, em especial ao Laboratório de Química Analítica “Henrique Bergamin Filho”, por toda infraestrutura oferecida para a realização deste trabalho.

Ao Professor Valdemar Luiz Tornisielo e ao técnico Rodrigo Floriano Pimpinato, pelo auxílio na determinação de ácido salicílico em águas por LC-MS.

Ao Professor Plínio Barbosa de Camargo, do laboratório de Ecologia Isotópica, pelo fornecimento das amostras de águas naturais.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa concedida, Processo Nº 132096/2017-0.

Muito obrigado a todos!

“Dimidium facti qui coepit habet: sapere aude.”

Quintus Horatius Flaccus

RESUMO

SOUZA, P. A. F. **Procedimento analítico para a determinação de ácido salicílico em águas naturais explorando pré-concentração na coluna em sistema de cromatografia por injeção sequencial**. 2019. 62 p. Dissertação (Mestrado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2019.

O ácido salicílico é encontrado naturalmente em diversas plantas, agindo como fitohormônio e exercendo várias funções no metabolismo vegetal. Também tem sido amplamente utilizado na medicina e na cosmetologia, sendo usualmente encontrado na urina dos seres humanos, por ser o principal metabólito do ácido acetilsalicílico, fármaco mundialmente utilizado. Entretanto, por não existir legislação que regulamente a sua concentração no ambiente, é considerado um poluente emergente. Os métodos comumente utilizados para a determinação do analito são baseados em cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por espectrometria de massas. Entretanto, estes métodos requerem instrumentação de custo relativamente alto e procedimentos exaustivos de *clean-up* de amostras e pré-concentração do analito. Visando simplificar o procedimento de determinação de ácido salicílico em águas e tornar o processo mais ambientalmente amigável, o objetivo desta dissertação foi o desenvolvimento de um procedimento analítico alternativo para a determinação de ácido salicílico em águas naturais, explorando a fluorescência intrínseca do íon salicilato e utilizando a estratégia de pré-concentração na coluna cromatográfica em sistema de cromatografia por injeção sequencial. Faixa linear entre 0,25 e 5,00 µg L^{-1} foi atingida, além de figuras de mérito analítico adequadas à aplicação proposta: coeficiente de variação, limite de detecção, limite de quantificação, e frequência de amostragem estimados em 3,0% (n = 10), 20 ng L^{-1} (99,7% de confiança), 60 ng L^{-1} e 7 h^{-1}, respectivamente. Melhores precisão e porcentagens de recuperação foram obtidos em relação ao método de referência, baseado em LC-ESI-MS/MS. Além disso, o baixo consumo de solvente orgânico (150 µL de acetonitrila por determinação), bem como a ausência de etapas prévias de tratamento da amostra, possibilitaram o atendimento aos requisitos da química limpa.

Palavras-chave: Análises em fluxo. Fluorescência. *On-column preconcentration*. Química verde.

ABSTRACT

SOUZA, P. A. F. **Determination of salicylic acid in natural waters exploiting on-column preconcentration in sequential injection chromatography**. 2019. 62 p. Dissertação (Mestrado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2019.

Salicylic acid, a phytohormone naturally found in several plants, exerts diverse functions in the plant metabolism, and has been used in medicine and cosmetology. It is usually found in the urine of humans, as the main metabolite of acetylsalicylic acid, a worldwide used drug. Due to the absence of threshold limits in the environment, it is considered as an emerging pollutant. Usual methods for its determination are based on high performance liquid chromatography with mass spectrometry, UV or fluorescence detection. However, these methods require relatively expensive instrumentation and exhaustive procedures for sample clean-up and analyte preconcentration. Aiming to simplify the procedure for salicylic acid determination in waters, and to make the process more environmentally friendly, the aim of this work was the development of an alternative procedure for the determination of salicylic acid in natural waters, exploiting the intrinsic fluorescence of the salicylate ion and the on-column preconcentration in a sequential injection chromatographic system. A linear response between 0.25 and 5.00 µg L^{-1} and other suitable figures of merit were attained: the coefficient of variation, limit of detection, limit of quantification, and sampling rate were estimated as 3.0% (n = 10), 20 ng L^{-1} (99.7% confidence level), 60 ng L^{-1}, and 7 h^{-1}, respectively. Improved precision and recoveries were obtained in comparison to the LC-ESI-MS/MS reference method. In addition, in view of the low consumption of organic solvent (150 µL of acetonitrile per determination), as well as the absence of sample pretreatment, the proposed method meets the requirements of Green Chemistry.

Keywords: Flow analysis. Fluorescence. On-column preconcentration. Green chemistry.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Concentrações de AS determinadas em águas naturais e residuárias em diversas regiões do mundo. 23

Tabela 2- Rotina analítica do sistema de injeção sequencial para a determinação de AS em águas naturais com pré-concentração na coluna. 36

Tabela 3- Áreas e larguras de pico referentes ao processamento da solução de AS nas colunas cromatográficas avaliadas.....41

Tabela 4- Parâmetros cromatográficos estimados para as duas fases móveis avaliadas. 43

Tabela 5- Condições ótimas de análise de AS pelo método proposto. 47

Tabela 6- Recuperações de AS adicionado em 6 amostras de águas de rio. 49

Tabela 7- Avaliação de exatidão do método proposto. 51

Tabela 8- Principais características analíticas dos procedimentos para a determinação de AS em águas naturais 52

Tabela 9- Concentrações de AS encontradas em amostras de águas naturais. 53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representação esquemática da pré-concentração em coluna. 31

Figura 2- Fotografias do sistema SIC. 33

Figura 3- Fotografias do espectrofluorímetro. 34

Figura 4- Diagrama do módulo de análises do sistema de cromatografia por injeção sequencial para a determinação de AS em amostras de águas. 36

Figura 5- Espectros de excitação e emissão de fluorescência do AS. 37

Figura 6- Efeito do pH sobre a intensidade de fluorescência do AS. 39

Figura 7- Cromatogramas obtidos com diferentes colunas cromatográficas. 40

Figura 8- Influência do teor de ACN na fase móvel para a separação cromatográfica de AS em uma amostra de água natural. 42

Figura 9- Efeito do volume do transportador sobre a largura e a área de pico. 44

Figura 10- Influência do volume de amostra injetada na coluna cromatográfica. 45

Figura 11- Influência da vazão na etapa de pré-concentração sobre a largura e área de pico. 46

Figura 12- Influência da vazão do eluente sobre a largura e área de pico. 47

Figura 13- Cromatogramas obtidos para uma amostra de água de rio sem e com adição de AS. 49

Figura 14- Cromatogramas de amostras de águas de rio. 53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α	Fator de separação
μ	Vazão linear
A	Amostra
ACN	Acetonitrila
AS	Ácido salicílico
BR	Bobina de retenção
BS	Bomba de seringa
C18	Sílica funcionalizada com octadecilsilano
CC	Coluna cromatográfica
CE	Eletroforese capilar, do inglês *capillary electrophoresis*
CV	Coeficiente de variação
D	Detector
EC	Eficiência de concentração
ESI	Ionização por eletronebulização, do inglês *electrospray ionization*
FE	Fator de enriquecimento
FM	Fase móvel
GC	Cromatografia gasosa, do inglês *gas chromatography*
H	Altura de pratos
IC	Índice de consumo
k'	Fator de retenção
LC	Cromatografia líquida de alta eficiência
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
MS	Espectrometria de massas, do inglês *mass spectrometry*
N	Número de pratos
R_S	Resolução cromatográfica
SIA	Análise por injeção sequencial, do inglês *sequential injection analysis*
SIC	Cromatografia por injeção sequencial, do inglês *sequential injection chromatography*
SPE	Extração em fase sólida, do inglês *solid-phase extraction*

T	Transportador
TOF	Tempo de voo, do inglês *time-of-flight*
UHPLC	Cromatografia líquida de ultra eficiência, do inglês *ultra performance liquid chromatography*
V	Válvula seletora de 8 vias
W	Resíduo, do inglês *waste*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 21

1.1. Ácido salicílico em águas naturais 21

1.2. Cromatografia por injeção sequencial 25

1.3. Extração em fase sólida em sistemas de análises em fluxo 27

1.3.1. Pré-concentração na coluna cromatográfica **30**

2. OBJETIVOS 32

3. PARTE EXPERIMENTAL 33

3.1. Materiais e métodos 33

3.1.1. Equipamentos e acessórios **33**

3.1.2. Reagentes e soluções **34**

3.1.3. Sistema de cromatografia por injeção sequencial **35**

4. Resultados e Discussão 37

4.1. Fluorescência do ácido salicílico 37

4.2. Cromatografia por injeção sequencial 39

4.2.1. Fase estacionária **39**

4.2.2. Fase móvel **41**

4.2.3. Otimização dos parâmetros cromatográficos **43**

4.2.4. Características analíticas **48**

4.2.5. Quantificação de AS em águas naturais **53**

5. CONCLUSÕES 55

REFERÊNCIAS 56

1. INTRODUÇÃO

1.1. Ácido salicílico em águas naturais

O ácido salicílico (AS), ou ácido orto-hidroxibenzóico, é encontrado naturalmente em diversas plantas, principalmente na árvore salgueiro, *Salix alba* (da qual herdou seu nome). Atua como fitohormônio e exerce diversas funções no metabolismo das plantas, como na regulação do crescimento e do desenvolvimento e na interação com outros organismos (DURNER; SHAH; KLESSIG, 1997; HAYAT et al., 2010; MALAMY et al., 1990; RASKIN, 1992; SENARATNA et al., 2000; YALPANI et al., 1994). O AS também atua na defesa contra patógenos que afetam as plantas (DURNER; SHAH; KLESSIG, 1997; HAYAT et al., 2010; MALAMY et al., 1990).

O AS pode ser sintetizado pela reação de Kolbe-Schmitt (LINDSEY; JESKEY, 1957) e tem sido utilizado na medicina e na cosmetologia, principalmente como agente queratolítico, destruindo a camada córnea da pele e, assim, eliminando acnes, verrugas e/ou lesões, em um processo conhecido como *peeling* (ARIF, 2015; KORNHAUSER; COELHO; HEARING, 2010; MADAN; LEVITT, 2014; RENDON et al., 2010). Além disso, é usualmente encontrado na urina humana, por ser o principal metabólito do ácido acetilsalicílico, o fármaco mais utilizado no mundo como analgésico, anti-inflamatório e antipirético (LIN; NAKATSUI, 1998; MADAN; LEVITT, 2014; PULGARÍN; MOLINA; ROBLES, 2011; RANDJELOVIĆ et al., 2015).

O uso indevido do AS, seja por ingestão ou absorção cutânea, pode gerar graves problemas à saúde, como o salicilismo, *i.e.* intoxicação por ácido salicílico, que ocorre quando a concentração do íon salicilato no sangue é superior a 350 mg L^{-1}, e cujos sintomas são náuseas, vômito, tontura e dores abdominais. Em casos mais extremos, o salicilismo pode causar a morte (LIN; NAKATSUI, 1998; MADAN; LEVITT, 2014).

Devido ao inadequado descarte de fármacos nos esgotos domésticos e ao fato do AS ser excretado pelo corpo humano por meio da urina (GROOTVELD; HALLIWELL, 1988; HIGNITE; AZARNOFF, 1977), esse composto tem sido encontrado em águas naturais e residuais (GROS et al., 2010; PETRIE; BARDEN; KASPRZYK-HORDERN, 2014; PETROVIĆ; GONZALEZ; BARCELÓ, 2003;

RICHARDSON, 2009). A Tabela 1 lista as concentrações de AS encontradas em diversas regiões do mundo. Por não existir legislação que regulamente a sua concentração nessas matrizes, o AS é considerado um poluente emergente (FARRÉ et al., 2001; RICHARDSON, 2009).

Poluentes emergentes compreendem, principalmente, os produtos usados em larga escala no cotidiano, podendo ser fármacos, cosméticos, tensoativos ou aditivos de uso industrial. Estes contaminantes apresentam efeitos deletérios mesmo com baixo tempo de permanência no ambiente, uma vez que os altos níveis de transformação e remoção são compensados pela sua contínua introdução no meio (PETROVIĆ; GONZALEZ; BARCELÓ, 2003). Desta forma, o monitoramento dos poluentes emergentes é fundamental, bem como o desenvolvimento de processos para seu tratamento, visando reduzir o impacto ambiental. A demanda por métodos analíticos confiáveis para a determinação da concentração dos poluentes nas águas e nos efluentes líquidos é salientada na legislação ambiental brasileira (CONAMA, 2008). Assim sendo, para que concentrações permissíveis de AS em águas naturais possam ser regulamentadas, são necessários métodos analíticos padronizados para a sua determinação.

Tabela 1- Concentrações de AS determinadas em águas naturais e residuárias em diversas regiões do mundo

Região	Método de determinação	Concentração (µg L^{-1})		Referência
		Água natural	Água residual	
Reino Unido	UHPLC-ESI-MS/MS	0,025 - 0,062	0,075 - 0,209	(Kasprzyk-Hordern; Dinsdale; Guwy, 2008)
EUA	LC-ESI-MS/MS	_	0,434 - 8,036	(Spongberg; Witter, 2008)
Itália	LC-ESI-MS/MS	0,007 - 0,205	0,9 - 12,0	(Marchese et al., 2003)
Bélgica	LC-MS/MS	0,011 - 0,855	_	(Wille et al., 2010)
Espanha	LC-ESI-MS	0,018 - 8,800	0,209 - 17,461	(Farré et al., 2001)
Polônia	GC-GC-TOF-MS	_	0,020 - 0,519	(Lacina; Mravcová; Vávrová, 2013)
Canadá	GC-MS	_	2,82 - 12,7	(Lee; Peart; Svoboda, 2005)
Brasil	LC-TOF-MS	1,65 - 4,81	_	(Lopes et al., 2016)

UHPLC: cromatografia líquida de ultra eficiência; LC: cromatografia líquida de alta eficiência; GC: cromatografia gasosa; ESI: ionização por eletronebulização; TOF: tempo de voo; MS espectrometria de massas

Diversas técnicas analíticas têm sido utilizadas para a determinação de ácido salicílico em diversas matrizes, como a espectrofotometria na região UV/vis (CHOCHOLOUŠ et al., 2007; PULGARÍN; MOLINA; ROBLES, 2011), a cromatografia a líquido (BOSCO et al., 2014; FARRÉ et al., 2001; HIGNITE; AZARNOFF, 1977; TAGLIARI et al., 2012) e a espectrofluorometria (BARRIENTOS; BATISTA; ROCHA, 2016; DAMIANI et al., 1995; PAGANI; IBAÑEZ, 2014; PULGARÍN; MOLINA; ROBLES, 2011; SOLICH et al., 2001; STREET; SCHENK, 1981). Porém, os métodos de maior simplicidade instrumental não apresentam sensibilidade e seletividade suficientes para a determinação desta espécie em baixas concentrações e em matrizes complexas, como as tipicamente encontradas em águas naturais. Os métodos utilizados para esse fim são baseados em cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por espectrometria de massas em tandem (KASPRZYK-HORDERN; DINSDALE; GUWY, 2008; LACEY et al., 2008; MARCHESE et al., 2003; WILLE et al., 2010), espectrofotometria no ultravioleta (TAGLIARI et al., 2012) ou fluorescência (PULGARÍN; MOLINA; ROBLES, 2011; SOLICH et al., 2001). Contudo, os métodos cromatográficos requerem instrumentação de custo relativamente alto e procedimentos exaustivos de limpeza (*clean-up*) de amostras e pré-concentração do analito. Já a fluorescência possibilita a utilização de instrumentos de menor custo e de mais simples manuseio, porém requer estratégias para a melhoria de seletividade, caso não seja acoplada à separação cromatográfica.

O ácido salicílico é intrinsicamente fluorescente, com máximos de excitação e emissão nos comprimentos de onda de 299 e 409 nm, respectivamente (CHA; PARK, 1998). A intensidade de fluorescência é dependente do pH, sendo o íon salicilato a espécie fluorescente. Medidas fluorimétricas foram exploradas para a determinação de AS em fármacos (CHOCHOLOUŠ et al., 2007; TAGLIARI et al., 2012), fluidos biológicos (PULGARÍN; MOLINA; ROBLES, 2011) e extratos vegetais, algumas vezes, após separação cromatográfica (BARRIENTOS; BATISTA; ROCHA, 2016). Porém, a fluorescência ainda não foi aplicada à determinação de AS em amostras ambientais, provavelmente por limitações de sensibilidade e seletividade.

1.2. Cromatografia por injeção sequencial

A análise por injeção sequencial (SIA), proposta por Ruzicka e Marshall (1990), consolidou-se no início dos anos 2000 devido à possibilidade de ser aplicada aos mais diversos tipos de amostra, como ambiental (ZHANG; MIRÓ; KOLEV, 2017), farmacêutica (WESOŁY et al., 2016) e alimentos (WIBOWOTOMO; EUN; RHEE, 2017). A alta aplicabilidade deve-se à robustez e versatilidade do módulo de análises, que possibilita a implementação de diversos processos sem a alteração de sua estrutura física, mediante controle por um computador. Desta forma, alterações de volumes de alíquotas, sequência de amostragem, vazões e direções dos fluídos podem ser implementadas (HUCLOVÁ; ŠATÍNSKÝ; KARLÍČEK, 2003). O módulo de análises do sistema SIA consiste, geralmente, em uma única bomba de seringa bidirecional de baixa pressão, uma válvula seletora de múltiplas posições, bobinas de retenção (*holding coil*) e reação e sistema de detecção (HUCLOVÁ; ŠATÍNSKÝ; KARLÍČEK, 2003; RUZICKA; MARSHALL, 1990). Todas as operações relacionadas à manipulação das soluções são automatizadas, minimizando o contato do analista, permitindo minimizar contaminações e aumentando a reprodutibilidade das medidas.

Apesar das vantagens apresentadas pelo sistema SIA, a aplicação à determinação de multicomponentes é limitada, mesmo com a integração de etapas de extração em fase sólida (HUCLOVÁ; ŠATÍNSKÝ; KARLÍČEK, 2003). Em vista disto, a cromatografia por injeção sequencial (SIC) foi proposta por Šatínský et al. (2003), baseando-se no acoplamento de uma coluna para separações cromatográficas a baixa pressão (*e.g.* colunas monolíticas curtas) ao sistema SIA (DAVLETBAEVA et al., 2017). Diferentemente das técnicas cromatográficas convencionais, o SIC baseia-se no fluxo programável das soluções, característico do SIA, que permite a seleção conveniente de volumes de amostra e eluente (ŠATÍNSKÝ et al., 2003). Geralmente, o fluxo programável resulta em baixo consumo de solventes, baixos custos operacionais, baixa geração de resíduos e frequência de amostragem relativamente alta em relação à cromatografia convencional (ŠATÍNSKÝ et al., 2004). Além da determinação de multicomponentes, o desenvolvimento do SIC também possibilitou aplicações analíticas em que a separação do analito da matriz é necessária.

Em decorrência do uso da bomba de seringa, usual em sistemas SIA, os primeiros trabalhos utilizando separação em SIC apresentavam limitações de pressão, na faixa de 150 a 300 psi, mesmo com o uso de colunas monolíticas, restringindo à aplicação de vazões na ordem de 1,2 mL min^{-1} (DAVLETBAEVA et al., 2017; HUCLOVÁ; ŠATÍNSKÝ; KARLÍČEK, 2003). Colunas monolíticas consistem em uma única haste cilíndrica com estrutura sólida e porosa, sendo que os poros (canais do monolito) podem chegar até a 2 µm (DAVLETBAEVA et al., 2017; FARIA et al., 2006). Em comparação com as colunas particuladas, usualmente utilizadas em LC, com tamanho de partícula de 2,7 µm, os poros da coluna monolítica são até 220 vezes maiores, proporcionando menor resistência à passagem das soluções, *i.e.* menor contrapressão. As colunas monolíticas possibilitaram trabalhar com vazões mais elevadas, sem perdas significativas em eficiência de separação, resultando em maiores frequências de amostragem (FARIA et al., 2006). Atualmente, aos sistemas SIC, foram adaptadas bombas de pistão mais resistentes e as mesmas válvulas seletoras utilizadas em LC, possibilitando aumentar o limite de pressão para *ca.* 750 psi e utilizar colunas mais longas, buscando maior eficiência de separação (CHOCHOLOUŠ et al., 2013; DAVLETBAEVA et al., 2017).

Mais recentemente, colunas de núcleo fundido (*fused-core columns*) foram utilizadas em SIC. Essas colunas são recheadas por partículas formadas por um núcleo esférico maciço recoberto por uma fina camada porosa (*e.g.* 0,5 µm), que efetivamente atua como fase estacionária. Devido à espessura da fase estacionária e à uniformidade do tamanho das partículas, melhores separações cromatográficas podem ser atingidas, como é ilustrado pela equação de van Deemter (equação 1).

$$H = A + B/\mu + C\,\mu \qquad (1)$$

Onde H simboliza a altura de um prato e os parâmetros A, B, C e µ representam, respectivamente, os caminhos múltiplos, a difusão longitudinal, a resistência à transferência de massa entre as fases móvel e estacionária e a vazão linear média da fase móvel (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006; VAN DEEMTER; KLINKENBERG; ZUIDERWEG, 1956).

Por apresentarem tamanhos de partículas mais uniformes, o empacotamento das colunas de núcleo fundido é mais efetivo, resultando em menor contribuição do parâmetro A. Além disso, como consequência da menor espessura da fase

estacionária, a transferência de massa da fase móvel para a fase estacionária e vice-versa ocorre mais rapidamente, o que diminui a contribuição do parâmetro C (VAN DEEMTER; KLINKENBERG; ZUIDERWEG, 1956; WU; CLAUSEN, 2007). Desta forma, as separações cromatográficas com colunas de núcleo fundido em sistemas SIC podem ser mais eficientes (BATISTA et al., 2015).

1.3. Extração em fase sólida em sistemas de análises em fluxo

A preparação da amostra é crucial em análises químicas e, muitas vezes, envolve procedimentos elaborados e demorados, que chegam a demandar 80% do tempo total das análises (BUSZEWSKI; SZULTKA, 2012). Este tratamento prévio da amostra pode incluir os mais distintos processos, desde os mais simples, como diluição, filtração e centrifugação, até os mais complexos, como limpeza de amostra e pré-concentração do analito. Além disso, a importância deste processo não pode ser subestimada, pois os erros que ocorrerem nesta etapa serão propagados no resultado final. Desta forma, antes de uma aplicação bem sucedida dos métodos cromatográficos, a extração é normalmente necessária para separar o(s) analito(s) dos componentes da matriz e enriquecê-los, a fim de atingir níveis apropriados para a técnica de detecção utilizada (CALDERILLA et al., 2018; PŁOTKA-WASYLKA et al., 2016; WASIK; KOT-WASIK; NAMIESNIK, 2016). Portanto, a seleção do método apropriado de preparo de amostras é fundamental para o sucesso da análise química.

A extração em fase sólida (SPE), proposta por Braus, Middleton e Walton, (1951), é uma das técnicas mais utilizadas na preparação de amostras, especialmente em procedimentos cromatográficos, para a limpeza de amostras e para o aprimoramento da sensibilidade analítica, seletividade ou ambos (BUSZEWSKI; SZULTKA, 2012). De maneira geral, a SPE envolve a transferência do(s) analito(s) de uma amostra líquida para um sorvente sólido com subsequente eluição. Esta técnica usualmente envolve quatro etapas (CAMEL, 2003; JARDIM, 2010): 1) condicionamento do sorvente com um solvente apropriado, 2) introdução da amostra para a retenção do(s) analito(s) e/ou espécies interferentes, 3) lavagem do sorvente para a eliminação da solução nos espaços intersticiais e 4) eluição do(s) analito(s).

Quando a SPE é realizada em batelada, condições de equilíbrio devem ser atingidas em todas as etapas, demandando tempo e elevados volumes de solventes orgânicos. Visando minimizar esses efeitos, estratégias simplificadas são adotadas na prática, como realizar duas etapas em conjunto (*e.g.* etapas 2 e 3). Isso é possível quando a SPE é automatizada, por exemplo em sistemas em fluxo, que envolvem a interação transiente da zona de amostra com o sorvente e a lavagem deste dá-se quando há a passagem do fluído transportador pelo sorvente. Além disso, na SPE em fluxo, os intervalos de tempo disponíveis para os processos físico-químicos envolvidos são altamente reprodutíveis, permitindo o desenvolvimento de métodos analíticos em que as condições de equilíbrio não precisam ser atingidas (ROCHA et al., 2018). Consequentemente, extrações não exaustivas podem ser executadas com precisão.

A SPE pode ser implementada em diferentes configurações em sistemas de análises em fluxo, usualmente utilizando uma mini-coluna recheada com partículas do material adsorvente. Esta mini-coluna pode ser posicionada antes, depois ou na posição da alça de amostragem, de acordo como a aplicação analítica. Quando se encontra posicionada antes da alça de amostragem, possibilita a remoção de espécies interferentes previamente à injeção, mas requer um adsorvente com capacidade de sorção elevada e/ou a substituição/regeneração periódica deste. A mini-coluna posicionada no injetor permite realizar a introdução da amostra e a limpeza do sorvente na mesma etapa, mas implica em maior gasto de eluente (ROCHA et al., 2018). O posicionamento após o injetor é explorado para a retenção de espécies interferentes ou pré-concentração do analito, neste caso requerendo a introdução posterior de um eluente apropriado.

Estratégias alternativas à SPE convencional têm sido propostas em sistemas de análises em fluxo, como as técnicas de *optosensing* (espectrometria em fase sólida), *bead injection* e leito fluidizado.

A espectrometria em fase sólida consiste na medida das espécies adsorvidas diretamente no suporte sólido, sendo esta realizada por espectrofotometria (por transmissão ou reflexão), por espectrometria vibracional (Raman ou infravermelho) ou por luminescência, *i.e.* espectrofluorescência ou quimiluminescência (ROCHA; RAIMUNDO; TEIXEIRA, 2011). Esta estratégia possibilita aumentar a sensibilidade devido ao acúmulo do analito na fase sólida e pelas medições serem realizadas antes da etapa de eluição, evitando a diluição intrínseca observada nos procedimentos convencionais de SPE. Outras vantagens incluem redução do consumo de reagentes e da geração de resíduos, bem como melhoria em seletividade (LLORENT-MARTINEZ et al., 2015). Por outro lado, o aumento da contrapressão devido à presença de partículas sólidas na cela de fluxo pode limitar as vazões ou a quantidade de adsorvente a serem utilizadas.

Uma variante da espectrometria em fase sólida, a estratégia *bead injection* envolve a manipulação de uma suspensão de partículas (comumente de material polimérico) em um sistema de análises em fluxo, sendo usualmente utilizada em espectrofotometria UV-vis. Geralmente, um reagente cromogênico seletivo é previamente adsorvido nas partículas, visando promover uma reação colorimétrica com o analito, e o sorvente é retido numa cela específica (conhecida como *jet-ring cell*). Dessa forma, a extração, reação e detecção são realizadas em linha (RUZICKA; SCAMPAVIA, 1999). O processamento da amostra e sorvente em suspensão favorece a retenção do analito (ou de espécies potencialmente interferentes), evita problemas de formação de caminhos preferenciais e contrapressão. Após a medida, as partículas são descartadas ou renovadas, evitando, assim, problemas de contaminação e de retenção irreversível de analito (OLIVEIRA et al., 2000; RUZICKA, 2005). Por outro lado, isso envolve maior consumo de sorvente, o que implica em maiores custo e geração de resíduos. Uma variante do processo *bead injection* consiste na exploração analítica de (nano)partículas magnéticas que podem ser dispersas na amostra e removidas mediante à aplicação de um campo magnético (CALDERILLA et al., 2018).

A técnica de leito fluidizado refere-se à conversão de um material sólido particulado de um estado estático para um fluido/dinâmico, com o objetivo de melhorar a interação sólido-líquido (ROCHA et al., 2018). Dessa forma, também são evitados os problemas com a formação de caminhos preferenciais e de aumento da

contrapressão. Em análises em fluxo, as formas mais usuais de fluidização do adsorvente envolvem borbulhamento com ar ou fluxos pulsados, como aqueles gerados por bombas solenoide. Contudo, as partículas também podem ser fluidizadas por sonicação ou quando são utilizadas partículas magnéticas e um campo magnético alternado é aplicado à câmara que contém o material sólido (DIAS et al., 2018).

1.3.1. Pré-concentração na coluna cromatográfica

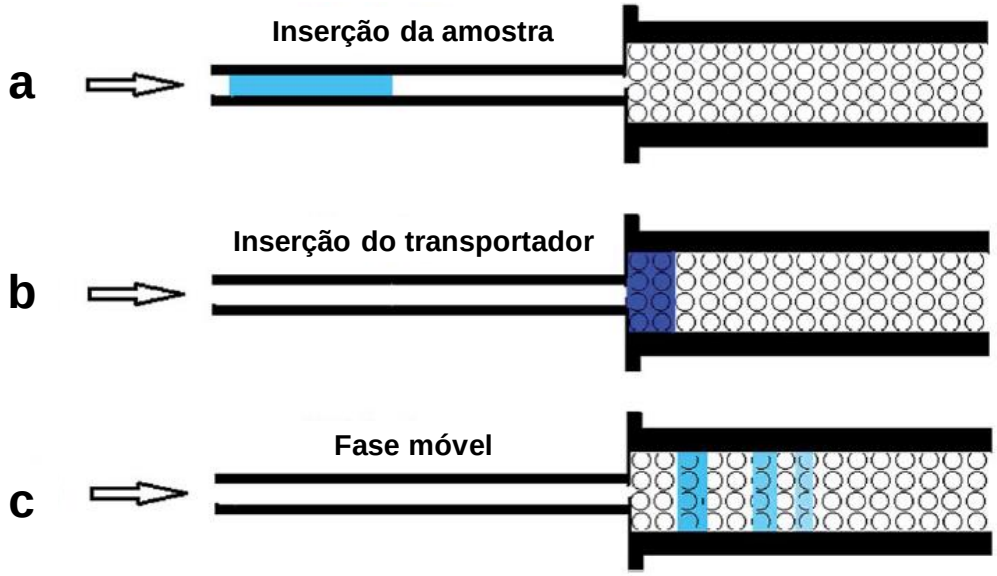
Em cromatografia líquida, tem sido cada vez mais usual a implementação em linha da SPE antes da coluna cromatográfica, devido à redução de tempo, e pelos solventes tipicamente utilizados para eluição em SPE (*e.g.* metanol) serem compatíveis com o modo de separação final (LISKA, 2000). Usualmente, mini-colunas com comprimento de 5-20 mm e diâmetro de 2-4 mm, recheadas com um sorvente adequado, são utilizadas para a etapa de SPE em linha (ZWIR-FERENC; BIZIUK, 2006). De fato, essa estratégia tem sido destacada como uma das tendências na área de análises em fluxo (ROCHA, 2018).

A SPE em linha tem sido explorada para a limpeza da amostra e/ou pré-concentração do analito e a seletividade é assegurada pela separação cromatográfica posterior. Contudo, um sistema de análises em fluxo e um cromatógrafo ou, alternativamente, um sistema SIC com duas válvulas seletoras (BATISTA et al., 2015) são necessários para realizar as etapas de preparo de amostra e de separação cromatográfica separadamente. Visando integrar essas etapas, foi proposta a pré-concentração diretamente na coluna cromatográfica (*on-column preconcentration*). Em condições apropriadas, a sensibilidade deve aumentar com o volume da amostra inserida. Em um dos primeiros trabalhos, essa estratégia foi explorada para a determinação de lantanídeos em óxido de cério (Kubáň, Jančářová e Šulová, 1992); volumes de amostra entre 0,1 e 12 mL foram avaliados, resultando em fatores de enriquecimento na ordem de 100. Mais recentemente, Batista e Rocha (2015) demonstraram a aplicabilidade da pré-concentração em coluna em sistemas SIC para a determinação de parabenos.

A proposta, que consiste na única encontrada na literatura referente à pré-concentração em coluna cromatográfica em SIC, resultou em fatores de enriquecimento na faixa de 405 a 435, utilizando 5 mL de amostra.

A estratégia de pré-concentração do(s) analito(s) na coluna cromatográfica pode ser aplicada quando os analitos possuírem altos fatores de retenção sendo recomendados k' > 20 (RUIZ-JIMÉNEZ; LUQUE DE CASTRO, 2007). Esse parâmetro cromatográfico refere-se à razão entre as quantidades de moléculas do(s) analito(s) retidas na fase estacionária em relação às que estão percorrendo a coluna (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006). Com este objetivo, utiliza-se um transportador de amostra com baixa força de eluição (*e.g.* soluções aquosas em cromatografia em fase reversa). Neste caso, quando a amostra é injetada na coluna, ocorre a concentração do(s) analito(s) no topo da coluna, bem como sua limpeza, sendo que uma fase móvel apropriada possibilita a separação cromatográfica posterior, sem perda de resolução (BATISTA; ROCHA, 2015). A Figura 1 ilustra o processo descrito. Quando os fatores de retenção não forem elevados, o(s) analito(s) se dispersarão ao longo da coluna, proporcionando alargamento de banda e comprometendo a resolução cromatográfica.

Figura 1- Representação esquemática da pré-concentração em coluna: (a) carregamento da amostra; (b) concentração do(s) analito(s) no topo da coluna e (c) separação cromatográfica. Adaptada de Batista e Rocha (2015).



2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um procedimento analítico alternativo para a determinação de AS em águas. Considerando que os procedimentos usuais envolvem a extração e pré-concentração do analito e limpeza da amostra com solventes orgânicos, separação cromatográfica e determinação em equipamentos de alta complexidade e alto custo, os objetivos específicos foram desenvolver:

(i) um procedimento de pré-concentração do analito diretamente na coluna cromatográfica;

(ii) um procedimento de separação e determinação de AS utilizando a cromatografia por injeção sequencial com detecção fluorimétrica, a fim de atingir simplicidade e rapidez, além de reduzir custos, consumo de reagentes e a geração de efluentes.

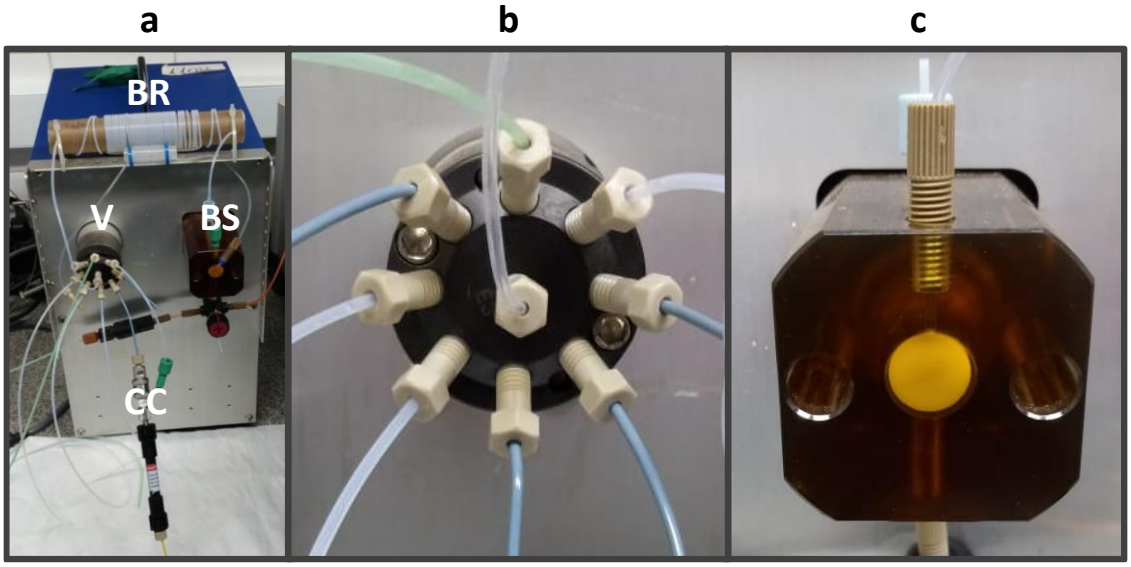
3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Materiais e métodos

3.1.1. Equipamentos e acessórios

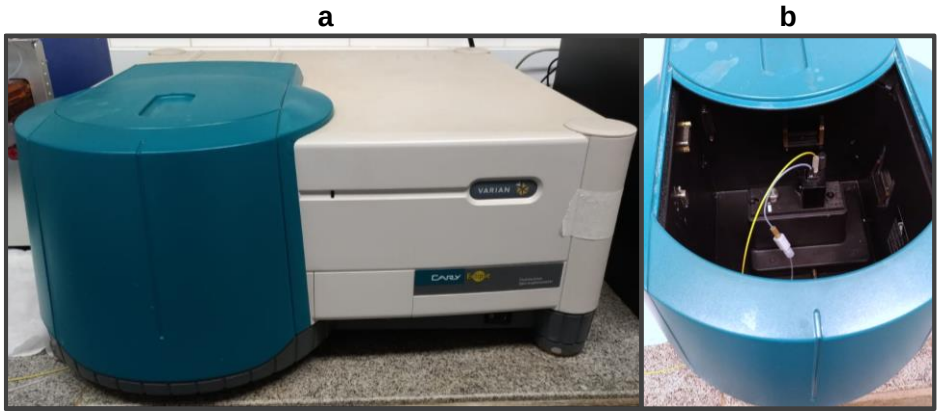
As separações cromatográficas foram realizadas em um sistema de cromatografia por injeção sequencial SIChromTM (FIAlab Instruments®), Figura 2a. Este equipamento é composto por uma válvula seletora de oito portas construída em aço inox (C5H, Valco Instrument Co.), Figura 2b, e por uma bomba tipo seringa com reservatório de 4,0 mL (Figura 2c). O sistema foi controlado por um computador por meio de um programa fornecido pela FIALab® (FIAlab 5.9®). Tubos PEEK com 0,25 e 0,5 mm de diâmetro foram utilizados nas conexões dos frascos das soluções com a válvula seletora, conexões entre a válvula, coluna cromatográfica e cela de detecção e construção da bobina de retenção (*holding coil*), com volume de 2,0 mL. Uma válvula de segurança foi utilizada para garantir que a pressão interna do sistema não ultrapassasse 500 psi evitando, assim, danos à seringa. Nas separações cromatográficas, foram utilizadas uma coluna monolítica (Onyx™ Phenomenex® C18, 50,0 mm x 4,6 mm) acoplada a uma coluna de guarda (Onyx™ Phenomenex® C18, 5,0 mm x 4,6 mm).

Figura 2- Fotografias do sistema SIC. (a) Visão geral do equipamento, com a bobina de retenção (BR), válvula seletora (V), bomba de seringa (BS), válvula de segurança, coluna de guarda e coluna cromatográfica (CC). (b) Válvula seletora de oito vias. (c) Bomba de seringa com capacidade de 4,0 mL.



As medidas de fluorescência foram realizadas em um espectrofluorímetro Cary Eclipse (Varian) equipado com uma cubeta de fluxo de quartzo com 10 mm de caminho ótico e volume de 40 µL. A Figura 3 refere-se às visões externa e do compartimento da cela de fluxos do espectrofluorímetro.

Figura 3- Fotografias do espectrofluorímetro. (a) Visão do equipamento fechado. (b) Visão do equipamento aberto, com detalhe da cela de fluxo



Para o preparo das soluções, utilizou-se uma balança analítica (AX 304, Mettler Toledo) e um pHmetro digital (2mp, TEC). Tubos graduados de polietileno tipo Falcon® de 15 e 50 mL foram utilizados para a preparação e armazenamento das amostras e demais soluções a 4 ºC.

3.1.2. Reagentes e soluções

As soluções foram preparadas com reagentes de grau analítico (Merck), solventes grau HPLC (Merck) e água ultrapura (resistividade > 18,2 MΩ cm).

Ácido salicílico foi utilizado para o preparo da solução estoque 1,000 g L^{-1}, sendo as soluções de referência (0,25 a 5,00 µg L^{-1}) obtidas a partir de diluições em água com pH ajustado a 2,0 com ácido clorídrico. Acetato de sódio e ácido clorídrico 2,0 mol L^{-1} foram utilizados para a preparação de tampão acetato 0,2 mol L^{-1}, pH 5,0. O transportador foi uma solução 0,01 mol L^{-1} HCl e a fase móvel foi uma solução 5:95 %(v/v) de acetonitrila/tampão acetato (0,2 mol L^{-1}, pH 5,0). Essas soluções foram filtradas a vácuo através de filtro 0,45 µm (Hydrophilic PVDF, Millipore Millex – HV) previamente ao uso. Acetonitrila foi também utilizada para a limpeza da coluna cromatográfica.

As amostras de águas naturais foram coletadas de rios da região de Piracicaba, no Estado de São Paulo, filtradas a vácuo através de filtro 0,22 µm (Hydrophilic PVDF, Millipore Millex – HV) e acidificadas a pH 2,0. As amostras foram imediatamente analisadas ou congeladas a -6 °C para a preservação, sendo estabilizadas à temperatura ambiente no momento da análise.

3.1.3. Sistema de cromatografia por injeção sequencial

As soluções de referência e as amostras foram acidificadas com ácido clorídrico a pH 2,0, favorecendo a retenção do ácido salicílico na fase estacionária utilizada (fase reversa). Para a pré-concentração na coluna, separação cromatográfica e determinação fluorimétrica, o sistema SIC (Figura 4) foi operado de acordo com a rotina descrita na Tabela 2. As medidas fluorimétricas foram realizadas com comprimentos de onda de excitação e emissão de 295 e 410 nm, respectivamente, com fendas de excitação e emissão correspondentes à resolução espectral de 20 nm, com o objetivo de maximizar a sensibilidade. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e as medidas foram baseadas em área de pico cromatográfico.

As soluções de referência e amostras foram mantidas em tubos tipo Falcon® de 15 mL. Durante as medidas, os tubos foram abertos e vedados com filme polimérico (Parafilm® M, Merck) para evitar contaminação por poeira no ambiente e a diminuição da pressão interna com a retirada de alíquotas das soluções.

Figura 4- Diagrama do módulo de análises do sistema de cromatografia por injeção sequencial para a determinação de AS em amostras de águas. A: amostra; FM: fase móvel; T: transportador; W: recipiente de descarte; V: válvula seletora; BR: bobina de retenção (*holding coil*); BS: bomba de seringa; CC: coluna cromatográfica; D: espectrofluorímetro.

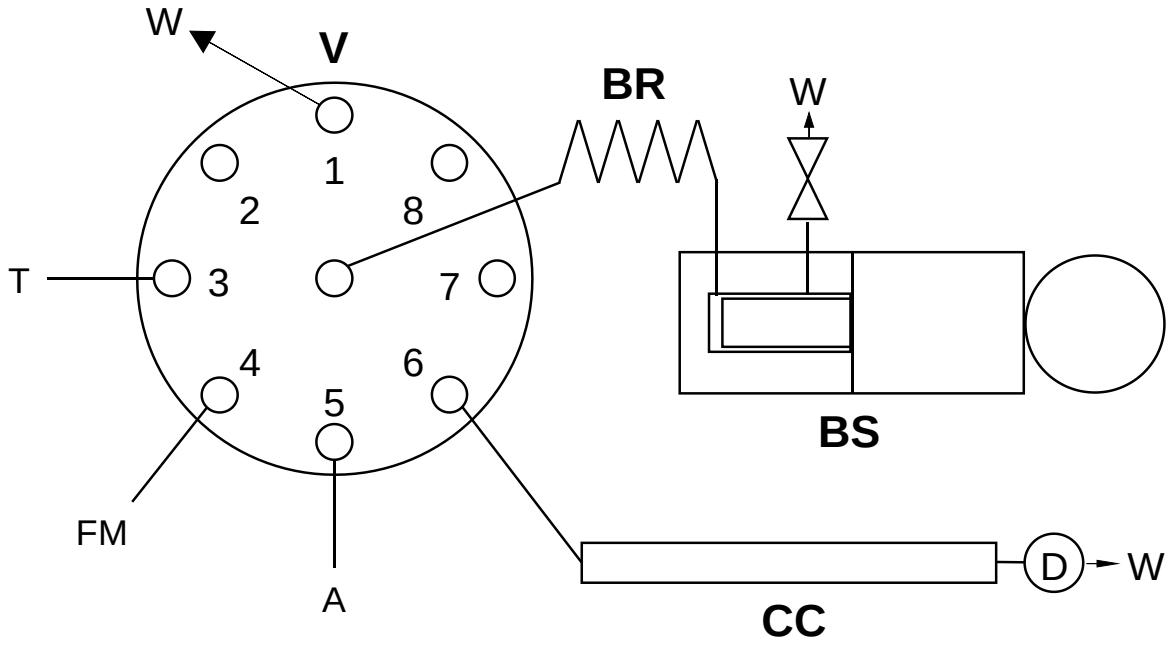


Tabela 2- Rotina analítica do sistema de injeção sequencial para a determinação de AS em águas naturais com pré-concentração na coluna.

Etapa	Ação	Porta da válvula	Volume (µL)	Vazão (µL s^{-1})
1	Aspiração do transportador	3	250	50
2	Aspiração da amostra	5	1750	50
3	Transporte da zona de amostra para a coluna cromatográfica	6	2000	25
4	Aspiração da fase móvel	4	3000	50
5	Transporte da fase móvel e eluição	6	3000	9

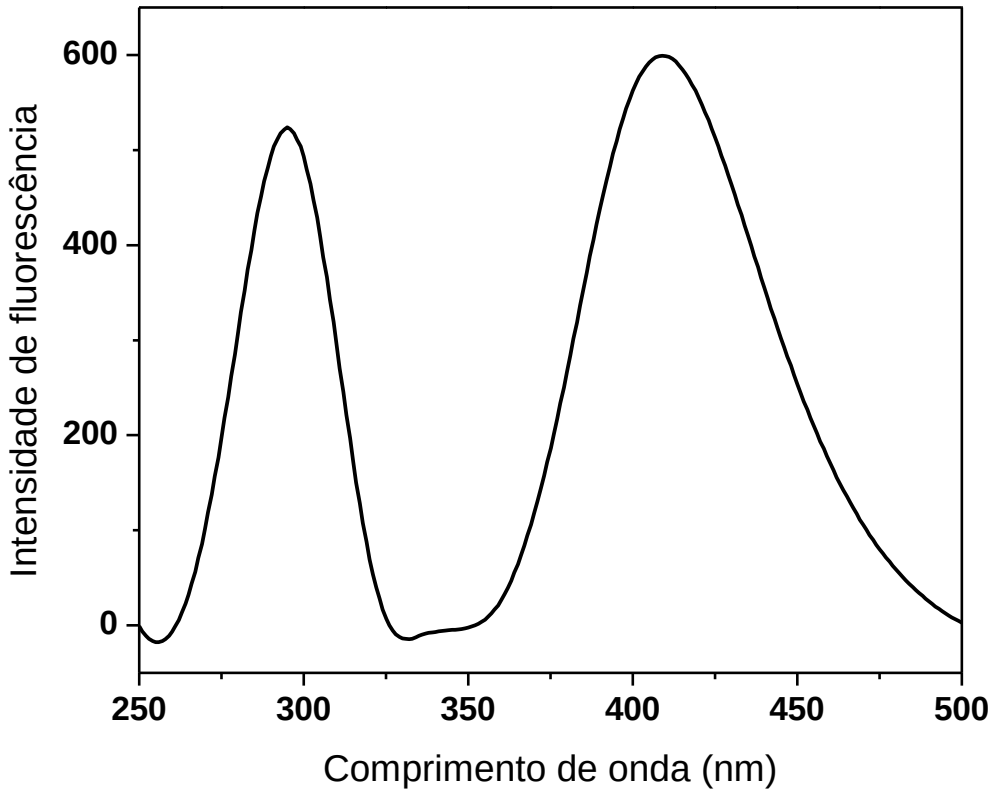
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Fluorescência do ácido salicílico

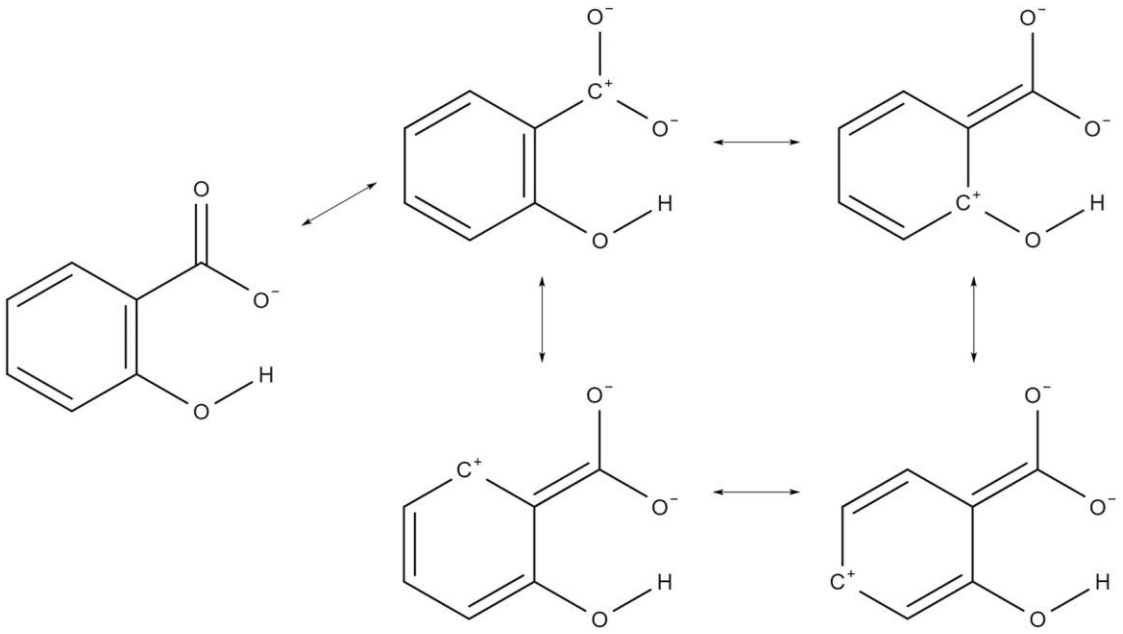
A detecção do analito nas amostras foi baseada na medida da fluorescência intrínseca do íon salicilato, a fim de evitar-se a derivação química do ácido salicílico. Consequentemente, a separação cromatográfica torna-se imprescindível, uma vez que águas naturais são matrizes complexas e podem conter outros compostos com fluorescência em região espectral próxima à do salicilato (*e.g.* ácidos fúlvidos (SENESI, 1990)) ou espécies supressoras de fluorescência, que podem causar interferências.

Com o objetivo de maximizar a sensibilidade para a detecção de AS por fluorescência, foram avaliadas as características espectrais e o efeito da acidez da solução. Os espectros de excitação e emissão de fluorescência do AS (Figura 5) são concordantes com os encontrados na literatura (CHA; PARK, 1998), sendo que os comprimentos de onda de excitação e de emissão utilizados em todos os experimentos deste trabalho foram 295 nm e 410 nm, respectivamente.

Figura 5- Espectros de excitação (esquerda) e emissão (direita) de fluorescência do AS, obtidos com fendas de excitação e emissão com resolução espectral de 20 nm. Solução de AS 15 µg L^{-1} em pH 6,5



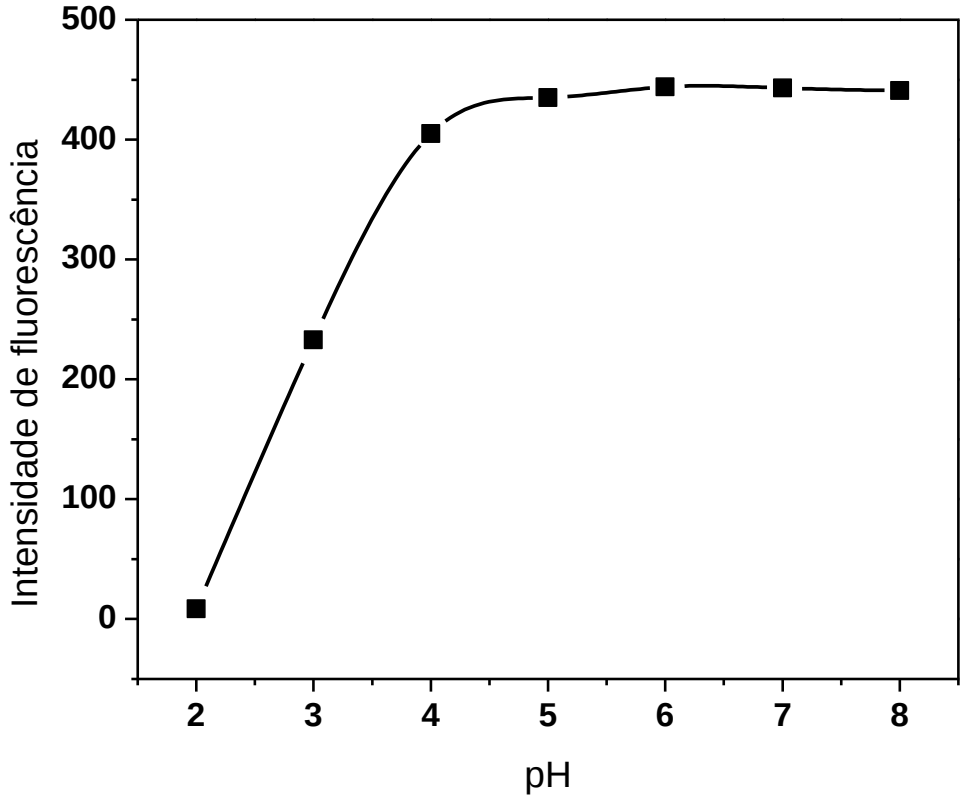
Dentre os fatores que podem afetar o rendimento quântico de fluorescência do AS, o efeito da acidez do meio se destaca, pois somente o ânion salicilato é fluorescente. Por outro lado, a retenção em colunas cromatográficas de fase reversa é favorecida com o analito na forma ácida (*i.e.* não dissociada). Neste sentido, a detecção fluorimétrica de AS foi baseada na forma desprotonada do analito, em pH acima de 2,98 (pKa do ácido salicílico). Devido à estrutura química deste íon e à carga negativa concentrada na carboxila, as formas de ressonância (equação 2) apresentadas possibilitam transições eletrônicas do tipo n→π* (SKOOG et al., 2014), que geram fluorescência em comprimentos de onda na região visível (400 nm a 750 nm). No caso do íon salicilato, a energia necessária para a promoção dos elétrons do nível n ao nível π* corresponde a comprimentos de onda em torno de 295 nm, enquanto a fluorescência ocorre em comprimentos de onda em torno de 410 nm.



(2)

O ácido salicílico, pelo contrário, não apresenta fluorescência devido ao próton presente na carboxila. Desta forma, há menos transições eletrônicas n→π e mais π →π*, fazendo com que o comprimento de onda da energia liberada seja menor e não entre na faixa do espectro visível. Os resultados deste fenômeno podem ser observados na Figura 6, onde é apresentado o efeito do pH sobre a intensidade de fluorescência do salicilato/ácido salicílico.

Figura 6- Efeito do pH sobre a intensidade de fluorescência do AS. Fluorescência em 410 nm medida com solução de AS 10 µg L^{-1}, com excitação em 295 nm. Fendas de excitação e emissão com resolução espectral de 20 nm



4.2. Cromatografia por injeção sequencial

4.2.1. Fase estacionária

As condições operacionais do sistema SIC foram otimizadas com o objetivo de pré-concentrar o analito no topo da coluna cromatográfica e permitir a eficiente separação da matriz, tendo em vista os baixos teores de AS esperados nas amostras e a alta complexidade da matriz. Desta forma, avaliou-se a fase estacionária mais apropriada, os efeitos das composições do transportador e da fase móvel (eluição isocrática), o volume de amostra e as vazões da zona de amostra e do eluente.

Em relação à coluna cromatográfica, a escolha foi baseada tanto nas propriedades do analito e da fase estacionária, quanto nas restrições de pressão da bomba tipo seringa do sistema SIC (limite de 500 psi). Devido à necessidade de pré-concentração do analito, optou-se por trabalhar em cromatografia em fase reversa. Neste contexto, a forma protonada do AS interagiria mais efetivamente com a fase

estacionária (apolar), enquanto a forma desprotonada, o ânion salicilato, deveria ser prontamente eluída pela fase móvel (polar). Desta forma, três fases estacionárias distintas foram avaliadas, *i.e.* monolítica C18 (50 mm x 4,6 mm) e particuladas de núcleo fundido Fenil-hexil e RP-amida (30 mm x 4,6 mm, 2,7 µm). A melhor fase estacionária seria a que apresentasse altos fatores de enriquecimento e baixo alargamento de pico na etapa de pré-concentração, *i.e.* k' mais elevados. Os cromatogramas obtidos e os respectivos valores de área e largura de pico são apresentados na Figura 7 e na Tabela 3, respectivamente.

Figura 7- Cromatogramas obtidos com colunas (a) monolítica C18, (b) particulada Fenil-hexil e (c) particulada RP-amida, para a determinação de AS. Solução de AS 30 µg L^{-1}, 1750 µL de amostra injetada, vazão de 10 µL s^{-1} nas etapas de pré-concentração e de eluição e fase móvel composta por tampão aquoso e acetonitrila 93:7 v/v

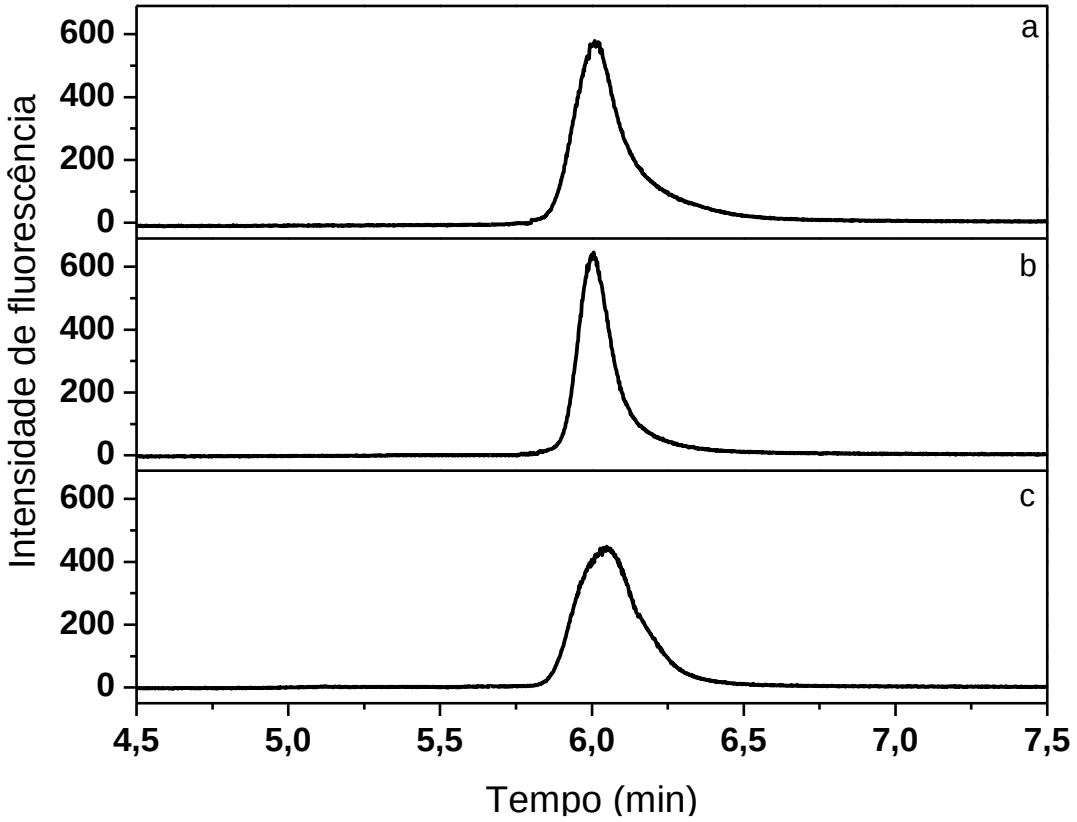


Tabela 3- Áreas e larguras de pico e respectivos coeficientes de variação (n=3) referentes ao processamento da solução de AS 30 µg L^{-1} nas colunas cromatográficas avaliadas

Coluna	Área de pico	CV da área (%)	Largura de pico (min)	CV da largura (%)
Monolítica C18	112,4	0,82	0,712	0,22
Particulada Fenil-hexil	92,2	0,12	0,640	1,34
Particulada RP-amida	104,2	5,64	0,747	4,55

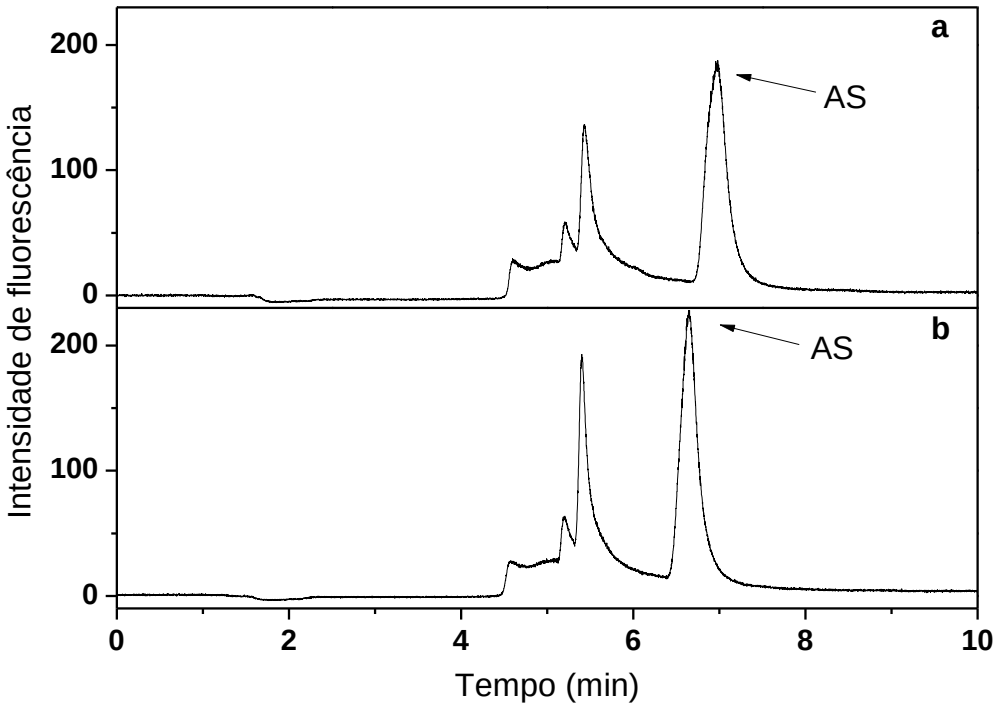
Mesmo com um alto valor de área, o pico cromatográfico gerado a partir da separação pela coluna particulada de RP-Amida apresentou o maior alargamento dentre as três colunas avaliadas e os maiores valores de coeficiente de variação, como observado na Tabela 3. As colunas monolíticas de C18 e particulada de Fenil-hexil apresentaram os melhores desempenhos, com picos mais estreitos e melhor precisão dos dados obtidos. Porém, a coluna de núcleo fundido com Fenil-hexil (tamanho de partícula de 2,7 µm e tamanho de poro de 0,009 µm (SIGMA-ALDRICH, 2019) proporcionou altas pressões de trabalho, até mesmo quando baixas vazões eram utilizadas. Desta forma, o limite de pressão de 500 psi estabelecido pela seringa do SIC era eventualmente ultrapassado e a válvula de segurança era acionada. Já a coluna monolítica de C18 proporcionou pressões de trabalho inferiores ao limite estabelecido pelo sistema, uma vez que o tamanho de seus poros varia de 0,013 a 2 µm (PHENOMENEX, 2019). Devido aos fatores citados acima, os estudos posteriores foram realizados com a coluna monolítica de C18.

4.2.2. Fase móvel

Visando minimizar a viscosidade, uma mistura de tampão aquoso de ácido acético/acetato com acetonitrila foi escolhida para a eluição isocrática do analito. Soluções aquosas de etanol e metanol, que poderiam ser alternativamente utilizadas, apresentam maiores viscosidades e, portanto, ocasionam maiores contrapressões em cromatografia a líquido (COLIN et al., 1978; KHATTAB et al., 2012). Esse efeito é particularmente crítico em SIC, pois a pressão limite de 500 psi pode ser ultrapassada mesmo com vazões baixas.

Partindo de estudos relatados na literatura, referentes à separação de ácido salicílico de extratos vegetais (BARRIENTOS; BATISTA; ROCHA, 2016), duas proporções entre tampão aquoso e acetonitrila foram avaliadas (Figura 8). Observa-se que o pico do ácido salicílico é mais alto e estreito para a fase móvel que contém 7% v/v de ACN (Figura 8b), além de possuir tempo de retenção menor em relação à fase móvel com 5% v/v de ACN. Esses resultados estão de acordo com o esperado em cromatografia em fase reversa e devem-se à maior força de eluição proporcionada pelo eluente mais rico em solvente orgânico. Contudo, as duas condições forneceram picos cromatográficos com áreas semelhantes ($A^{5\%ACN}$ = 49,2 ± 0,2 e $A^{7\%ACN}$ = 51,1 ± 0,2).

Figura 8- Influência do teor de ACN na fase móvel para a separação cromatográfica de AS em uma amostra de água natural adicionada com 2,5 µg L^{-1} do analito: (a) 5% v/v e (b) 7% v/v de ACN. As condições cromatográficas foram aquelas descritas na Tabela 2



A partir dos resultados apresentados na Figura 8, o tempo de retenção e a largura da base do pico foram estimados graficamente para o cálculo dos parâmetros cromatográficos: fator de retenção (k'), fator de separação (α), número de pratos (N) e resolução (R_s). Os valores são apresentados na Tabela 4. Com ambas as fases móveis, a resolução calculada indica que os picos foram separados suficientemente para fins quantitativos, já que apresentam valores iguais ou superiores a 1,25 (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006). Porém, a fase móvel

com menor concentração de acetonitrila apresentou maior eficiência cromatográfica (número de pratos) e possibilita o menor consumo do solvente orgânico, equivalente a 60 µL a menos por determinação em relação à fase móvel com 7% v/v de acetonitrila.

Tabela 4- Parâmetros cromatográficos estimados para as duas fases móveis avaliadas

Teor de ACN % v/v	k'	α	N	R_S
5,0	6,97	1,29	1211	1,78
7,0	6,65	1,23	941	1,25

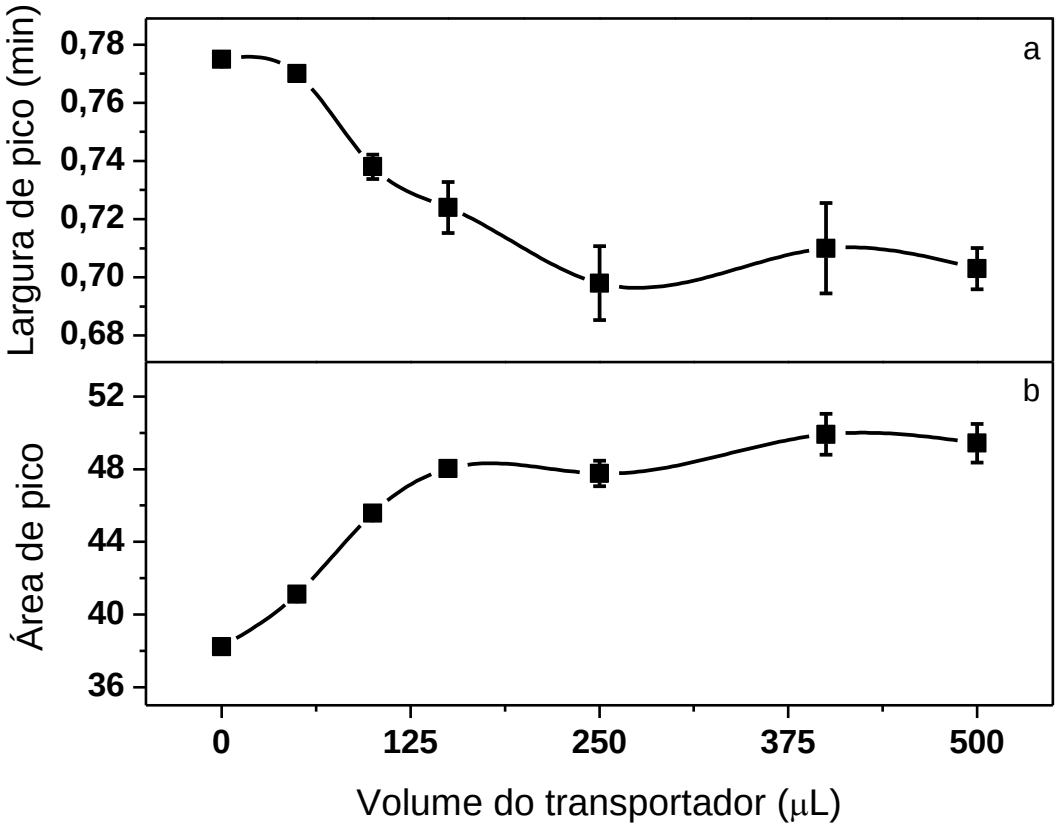
k': fator de retenção; α: fator de separação; N: número de pratos; R_S: resolução cromatográfica

4.2.3. Otimização dos parâmetros cromatográficos

Visando melhorar a retenção do analito na fase estacionária e minimizar o alargamento de pico na etapa de pré-concentração, foram avaliados os efeitos dos volumes de transportador e da amostra e as vazões nas etapas de inserção de amostra e eluição.

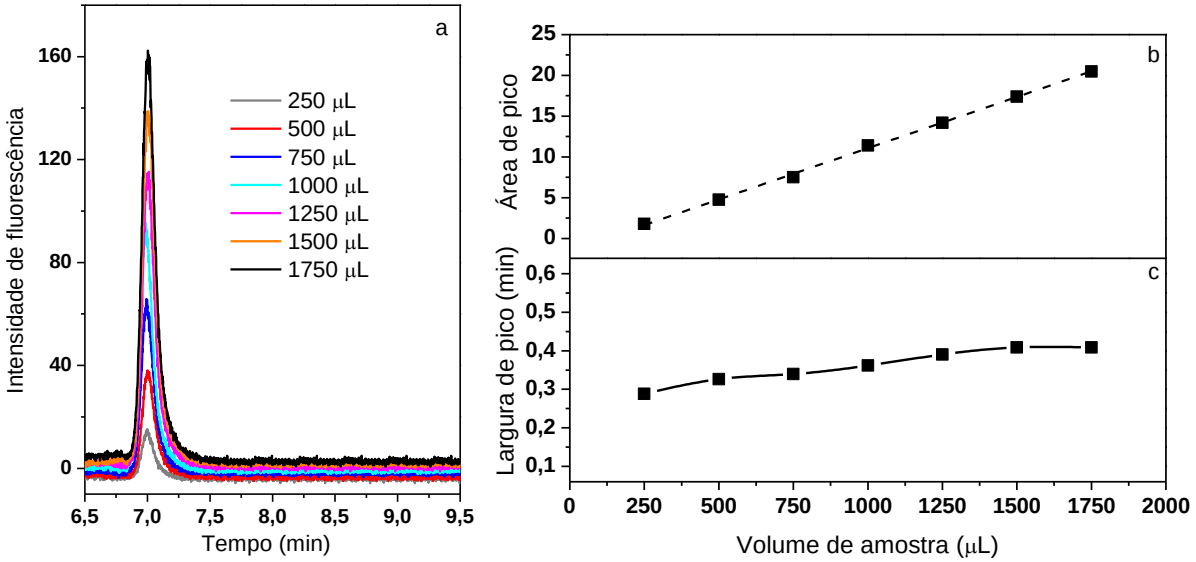
O volume de transportador afeta diretamente a interação entre a fase móvel e a alíquota da amostra injetada. Pequenos volumes de transportador implicam em maior sobreposição das zonas de eluente e de amostra, o que afetaria a eficiência de pré-concentração e dificultaria a separação cromatográfica devido ao alargamento de pico. Por outro lado, volumes excessivos de transportador diminuem o volume de amostra que pode ser injetado, limitado pelos volumes da bobina de retenção e da seringa da bomba propulsora. Desta forma, foi avaliado o mínimo volume necessário do transportador para minimizar o efeito de sobreposição das zonas de amostra e eluente (Figura 9). É possível observar a diminuição da largura e aumento da área com volume de transportador; a partir de 250 µL de transportador, não há alterações significativas de área ou largura de pico, indicando que a sobreposição das zonas de amostra e eluente é negligenciável.

Figura 9- Efeito do volume do transportador sobre a largura (a) e a área (b) de pico. Resultados referentes a médias de três replicatas. Solução de AS 5 µg L^{-1}. Exceto pelo volume do transportador, as condições cromatográficas foram aquelas descritas na Tabela 2



O volume da amostra afeta diretamente o fator de pré-concentração e, portanto, a sensibilidade. Assim sendo, levando em consideração a limitação de volume da bobina de retenção (2,0 mL) e o volume definido de transportador, avaliou-se volumes de amostra até 1750 µL (Figura 10a). De fato, foi observado um aumento de sinal analítico proporcional ao volume injetado (Figura 10b), R^2 = 0,999. Além de ser um indicativo da eficiência do procedimento, este resultado também indica que o volume de *breakthrough* (BIELICKA-DASZKIEWICZ; VOELKEL, 2009; FANG, 1993) da coluna não foi alcançado, o que indica a possibilidade de aumentar a sensibilidade do método ao ampliar o volume utilizado de amostra. Além disso, apesar de uma ampla faixa de volumes ter sido avaliada, houve pouca influência na largura de pico (Figura 10c).

Figura 10- Influência do volume de amostra injetada na coluna cromatográfica. (a) Cromatogramas obtidos com volumes de 250 a 1750 µL de solução de AS 1 µg L^{-1}, seguindo as condições cromatográficas descritas na Tabela 2. Influência do volume injetado na área (b) e na largura (c) de pico

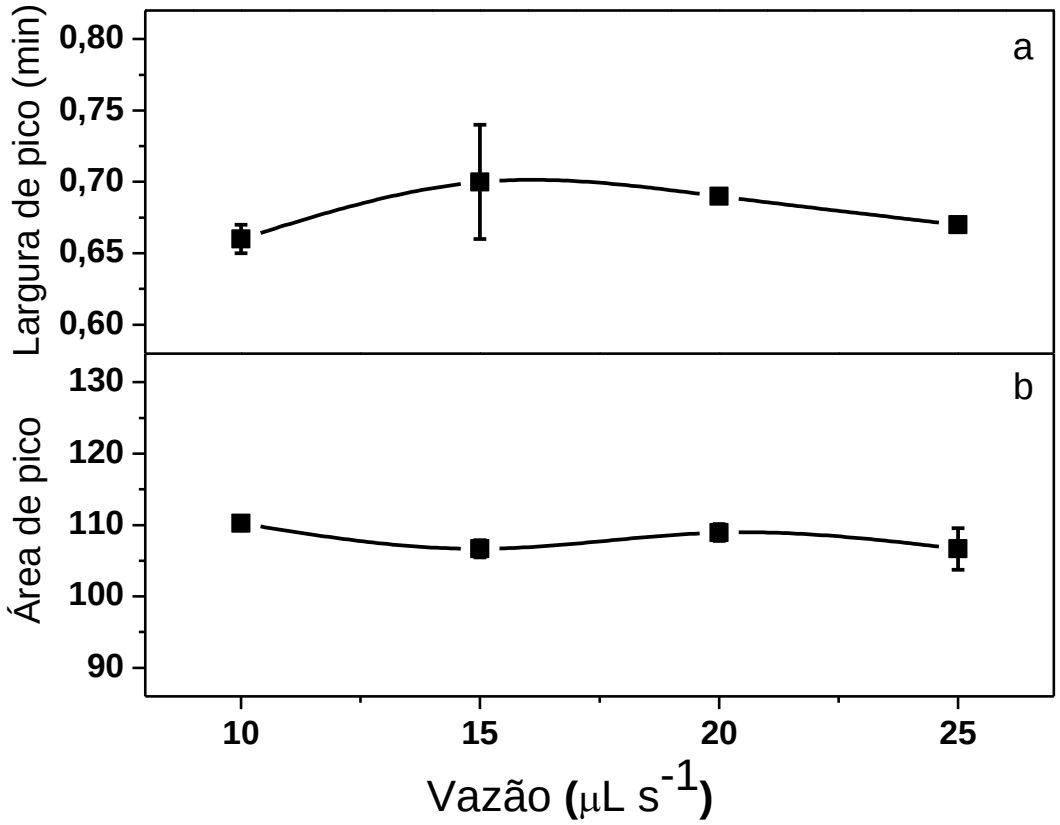


A vazão é um importante parâmetro a ser avaliado em cromatografia, pois afeta diretamente a interação do analito com a fase estacionária, podendo afetar a resolução. Os efeitos envolvidos são descritos pela equação de van Deemter (equação 1), a qual trata da dependência da altura de prato (H) com a velocidade linear (µ), que é diretamente proporcional à vazão. A altura de prato é a constante de proporcionalidade entre a variância da banda cromatográfica e o comprimento da coluna e, portanto, menor altura de prato equivale à maior eficiência de separação cromatográfica (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006; HARRIS, 2007). Portanto, visando minimizar o alargamento de bandas, o valor ideal da vazão precisa ser avaliado. A vazão também afeta diretamente a frequência de amostragem e, no caso do presente trabalho, pode afetar a eficiência de retenção do analito no topo da coluna na etapa de pré-concentração, que depende da taxa de sorção da espécie. Além disso, vazões mais altas ocasionam o aumento indesejado da contrapressão, o que é particularmente crítico para SIC. Isto posto, a avaliação da vazão torna-se essencial.

A vantagem de se usar uma coluna monolítica é que, como já mencionado, seus interstícios são maiores do que aqueles tipicamente encontrados em colunas particuladas. Desta forma, é possível avaliar vazões mais altas, possibilitando melhorar a frequência de amostragem e atingir resolução cromatográfica apropriada.

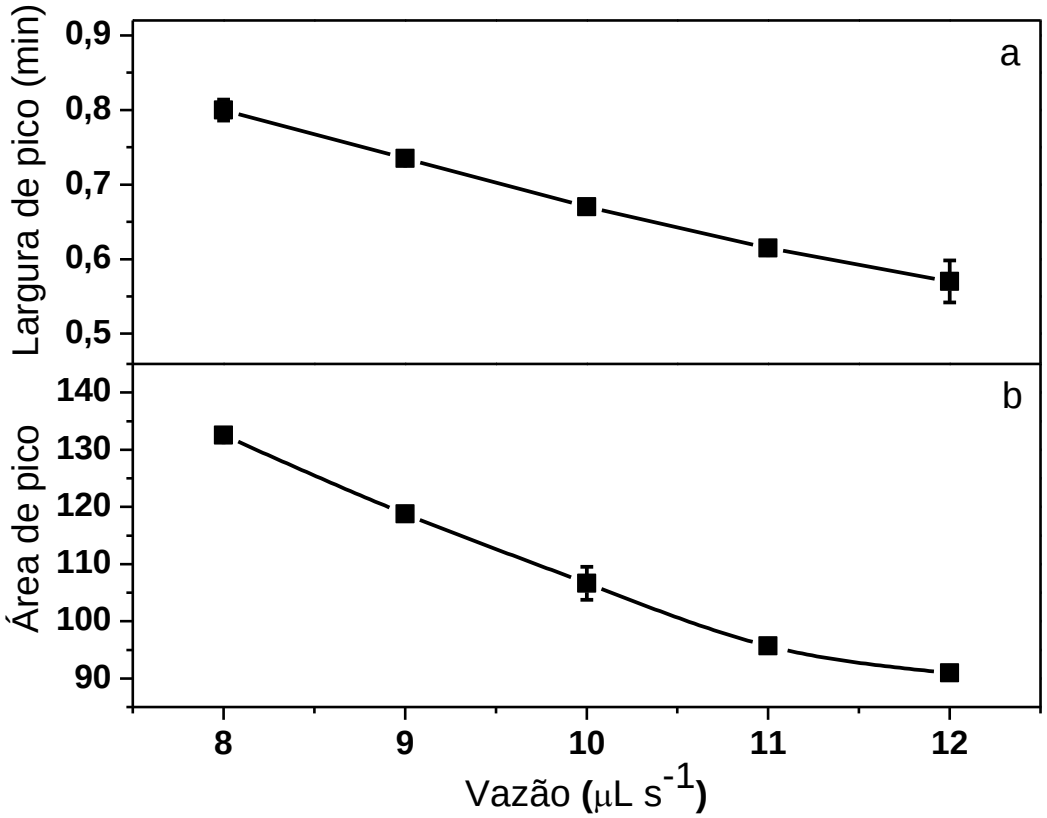
Assim sendo, o efeito da vazão foi avaliado entre 10 e 25 µL s^{-1} e entre 8 e 12 µL s^{-1} nas etapas de pré-concentração na coluna (Figura 11) e de eluição (Figura 12), respectivamente.

Figura 11- Influência da vazão na etapa de pré-concentração sobre (a) largura e (b) área de pico. Resultados referentes a médias de três replicatas. Solução de AS 10 µg L^{-1}. As demais condições cromatográficas são aquelas descritas na Tabela 2



A variação pouco significativa para a área (1,3%) e largura do pico (1,8%) com as vazões avaliadas (Figura 11) indica que a retenção do analito é relativamente rápida e que o alargamento de banda é pouco significativo. Consequentemente, a maior vazão avaliada (25 µL s^{-1}) foi escolhida, visando aumentar a frequência de amostragem. Contudo, a vazão de eluição teve grande influência tanto na área quanto na largura do pico, que foram inversamente proporcionais à vazão (Figura 12). Este fato comprova a predominância do B (difusão longitudinal) sobre o termo C (tempo de equilíbrio) da equação de Van Deemter (equação 1). A vazão de 9 µL s^{-1} foi escolhida para estudos posteriores, como uma condição de compromisso entre a sensibilidade e a frequência de amostragem.

Figura 12- Influência da vazão da fase móvel sobre (a) largura e (b) área de pico. Resultados referentes a médias de três replicatas. Solução de AS 10 µg L^{-1}. Excluindo a vazão de eluição, as condições cromatográficas foram aquelas descritas na Tabela 2



Com o final dos experimentos de otimização, as melhores condições de acidez, composição de fase estacionária e de fase móvel, volume e vazão foram definidas e são apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5- Condições ótimas de análise de AS pelo método proposto

pH na etapa de pré-concentração	2,0
pH na etapa de eluição	5,0
Composição da FE	Monolítica C18
Composição da FM	5:95 %(v/v) de acetonitrila/tampão acetato (0,2 mol L^{-1}, pH 5,0)
Volume do transportador (µL)	250
Volume da FM (µL)	1750
Vazão na etapa de pré-concentração (µL s^{-1})	25
Vazão na etapa de eluição (µL s^{-1})	9

4.2.4. Características analíticas

As características analíticas foram avaliadas após a otimização do procedimento. Resposta linear foi observada entre 0,25 e 5,00 µg L^{-1} segundo a equação IF = (16,0±0,3) C - 0,795±0,067 com R^2 = 0,998, em que IF corresponde à intensidade de fluorescência medida em área de pico e C à concentração de AS em µg L^{-1}. O coeficiente de variação, os limites de detecção (LOD, 99,7% de confiança) e de quantificação (LOQ) e a frequência de amostragem foram estimados em 3,0% (n = 10), 20 ng L^{-1}, 60 ng L^{-1} e 7 h^{-1}, respectivamente. Em vista do excelente valor de LOQ, o método proposto mostrou-se apropriado para a quantificação de AS nas concentrações encontradas em águas de regiões metropolitanas brasileiras, bem como aquelas relatadas em estudos conduzidos na Espanha e na Bélgica (Tabela 1). Os resultados referentes ao efeito do volume de amostra indicam que a detectabilidade pode ser aumentada pela variação deste parâmetro. Apesar do limite operacional de 3,75 mL, definido pelos volumes da seringa e do transportador, foi avaliado que etapas consecutivas de retenção de amostra podem ser implementadas sem perda de eficiência. Outra característica favorável é o consumo de apenas 150 µL de ACN por determinação. Essa quantidade corresponde a *ca.* 1% daquela usualmente utilizada em procedimentos analíticos para determinação de AS em águas envolvendo pré-concentração (LEE; PEART; SVOBODA, 2005; MARCHESE et al., 2003; WILLE et al., 2010). O procedimento proposto gera somente 5 mL de resíduo por determinação.

O fator de enriquecimento (FE), a eficiência de concentração (EC) e o índice de consumo (IC) foram também estimados. Estes fatores remetem, respectivamente, ao aumento de sensibilidade devido à pré-concentração do analito, ao fator de enriquecimento atingido em um minuto e ao volume de amostra necessário para aumentar o fator de enriquecimento em uma unidade (FANG, 1993). Neste sentido, estimou-se o FE em 122, a partir da razão dos coeficientes angulares de curvas analíticas obtidas com volume de amostra de 1750 µL (pré-concentração em coluna) e 10 µL (condição cromatográfica usual), o EC em 14,4 min^{-1} e o IC em 0,0143 mL, demonstrando altas eficiências de pré-concentração e de uso do volume da amostra.

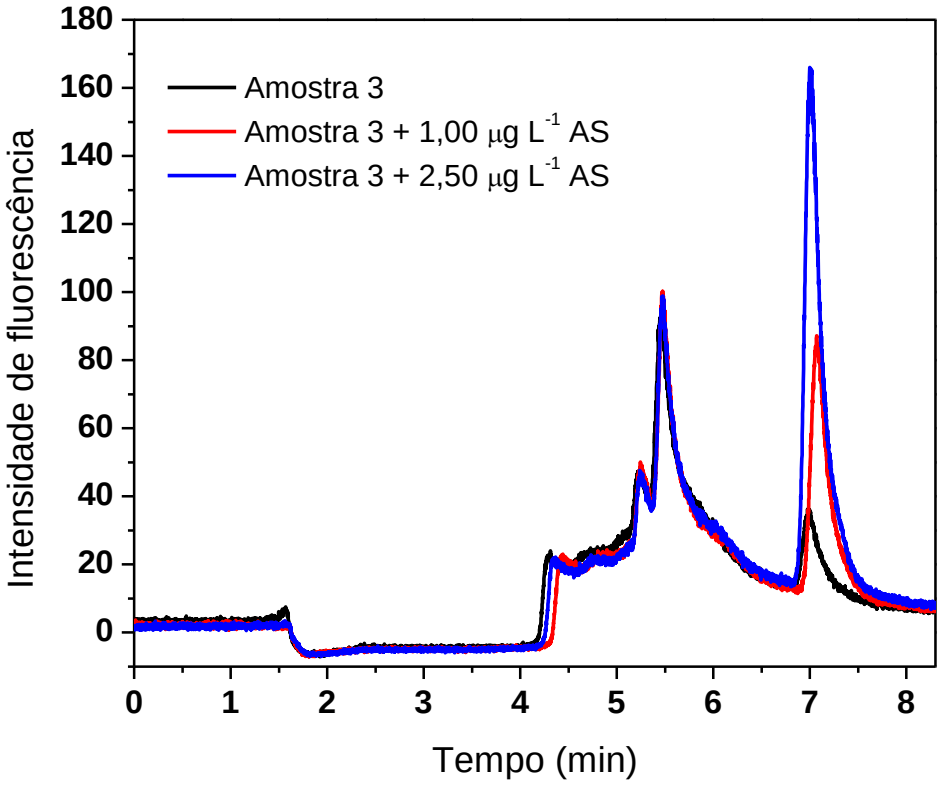
Visando avaliar a incidência de efeitos de matriz, posto que águas naturais são caracterizadas por matrizes altamente complexas, realizou-se um estudo de

recuperação do analito em seis amostras de águas naturais (Tabela 6), com adição de AS em amostras em dois níveis de concentração. Os resultados indicam a ausência de efeitos de matriz e, portanto, a eficiente separação cromatográfica do analito (Figura 13).

Tabela 6- Recuperações de AS adicionado em 6 amostras de águas de rio. Resultados referentes a médias de três replicatas. Condições cromatográficas conforme Tabela 2

Amostra	Recuperação (%)	
	1,0 µg L^{-1}	2,5 µg L^{-1}
1	96 ± 7	100,2 ± 0,5
2	96 ± 4	91± 3
3	87 ± 3	87 ± 3
4	108 ± 6	107 ± 4
5	107 ± 7	108 ± 1
6	104 ± 6	113,8 ± 0,9

Figura 13- Cromatogramas obtidos para uma amostra de água de rio (Amostra 3, Tabela 6) sem adição de AS e com adições de 1,00 e 2,50 µg L^{-1} de AS. Condições cromatográficas conforme Tabela 2



Na Figura 13, é possível observar dois deslocamentos da linha base, ocorridos em *ca.* 1,5 e 4,3 min. Isto ocorre devido à mudança do índice de refração da solução presente na cubeta de fluxo, causada pela substituição da fase móvel contendo acetonitrila pela amostra/transportador e vice-versa.

Para a avaliação de exatidão, foram analisadas diferentes amostras de águas naturais pelo procedimento proposto e os resultados obtidos foram comparados com aqueles alcançados pelo procedimento de referência baseado em LC–ESI–MS/MS (SEGARRA et al., 2006), Tabela 7. Os valores médios encontrados foram comparados pelo teste *t* pareado e o valor calculado (1,48) é inferior ao valor crítico (2,45, com 95% de confiança), indicando que os resultados são concordantes neste nível de confiança. Os limites de detecção e de quantificação estimados para o método de referência foram significativamente altos (0,7 µg L^{-1} e 2,1 µg L^{-1}, respectivamente) devido à omissão da etapa de pré-concentração antes da separação cromatográfica. Assim, as concentrações encontradas por este método com valores inferiores ao limite de quantificação foram desconsideradas para a avaliação da exatidão dos resultados. Com o procedimento proposto, foram obtidos melhores resultados de precisão e de recuperação do que aqueles encontrados pelo método de referência: coeficientes de variação entre 1 e 4% e 2 e 27%; e recuperações entre 90,8 e 100,8% e 65 e 97% para os procedimentos proposto e de referência, respectivamente.

O procedimento proposto apresentou vantagens em comparação com procedimentos analíticos com finalidade similar (Tabela 8), com destaque para os baixos coeficientes de variação e consumo de solvente orgânico e menor tempo de análise. Outras características importantes a serem mencionadas são a ausência da limpeza da amostra e da derivação química, etapas usuais em outros procedimentos cromatográficos (FARRÉ; PETROVIC; BARCELÓ, 2007; KASPRZYK-HORDERN; DINSDALE; GUWY, 2008; LACINA; MRAVCOVÁ; VÁVROVÁ, 2013; LEE; PEART; SVOBODA, 2005; MARCHESE et al., 2003; WILLE et al., 2010). Contudo, os procedimentos disponíveis para a determinação de AS em águas naturais envolvem, em sua maioria, cromatografia acoplada à espectrometria de massas. Devido à alta sensibilidade inerente a esta técnica, os limites de detecção destes procedimentos são mais baixos em comparação ao procedimento proposto.

Tabela 7- Avaliação de exatidão do método proposto. Resultados referentes a médias de três replicatas. Valores de concentração obtidos em amostras de águas de rio após a adição de 2,50 e 5,00 µg L^{-1} de AS. Condições cromatográficas conforme Tabela 2

Amostra	Método proposto				Método de referência			
	2,50 µg L^{-1}		5,00 µg L^{-1}		2,50 µg L^{-1}		5,00 µg L^{-1}	
	Encontrado (µg L^{-1})	Recuperação (%)	Encontrado (µg L^{-1})	Recuperação (%)	Encontrado (µg L^{-1})	Recuperação (%)	Encontrado (µg L^{-1})	Recuperação (%)
1	2,4 ± 0,1	95 ± 3	4,75 ± 0,09	95 ± 2	2,4 ± 0,2	97 ± 9	4,36 ± 0,07	87 ± 1
2	2,40 ± 0,02	96 ± 1	4,6 ± 0,2	93 ± 4	< LOQ	—	3,2 ± 0,2	65 ± 5
3	2,34 ± 0,08	94 ± 3	4,54 ± 0,03	90,8 ± 0,5	< LOQ	—	4,6 ± 0,4	92 ± 8
4	2,52 ± 0,02	100,8 ± 0,8	4,68 ± 0,04	93,6 ± 0,8	< LOQ	—	4,40 ± 0,07	88 ± 1

Tabela 8- Principais características analíticas dos procedimentos para a determinação de AS em águas naturais

Procedimento	Tempo de análise (min)	Consumo de solvente (mL)	Volume de amostra (mL)	FE	LOD (ng L^{-1})	CV (%)	Referência
CE	12,0	1,0[b]	10	10[d]	5000	8,0	(Caballero-Díaz; Valcárcel, 2014)
GC-MS	26,7	25,0[a]	1000	1000[d]	10	< 7,0	(Lee; Peart; Svoboda, 2005)
GC-GC-TOF-MS	96,0	12,0[a]	250	83[d]	0,15	10	(Lacina; Mravcová; Vávrová, 2013)
LC-TOF-MS	42,0	—	1000	1000[d]	—	—	(Lopes et al., 2016)
LC-MS/MS	25,0	12,0[a], 5,0[b], 10,8[c]	1000	3333[d]	2	14	(Wille et al., 2010)
LC-ESI-MS/MS	15,0	11,5[a]	1000	3333[d]	< 0,1	8,0	(Marchese et al., 2003)
SIC-Fluorescência	8,5	0,15[c]	1,75	122	20	3,0	Procedimento proposto

[a]Metanol; [b]Acetona; [c]Acetonitrila; [d]Valores estimados a partir dos volumes de amostra e de extrato final.

CE: eletroforese capilar; LC: cromatografia líquida de alta eficiência; GC: cromatografia gasosa; ESI: ionização por eletronebulização; TOF: tempo de voo; MS espectrometria de massas; SIC: cromatografia por injeção sequencial.

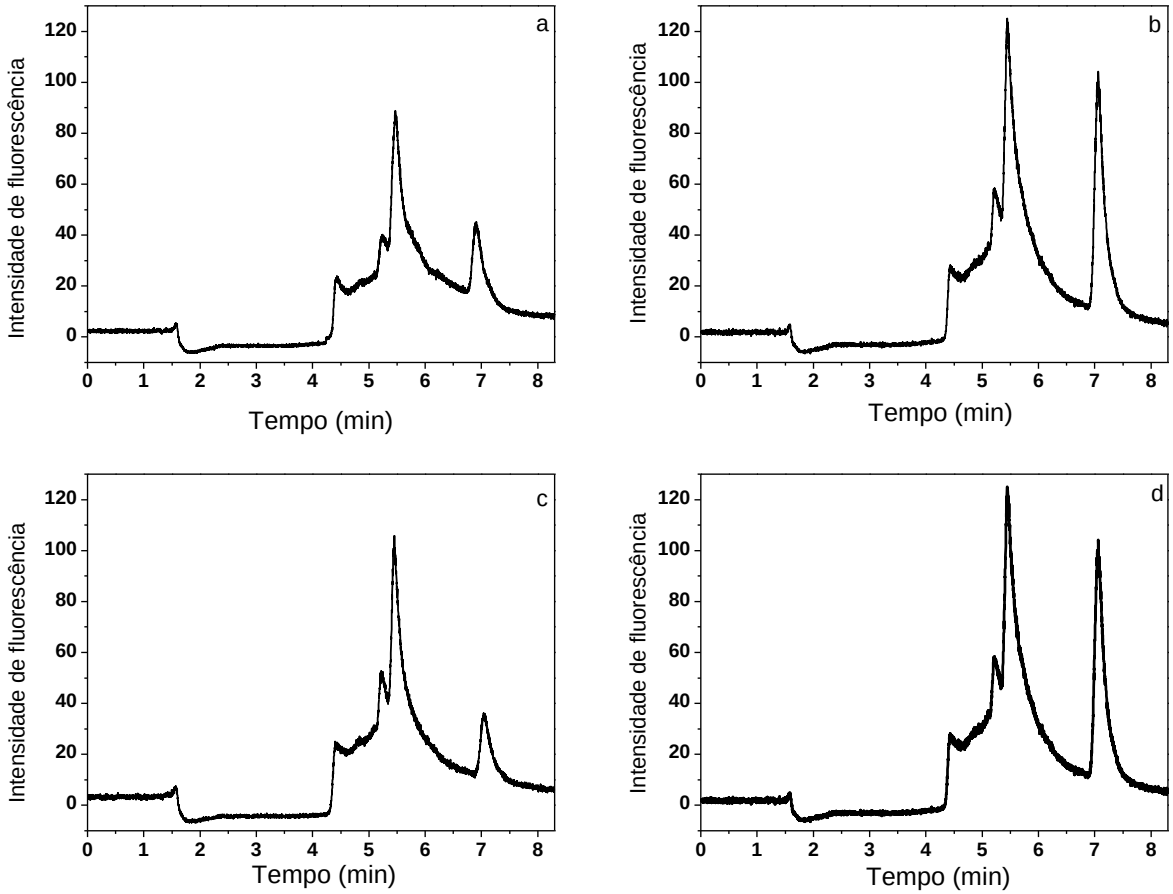
4.2.5. Quantificação de AS em águas naturais

Com o procedimento otimizado, foram estimadas as quantidades de AS em 4 amostras de águas de rio (Tabela 9), ressaltando que essas concentrações estão abaixo do limite de quantificação do procedimento de referência (2,1 µg L^{-1}). Os cromatogramas das amostras investigadas encontram-se na Figura 14, sendo que apresentam resoluções adequadas para a quantificação de AS (R_S > 1,25).

Tabela 9- Concentrações de AS encontradas em amostras de águas naturais. Resultados referentes a médias de três replicatas

Amostra	Concentração (µg L^{-1})
1	0,88 ± 0,02
2	1,22 ± 0,01
3	0,34 ± 0,02
4	1,37 ± 0,04

Figura 14- Cromatogramas de amostras de águas de rio: (a) Amostra 1, (b) Amostra 2, (c) Amostra 3 e (d) Amostra 4 (Tabela 8)



As concentrações de AS obtidas pelo método proposto são concordantes com aquelas encontradas em águas naturais de regiões metropolitanas brasileiras, além de estarem dentro da faixa de concentrações encontradas em outras regiões do mundo (Tabela 1).

5. CONCLUSÕES

Um procedimento alternativo para a determinação de AS em águas naturais com pré-concentração em coluna e separação com cromatografia por injeção sequencial foi desenvolvido. O baixo consumo de solventes orgânicos (apenas 150 µL de acetonitrila por determinação), bem como a ausência de etapas prévias de tratamento da amostra para limpeza e concentração do analito, possibilitaram o atendimento aos objetivos propostos, especialmente em relação à possibilidade de determinação direta de AS em amostras de águas naturais, sem a etapa de derivação química e atendendo aos requisitos da química verde (baixo consumo de solvente orgânico, eliminação da etapa de pré-tratamento da amostra e geração de apenas 5 mL de resíduo por determinação). Não foram observados efeitos de matriz nas diferentes amostras avaliadas, os quais foram superados pela eficiente separação cromatográfica, mesmo utilizando uma coluna cromatográfica curta. O procedimento apresentou uma alta frequência de amostragem para procedimentos analíticos cromatográficos, pois realizou toda a etapa de pré-concentração, separação e detecção do analito de forma mecanizada, com aproximadamente 7 determinações por hora (*ca*. 8,5 min por determinação), além de utilizar equipamento de menor custo em relação aos outros procedimentos destinados à determinação de AS. O procedimento é inovador quanto à determinação de AS em águas naturais com vantagens de ser rápido, altamente sensível, seletivo e robusto, além de poder contribuir para a definição do método avaliativo de um poluente emergente em águas naturais.

REFERÊNCIAS

ARIF, T. Salicylic acid as a peeling agent: a comprehensive review. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, Auckland, NZ, v. 8, p. 455–461, 2015.

BARRIENTOS, M. O.; BATISTA, A. D.; ROCHA, F. R. P. Fast and environmentally friendly determination of salicylic acid in plant materials by sequential injection chromatography. **Analytical Methods**, Cambridge, UK, v. 8, n. 34, p. 6398–6403, 2016.

BATISTA, A. D. et al. On-line hyphenation of solid-phase extraction to chromatographic separation of sulfonamides with fused-core columns in sequential injection chromatography. **Talanta**, Oxford, UK, v. 133, p. 142–149, 2015.

BATISTA, A. D.; ROCHA, F. R. P. On-column preconcentration in sequential injection chromatography: Application to determination of parabens. **Analytical Methods**, Cambridge, UK, v. 7, n. 10, p. 4371–4375, 2015.

BIELICKA-DASZKIEWICZ, K.; VOELKEL, A. Theoretical and experimental methods of determination of the breakthrough volume of SPE sorbents. **Talanta**, Oxford, UK, v. 80, n. 2, p. 614–621, 2009.

BOSCO, R. et al. Development of an ultrahigh-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of salicylic acid, jasmonic acid, and abscisic acid in rose leaves. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 62, n. 27, p. 6278–6284, 2014.

BRAUS, H.; MIDDLETON, F. M.; WALTON, G. Organic chemical compounds in raw and filtered surface waters. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 23, n. 8, p. 1160–1164, 1951.

BUSZEWSKI, B.; SZULTKA, M. Past, present, and future of solid phase extraction: A review. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, Boca Raton, v. 42, n. 3, p. 198–213, 2012.

CABALLERO-DÍAZ, E.; VALCÁRCEL, M. Carbon nanotubes as SPE sorbents for the extraction of salicylic acid from river water. **Journal of Separation Science**, Weinheim, DE, v. 37, n. 4, p. 434–439, 2014.

CALDERILLA, C. et al. Recent advances in flow-based automated solid-phase extraction. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, NL, v. 108, p. 370–380, 2018.

CAMEL, V. Solid phase extraction of trace elements. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, Oxford, UK, v. 58, p. 1177–1233, 2003.

CHA, K. W.; PARK, K. W. Determination of iron(III) with salicylic acid by the fluorescence quenching method. **Talanta**, Oxford, UK, v. 46, n. 6, p. 1567–1571, 1998.

CHOCHOLOUŠ, P. et al. A novel application of Onyx™ monolithic column for simultaneous determination of salicylic acid and triamcinolone acetonide by sequential injection chromatography. **Talanta**, Oxford, UK, v. 72, n. 2, p. 854–858, 2007.

CHOCHOLOUŠ, P. et al. Advantages of core-shell particle columns in Sequential Injection Chromatography for determination of phenolic acids. **Talanta**, Oxford, UK, v. 103, p. 221–227, 2013.

COLIN, H. et al. The role of the temperature in reversed-phase high-performance liquid chromatography using pyrocarbon-containing adsorbents. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, NL, v. 167, p. 41–65, 1978.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora da Unicamp, 2006.

CONAMA. Resolução CONAMA Nº 396, de 3 de abril de 2008. Dispõe sobre a classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento das águas subterrâneas e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 7 abr. 2008. Seção 1, n. 66, p. 64-68. Disponível em: <http://pnqa.ana.gov.br/Publicacao/RESOLU%C3%87%C3%83O%20CONAMA%20n%C2%BA%20396.pdf>. Acesso em: 17 abr. 2019.

DAMIANI, P. et al. Determination of three aspirin metabolites in human urine by derivative synchronous spectrofluorimetry. **Analyst**, London, UK, v. 120, n.2, p. 443–445, 1995.

DAVLETBAEVA, P. et al. Sub–1 min separation in sequential injection chromatography for determination of synthetic water-soluble dyes in pharmaceutical formulation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, UK, v. 143, p. 123–129, 2017.

DIAS, T. R. et al. Fluidized particles in flow analysis: potentialities, limitations and applications. **Talanta**, Oxford, UK, v. 184, n. February, p. 325–331, 2018.

DURNER, J.; SHAH, J.; KLESSIG, D. F. Salicylic acid and disease resistance in plants. **Trends in Plant Science**, Kidlington, UK, v. 2, n. 7, p. 266–274, 1997.

FANG, Z. **Flow injection separation and preconcentration**. Weinheim: Wiley, 1993.

FARIA, A. M. et al. Monolithic stationary phases for chromatographic separations. **Química Nova**, São Paulo, SP, v. 29, n. 2, p. 300–309, 2006.

FARRÉ, M. et al. Determination of drugs in surface water and wastewater samples by liquid chromatography-mass spectrometry: Methods and preliminary results including toxicity studies with Vibrio fischeri. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, NL, v. 938, n. 1–2, p. 187–197, 2001.

FARRÉ, M.; PETROVIC, M.; BARCELÓ, D. Recently developed GC/MS and LC/MS methods for determining NSAIDs in water samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, DE, v. 387, n. 4, p. 1203–1214, 2007.

GROOTVELD, M.; HALLIWELL, B. 2,3-Dihydroxybenzoic acid is a product of human aspirin metabolism. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, UK, v. 37, n. 2, p. 271–280, 1988.

GROS, M. et al. Removal of pharmaceuticals during wastewater treatment and environmental risk assessment using hazard indexes. **Environment International**, Oxford, UK, v. 36, n. 1, p. 15–26, 2010.

HARRIS, D. C. **Quantitative chemical analysis**. 7. ed. New York: W. H. Freeman, 2007.

HAYAT, Q. et al. Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: A review. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, UK, v. 68, n. 1, p. 14–25, 2010.

HIGNITE, C.; AZARNOFF, D. L. Drugs and drug metabolites as environmental contaminants: Chlorophenoxyisobutyrate and salicylic acid in sewage water effluent. **Life Sciences**, Oxford, UK, v. 20, n. 2, p. 337–341, 1977.

HUCLOVÁ, J.; ŠATÍNSKÝ, D.; KARLÍČEK, R. Coupling of monolithic columns with sequential injection technique. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, ND, v. 494, n. 1–2, p. 133–140, 2003.

JARDIM, I. C. S. F. Extração em Fase Sólida : Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas. **Scientia Chromatographica**, São Carlos, SP, v. 2, n. 1, p. 13–25, 2010.

KASPRZYK-HORDERN, B.; DINSDALE, R. M.; GUWY, A. J. Multiresidue methods for the analysis of pharmaceuticals, personal care products and illicit drugs in surface water and wastewater by solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, DE, v. 391, n. 4, p. 1293–1308, 2008.

KHATTAB, I. S. et al. Density, viscosity, and surface tension of water+ethanol mixtures from 293 to 323K. **Korean Journal of Chemical Engineering**, Seoul, KR, v. 29, n. 6, p. 812–817, 2012.

KORNHAUSER, A.; COELHO, S. G.; HEARING, V. J. Applications of hydroxy acids: classification, mechanisms, and photoactivity. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, Auckland, NZ, v. 3, p. 135–142, 2010.

KUBÁŇ, V.; JANČÁŘOVÁ, I.; ŠULOVÁ, R. Determination of traces of lanthanides in cerium oxide by liquid chromatography with on-column preconcentration. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, Berlin, DE, v. 342, n. 9, p. 706–710, 1992.

LACEY, C. et al. An LC-MS method for the determination of pharmaceutical compounds in wastewater treatment plant influent and effluent samples. **Talanta**, Oxford, UK, v. 75, n. 4, p. 1089–1097, 2008.

LACINA, P.; MRAVCOVÁ, L.; VÁVROVÁ, M. Application of comprehensive two-dimensional gas chromatography with mass spectrometric detection for the analysis of selected drug residues in wastewater and surface water. **Journal of Environmental Sciences (China)**, Beijing, CN, v. 25, n. 1, p. 204–212, 2013.

LEE, H. B.; PEART, T. E.; SVOBODA, M. L. Determination of endocrine-disrupting phenols, acidic pharmaceuticals, and personal-care products in sewage by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, NL, v. 1094, n. 1–2, p. 122–129, 2005.

LIN, A. N.; NAKATSUI, T. Salicylic acid revisited. **International Journal of Dermatology**, Oxford, UK, v. 37, n. 5, p. 335–342, 1998.

LINDSEY, A. S.; JESKEY, H. The Kolbe-Schmitt Reaction. **Chemical Reviews**, WAshington, DC, v. 57, n. 4, p. 583–620, 1957.

LISKA, I. Fifty years of solid-phase extraction in water analysis – historical development and overview. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, NL, v. 885, p. 3–16, 2000.

LLORENT-MARTINEZ, E. J. et al. Analysis of agroalimentary and environmental contaminants using flow-through chemical optosensors. **Applied Spectroscopy Reviews**, New York, NY, v. 50, n. 7, p. 527–556, 2015.

LOPES, V. S. A. et al. Development of a solid-phase extraction system modified for preconcentration of emerging contaminants in large sample volumes from rivers of the lagoon system in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, London, UK, v. 110, n. 1, p. 572–577, 2016.

MADAN, R. K.; LEVITT, J. A review of toxicity from topical salicylic acid preparations. **Journal of the American Academy of Dermatology**, St. Louis, MO, v. 70, n. 4, p. 788–792, 2014.

MALAMY, J. et al. Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. **Science**, New York, NY, v. 250, n. 4983, p. 1002–1004, 1990.

MARCHESE, S. et al. Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in surface water and wastewater by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Chromatographia**, Braunschweig, DE, v. 58, n. 5–6, p. 263–269, 2003.

OLIVEIRA, C. C. et al. A bead injection system for copper determination. **Analytical Letters**, New York, NY, v. 33, n. 5, p. 929–940, 2000.

PAGANI, A. P.; IBAÑEZ, G. A. Second-order multivariate models for the processing of standard-addition synchronous fluorescence-pH data. Application to the analysis of salicylic acid and its major metabolite in human urine. **Talanta**, Oxford, UK, v. 122, p. 1–7, 2014.

PETRIE, B.; BARDEN, R.; KASPRZYK-HORDERN, B. A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: Current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. **Water Research**, Oxford, UK, v. 72, p. 3–27, 2014.

PETROVIĆ, M.; GONZALEZ, S.; BARCELÓ, D. Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, NL, v. 22, n. 10, p. 685–696, 2003.

PHENOMENEX. **Monolothic HPLC Columns**. Torrance, CA, 2019. Disponível em: <https://www.phenpreview.com/onyx>. Acesso em: 10 mai. 2019.

PŁOTKA-WASYLKA, J. et al. Modern trends in solid phase extraction: New sorbent media. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, NL, v. 77, p. 23–43, 2016.

PULGARÍN, J. A. M.; MOLINA, A. A.; ROBLES, I. S.-F. Simultaneous determination of salicylic acid and salicylamide in biological fluids. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Oxford, UK, v. 79, n. 5, p. 909–914, 2011.

RANDJELOVIĆ, P. et al. The beneficial biological properties of salicylic acid. **Acta Facultatis Medicae Naissensis**, Niš, RS, v. 32, n. 4, p. 259–265, 2015.

RASKIN, I. Role of salicylic acid in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, CA, v. 43, n. 1, p. 439–463, 1992.

RENDON, M. I. et al. Evidence and considerations in the application of chemical peels in skin disorders and aesthitic resurfacing. **The Journal of Clinacal and Aesthetic Dermatology**, Edgemont, PA, v. 3, n. 7, p. 32–43, 2010.

RICHARDSON, S. D. Water analysis: Emerging contaminants and current issues. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 81, n. 12, p. 4645–4677, 2009.

ROCHA, F. R. P. et al. Solid-phase extractions in flow analysis. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, RJ, v. 90, n. 1, p. 803–824, 2018.

ROCHA, F. R. P. Flow analysis: Looking back and forward. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, SP, v. 29, n. 5, 2018.

ROCHA, F. R. P.; RAIMUNDO, I. M.; TEIXEIRA, L. S. G. Direct solid-phase optical measurements in flow systems: A review. **Analytical Letters**, New York, NY, v. 44, n. 1–3, p. 528–559, 2011.

RUIZ-JIMÉNEZ, J.; LUQUE DE CASTRO, M. D. In-column micro-high-performance liquid chromatographic concentration-separation prior to ultraviolet detection for the determination of chlorophenols in water samples. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, NL, v. 1174, n. 1–2, p. 78–84, 2007.

RUZICKA, J. From Beaker Chemistry to Programmable Microfluidics. **Collection of Czechoslovak Chemical Communications**, Prague, CZ, v. 70, n. 11, p. 1737–1755, 2005.

RUZICKA, J.; MARSHALL, G. D. Sequential injection: a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, ND, v. 237, p. 329–343, 1990.

RUZICKA, J.; SCAMPAVIA, L. From flow injection to bead injection. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 71, p. 257A-263A, 1999.

ŠATÍNSKÝ, D. et al. Monolithic columns - A new concept of separation in the sequential injection technique. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, ND, v. 499, n. 1–2, p. 205–214, 2003.

ŠATÍNSKÝ, D. et al. Sequential injection chromatographic determination of paracetamol, caffeine, and acetylsalicylic acid in pharmaceutical tablets. **Journal of Separation Science**, Weinheim, DE, v. 27, n. 7–8, p. 529–536, 2004.

SEGARRA, G. et al. Simultaneous quantitative LC-ESI-MS/MS analyses of salicylic acid and jasmonic acid in crude extracts of Cucumis sativus under biotic stress. **Phytochemistry**, Oxford, UK, v. 67, n. 4, p. 395–401, 2006.

SENARATNA, T. et al. Acetyl salicylic acid (Asprin) and salicylic acid induce multiple stress tolerance in bean and tomato plants. **Plant Growth Regulation**, The Hague, ND, v. 30, p. 157–161, 2000.

SENESI, N. Molecular and quantitative aspects of the chemistry of fulvic acid and its interactions with metal ions and organic chemicals. Part II: The fluorescence spectroscopy approach. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, ND, v. 232, p. 77–106, 1990.

SIGMA-ALDRICH. **Ascentis® Express U/HPLC Columns**. Munich, DE, 2019. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/analytical-products.html?TablePage=17841436>. Acesso em: 14 mai. 2019.

SKOOG, D. A. et al. **Fundamentos da química analítica**. 9. ed. New York: Cengage Learning, 2014.

SOLICH, P. et al. Application of flow injection technique in pharmaceutical analysis. Part II: Other spectroscopic methods and electroanalytical detection. **Journal of Flow Injection Analysis**, Tokyo, JP, v. 18, n. 2, p. 118–125, 2001.

SPONGBERG, A. L.; WITTER, J. D. Pharmaceutical compounds in the wastewater process stream in Northwest Ohio. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, ND, v. 397, n. 1–3, p. 148–157, 2008.

STREET, K. W.; SCHENK, G. H. Spectrofluorometric determination of acetylsalicylic acid, salicylamide, and salicylic acid as an impurity in pharmaceutical preparations. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Easton, PA, v. 70, n. 6, p. 641–646, 1981.

TAGLIARI, M. P. et al. Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para determinação de ácido glicirrízico, ácido salicílico e cafeína em nanopartículas de quitosana e alginato. **Química Nova**, São Paulo, SP, v. 35, n. 6, p. 1228–1232, 2012.

VAN DEEMTER, J. J.; KLINKENBERG, A.; ZUIDERWEG, F. J. Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography. **Chemical Engineering Science**, Oxford, UK, v. 5, n. 6, p. 271–289, 1956.

WASIK, A.; KOT-WASIK, A.; NAMIESNIK, J. New Trends in Sample Preparation Techniques for the Analysis of the Residues of Pharmaceuticals in Environmental Samples. **Current Analytical Chemistry**, Sharjah, AE, v. 12, n. 4, p. 280–302, 2016.

WESOŁY, M. et al. Quantitative Analysis of Active Pharmaceutical Ingredients (APIs) Using a Potentiometric Electronic Tongue in a SIA Flow System. **Electroanalysis**, New York, NY, v. 28, n. 3, p. 626–632, 2016.

WIBOWOTOMO, B.; EUN, J. B.; RHEE, J. IL. Development of a sequential injection analysis system for the determination of saccharin. **Sensors**, Basel, CH, v. 17, n. 12, p. 1–10, 2017.

WILLE, K. et al. Validation and application of an LC-MS/MS method for the simultaneous quantification of 13 pharmaceuticals in seawater. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, DE, v. 397, n. 5, p. 1797–1808, 2010.

WU, N.; CLAUSEN, A. M. Fundamental and practical aspects of ultrahigh pressure liquid chromatography for fast separations. **Journal of Separation Science**, Weinheim, DE, v. 30, n. 8, p. 1167–1182, 2007.

YALPANI, N. et al. Ultraviolet light and ozone stimulate accumulation of salicylic acid, pathogenesis-related proteins and virus resistance in tobacco. **Planta**, Berlin, DE, v. 193, n. 3, p. 372–376, 1994.

ZHANG, Y.; MIRÓ, M.; KOLEV, S. D. An automatic flow assembly for on-line dynamic fractionation of trace level concentrations of mercury in environmental solids with high organic load. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, ND, v. 975, p. 1–10, 2017.

ZWIR-FERENC, A.; BIZIUK, M. Solid Phase Extraction Technique – Trends, Opportunities and Applications. **Polish Journal of Environmental Studies**, Olsztyn, PL, v. 15, n. 5, p. 677–690, 2006.