



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Química – Mestrado e Doutorado



DETERMINAÇÃO DE “BISFENOL A” EM ÁGUA POR MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA E CROMATOGRAFIA LÍQUIDA COM DETECÇÃO POR FLUORESCÊNCIA

AYKELL FERNANDO DA CUNHA CARNEIRO

Orientadora: Prof. Dr^a Nilva Ré

Coorientadora: Prof. Dr^a Marcia Helena de Rizzo da Matta

Campo Grande – 2016



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Química – Mestrado e Doutorado



DETERMINAÇÃO DE “BISFENOL A” EM ÁGUA POR MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA E CROMATOGRAFIA LÍQUIDA COM DETECÇÃO POR FLUORESCÊNCIA

AYKELL FERNANDO DA CUNHA CARNEIRO

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Química – Nível de
Mestrado – da Universidade Federal de Mato
Grosso do Sul para obtenção do título de
Mestre em Química (área de concentração:
Química)

Orientadora: Prof. Dr^a. NILVA RÉ

Coorientadora: Prof. Dr^a. MARCIA HELENA DE RIZZO DA MATTA

Campo Grande – 2016



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Química – Mestrado e Doutorado



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA – CURSOS DE MESTRADO E DOUTORADO

TERMO DE DEFESA

(X) – Dissertação () – Tese () – Qualificação

ALUNO
AYKELL FERNANDO DA CUNHA CARNEIRO

TÍTULO DO TRABALHO
DETERMINAÇÃO DE BISFENOL A EM ÁGUA POR MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA E CROMATOGRAFIA LÍQUIDA COM DETECÇÃO POR FLUORESCÊNCIA.

Defesa de Dissertação de Mestrado em Química/UFMS, submetida à Comissão Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Química – Cursos de Mestrado e Doutorado, do Instituto de Química da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (Resolução nº 126/2016), como parte dos requisitos necessários para titulação no curso.

COMISSÃO EXAMINADORA		
NOME	INSTITUIÇÃO DE ENSINO	ASSINATURA
Nilva Ré	UFMS	
Claudia Andrea Lima Cardoso	UEMS	
João Batista Gomes de Souza	UFMS	

Campo Grande, 09 de setembro de 2016

Instituto de Química – UFMS

Eu dedico este trabalho ao meu Provedor, Deus;
E à minha FAMÍLIA que sempre estive ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

À Deus por tudo, pela vida, inteligência, capacidade, por essa oportunidade. Louvado seja Ele, Sempre. Meu grande suporte.

À minha orientadora PROF.^a DR.^a NILVA RÉ, por ter me acolhido, pela orientação, compreensão e por compartilhar a sua sabedoria na orientação desta dissertação, que me proporcionou grande ganho intelectual.

À minha co-orientadora PROF.^a DR.^a MARCIA HELENA DE RIZZO DA MATTA, por ter me auxiliado grandemente no início deste trabalho e, sobretudo pelos ensinamentos e amizade desde a minha iniciação no grupo PET.

Aos meus amigos, colegas de laboratório, Laboratório de Pesquisa 3 InQui-UFMS, pelos momentos ali vivenciados; pela troca de conhecimentos, experiências e principalmente pela amizade.

À minha família, que são pessoas incríveis e que me forneceram suporte em tudo.

Obrigado, pais BRAZ e CÉLIA, meus irmãos BRUNO e LAÍS, minha Tia CIDADINHA e minha vó MARIA DO CARMO. Pelo suporte verdadeiro e necessário. Amo vocês.

À todos os meus amigos e a todas as pessoas que possibilitaram que essa pesquisa seguisse em frente.

À minha Eterna Parceira, PAULA, quem me apoiou incondicionalmente nesta longa e dura caminhada. Dividiu muitos de seus feriados e finais de semana comigo, no desenvolvimento deste trabalho. Te Amo muito, Linda.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

(Arthur Schopenhauer)

Sumário

1. Referencial Teórico	17
1.1 Bisfenol A	17
1.2 O sistema endócrino	18
1.3 Ação do BFA como Desregulador Endócrino	22
1.4 Mamadeiras	24
1.4 Cromatografia Líquida da Alta Eficiência (CLAE)	24
1.4.1 Colunas	25
1.5 Técnicas de Extração de BFA	28
1.5.1. Extração Líquido-Líquido (ELL)	28
1.5.2 Extração em Fase Sólida de compostos orgânicos	28
1.5.3 Microextração em Fase Sólida (MEFS)	30
1.5.4 Microextração em Fase Líquida	32
1.5.4.1 Microextração por Gota Única (MEGU)	32
1.5.4.2 Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (MELLD)	35
2. Objetivos	44
2.1 Objetivo Geral	44
2.2 Objetivos Específicos	44
3 Procedimento Experimental	45
3.1 Materiais	45
3.1.1 Padrão, solução estoque e solução de trabalho	45
3.1.2 Reagentes e solventes	45
3.1.3 Instrumentação	46
3.1.4. Outros materiais	46
3.2 Protocolo de limpeza	46
3.3 Método de análise	47
3.3.1 Otimização das condições cromatográficas	47
3.3.2 Procedimento da microextração líquido-líquido dispersiva (MELLD)	48
3.3.3 Validação do método MELLD-CLAE/FLU	50
3.3.3.1 Seletividade	51
3.3.3.2 Linearidade do método	51
3.3.3.3 Limites de detecção e quantificação	52
3.3.3.4 Exatidão e precisão	53

3.3.3.4.1	Precisão do instrumento.....	53
3.3.3.4.2	Exatidão e precisão do método MELLD-CLAE/FLU	53
3.3.3.5	Amostras	55
3.3.3.5.1	Coleta das amostras.....	55
3.3.3.5.2	Limpeza das mamadeiras	56
3.3.3.5.3	Extração de Bisfenol A	56
4.	Resultados e discussão.....	57
4.1	Análise cromatográfica do BFA	57
4.2.	Linearidade.....	58
4.3	Precisão do instrumento e Limites de Detecção e quantificação.....	59
4.5	Microextração Líquido Líquido Dispersiva (MELLD)	59
4.5.1	Efeito do pH	59
4.5.2	Efeito da adição de sal	60
4.5.3	Condições estabelecidas para a MELLD para a extração do Bisfenol A	61
4.6	Validação do método MELLD-CLAE/FLU.....	62
4.6.1	Linearidade e curva analítica.....	62
4.6.2	Seletividade.....	63
4.6.3	Limite de Detecção e Limite de Quantificação MELLD-CLAE/FLU.....	64
4.6.4	Recuperação e precisão do método	64
4.6.4.1	Recuperação.....	64
4.7	Aplicação do método	66
4.7.1.	Amostras de mamadeira.....	66
5.	Conclusão	71
6.	Perspectivas de continuidade do trabalho	72
7.	Referências Bibliográficas	Erro! Indicador não definido.

Lista de Equações

Equação 1: Fluxo Volumétrico (CLAE).....	27
Equação 2: Intervalo de Confiança (Teste de Huber)	52
Equação 3: Coeficiente de variação, em porcentagem.	53
Equação 4: Recuperação Absoluta	54
Equação 5: Fator de Pré Concentração.....	54
Equação 6: Recuperação Relativa.....	55

Lista de Figuras

Figura 1 Estrutura molecular BFA.....	18
Figura 2 Glândulas que compõem o sistema endócrino humano.	19
Figura 3: Disfunções endócrinas: a) resposta natural, b) efeito agonista e c) efeito antagonista.....	23
Figura 4 Revestimento interno de coluna C-18 (CLAE).....	25
Figura 5 Comparação em escala dos diversos diâmetros internos das colunas. a) convencional (4,6 mm); b) microbore (2,1 mm); c) capilar (320 μm); d) WCOT (20 μm).	26
Figura 6 Etapas envolvidas na EFS: condicionamento do sorvente, adição da amostra, remoção dos interferentes e eluição do analito.	29
Figura 7 Microextração em fase sólida (MEFS).....	31
Figura 8 (A) Extração direta (B) Extração headspeace	34
Figura 9 Etapas envolvidas um dos procedimentos da MELLD	35
Figura 10 Etapas envolvidas na microextração líquido-líquido dispersiva com base na solidificação da gota flutuante	38
Figura 11 Espectro de Fluorescência 3D do BFA.....	47
Figura 12 Esquema da extração da amostra por MELLD.....	50
Figura 13 Cromatograma de uma solução padrão de 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ de BFA.....	57
Figura 14 Curva analítica obtida sem pré-concentração da solução padrão por MELLD	58
Figura 15 Gráfico de área versus pH.....	60
Figura 16 Influência da força iônica na extração do Bisfenol A	61
Figura 17 Curva analítica com a MELLD	62
Figura 18 Comparativo Amostra com 3 $\mu\text{g L}^{-1}$ (azul) com branco (preto).....	63
Figura 19: Cromatograma da amostra (Mamadeira A)	67
Figura 20: Cromatograma da amostra real (Mamadeira B).....	68
Figura 21: Cromatograma da amostra real (Mamadeira C).....	69
Figura 22 Cromatograma Branco.....	69

Lista de Tabelas

Tabela 1 Propriedades Físico Químicas do BFA.....	18
Tabela 2 Glândulas endócrinas, hormônios e suas funções.....	20
Tabela 3: Métodos diversos de análise de Bisfenol A.....	41
Tabela 4(continuação): Métodos diversos de análise de Bisfenol A.....	42
Tabela 5(continuação): Métodos diversos de análise de Bisfenol A.....	43
Tabela 6: Estudo da repetitividade dos tempos de retenção e das áreas do analito para as concentrações de 120, 270 e 440 $\mu\text{g L}^{-1}$	59
Tabela 7 valores dos limites de detecção e quantificação da literatura com o deste trabalho.	64
Tabela 8 Valores de recuperação absoluta, coeficiente de variação e fator de pré-concentração do analito em estudo, BFA.	65
Tabela 9: Valores de recuperação relativa, coeficiente de variação nas concentrações de 5, 7 e 12 $\mu\text{g L}^{-1}$ dos agrotóxicos estudados	66
Tabela 10: Valores obtidos na análise de amostras reais	70

Lista de siglas, abreviaturas e acrônimos

ACN – acetonitrila

ACTH – hormônio adrenocorticotrófico.

ADH – hormônio antidiurético, do inglês *Antidiuretic hormone*

AEPD – fenóis desreguladores endócrinos

Anvisa – Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria

AP – alquilfenol

BFA – bisfenol A

CG – cromatografia a gás

CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência

FLU – detector de fluorescência

C_o = concentração do analito na amostra aquosa

C_{org} – concentração analito na fase orgânica

CRH – hormônio liberador de corticotrofina

CV – coeficiente de variação

DE – desregulador endócrino

EFS – extração fase sólida

ELL – extração líquido-líquido

EM – espectrômetro de massas

ETE – estação de tratamento de esgoto

GH –hormônio do crescimento

GHRH –hormônio liberador de hormônio do crescimento

HPA –hidrocarbonetos aromáticos policíclicos

KPa –quilo Pascal

LD – limite de detecção

LQ –Limite de Quantificação

MEFL – Micro Extração em Fase Liquida

MEFS – Micro Extração em Fase Sólida

MELL – Micro Extração Liquido Liquido

MELLD – Micro Extração Liquido Liquido Dispersiva

mL – mili Litro

mm.Hg –milimitros de Mercúrio

MS – Mato Grosso do Sul

NaCl – Cloreto de Sódio

NF – Nonilfenol

nm – nanômetro

pH – Potencial Hidrogenionico

PIF – Fator de Inibição da Prolactina

PVC – Poli cloreto de Vinila

TRH – Hormônio liberador de tireotrofina

TSH – Hormônio estimulador da tireoide

V_{aq} – volume da amostra aquosa

V_{org} = volumes da fase orgânica (55 µL);

µg.L⁻¹ – micro grama por litro

Resumo

O Bisfenol A (BFA) é um monômero formado por dois anéis fenólicos e utilizado na produção de plástico policarbonato e resinas epóxi. O policarbonato é amplamente utilizado na fabricação de vários produtos, recipientes reusáveis de alimentos e bebidas e na produção de Poli Cloreto de Vinila (PVC). As resinas epóxi são usadas em circuitos elétricos, pinturas, adesivos, revestimentos protetores de latas de alimentos e em complexos dentários para obturações. Estudos revelaram que o BFA age nos organismos vivos com efeitos de desregulação endócrina, como um xenobiótico com ação estrogênica, provocando aumento da incidência de câncer de mama, queda da quantidade de esperma, diminuição da fertilidade, defeitos congênitos secundários à exposição fetal e outras alterações. Este trabalho teve como finalidade desenvolver um método visando à determinação de bisfenol A em água após contato direto com uma mamadeira. O método proposto emprega a microextração líquido-líquido dispersiva (MELLD) e cromatografia a líquido de alta eficiência com detector de fluorescência (CLAE-FLU). Para a MELLD o pH da amostra foi ajustado em 2, decanol foi o solvente de extração e a acetonitrila solvente de dispersão. O método apresentou linearidade com valor de r^2 igual a 0,9967. Os limites de detecção e quantificação do método foram 0,9 e 3 $\mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente. A recuperação absoluta foi de 98,36% com coeficiente de variação (CV) de 4,5% e fator de pré-concentração de 85,68. Os valores de recuperação relativa de bisfenol A, para três níveis de concentração, foram de 102,1-107,2% e CV de 3,7-7,5%. Detectou-se Bisfenol A nas três amostras de mamadeiras analisadas e foi possível quantificar bisfenol A em uma das amostras. O método desenvolvido mostrou-se simples, rápido, eficiente e ambientalmente correto uma vez que emprega pequeno volume de solvente.

Palavras chaves: bisfenol A, microextração líquido-líquido dispersiva, CLAE-FLU

Abstract

Bisphenol A (BFA) is a monomer formed by two phenolic rings and used in the production of polycarbonate plastic and epoxy resins. Polycarbonate is widely used in the manufacture of various products, reusable containers for food and drinks and in the production of polyvinyl chloride (PVC). Epoxy resins are used in electrical circuits, paints, adhesives, protective coatings of cans of food and beverages and in dental fillings to complex. The bottles are manufactured mostly by polycarbonates. Studies have revealed that the BFA acts in living organisms with endocrine disrupting effects, such as a xenobiotic with estrogenic activity, causing increased incidence of breast cancer, decrease in sperm count, decreased fertility, secondary birth defects fetal exposure and other changes. This work was to develop a method aimed at determination of bisphenol A in water after direct contact with a bottle. The proposed method employs liquid-liquid microextraction dispersive (DLLME) and liquid chromatography high efficiency with fluorescence detection (HPLC-FLU). For DLLME the sample pH was adjusted to 2, decanol was the extraction solvent acetonitrile and dispersion solvent. The method was linear with r^2 value of 0.9967. The limits of detection and quantification method were 0.9 and 3 $\mu\text{g.L}^{-1}$, respectively. The absolute recovery was 98.36% with a coefficient of variation (CV) of 4.5% and factor pre-concentration of 85.68. The relative recovery of bisphenol values for three concentration levels were 102.1 to 107.2% and 3.7 to 7.5% CV. Bisphenol A was detected in the analyzed samples and three bottles was possible to quantify bisphenol A in a sample. The developed method proved to be simple, fast, efficient and environmentally friendly as it uses small volume of solvent.

Key-words: Bisphenol A, dispersive liquid-liquid microextraction, HPLC/FLU

1. Referencial Teórico

1.1 Bisfenol A

O russo Aleksandr Dianin no final do século XIX foi quem sintetizou pela primeira vez o 4,4'- (propano-2,2-diil) difenol, Bisfenol A, que ficou conhecido como composto de Dianin.

Em busca de estrogênio sintético, na década de 30, pesquisadores estudaram o Bisfenol A e outras substâncias. O dietilestilbestrol foi o escolhido por apresentar maiores efeitos que o próprio estrogênio (TOXIPEDIA, 2016).

A síntese de BFA se resume a condensação do fenol com acetona em condições de pH ácido, alta temperatura e em presença de catalisadores; na sequência o BFA é purificado através de destilação, filtrado e seco.

A produção de BFA supera cinco milhões de toneladas por ano. O BFA é usado essencialmente como um monômero para a produção de plásticos, incluindo embalagens de alimentos, garrafas de água e mamadeiras (DHAINI; NASSIF, 2014; RUBIN, 2011). É também utilizado na indústria como: na produção de resinas epóxi e de poliéster de estireno insaturado, retardadores de chama, fungicidas, antioxidantes e produtos químicos derivados da borracha. Além disso, é empregado em resina para obturações dentárias, revestimentos de latas, tintas em pó e como aditivo em papel térmico. É liberado para o ambiente aquático através das descargas industriais, chorume e cursos d'água contendo detritos plásticos (ROCHESTER, 2013).

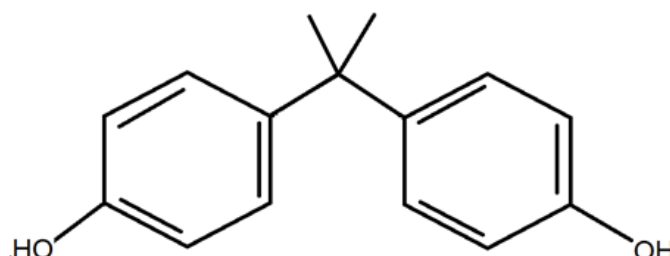
Em condições ambientes, o BFA é sólido de coloração branca, comercializado em cristais, ou pastilhas. Suas propriedades físico químicas estão, na tabela 1 a seguir:

Tabela 1 Propriedades Físico Químicas do BFA

Propriedade	Valor
Massa molar	228 g.mol ⁻¹
Fórmula molecular	C ₁₅ H ₁₆ O ₂
Densidade	1.195 g.cm ⁻³
Ponto de ebulição	398°C (760 mm.Hg)
Ponto de fusão	155°C
pKa	9,59 - 11,30
Solubilidade em água	300 mg.L ⁻¹
Pressão de vapor	5,3 x 10 ⁻⁶ KPa

Fonte: Sigma-Aldrich

Figura 1 Estrutura molecular BFA



Bisfenol A

Fonte: O Próprio Autor

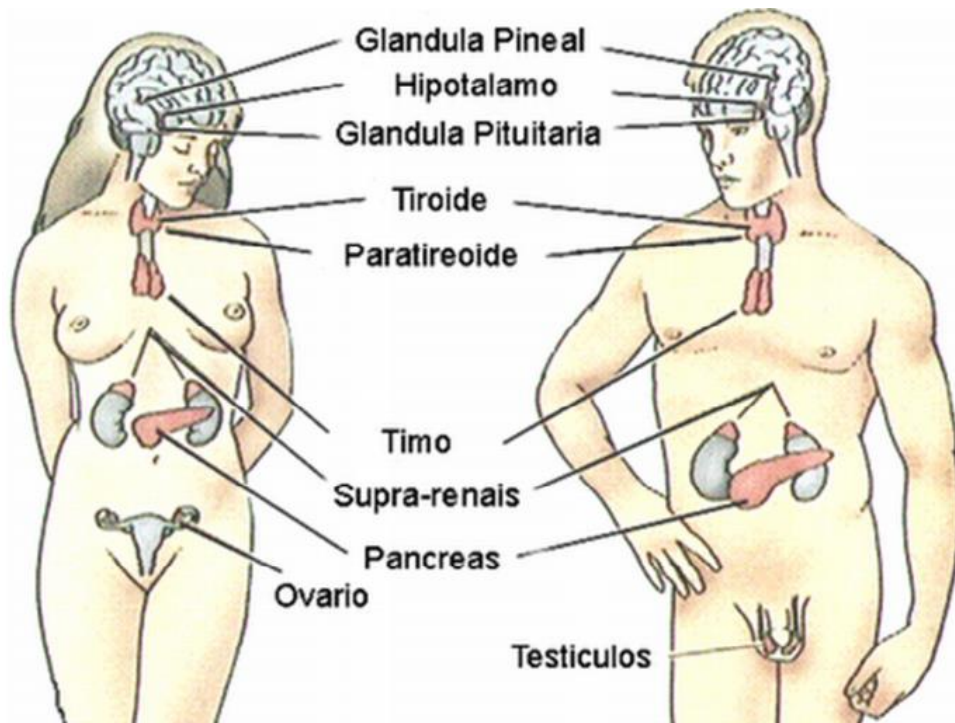
1.2 O sistema endócrino

Sistema endócrino (Figura 2) é um sistema de comunicação em que as glândulas ou células especializadas liberam, no sangue circulante, substâncias químicas (hormônios) que influenciam a função das células em outros locais do corpo (GUYTON; HALL, 2011).

Os sistemas circulatórios transportam os hormônios endócrinos para as células distribuídas por todo o corpo, incluindo em certos casos, o sistema nervoso, onde se ligam a receptores e iniciam várias reações. Alguns hormônios endócrinos afetam a

maioria das células do corpo, como por exemplo, o hormônio do crescimento (hipófise anterior) que causa crescimento em quase todas as partes do corpo, enquanto a tiroxina (da tireoide) aumenta a velocidade de muitas reações químicas também em quase todas as células do organismo (GUYTON; HALL, 2011).

Figura 2 Glândulas que compõem o sistema endócrino humano.



Fonte: Beraldo, 2012

A Tabela 1, relaciona algumas glândulas endócrinas com os hormônios e suas funções:

Tabela 2 Glândulas endócrinas, hormônios e suas funções

GLÂNDULA	HORMÔNIOS	PRINCIPAIS FUNÇÕES
Hipotálamo	Hormônio de liberação da tireotropina (TRH)	Estimula a secreção de TSH e prolactina
	Hormônio de liberação da corticotropina (CRH)	Produz a liberação de ACTH
	Hormônio de liberação do hormônio de crescimento (GHRH)	Causa a liberação do hormônio de crescimento
	Dopamina, ou fator inibitório da prolactina (PIF)	Inibe a liberação de prolactina
Hipófase posterior	Hormônio antidiurético (ADH) (também denominado vasopressina)	Aumenta a reabsorção de água pelos rins e causa vasoconstrição e elevação da pressão arterial
Tireoide	Tiroxina (T4) e Tri-iodotironina (T3)	Aumenta a velocidade das reações químicas na maioria das células, aumentando assim o metabolismo corporal.
	Calcitonina	Promove a deposição de cálcio nos ossos e a concentração de íons cálcio no líquido extracelular
Córtex Adrenal	Cortisol	Múltiplas funções metabólicas no controle do metabolismo das proteínas, carboidratos e gorduras; tem também efeitos anti-inflamatórios
	Aldosterona	Aumenta a reabsorção renal de sódio e a secreção de íons hidrogênio
Pâncreas	Insulina (células β)	Promove a entrada de glicose em muitas células e, dessa maneira, controla o metabolismo dos carboidratos
	Glucagon (células α)	Aumenta a síntese e a liberação de glicose, pelo fígado
Paratireoide	Hormônio paratireoide (PTH)	Controla concentração sérica de íons cálcio aumentando a absorção de cálcio pelo intestino e pelos rins e liberando cálcio dos ossos

Tabela 1 (Continuação) Glândulas endócrinas, hormônios e suas funções

Glândula	Hormônios	Principais Funções
Testículos	Testosterona	Promove o desenvolvimento do sistema reprodutor masculino e os caracteres sexuais secundários masculinos
Ovários	Estrógenos	Promove o crescimento e o desenvolvimento do sistema reprodutor feminino, das mamas femininas e dos caracteres sexuais secundários femininos
Hipófise anterior	Hormônio de crescimento (GH)	Estimula a síntese de proteínas e o crescimento global da maioria dos tecidos
	Hormônio tireoestimulante (TSH)	Estimula a síntese e a secreção dos hormônios tireóides (tiroxina e triiodotironina)
	Hormônio adrenocorticotrópico (ACTH)	Estimula a síntese e a secreção dos hormônios adrenocorticais (cortisol, androgênio e aldosterona)
Hipófise anterior	Prolactina	Promove o desenvolvimento das mamas femininas e a secreção de leite
	Hormônio foliculoestimulante (FSH)	Causa o crescimento dos folículos, nos ovários, e a maturação dos espermatozoides, nas células de Sertoli, dos testículos

Fonte: GUYTON; HALL, 2011

1.3 Ação do BFA como Desregulador Endócrino

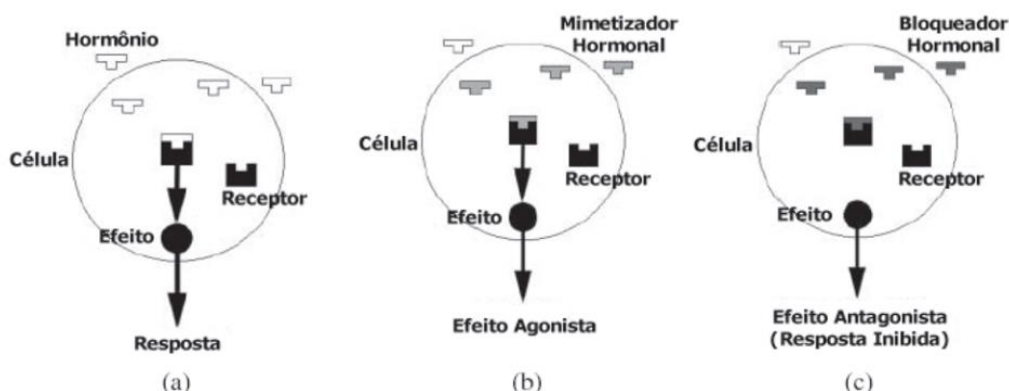
Os hormônios agem de forma específica, ligando-se diretamente a receptores específicos em células alvo. Caso a célula não possua o receptor para o hormônio, não há resposta. Esses receptores podem estar em vários locais da célula alvo, podendo estar no citoplasma, na membrana ou no núcleo da célula alvo. Ao se ligar com seu receptor os hormônios desencadeiam uma série de reações na célula, mesmo em baixas concentrações esses hormônios podem gerar grandes efeitos. (GUYTON; HALL, 2011).

Um receptor hormonal possui elevada sensibilidade e afinidade por um hormônio específico produzido no organismo. Devido a isso, concentrações extremamente baixas de um determinado hormônio geram um grande efeito, produzindo uma resposta natural. Porém, estes receptores hormonais, podem também se ligarem a outros compostos químicos. Sendo assim, pode-se entender o porquê de determinados DE mesmo que em baixas concentrações, serem capazes de propiciarem um grande efeito (SPADOTO, 2013).

As alterações do sistema endócrino ocorrem quando um DE interagem com um receptor hormonal, gerando uma resposta diferente do esperado. Sendo esse processo dividido em dois: Efeito Agonista e Efeito Antagonista.

O Efeito Agonista ocorre quando uma substância química se liga ao receptor hormonal gerando uma resposta, então esta substância atuou como mimetizador, imitando um determinado hormônio, porém gerando outra resposta diferente da esperada. O Efeito Antagonista ocorre quando uma substância química se liga ao receptor hormonal e não gera resposta, sendo assim bloqueia esse receptor de receber o hormônio natural devido, sendo assim esta substância atua como bloqueador (GHISELLI; JARDIM, 2007).

Figura 3: Disfunções endócrinas: a) resposta natural, b) efeito agonista e c) efeito antagonista



Fonte: GHISELLI; JARDIM, 2007

O BFA é um comum desregulador endócrino que possui característica estrogênica e também gera algumas alterações neurocomportamentais, e essas alterações são mais suscetíveis quando ocorre em estágios de desenvolvimento sensível do ciclo de vida. As alterações comportamentais são efeito da exposição a baixas doses de BFA (CHAVES,2016).

Em experimentos com fêmeas adultas de ratos, que foram expostas por um bom tempo a baixas concentrações de BFA, durante o período de gestação e de amamentação, pôde se constatar alteração em seu comportamento maternal e sexual como a redução no tempo gasto para amamentação dos filhotes e o aumento no tempo fora do ninho. E o contato com BFA no período de lactação induziu decréscimo das células α -receptoras de estrogênio (SETA et al., 2005).

A atividade estrogênica do BFA está relacionada com a interrupção da ação do hormônio da tireoide, o que compromete o desenvolvimento das glândulas mamárias, células germinativas e pode causar anomalias cromossômicas. Sendo assim, a US-EPA estabeleceu a dose aceitável de ingestão diária para o BFA de $50 \mu\text{gkg}^{-1}$ de peso corporal por dia (BROWNE et al., 2013) idêntica à dose diária admissível estabelecida por Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) em 2006.

Ao analisar amostras de urina em países industrializados, 95% delas apresentaram a presença de Bisfenol A. Uma de suas características é conseguir

contaminar em larga escala o ambiente, devido a facilidade de migração de sua estrutura de origem devido a presença de alta temperatura ou variação de pH, meio alcalino ou ácido. (CORREIA; FONTOURA, 2015).

1.4 Mamadeiras

É estimado que pelo menos dois terços das crianças terão contato direto com mamadeiras em algum momento do primeiro ano de vida. O uso desses utensílios, feitos com resíduos de BFA, pode afetar o processo de amamentação e produzir alterações na saúde da criança. (BUCCINI et al, 2014).

O policarbonato é um plástico que sua matéria prima é o Bisfenol A, sendo assim a liberação de BFA é eminente a partir de objetos.

De acordo com Dupont (2011), os órgãos legislativos de varios países (Canadá, França e Dinamarca), estão fazendo uso do princípio da precaução e com isso adotaram medida cautelar resolvendo proibir o uso de BFA em embalagens para uso infantil, como mamadeiras.

A Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) determinou a proibição, em todo o Brasil, da venda e da fabricação de mamadeiras de plástico que contenham Bisfenol A (BFA), Resolução - RDC N° - 41 de 16 de setembro de 2011. A medida entrou em vigor a partir de janeiro de 2012. O principal argumento da instituição é que estudos realizados com animais mostraram que o BFA pode causar problemas neurológicos, sobretudo, em crianças expostas à substância química nos primeiros anos de vida.

1.4 Cromatografia Líquida da Alta Eficiência (CLAE)

Na CLAE, uma amostra líquida é injetada no cromatógrafo, onde, é transportada por meio de uma fase móvel (Água, acetonitrila, Metanol, Ácido Acético) através de uma coluna, na qual os analitos separados fluem até um detector gerando uma resposta em um receptor de dados (HARRIS, 2012).

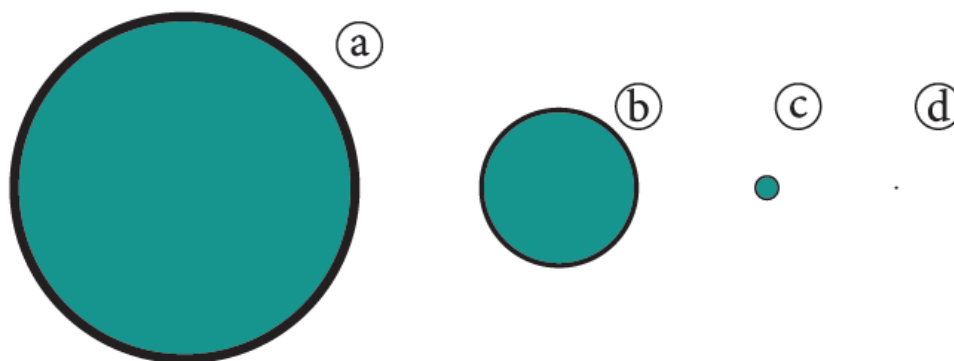
Os detectores cromatográficos estão conectados logo após a coluna cromatográfica, sendo assim os analitos ao passarem pela coluna tem contato com o

ser utilizada. Na atualidade tem-se estudado o uso de cromatografia líquida capilar, onde se utilizam colunas cromatográficas com propriedades diferentes das mais usuais, sendo o tamanho da coluna e da fase estacionária menores.

As Vantagens são: menor custo e maior eficiência técnica.

A figura 5 apresenta o comparativo de tamanhos proporcionais das colunas utilizadas em cromatografia líquida de alta eficiência, comparando os diâmetros internos.

Figura 5 Comparação em escala dos diversos diâmetros internos das colunas. a) convencional (4,6 mm); b) microbore (2,1 mm); c) capilar (320 μm); d) WCOT (20 μm).



Fonte: COUTINHO; LANÇAS, 2011

A redução na quantidade de fase estacionária, é uma das grandes vantagens da diminuição do diâmetro interno da coluna. Para colunas empacotadas (recheadas ou preenchidas), o volume que a fase estacionária ocupa dentro de uma coluna é proporcional ao comprimento da coluna e ao quadrado do seu diâmetro interno. Desse modo, uma coluna que possui um diâmetro interno de 0,32 mm consumirá uma quantidade de fase estacionária em torno de 200 vezes menor que aquela utilizada no empacotamento de uma coluna de 4,6 mm d.i. Sendo assim, torna-se viável o uso de outras fases estacionárias que não são muito utilizadas devido ao alto custo. (COUTINHO; LANÇAS, 2011)

Com a diminuição do diâmetro interno, há também uma diminuição no consumo de fase móvel. Tendo em vista que a separação cromatográfica não depende do fluxo da fase móvel, e sim da velocidade linear média (u), sendo assim uma separação pode ser feita em colunas semelhantes com diâmetros internos diferentes, desde que mantivemos a mesma velocidade linear na coluna. (YANG, 1989) (NOVOTNY; ISHII;1985) (ISHII;1988).

A relação entre o fluxo volumétrico (F) da fase móvel e sua velocidade linear média (u) é dada pela seguinte Equação 1:

Equação 1: Fluxo Volumétrico (CLAE)

$$F = \frac{u \cdot \pi \cdot d_c^2 \cdot \varepsilon}{4}$$

Onde d_c é o diâmetro interno da coluna e ε a porosidade da mesma.

Devido à significativa redução no consumo de fase móvel, a miniaturização da coluna possibilitará o uso de fases móveis de maior custo, como fases quirais, e solventes deuterados, assim como fases móveis tóxicas e inflamáveis, sem que eles forneçam grandes riscos à segurança do laboratório ou à saúde dos analistas.

O Volume de amostra é um fator importante a ser considerado, tendo em vista que em alguns estudos a quantidade de amostra disponível é baixa. Em colunas de tamanhos menores deve se usar uma menor quantidade de amostra, tendo em vista que o volume injetado deve ser proporcional ao quadrado do diâmetro da coluna. (COUTINHO; LANÇAS, 2011)

A diluição do analito dentro de uma coluna cromatográfica é inversamente proporcional ao quadrado de seu diâmetro. Sendo assim uma mesma amostra em uma coluna 0,32 mm d.i será cerca de 200 vezes mais concentrado que eluido em uma coluna convencional de 4,6 mm d.i. (COUTINHO; LANÇAS, 2011)

1.5 Técnicas de Extração de BFA

Para a determinação de resíduos contaminantes ambientais, em matriz aquosa, geralmente a primeira etapa é de extração e de pré-concentração, antes de quantificá-lo.

Para quantificar, são empregadas técnicas de separação e, dentre as mais comuns para amostras ambientais, destacam-se a Cromatografia a Gás (CG) com espectrômetro de massas (MONTAGNER 2013; CUNHA, 2015) e a Cromatografia em Fase Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (LÓPEZ-DARIAS et al., 2010; HAERI, 2016).

Dentre as técnicas de extração, a: extração líquido-líquido (ELL) e a extração em fase sólida (EFS) têm sido muito utilizadas.

1.5.1. Extração Líquido-Líquido (ELL)

A ELL se baseia na solubilidade relativa do analito em duas fases imiscíveis e a extração do analito é realizada pela diferença do poder de solubilidade (polaridade) de duas fases líquidas imiscíveis. Na ELL, normalmente utiliza-se um funil de separação onde duas fases imiscíveis são agitadas para interagirem, possibilitando a separação do analito. Para evitar as emulsões se utiliza sal e centrifugação. O grande volume de solventes orgânicos é a maior desvantagem apresentada pela ELL, que também se limita por conta da seletividade, pois, para análises em nível de traço, se faz necessário uma limpeza ou passos de enriquecimento/concentração do analito (RIDGWAY; LALLJIE; SMITH, 2007).

Trabalhos que utilizaram desta técnica de extração, para BFA, são relatados na literatura (ANDERSON et al., 2014; JAKIMSKA et al., 2013; CHEN et al., 2010).

1.5.2 Extração em Fase Sólida de compostos orgânicos

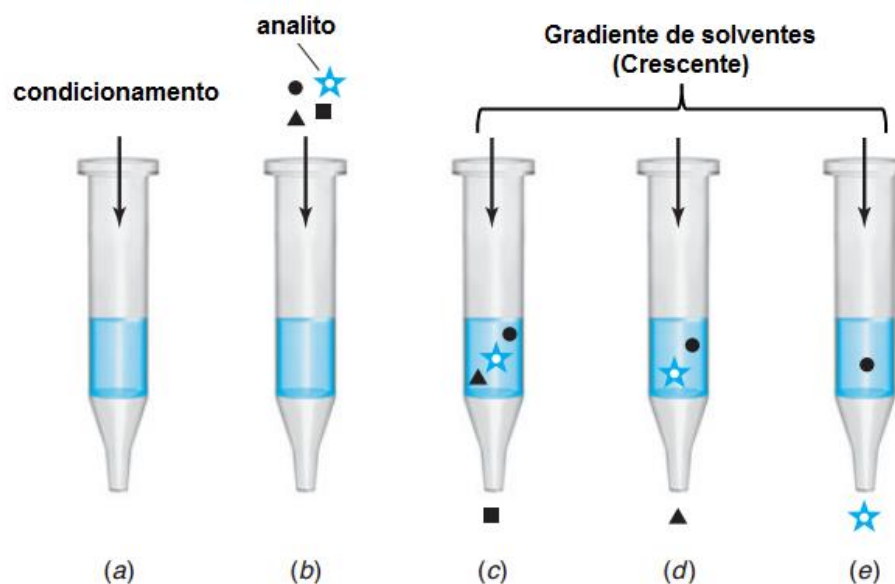
A extração em fase sólida (EFS) é uma técnica amplamente utilizada para a extração, mudança de solventes, limpeza, pré-concentração e o fracionamento de compostos orgânicos a partir de inúmeras amostras (ANDRADE-EIROA et al., 2016).

A EFS foi introduzida para fins analíticos em meados dos anos 70 (HENNION, 1999), cartuchos descartáveis para EFS em formato tipo seringa foi

introduzido em 1979 e em forma de disco em 1990. Desde então, tem havido muitas melhorias nos formatos de cartuchos EFS ou discos (ANTHEMIDIS et al., 2011) e surgido novos sorventes. Dentre os novos sorventes encontram-se os polímeros com impressão molecular (SHI et al., 2016) e nanopartículas de Fe_3O_4 revestidas com grafeno, sílica, alumina, quitosano entre outras substâncias para uso na extração em fase sólida magnética (ANDRADE-EIROA et al., 2016)

O procedimento básico da EFS convencional consiste em percolar a amostra através do sorvente (geralmente em um cartucho), no qual os analitos ficam retidos e posteriormente são eluídos com uma pequena quantidade de um solvente orgânico adequado, como ilustrado na Figura 6.

Figura 6 Etapas envolvidas na EFS: condicionamento do sorvente, adição da amostra, remoção dos interferentes e eluição do analito.



Fonte: Harris, 2012(Adaptado).

A EFS é extremamente simples. As etapas da extração resumem-se na ativação do sorvente, percolação da amostra/sorção dos analitos no sorvente, eliminação dos interferentes da matriz (clean up), eluição dos analitos e posterior concentração do composto de interesse. Porém alguns parâmetros devem ser analisados tais como a escolha do tipo e quantidade de sorvente, volume de amostra e de solvente para ativação dos cartuchos e para a eluição dos analitos (CALDAS et al., 2011).

Muitos dos sorventes empregados em EFS são similares às aquelas utilizadas em cromatografia líquida em coluna, consequentemente, os mecanismos de separação também são similares. Os principais mecanismos quando se emprega esse tipo de sorvente são: adsorção, partição (fase normal e reversa), troca iônica e exclusão. Esses mecanismos estão associados a processos químicos, físicos e mecânicos que atuam durante a separação (Jardim, 2010). Dentre as principais forças químicas e físicas atuantes entre as moléculas do analito e do sorvente, destacam-se as ligações de hidrogênio, interações dipolo-dipolo, dipolo-dipolo induzido, dipolo induzido-dipolo induzido e interações iônicas.

Rodrigues-Mozaz e colaboradores (2004) desenvolveram um método multiresíduo para determinação de várias classes de disruptores endócrinos em água. No método desenvolvido, empregou-se a EFS com sorvente RP-18 (*LiChrolut*) para pré-concentrar os analitos de 500 mL de amostra de água. O limite de detecção para bisfenol A foi de 5,3 ng L⁻¹ em análise por cromatografia em fase líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (CL-EM) com ionização química a pressão atmosférica.

Bisfenol A foi determinado em leite materno por CL-EM/EM. A EFS com sorvente Oasis HLB foi empregada para limpeza da amostra em uma das etapas do procedimento analítico (ZIMMERS et al., 2014). Oasis HLB é um sorvente polimérico não proveniente da sílica que pode reter substâncias lipofílicas e hidrofílicas devido a sua estrutura.

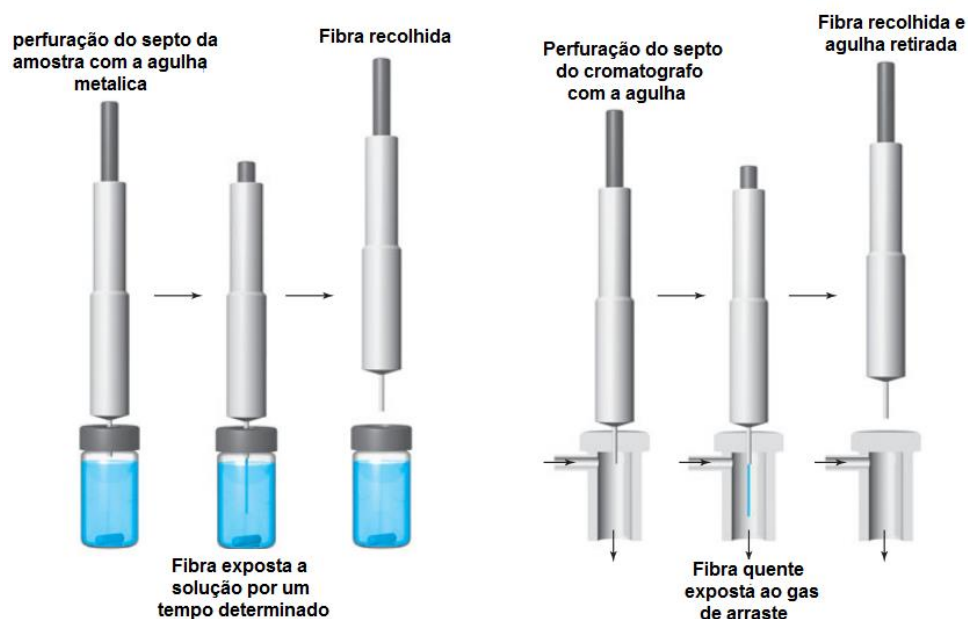
1.5.3 Microextração em Fase Sólida (MEFS)

Nas últimas décadas, uma atenção especial tem sido dada a métodos menos dependentes do emprego de solventes, rápidos e eficientes. Desta forma, métodos baseados em microextração vêm sendo desenvolvidos como alternativa aos métodos clássicos de extração (MARTINS et al., 2015). Um destes métodos é a microextração em fase sólida (MEFS), porque não utiliza solvente, tem alto poder de concentração, adequando-se com as sensibilidades dos detectores de CG.

A MEFS foi introduzida por Arthur e Pawlisyn em 1990. Nesta técnica utiliza-se uma fibra capilar de sílica fundida (10 mm comprimento e 110-160 µm de diâmetro)

recoberta com um filme fino de um líquido polimérico (por exemplo: polidimetilsiloxano = PDMS, poliacrilato = PA) ou de um sólido adsorvente (carvão microparticulado = Carboxen). A espessura do recobrimento (fase extratora) pode variar de 7 μm a 100 μm . A extração dos compostos de interesse pode ser efetuada por imersão da fibra na solução ou no *headspace* da amostra. Os analitos presentes na amostra serão absorvidos ou adsorvidos sobre a fibra dependendo da natureza do recobrimento. Nas análises por cromatografia a gás, a fibra é inserida diretamente no injetor do cromatógrafo onde os analitos são dessorvidos termicamente e carregados pelo gás de arraste para a coluna cromatografia, separados e analisados. É uma técnica simples e rápida, extração e injeção em apenas duas etapas e não utiliza solventes na extração. É aplicável no modo direto para amostras aquosas limpas e analitos de baixa volatilidade, no modo *headspace* para analito de média a alta volatilidade em amostras aquosas complexas, sólidas e biológicas. (HE et al., 2007). O esquema da MEFS pode ser visto na Figura 7.

Figura 7 Microextração em fase sólida (MEFS)



Fonte: Harris 2012(Adaptado).

Em análises por cromatografia em fase gasosa, a fibra é inserida diretamente no injetor do cromatógrafo onde os analitos são dessorvidos termicamente e carreados pelo gás de arraste para a coluna cromatografia, separados e analisados. A dessorção de solutos não voláteis ou termolábeis pode ser efetuada em fase líquida (fase móvel ou solvente orgânico) para a análise por cromatografia em fase líquida ou eletroforese capilar. Para a análise por cromatografia em fase líquida a dessorção de solutos não voláteis ou termolábeis é efetuada em fase líquida (fase móvel ou solvente orgânico). O procedimento pode ser feito empregando uma interface MEFS-CL apropriada ou em um sistema off-line. (HARRIS, 2012)

Trabalhos que utilizaram desta técnica de extração, para BFA, são relatados na literatura (KAMALABADI et al., 2016; HU et al., 2006; MOREIRA et al., 2015; WANG et al., 2011; ZHANG et al., 2015).

1.5.4 Microextração em Fase Líquida

As técnicas de microextração em fase líquida permitem extrair espécies orgânicas e inorgânicas a partir de matrizes aquosas com apenas alguns microlitros de um solvente orgânico. A miniaturização da técnica de extração líquido líquido surgiu com o objetivo de reduzir a razão volumétrica entre as fases e favorecer a transferência dos analitos da fase aquosa para a fase orgânica e ainda obter um elevado fator de enriquecimento (Oliveira et al., 2008). Esse conceito foi introduzido com o desenvolvimento da técnica de microextração em gota suspensa (SDME - *single-drop microextraction*) em 1996 por Jeannot e Cantwell (JEANNOT, 1996).

1.5.4.1 Microextração por Gota Única (MEGU)

A técnica de microextração por gota única (MEGU) foi desenvolvida a partir de um experimento em que uma microgota de solvente orgânico imiscível em água (~8 µL de n-octano) foi acomodada na porção final de um dispositivo de politetrafluoretileno (PTFE), sendo então imerso na solução contendo a amostra. Após 5 minutos de extração sob agitação, o dispositivo foi removido da amostra, a gota recolhida com microseringa e 1 µL a fase orgânica foi injetada no cromatógrafo a gás (JEANNOT, 1996; Oliveira et al., 2008). Posteriormente, a técnica foi modificada, passando-se a utilizar uma microseringa com agulha de ponta cônica como suporte, onde a fase orgânica era suspensa na ponta da agulha (Figura 8).

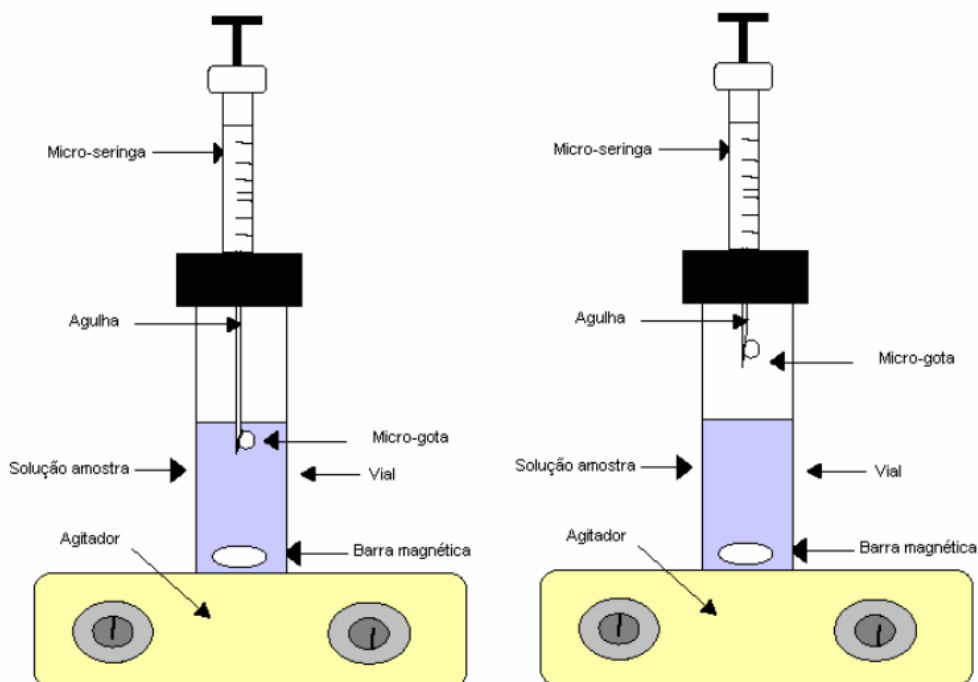
A técnica apresenta duas maneiras de extração, direta ou no *headspace*.

No modo de extração direta, a fase extratora presente na seringa é inserida na amostra, em forma de gota, na qual os analitos são aderidos e podem então serem transportados. A agitação favorece o transporte de analitos da matriz para a gota. Já no modo *headspace*, a gota de extrator interage com a parte volátil da amostra, sem entrar em contato com a parte líquida da matriz (XU, 2007). Isso é visualizado na Figura 8.

A extração por imersão da gota na solução da amostra é aplicável a extração de analitos polares ou semi-polares em amostras aquosas (por exemplo: água, sucos, urina e soro sanguíneo). Os solventes n-octano e tolueno têm sido muito empregados nesta técnica, principalmente quando a análise é por cromatografia em fase gasosa. Líquidos orgânicos iônicos devido a sua baixa pressão de vapor e alta viscosidade permitem a formação de gotas maiores e reprodutíveis, estes são utilizados na extração quando a análise é por CLAE. Os líquidos iônicos mais empregados são: hexafluoro fosfato de 1-butil-3-metilimidazólio, tetrafluoro borato de 1-butil-3-metilimidazólio, hexafluoro fosfato de 1-octil-3-metilimidazólio (JAIN & VERMA, 2011).

A extração no *headspace* da amostra é mais utilizada que a extração direta por ser mais vantajosa. Esta não sofre interferência da matriz, pode ser aplicada a amostras sólidas e líquidas e o coeficiente de difusão na fase gasosa é muito superior ao da fase condensada. Solventes que não evaporam rapidamente, como tolueno, octanol, álcool benzílico, butanol, dodecano, são empregados neste procedimento (JAIN & VERMA, 2011).

Figura 8 (A) Extração direta (B) Extração headspace



Fonte: MALTEZ, 2007

Nesta técnica, os analitos de elevado coeficiente de partição podem atingir altas concentrações, uma vez que são transferidos por difusão de um expressivo volume de amostra (1-5 mL) para um diminuto microextrato (5-50 μ L). No entanto, a microextração em gota suspensa não é tão robusta, ocorrendo perda de solvente durante a extração, especialmente quando é aplicada agitação para acelerar o processo de extração, além da necessidade de pré-tratamento de amostras bastante viscosas ou contendo material particulado (possível colisão com a microgota) (JEANNOT, 1996; JAIN & VERMA, 2011).

Trabalhos que utilizaram desta técnica de extração, para BFA, são relatados na literatura (LÓPES-DARIAS et al., 2010).

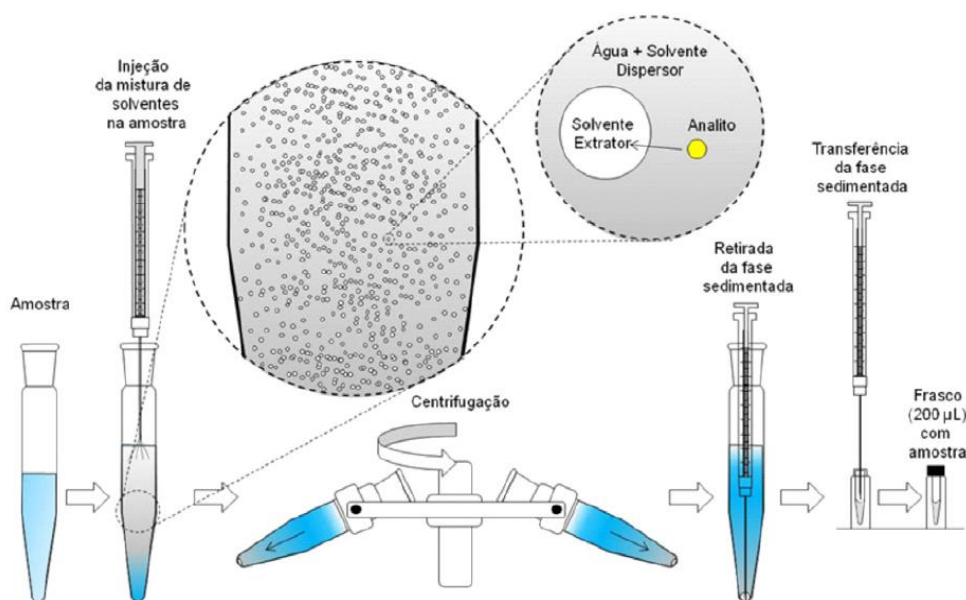
Dois procedimentos de microextração para determinação de fenóis (bisfenol A, 4-octilfenol, 4-nonilfenol, 4-terbutilfenol) em água do mar foram desenvolvidos por Lopes-Darias e colaboradores. Um procedimento empregando a extração por gota única e o outro a microextração líquido-líquido dispersiva e análise por CLAE com detecção por UV. Os parâmetros que evidenciaram maior eficiência de extração para o método empregando a MEGU foram o uso de decanol com solvente de extração,

volume da gota de 2,5 μL , 5 mL de água do mar, e 60 minutos para o tempo de extração por imersão da gota a amostra. Os limites de detecção obtidos ficaram entre 4 e 9 ng mL^{-1} (LÓPES-DARIAS *et al.*, 2010).

1.5.4.2 Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (MELLD)

A microextração líquido-líquido dispersiva (MELLD) foi introduzida em 2009 por Rezaee e colaboradores (REZAEI *et al.*, 2009). Neste método, uma mistura apropriada de solventes (solvente de extração e solvente dispersor) é injetada rapidamente na amostra aquosa, com auxílio de uma seringa. A mistura é agitada para formação de micro gotas do solvente orgânico, completamente dispersas na fase aquosa. Nesta etapa os analitos são transferidos da fase aquosa para a fase extratora por partição. A transferência é rápida e, portanto o estado de equilíbrio é atingido rapidamente. Após centrifugação a fase orgânica é retirada com auxílio de uma seringa e analisada pela técnica apropriada (AL-SAIDI e EMARA, 2014; CALDAS, *et al.*, 2011). A MELLD é realizada em duas etapas: extração e separação das fases. As etapas do procedimento convencional de MELLD estão ilustradas na Figura 10 (CALDAS *et al.*, 2011).

Figura 9 Etapas envolvidas um dos procedimentos da MELLD



Fonte: (CALDAS *et al.*, 2011).

O solvente dispersor deve ser solúvel na amostra aquosa e o solvente extrator deve ser insolúvel na amostra aquosa e solúvel no solvente dispersor.

Esta técnica possui diversas vantagens comparada às técnicas convencionais, tais como, simplicidade de operação, rapidez, baixo custo, fácil manipulação, baixo consumo de solventes orgânicos, alta recuperação, alto fator de enriquecimento. A MELLDD pode ser aplicada em análises de compostos orgânicos e inorgânicos e é compatível com análises por CG, CLAE, AAS, ICP-OES, ICP-MS e UV-Vis (REZAEI et al., 2009).

Metanol, acetonitrila, acetona, etanol e tetraidrofurano são os solventes dispersores mais utilizados. O volume adequado de solvente dispersor para a formação das microgotas depende tanto do volume da fase aquosa quanto do volume do solvente extrator (ZHANG, et al., 2015).

Em geral, o solvente de extração deve ser capaz de extrair bem os analitos, enquanto a sua solubilidade em água deve ser muito baixa. Os solventes com maior densidade que a água e baixa solubilidade nesta permitem a separação do extrato orgânico na fase sedimentada. Alguns solventes halogenados têm sido utilizados como solventes extratores, como clorofórmio, diclorometano, clorobenzeno e tetracloreto de carbono (PUSVASKIENE et al., 2009; MARTINS et al., 2015).

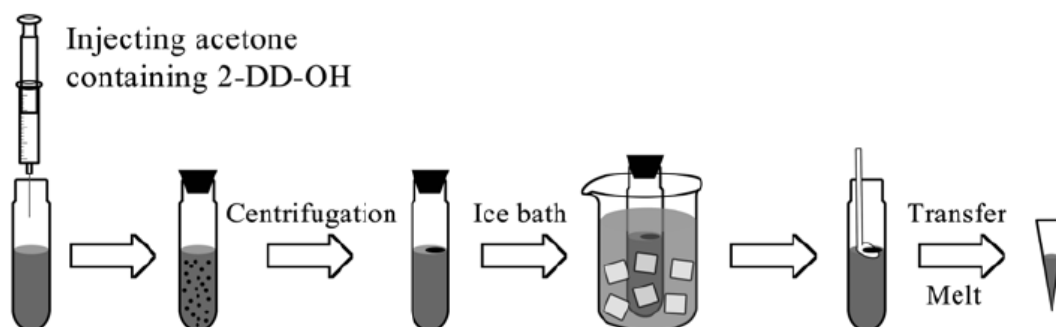
Os principais fatores que afetam a eficiência da extração por MELLDD devem ser estudados e otimizados, entre eles o solvente de extração, solvente de dispersão, os volumes dos solventes de extração e dispersão, tempo de extração, força iônica e pH da amostra (CALDAS et al., 2011). Apesar do equilíbrio de partição dos analitos entre a fase orgânica e a fase aquosa ser atingido muito rapidamente, na prática, o tempo de extração é definido como o intervalo entre a adição da mistura dos solventes extrator e dispersor na fase aquosa e o final da centrifugação. A influência da força iônica deve ser considerada, uma vez que influencia na separação das fases. O aumento na concentração de NaCl aumenta o volume da fase sedimentada, devido à diminuição da solubilidade do solvente extrator na presença de um sal. Esta influência depende das características do analito. Observa-se nos trabalhos publicados uma grande variação, desde a não utilização de NaCl a adição de 0,5 a 30%. O pH é

otimizado em função da acidez ou basicidade de alguns compostos. O ajuste do pH do meio permite que os analitos permaneçam na forma neutra, facilitando a extração.

O coeficiente de distribuição (K_D) é definido como a razão entre a concentração do analito no solvente de extração e a solução de amostra. A MELLD é aplicável apenas para analitos com propriedade lipofílica alta ou moderada ($K_D > 500$) e não se adapta para analitos neutros com alta propriedade hidrofílica. Para analitos ácidos ou alcalinos o coeficiente de distribuição pode ser aumentado pelo controle do valor de pH da solução da amostra, fazendo com que os analitos existentes fiquem no estado não iônico (ZHANG et al., 2015).

O solvente de extração na MELLD pode ser mais denso ou menos denso que a solução aquosa da amostra. Nos últimos anos pesquisadores tem se dedicado ao desenvolvimento de métodos que substitua os solventes de extração clorados por solventes ambientalmente mais amigáveis, por exemplo, o uso de alcoóis de cadeia longa e de líquidos iônicos. O emprego de solventes de baixa densidade e ponto de fusão superior ao da água foi introduzido por Leong e Huang em 2008. A técnica foi denominada de microextração líquido-líquido dispersiva com base na solidificação da gota flutuante (dispersive liquid-liquid microextraction based on the solidification of floating organic droplets). Nesta técnica, a mistura de solventes (dispersor e extrator) é injeta na amostra e após a centrifugação, as gotas finas do solvente de baixa densidade contendo os analitos extraídos flutuaram. O tubo é colocado em banho com gelo para que o solvente se solidifique, este é removido e transferido para um frasco cônico onde se liquefaz rapidamente a temperatura ambiente (Figura 10). Neste procedimento tem-se usado os solventes: 1- dodecanol (p.f.=22 °C dodecanol (p.f.=18°C), 1-undecanol (p.f. =16 °C) e 1-decanol (p.f.= 6 °C) (JIA et al., 2013).

Figura 10 Etapas envolvidas na microextração líquido-líquido dispersiva com base na solidificação da gota flutuante



Fonte: Leong e Huang, 2008

Desde 2009, métodos empregando a microextração líquido-líquido dispersiva com base na solidificação da gota flutuante e análise por GC e HPLC tem sido desenvolvido para a determinação de fungicidas, hormônio e fármacos em amostras aquosas (KOCÚROVÁ et al., 2012; JIA et al., 2013; MARTÍNS et al., 2015).

Outra forma da MELLD consiste no emprego de líquidos iônicos (LI) como solvente de extração (*Ionic Liquids in Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*). As propriedades mais notáveis dos líquidos iônicos (LI) incluem sua insignificante pressão de vapor à temperatura ambiente, uma elevada estabilidade térmica, e viscosidade variável (Trujillo-Rodrigues et al., 2013). A LI-MELLD convencional, não requer aquecimento e a agitação é manual, necessita apenas da mistura ternária dos componentes (amostra aquosa contendo analitos, solvente iônico extrator e solvente dispersivo). Como solvente dispersor é usado um solvente orgânico (metanol, acetonitrila) ou um líquido iônico hidrofílico em substituição ao solvente orgânico (EUCUDERO et al, 2013). A extração com LI pode ser assistida por temperatura, nesta técnica, o LI é injetado na amostra e a amostra é aquecida. O aquecimento aumenta a solubilidade do LI e favorece a dispersão do mesmo na solução aquosa. Na etapa seguinte, a amostra é resfriada para facilitar a separação entre as fases (BAGHDADI & SHEMIRANI, 2008; BERTON E WUILLOUD, 2010). Os líquidos iônicos hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio, tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazólio, hexafluorofosfato de 1-octil-3-metilimidazólio e outros têm sido utilizados em MELLD (TRUJILLO-RODRIGUEZ et al., 2013).

Um método para determinação de Bisfenol A em água empregando MELLD e análise por CLAE-UV foi desenvolvido Rezaee e colaboradores (RAZAEI et al., 2009). Neste, uma mistura composta por 142 µL de clorofórmio (solvente extrator) e 2,0 mL de acetona (solvente dispersor) foi injetada rapidamente na amostra de água contendo Bisfenol A, sem adição de sal. O limite de detecção do método foi de 0,07 µg L⁻¹.

Lópes-Dárias e colaboradores propuseram um método para determinação de bisfenol A em água do mar usando MELLD-CLAE-UV (LÓPES-DARIAS, 2010). Os parâmetros estabelecidos para a extração foram: 5 mL de amostras, 150 µL da mistura de solventes (dispersor+extrator, razão de 15,7:1), agitação de 4 min em vórtex, centrifugação por 5 min. a 2000 rpm. Decanol foi usado com solvente extrator e acetonitrila com dispersor. O limite de detecção do método foi de 0,2 ng mL⁻¹.

A microextração líquido-líquido dispersiva com base na solidificação de uma gota orgânica flutuante, assistida por ultrassom, foi aplicada em um método de determinação multirresíduo (17 α-etinilestradiol; 17 β-estradiol; estriol; estrona; bisfenol A; metil-, etil-, e propil-parabeno; perfluorooctano; **ácido perfluooctano sulfônico** e cinco ácidos carboxílicos perfluoroalquilo, de C4 a C8 e hexabromociclododecano). Neste, uma alíquota de 10 mL de amostra de água acidificada (pH=1) foi transferida para um tubo de centrífuga de 12 mL. Uma mistura de 80 µL de solvente de extração (1-undecanol) e 500 µL de solvente dispersor (metanol) foi rapidamente injetada no tubo e uma solução turva foi formada. A mistura foi **ultrassonificada** por 5 min e centrifugada por 5 min a 4000 rpm. Após centrifugação, as finas gotículas do solvente de extração flutuaram na parte superior do tubo. Em seguida, o tubo foi arrefecido em um banho de gelo durante 5 min. As gotículas solidificadas foram transferidos para um balão volumétrico de 1 mL, onde o solvente se liquefez à temperatura ambiente. A solução foi diluída até ao volume

Outros métodos foram desenvolvidos para a determinação de BFA em várias matrizes, empregando MELLD com alguma outra variável envolvida (ROCHA et al., 2016; HAERI, 2016; SALGUEIRO-GONZÁLEZ et al., 2012; CUNHA, 2015; LIU et al., 2013).

Trabalhos recentes demonstram a preocupação com os danos causados pelo BFA e suas fontes de contaminação. Os dados referentes a estes trabalhos podem ser vistos na Tabela 3.

Tabela 3: Métodos diversos de análise de Bisfenol A

Analito	Técnica de Análise	Volume Amostra	Volume Solvente	Tempo extração	Faixa linear	Limite de Detecção	Ref.
Fenóis	CG-EM	1000mL	5mL		5 -50 pg.L ⁻¹	10-50 ng.L ⁻¹	BOLZ, et al 2000
Pesticidas + BFA	CLAE-EM	500mL	8mL		0.005–1 µg.L ⁻¹	6,3 ng.L ⁻¹	RODRIGUEZ -MOZAZ,et al 2004
BFA	CG-EM	10mL	200mL		0.005–10 µg.L ⁻¹	1 ng.L ⁻¹	KAWAGUCHI et al 2004
BFA + AP	CG-EM	5mL	5ul	30min	2.5–250 µg.L ⁻¹	0,014 ug.L ⁻¹	BASHEER, et al. 2004a
APs + BFA	CG-EM	10mL	100ul	60min	0,012–0,026 µg.L ⁻¹ 1	0,014 µg.L ⁻¹	BASHEER, et al. 2004
BFA	CG-EM	1000mL	60 – 150mL		0.51-25.1 µg.L ⁻¹	0,67µg.L ⁻¹	GHISELI, 2006
Fenois	CG-FID	10mL	1uL	25min	4-4000 µg.L ⁻¹	0.1-0. µg.L ⁻¹	ZHAO, et al 2008
Fenóis	CLAE-UV	10mL	7uL	10min	1-1000mg.L ⁻¹	0.5-0.6mg.L ⁻¹	PAN et al 2008

Tabela 4(continuação): Métodos diversos de análise de Bisfenol A

Analito	Técnica de Análise	Volume Amostra	Volume Solvente	Tempo extração	Faixa linear	Limite de Detecção	Ref.
BFA	CG-EM	10mL	-	60min	5-600 $\mu\text{g.L}^{-1}$	0,05 $\mu\text{g.L}^{-1}$	CAO, X.; CORRIVEAU, J. 2008
BFA	CLAE- UV	10mL	2mL 142uL	3min	0.5-100 $\mu\text{g.L}^{-1}$	0.07 $\mu\text{g.L}^{-1}$	Rezaee, et al. 2009
BFA	CLAE-FLU	20mL	50ul	2min	0.5-100 $\mu\text{g.L}^{-1}$	0,02 $\mu\text{g.L}^{-1}$	YANTZI, et al 2010
BFA	CLAE- FLU	250mL	45MI		0.2-14 $\mu\text{g.L}^{-1}$	0,1 $\mu\text{g.L}^{-1}$	NAM, 2010
BFA	CG-EM	24mL	8 MI		5-200ng.L ⁻¹	0.7 ng.L ⁻¹	LI et al 2010
BFA	CLAE-UV	5mL	150uL	4min	2-20 $\mu\text{g.L}^{-1}$	0.7 $\mu\text{g.L}^{-1}$	J. LÓPEZ- DARIAS et al 2010
BFA	CLAE-UV	5mL	2.5	60min	15--125 $\mu\text{g.L}^{-1}$	4 $\mu\text{g.L}^{-1}$	J. López- Darias et al 2010
BFA	CLAE- UV	1000mL	2MI		0.5–50 mg.L ⁻¹	0.5 $\mu\text{g.L}^{-1}$	GE, et al. 2010
BFA	CLAE-EM	500mL	-----	-----	-----	2,39 ng g ⁻¹	WANG et al. 2011

Tabela 5(continuação): Métodos diversos de análise de Bisfenol A

Analito	Técnica de Análise	Volume Amostra	Volume Solvente	Tempo extração	Faixa linear	Limite de Detecção	Ref.
Alquilfenóis + BFA	CLAE-FLU	14mL	15uL	50min	0.1-200 $\mu\text{g.L}^{-1}$	0.014 $\mu\text{g.L}^{-1}$	LIN, et al. 2011
Alquilfenóis + BFA	CLAE-EM	30mL	100uL	5min	0,09-50 $\mu\text{g.L}^{-1}$	0,005–0.03 $\mu\text{g.L}^{-1}$	GONZÁLEZ, 2011
BFA+ NF	CLAE-EM	30mL	100uL	5min	0.005–10 $\mu\text{g.L}^{-1}$	0,03 $\mu\text{g.L}^{-1}$	SALGUEIRO-GONZÁLEZ et al. 2012
BFA	CE-UV	10 mL	90uL e 1,5mL	2min	2.5-100 $\mu\text{g.L}^{-1}$	0.8 $\mu\text{g.L}^{-1}$	ALSHANA et al 2013
Fenois	EC-UV	3.3mL	120uL	8min	5-500 $\mu\text{g.L}^{-1}$	0,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$	H. HE ET AL 2014
BFA	CLAE-EM	800 μL	4ml	20min	0.75–20 ng mL ⁻¹	0.1 ng mL ⁻¹	ANDERSON et al. 2014
BFA	CG-EM	19mL		30min	0.01-0.18 $\mu\text{g kg}^{-1}$	0,26 $\mu\text{g kg}^{-1}$	MOREIRA et al. 2015

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver e validar um método para determinação de Bisfenol A (BFA) em águas, usando a micro extração líquido-líquido dispersiva (MELLD) e a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de Fluorescência.

2.2 Objetivos Específicos

Estabelecer as variáveis da técnica de MELLD, que evidencie maior eficiência na extração de Bisfenol A (BFA) de amostras de água.

Validar o método e comparar o desempenho analítico com os já existentes.

Aplicar o método na determinação de Bisfenol A migrado de mamadeiras.

3 Procedimento Experimental

3.1 Materiais

3.1.1 Padrão, solução estoque e solução de trabalho

Bisfenol A da Aldrich com teor de pureza $\geq 99\%$ foi utilizado como padrão cromatográfico. A solução padrão estoque foi preparada na concentração de 100 mg L^{-1} em água ultrapura, e armazenada em refrigerador. As soluções diluídas do padrão (soluções de trabalho) foram preparadas por diluição da solução estoque, 100 mg L^{-1} em água ultrapura e suas concentrações variaram entre $50\text{-}500 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$.

3.1.2 Reagentes e solventes

Acetonitrila (grau cromatográfico, J. T. Baker) foi utilizada como solvente dispersor na MELLD e como fase móvel na separação cromatográfica por CLAE.

Cloreto de sódio (99,5%) adquirido da Sigma Aldrich foi utilizado nos estudos do efeito da força iônica sobre a eficiência de extração.

Para o ajuste de pH das soluções foram utilizados ácido clorídrico (J.T. Baker, 37%).

Decanol (Aldrich, $\geq 99\%$) foi empregado como solventes de extração nos testes de otimização da MELLD.

No procedimento de limpeza de frascos e tubos de vidro empregou-se o detergente Extran MA 02 neutros (Merck).

3.1.3 Instrumentação

Foram utilizados agitador de tubos de ensaio – VM 3000 tipos VORTEX (Vixar, Brasil); balança analítica XT 220A (Precisa, Suíça) com mínimo de massa de 0,0001 g; centrífuga 4K15 (SIGMA, Alemanha); lavadora ultrassônica USC1800A com aquecimento da Unique (Brasil); sistema de purificação de água osmose Reversa - OS 50 LX TQ50 (Gehaka, Brasil).

Para as análises foi utilizado um Cromatógrafo a Líquido de Alta Eficiência com Detector por Fluorescência, com injetor automático, conjunto Finnigan Surveyor (Thermo Fischer Scientific, EUA) do Instituto de Química da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, campus Campo Grande; A coluna cromatográfica modelo Poroshell 120 EC-C18 (3,0 x 50mm, 2,7 μ m) (Agilente, EUA).

3.1.4. Outros materiais

Balões volumétricos de 5, 10, 25, 50, 100 e 250 mL; frascos de vidro de 2,0 mL com tampa de plástico e septo de PTFE/silicone (Agilent Technologies); micropipeta de 100 a 1000 μ L da marca EPPENDORF, modelo Research Plus (pipeta graduada de 10 mL; pipetas Pasteur de vidro; tubos de ensaio de vidro com fundo cônico de 12 mL.

3.2 Protocolo de limpeza

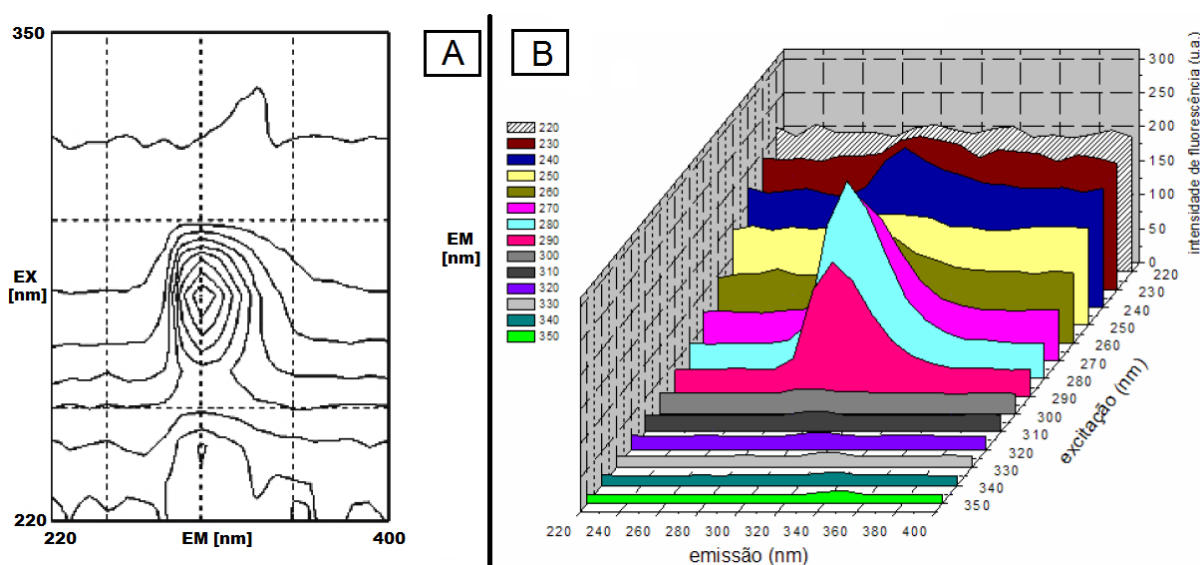
Para que as vidrarias tivessem a limpeza adequada, foi cumprido um protocolo de limpeza adaptado de LIMA (2011). Toda a vidraria necessária foi submetida à imersão em solução aquosa de detergente Extran (5% v/v) por 12 horas, e em seguida feito o enxague com água corrente. Após completa retirada do detergente, houve a lavagem com água ultrapura. Efetuada a secagem da vidraria em estufa a 40°C, após houve a lavagem com hexano em banho ultrassônico por 30 min e secagem novamente em estufa a 40°C e após, enfim, a lavagem com acetonitrila por 30 min em banho ultrassônico e secagem da vidraria em estufa a 40°C. O material volumétrico foi seco a temperatura ambiente.

3.3 Método de análise

3.3.1 Otimização das condições cromatográficas

Para a análise de BFA por CLAE/FLU foram aplicados os valores de comprimento de onda de 280 nm e 300 nm para excitação e emissão, respectivamente. O par de comprimento de onda (excitação/emissão) onde ocorre a maior fluorescência do BFA foi determinado por LEANDRO (2006), conforme mostra figura 11.

Figura 11 Espectro de Fluorescência 3D do BFA



Fonte: Leandro, 2006

Após testou-se a composição de fase móvel, volume de injeção e vazão reportadas na literatura, López-Darias e colaboradores (2010).

Onde se obteve as seguintes condições otimizadas:

1. Fase móvel (H₂O/ACN) = 50:50;
2. Volume de injeção= 10 µL;
3. Vazão= 0,4 mLmin⁻¹.

Uma vez otimizadas as condições cromatográficas, fez-se uma curva analítica com solução aquosa do padrão de BFA, em água ultrapura, na faixa entre 50-500 $\mu\text{g L}^{-1}$. Cada concentração foi analisada três vezes, o valor médio de área foi obtido após ter aplicado o teste de Huber. O valor de área foi relacionado com a concentração de BFA, a equação da reta foi obtida pelo método dos mínimos quadrados e a linearidade avaliada.

3.3.2 Procedimento da microextração líquido-líquido dispersiva (MELLD)

Para o desenvolvimento do método de extração foram estudados alguns dos parâmetros que afetam a eficiência da extração como: pH e força iônica.

Como solvente de extração foi utilizado o decanol e como solvente de dispersão a acetonitrila. A escolha dos solventes foi com base nos resultados apresentados no artigo de López-Darias e colaboradores (2010). Neste trabalho, os autores relatam o dodecanol e a acetonitrila (extrator: dispersor), na proporção 15, 7:1 como condição de maior eficiência na determinação de fenóis em água empregando MELLD-CLAE/UV.

Para verificar o efeito do pH na eficiência de extração foram efetuados experimentos com os pH 2,00, 4,00 6,00 e 8,00. O ajuste de pH da amostra é feito normalmente em função da acidez ou basicidade do analito. A espécie neutra, normalmente, é mais facilmente extraída pelo solvente orgânico.

A água já com o pH ajustado foi empregada no preparo de 25 mL de solução padrão de 3 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Para a MELLD foram transferidos 5 mL da solução padrão preparada com água ultra pura e pH ajustado para tubo de ensaio de vidro com fundo cônico. A seguir, adicionou-se a amostra 900 μL de uma mistura contendo os solventes extrator e dispersor, na razão de 15,7:1, com uma micropipeta.

A amostra foi agitada em vórtex por 4 min a 4000 rpm para formação de micro gotas de solvente orgânico dispersas na fase aquosa. As amostras foram centrifugadas por 10 min. a 3417 RCF a 20°C. Após a centrifugação formou-se uma solução em duas fases sendo a superior a fase extratora, devido a densidade do

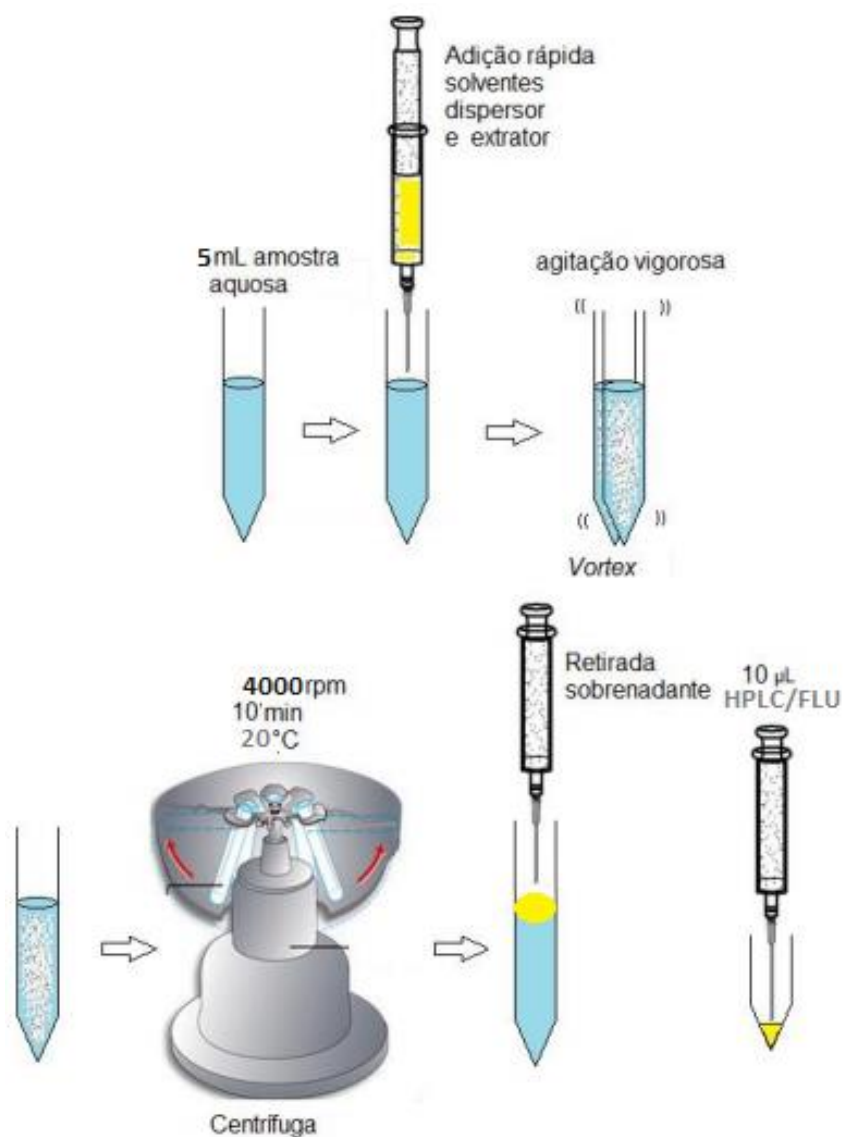
solvente extrator, aproximadamente 50 μL foi recolhido com o auxílio de uma microseringa de CLAE (100 μL). O extrato foi colocado no insert dentro de frasco de vidro de 2 mL com tampa de rosca e septo, e para análise cromatográfica injetou-se 10 μL da solução. As extrações foram realizadas em triplicata e cada extrato foi analisado.

O efeito da força iônica sobre a eficiência de extração foi avaliado em amostras com concentração de 3 μgL^{-1} de BFA, sem adição de sal e em concentração de 0,5; 1,0 e 2,4% de NaCl. As condições da MELLD e as diluições para análise cromatográficas foram similares as descritas no estudo de pH.

O tipo de agitação e a velocidade de centrifugação influenciam na formação de micro gota e separação de fases, e consequentemente na eficiência de extração. O tempo de extração é outro parâmetro importante para ser analisado no desenvolvimento da MELLD.

Após todas estas etapas avaliadas o procedimento de MELLD adotado para as análises por CLAE/FLU estão representadas na Figura 12.

Figura 12 Esquema da extração da amostra por MELLD



Fonte: Freire,2015 (adaptado)

3.3.3 Validação do método MELLD-CLAE/FLU

Os parâmetros para a validação do método MELLD-CLAE/FLU foram seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação, exatidão e precisão (método e instrumento).

3.3.3.1 Seletividade

A seletividade foi obtida pela comparação dos cromatogramas obtidos da matriz aquosa e da matriz fortificada com o padrão do analito de interesse na concentração de $3 \mu\text{g L}^{-1}$.

3.3.3.2 Linearidade do método

É a capacidade de uma metodologia analítica demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, 5 concentrações diferentes.

Para avaliar a linearidade do método, soluções padrões de concentrações diferentes do analito em água ultrapura (0,3; 1,0; 3,0; 5,0; 10; 15, e $20,0 \mu\text{g L}^{-1}$) foram analisadas empregando os parâmetros estabelecidos para MELLD e análise CLAE/FLU. Todo o procedimento foi feito em triplicata.

O estudo do comportamento linear do instrumento foi realizado através da injeção direta dos padrões do analito, sendo a faixa de concentração de 50 a $500 \mu\text{g L}^{-1}$.

Os gráficos de calibração foram feitos de acordo com a relação área obtida do analito com sua respectiva concentração. A equação da reta ($y = ax + b$, onde y = área do pico; a = coeficiente angular da reta; b = coeficiente linear da reta; x = concentração do analito) foi determinada pelo programa *Origin 6.1* para o tratamento dos dados.

Para a região linear, foi utilizado o teste de Huber para excluir pontos anômalos (VALENTE et al., 2006). O procedimento para aplicação do *Teste de Huber* segue as 7 etapas descritas a seguir:

1. Dividir as áreas pelas correspondentes concentrações, para plotar um gráfico da curva de linearidade: área/concentração vs concentração (A/C vs C);
4. Calcula-se a mediana (md) das razões A/C ;
5. Calculam-se as diferenças absolutas entre as A/C e md ;

6. Obtém-se a mediana (mad) dessas diferenças. Para obter a mad, ordenam-se os valores dessa diferença em ordem crescente (módulo) e faz-se a média dos dois pontos do centro da tabela formada, sendo que essa média é a mad;
7. Determina-se o intervalo de confiança (IC) pela Equação 2 e estabelece os limites superior e inferior;

Equação 2: Intervalo de Confiança (Teste de Huber)

$$IC_{s,i} = M_d \pm K.Mad$$

8. Rejeita-se as A/C de valor acima dos $IC_{s,i}$ e, conseqüentemente, as áreas correspondentes a elas;
9. Aplica-se a regressão linear às médias das áreas não rejeitadas e concentrações para obter uma equação para a curva analítica.

A avaliação da linearidade do método foi feita através do coeficiente de correlação linear ao quadrado (r^2). De acordo com a literatura quanto mais esse valor se aproximar de 1 melhor será a linearidade.

3.3.3.3 Limites de detecção e quantificação

Limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (ANVISA, 2003).

Para determinação do limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) do instrumento curvas analíticas foram obtidas com os dados de análise CLAE/FLU das soluções em diferentes concentrações do padrão sem empregar a MELLD.

O LD foi encontrado pelo cálculo de 3 vezes a razão entre o desvio padrão do residual da linha de regressão e coeficiente angular da curva analítica e o LQ foi encontrado pelo cálculo de 10 vezes a razão entre o desvio padrão do residual da linha de regressão pelo coeficiente angular da curva analítica.

Para a determinar o LQ do método foram analisadas soluções de baixa concentração empregando a MELLD e análise CLAE/FLU. Considerou-se como LQ a menor concentração que tiveram os valores de área aceitos, pelo teste de Huber, para as três réplicas. Esta concentração foi empregada como primeiro ponto da curva analítica. Limite de detecção foi adotado como $0,3 \times \text{LQ}$.

3.3.3.4 Exatidão e precisão

3.3.3.4.1 Precisão do instrumento

A precisão do instrumento foi avaliada em nível de repetitividade dos tempos de retenção do analito e de sua respectiva área.

O estudo do tempo de retenção levou em consideração a análise em triplicata de uma solução padrão a $500 \mu\text{g L}^{-1}$ do analito. Assim obteve-se através das médias (M) dos tempos de retenção, o desvio padrão (DP) e o coeficiente de variação (%CV).

A equação para determinar %CV é:

Equação 3: Coeficiente de variação, em porcentagem.

$$\%CV = \left[\frac{DP}{M} \right] \times 100$$

Já a análise da repetitividade das áreas do analito foi realizada pelo estudo de três diferentes concentrações de padrões do analito (150 , 350 e $500 \mu\text{g L}^{-1}$) em triplicatas. Com a média das áreas e desvio padrão se chegaram aos valores dos coeficientes de variação.

3.3.3.4.2 Exatidão e precisão do método MELLD-CLAE/FLU

A exatidão do método foi avaliada pelos ensaios de recuperação absoluta e relativa.

Os ensaios de recuperação absoluta foram realizados em triplicata na concentração de $3,0 \mu\text{g L}^{-1}$, solução preparada com água ultrapura.

A área média para o pico cromatográfico de três réplicas de extração MELLD foi calculada e a concentração do analito no extrato orgânico foi determinada empregando a curva analítica. Neste caso a curva analítica foi obtida pela análise de solução padrão sem empregar a MELLD.

A eficiência de extração ou recuperação absoluta (Freire, 2015) foi calculada conforme equação:

Equação 4: Recuperação Absoluta

$$R(\%) = \left[\frac{C_{org} \times V_{org}}{C_o \times V_{aq}} \right] \times 100$$

V_{org} = volumes da fase orgânica (55 μL);

V_{aq} = volume da amostra aquosa (5 mL);

C_{org} = concentração analito na fase orgânica;

C_o = concentração do analito na amostra aquosa.

O fator de pré-concentração também chamado de fator de enriquecimento foi calculado empregando a seguinte equação:

Equação 5: Fator de Pré Concentração

$$FP = \frac{C_{org}}{C_o}$$

Para avaliação da recuperação relativa amostras fortificadas nas concentrações de 1,0; 3,0 e 10 µg L⁻¹ foram analisadas. As concentrações nas amostras foram determinadas empregando-se a equação da reta da curva analítica de análise MELLD-CLAE/FLU das soluções padrões aquosos.

A recuperação relativa foi calculada conforme equação:

Equação 6: Recuperação Relativa

$$\%Rec = \left[\frac{(C1 - C2)}{C3} \right] \times 100$$

Onde:

%Rec. = recuperação em porcentagem;

C1 = concentração do analito na amostra fortificada;

C2 = concentração do analito na amostra não fortificada;

C3 = concentração do analito adicionada à amostra fortificada.

A precisão do método foi expressa pelo coeficiente de variação percentual, sendo que esse foi calculado para os valores de recuperação obtidos.

3.3.3.5 Amostras

3.3.3.5.1 Coleta das amostras

As mamadeiras selecionadas para análise foram adquiridas no mercado local, Campo Grande-MS, e todas elas tinham a informação contida em sua embalagem, livre de Bisfenol A. Foram 3 mamadeiras de 120 mL de marcas distintas. O procedimento de limpeza descrito em 4.3.3.5.2 foi realizado com todas as amostras.

3.3.3.5.2 Limpeza das mamadeiras

As mamadeiras testadas foram enxaguadas com pelo menos 1 litro de água destilada para remover qualquer poeira ou resíduo, então invertida e deixada secar ao ar numa câmara de fluxo laminar antes da utilização. Para assegurar a remoção de contaminantes superficiais.

3.3.3.5.3 Extração de Bisfenol A

A mamadeira completa com água (120 mL) foi colocado em banho com água a 95°C, por 30 min. Em seguida a mamadeira foi mantida em bancada até que a água atingisse a temperatura ambiente, 25°C. Logo após, três alíquotas de 5 mL de água foram retiradas para análise. Repetiu-se este procedimento de extração, três vezes de maneira consecutiva. (Adaptado, NAM et al., 2010).

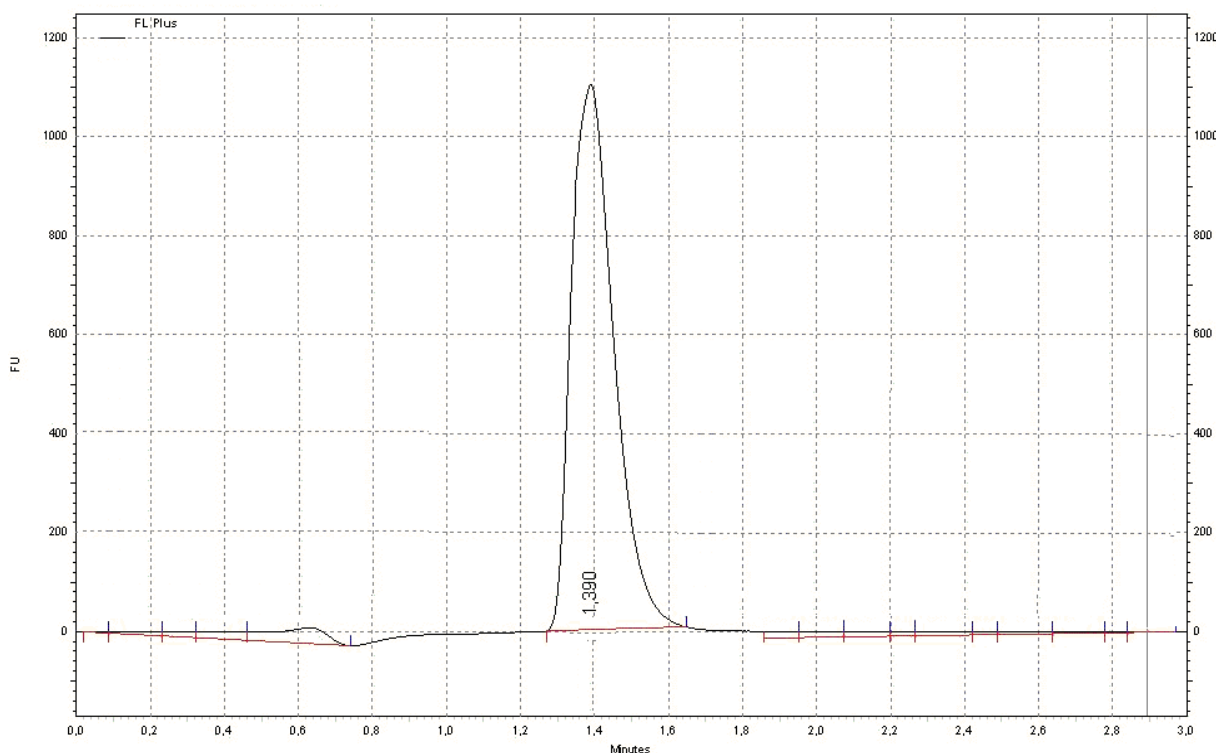
4. Resultados e discussão

Neste capítulo são apresentados os parâmetros de maior eficiência de extração de BFA por MELLD, as figuras de mérito obtidas do método CLAE/FLU e os resultados de análise de BFA migrados de mamadeira.

4.1 Análise cromatográfica do BFA

O cromatograma obtido da análise de BFA com fase móvel composta por H₂O/ACN 50:50 (v:v) e fluxo de 0,4 mLmin⁻¹, injeção de 10 µL da solução e comprimento de onda de 280 nm para excitação e de 300 nm para emissão é mostrado na figura 13. O uso da coluna cromatográfica de 50 mm de comprimento, diâmetro interno de 3,0 mm e tamanho de partículas de 2,7 µm possibilitou uma análise cromatográfica rápida com baixo consumo solvente (tempo de retenção do BFA de 1,39 min.).

Figura 13 Cromatograma de uma solução padrão de 500 µg L⁻¹ de BFA



Fonte: o próprio autor

4.2. Linearidade

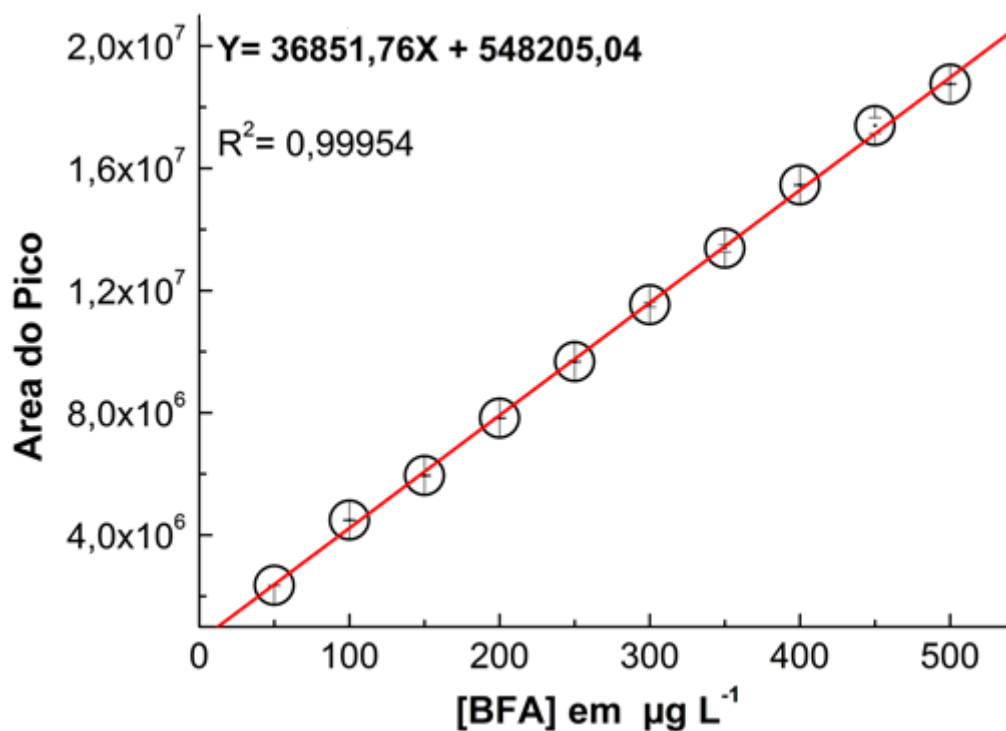
Curvas analíticas foram obtidas no início do trabalho e no transcorrer do mesmo para atender as necessidades dos experimentos executados.

Traçou-se a curva analítica com os dados obtidos de análise do padrão sem pré-concentração da solução padrão de BFA em concentrações que variaram de 50 a 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Figura 14).

O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (R) deve ser = 0,99 (ANVISA, 2003).

Neste trabalho obteve-se o valor de 0,99954 para R^2 . Sendo assim, o equipamento apresentou resposta diretamente proporcional à concentração do analito.

Figura 14 Curva analítica obtida sem pré-concentração da solução padrão por MELLD



Fonte: O próprio Autor

4.3 Precisão do instrumento e Limites de Detecção e quantificação

Os resultados sobre a repetitividade dos tempos de retenção (TRs) são mostrados na Tabela 6.

Tabela 6: Estudo da repetitividade dos tempos de retenção e das áreas do analito para as concentrações de 120, 270 e 440 $\mu\text{g L}^{-1}$

Analito	TR (min) $\pm$ DP	%CV	120 $\mu\text{g.L}^{-1}$		270 $\mu\text{g.L}^{-1}$		440 $\mu\text{g.L}^{-1}$	
			Área	%CV	Área	%CV	Área	%CV
BFA	1,41 $\pm$ 2,121 $\times 10^{-3}$	0,6	4,97*	2,2	11,18*	2,1	18,22*	1,4

* Multiplicar por 10^6
N= 3

O valor de 0,6% para o coeficiente de variação (%CV) indica boa repetitividade do tempo de retenção do analito.

Observaram-se pequenas variações de valores de área do pico cromatográfico entre as réplicas estudadas. Os valores obtidos para o coeficiente de variação foram $\leq 2,2\%$ evidenciando repetibilidade das medidas.

Para o instrumento obtiveram-se os valores de 14,6 e 48,7 $\mu\text{g L}^{-1}$ para LD e LQ respectivamente.

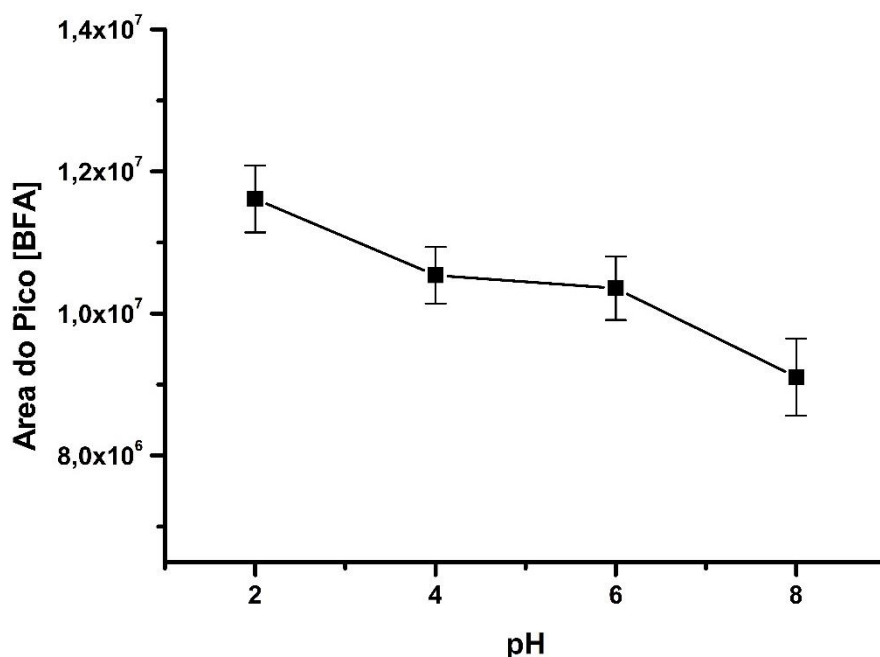
4.5 Microextração Líquido Líquido Dispersiva (MELLD)

Alguns parâmetros foram estudados para otimizar a técnica de extração.

4.5.1 Efeito do pH

Avaliou-se o comportamento da MELLD na extração do Bisfenol A, na concentração 3 $\mu\text{g L}^{-1}$, em a quatro valores de pH 2,0; 4,0; 6,0; e 8,0. As áreas médias para o pico do BFA e seus respectivos desvios padrões encontram-se no gráfico da figura 15.

Figura 15 Gráfico de área versus pH



Fonte: O próprio autor.

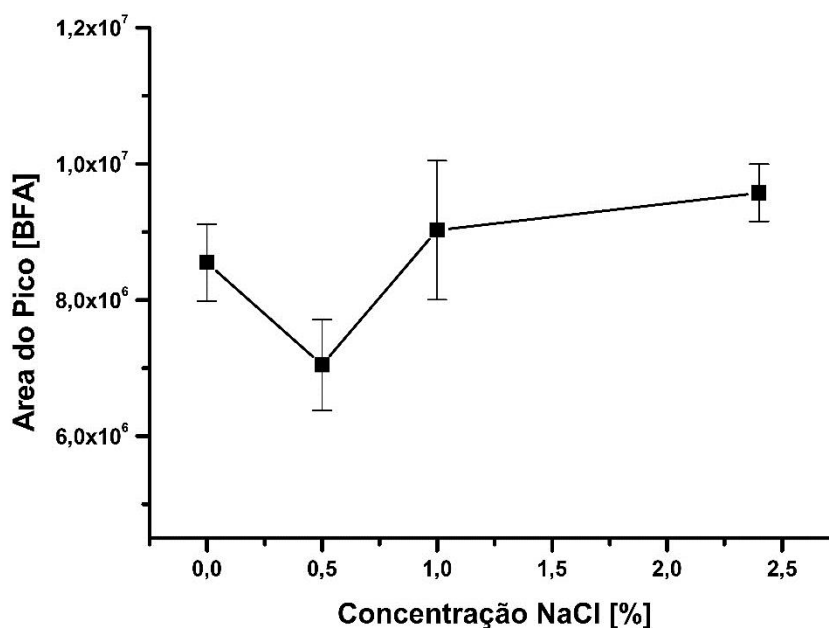
Como observado, para o pH 2,0 existe um ganho na extração do analito. Sendo este o pH estabelecido para garantir o melhor desempenho da técnica. O Ajuste do pH do meio permite que o analito permaneça na forma neutra mais facilmente extraída pelo solvente orgânico, como resultado obtém-se um aumento no coeficiente de distribuição entre a fase.

Por apresentar um caráter levemente ácido, a extração do BFA foi favorecida em meio ácido, pois o meio aparentava alto índice de acidez, sendo assim a concentração de íons H^+ é alta. Por ter alta concentração íons H^+ , não ocorre a desprotonação do analito, favorecendo a extração do analito.

4.5.2 Efeito da adição de sal

Para medir a influência da força iônica na extração do BFA foram realizados ensaios sem a adição de NaCl e com a adição de 0,5%, 1% ou 2,4% do mesmo. Os resultados das áreas são mostrados no gráfico da figura 16.

Figura 16 Influência da força iônica na extração do Bisfenol A



Fonte: O próprio Autor

Neste trabalho, observou-se uma melhora não significativa na eficiência de extração para concentrações de NaCl acima de 1%. Com base nos resultados optou-se por não adicionar NaCl a amostra.

Pois ao analisar os dados obtidos os valores acima de 1%, apresentou alto valor para o branco, sendo assim ao descontar o valor do branco do valor da amostra o aumento não se fez significativo, também se caracterizou que havia uma contaminação por conta da adição do sal, gerando um falso alto valor.

4.5.3 Condições estabelecidas para a MELLD para a extração do Bisfenol A

Para o procedimento de extração e pré-concentração do Bisfenol A empregando MELLD os seguintes parâmetros foram selecionados:

- 5 mL de alíquota aquosa;
- 900 μ L de acetonitrila: decanol (15,7:1)
- pH ajustado para 2,00;

- Sem a adição de NaCl;
- Etapa de agitação vigorosa por vortex em 4 minutos;
- Centrífuga a 4000 rpm, 3417 RCF, por 10 minutos, a 20°C

4.6 Validação do método MELLD-CLAE/FLU

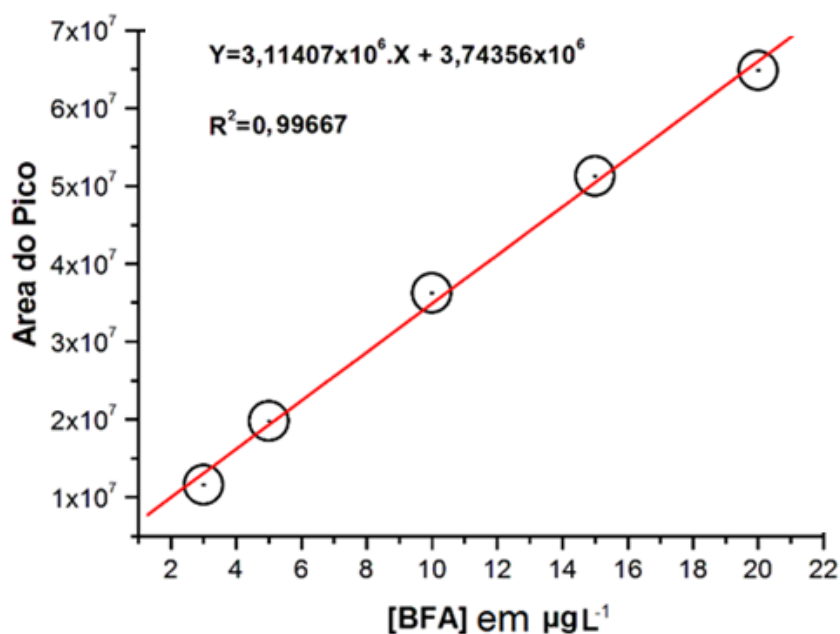
4.6.1 Linearidade e curva analítica

Obteve-se a curva analítica para o BFA, aplicando o método de extração, MELLD.

Utilizou-se neste estudo padrões com concentrações entre 0,5 a 20 μgL^{-1} , padrões em água ultrapura.

Obteve-se a equação da reta $Y = 3,11407 \times 10^6 X + 3,74356 \times 10^6$, coeficiente de correlação linear (R^2) de 0,99667 conforme pode ser visualizado na figura 17 a seguir.

Figura 17 Curva analítica com a MELLD



R^2 = coeficiente de correlação linear ao quadrado;

Y = área; X = concentração.

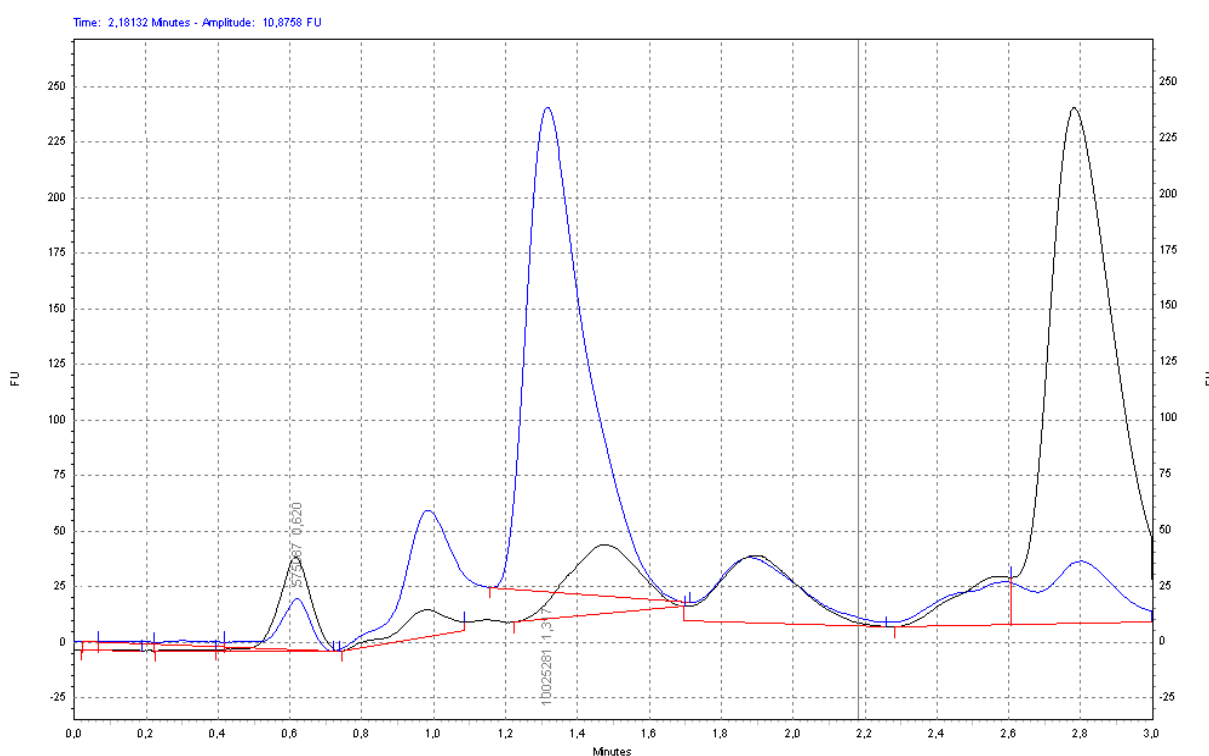
Fonte: O próprio autor

O valor de R^2 de 0,9967, valor próximo de 1, evidencia que o método apresenta boa linearidade na faixa de concentração avaliada.

4.6.2 Seletividade

A seletividade foi estudada pelo método de adição de padrão, onde foram comparados os resultados da solução de trabalho na concentração de $3 \mu\text{g L}^{-1}$ adicionada à matriz (água ultrapura) e outra sem a adição do analito na água. Na Figura 18 estão os cromatogramas da matriz com (azul) e sem a adição dos analitos (preto).

Figura 18 Comparativo Amostra com $3 \mu\text{g L}^{-1}$ (azul) com branco (preto)



Fonte: o próprio autor.

Observou-se no cromatogramas do branco de matriz um pequeno pico, com o mesmo tempo de retenção do analito. Em todas análises o valor do branco foi quantificado, fez-se o desconto do valor do branco em todas as análises.

4.6.3 Limite de Detecção e Limite de Quantificação MELLD-CLAE/FLU

Com base nos dados da curva analítica do método, MELLD-CLAE/FLU, pode se encontrar o limite de quantificação, sendo este o menor valor que foi quantificado.

Sendo assim, o limite de detecção foi de $0,9 \mu\text{g L}^{-1}$ e o de quantificação de $3 \mu\text{g L}^{-1}$ para o método. Segue tabela comparativa com métodos presentes na literatura e o método desenvolvido neste trabalho.

Tabela 7 valores dos limites de detecção e quantificação da literatura com o deste trabalho.

Método	LD	LQ	Ref.
MELLD CLAE/UV	$0,7 \mu\text{g L}^{-1}$	$2,3 \mu\text{g L}^{-1}$	López-Darias et al 2010
MELLD CLAE/UV	$0.33 \mu\text{g L}^{-1}$	$1,0 \mu\text{g L}^{-1}$	Haeri, 2016
MELLD CG-EM/EM	2 ng L^{-1}	10 ng L^{-1}	Cunha et al., 2015
MELLD CLAE/FLU	$0,9 \mu\text{g L}^{-1}$	$3 \mu\text{g L}^{-1}$	Este Trabalho

4.6.4 Recuperação e precisão do método

4.6.4.1 Recuperação

As micro técnicas de extração, que são técnicas de extração e de pré concentração não exaustivas, tem por características o equilíbrio, pois o analito se transfere da fase matriz para a fase orgânica.

Sendo assim, a recuperação (R) define a quantidade de analito que é transferido à fase extratora ao final da extração, dado representado em porcentagem.

Os resultados obtidos para recuperação absoluta são mostrados na Tabela 8.

Tabela 8 Valores de recuperação absoluta, coeficiente de variação e fator de pré-concentração do analito em estudo, BFA.

Analito	Quantidade Adicionada	Quantidade Recuperada	Recuperação Absoluta (%)	CV (%)	FC
BFA	15 ng	14,75 ng	98,36	4,5	85,68

CV % = porcentagem do coeficiente de variação; PF= fator de pré-concentração N= 3

O valor de recuperação absoluta para o analito em estudo foi de 98,36% com coeficiente de variação de 4,5%. O elevado valor de recuperação evidencia que a determinação de BFA em amostras aquosas pode ser efetuada sem a necessidade de aplicar a MELLD a padrões para obtenção da curva de calibração. Isto é uma grande vantagem para o método por que reduz o tempo de análise.

Na MELLD, como também em outras microtécnicas de extração não exaustivas as condições experimentais são determinadas e mantidas, com o intuito de que o analito contido na alíquota ao se transferir para a fase extratora, orgânica, seja proporcional a concentração inicial, amostra.

O valor obtido para o fator de enriquecimento foi de 85,68, sendo o valor relativamente alto, mostrando que a técnica MELLD é uma micro técnica de extração e também propicia elevados fatores de pré concentração.

Foram calculados também os valores de recuperação relativa. Para encontrar a concentração do analito na amostra submetida a este ensaio de recuperação utilizou-se a curva analítica obtida pela análises dos padrões submetidos a MELLD.

Tabela 9: Valores de recuperação relativa, coeficiente de variação nas concentrações de 5, 7 e 12 $\mu\text{g L}^{-1}$ dos agrotóxicos estudados

Analito	Faixa de Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação Relativa (%)					
			5 $\mu\text{g L}^{-1}$		7 $\mu\text{g L}^{-1}$		12 $\mu\text{g L}^{-1}$	
			R(%)	CV(%)	R(%)	CV(%)	R(%)	CV(%)
BFA	3,0-20,0	3,0	107,2	5,7	105,4	3,7	102,1	4,3

N = 3

Para analisar a precisão do método desenvolvido leva-se em consideração o coeficiente de variação (%CV).

Os valores de coeficiente de variação obtidos foram entre 3,7 e 5,7 para a recuperação relativa e de 4,5% para recuperação absoluta.

A precisão em análises de nível de traço deve ser menor do que 20% (RIBANI et al., 2004; ANVISA RE nº 899 de 29 de maio de 2003 e INMETRO DOQ-CGCRE 008 de julho de 2011).

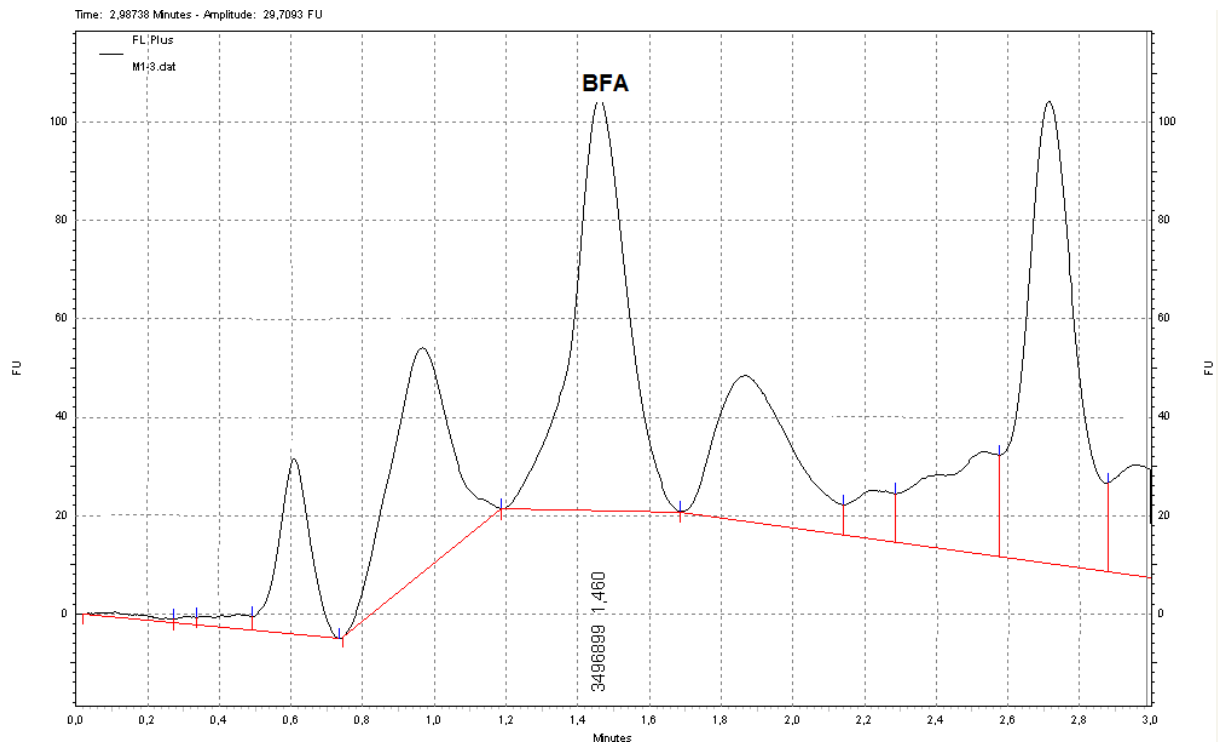
Para valores de exatidão são permitidos de 80 a 120% (RIBANI et al., 2004; ANVISA RE nº 899 de 29 de maio de 2003 e INMETRO DOQ-CGCRE 008 de julho de 2011). Conforme os dados fornecidos na Tabela 9 as recuperações se encontram na faixa estipulada pela literatura de 102,1 a 107,2%, logo o método apresenta boa exatidão, conforme era esperado.

4.7 Aplicação do método

4.7.1. Amostras de mamadeira

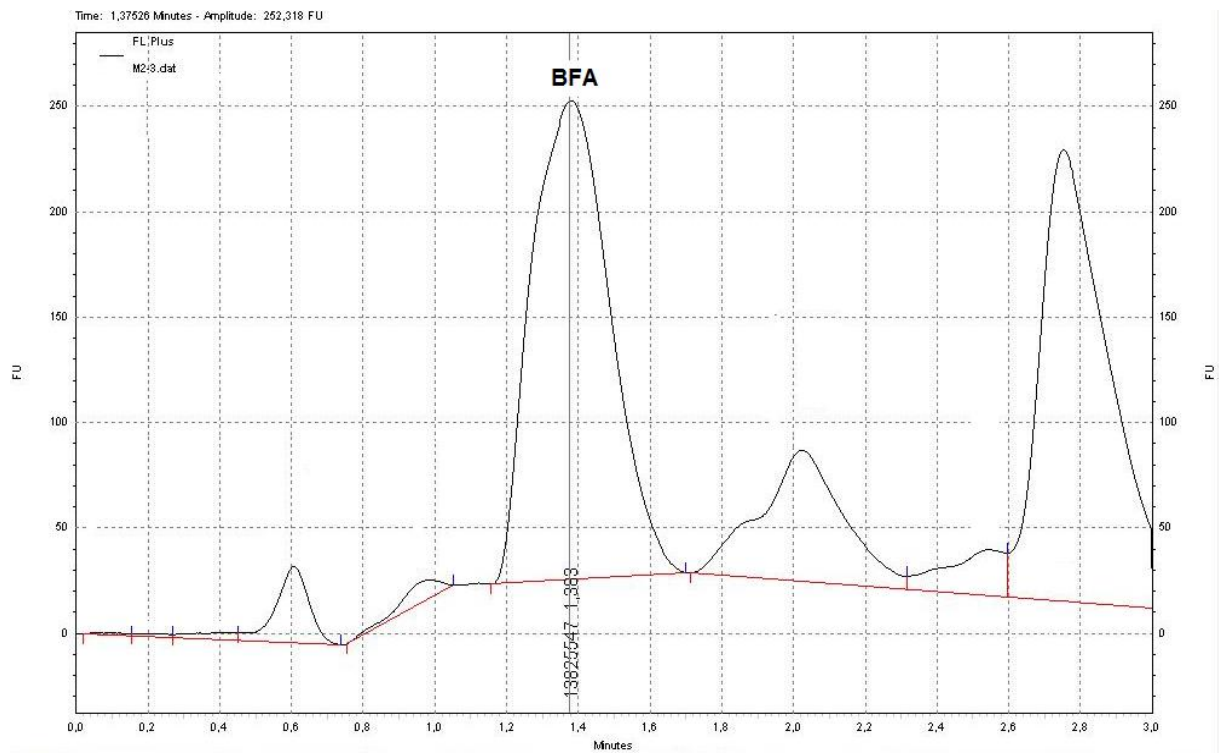
As figuras a seguir são os cromatogramas obtidos de análises de amostras reais.

Figura 19: Cromatograma da amostra (Mamadeira A)



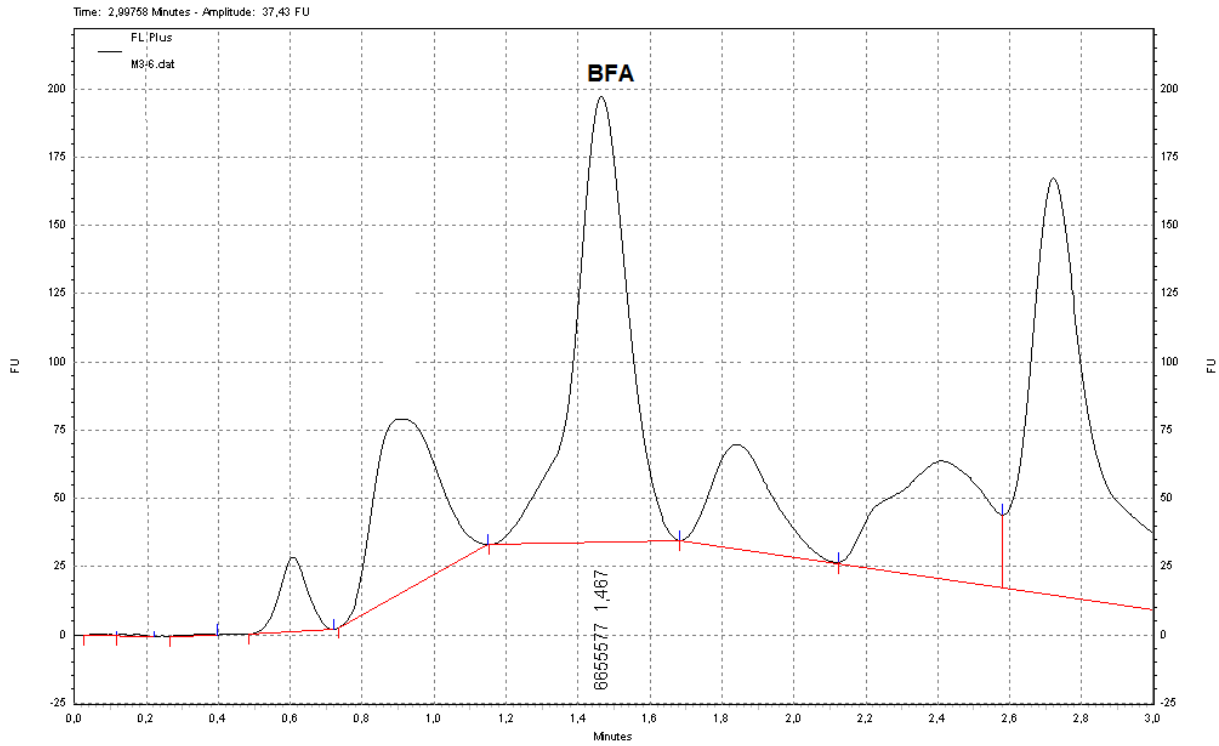
Fonte: O próprio autor

Figura 20: Cromatograma da amostra real (Mamadeira B)



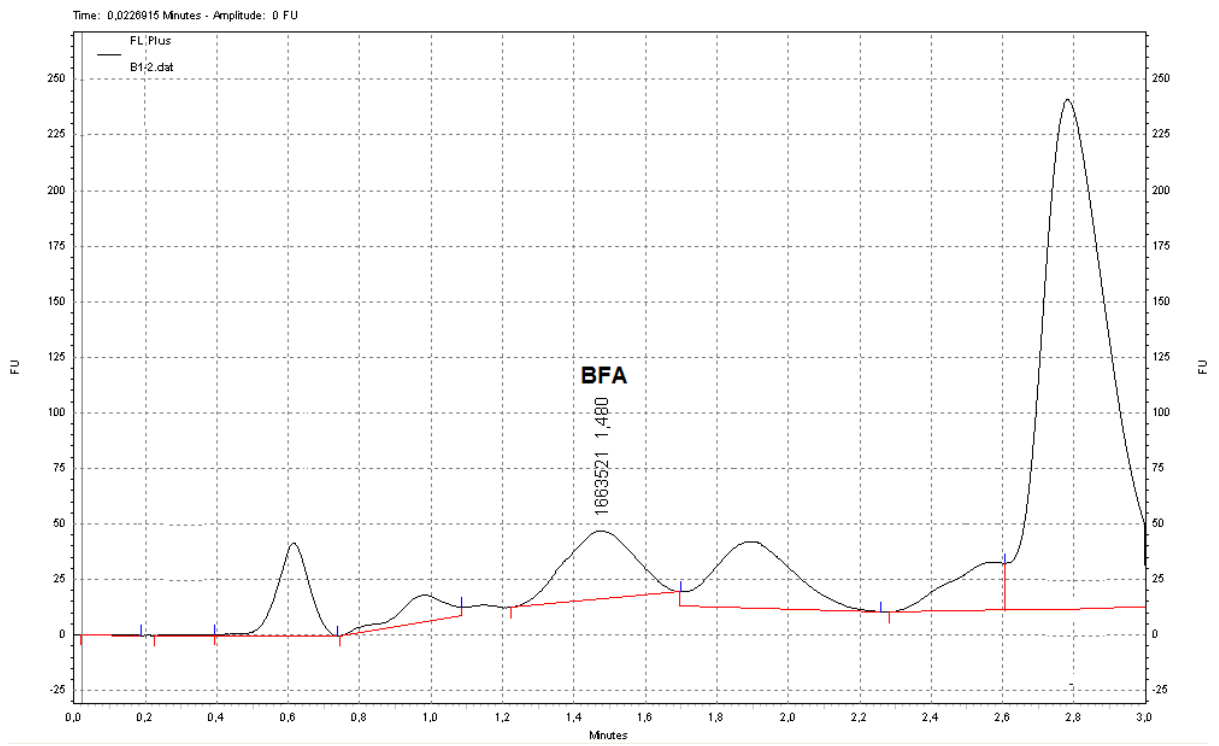
Fonte: O próprio autor

Figura 21: Cromatograma da amostra real (Mamadeira C)



Fonte: O próprio autor

Figura 22 Cromatograma Branco



Fonte: O próprio autor

Os dados obtidos estão presentes na tabela 10 a seguir,

Tabela 10: Valores obtidos na análise de amostras reais

Amostra	Deteccção do Analito [BFA]($\mu\text{g.L}^{-1}$)		
	1ªExtração	2ªExtração	3ªExtração
Mamadeira A	Detectado	Detectado	Detectado
Mamadeira B	3,67	3,14	Detectado
Mamadeira C	Detectado	Detectado	Detectado

Após as análises com as amostras reais, pode se constatar que mesmo os rótulos dizendo que as mamadeiras não possuíam Bisfenol A, pôde-se constatar que todas as amostras analisadas apresentaram resultado positivo para a presença de Bisfenol A.

Nas mamadeiras A e B, pôde-se detectar a presença de Bisfenol A, mas a quantidade ficou abaixo do limite de quantificação do método.

Na mamadeira B foi possível determinar a quantidade de BFA migrado para água aquecida 95°C, por 30 min. Os valores de BFA determinados foram de 3,67 $\mu\text{g L}^{-1}$ na primeira extração e de 3,14 $\mu\text{g L}^{-1}$ quando a mamadeira foi cheia com água pela segunda vez (2ª extração). Na terceira extração com 120 mL de água o valor obtido ficou abaixo do LQ.

5. Conclusão

O método MELLD-CLAE/FLU proposto para determinação de Bisfenol A apresentou excelente recuperação, linearidade e sensibilidade para aplicação em matriz aquosa. O método é simples, rápido e econômico.

O método apresentou valor de recuperação absoluta de BFA de 98,36% e de recuperação relativa entre 102,1 e 107,2%, elevado fator de enriquecimento (86,68), linearidade com valor de R^2 de 0,99667 e precisão com valor para o coeficiente de variação de 5,7% para recuperação relativa. Os limites de detecção e quantificação foram $0,3 \mu\text{g L}^{-1}$ e $3 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

Conseguiu-se detectar a presença de Bisfenol A em todas as amostras de mamadeiras estudadas, o que geram uma grande preocupação, sendo que pela ANVISA, é proibido o comércio de mamadeiras com Bisfenol A. Sendo assim este método mostrou-se eficaz.

6. Perspectivas de continuidade do trabalho

Para estudos futuros é necessário minimizar o efeito de matriz, para que menores limites de detecção e quantificação possam ser encontrados.

Assim, espera-se futuramente que após estes novos estudos, o método possa ser empregado em demais matrizes, tais como bebidas (sucos e refrigerantes) para garantir um monitoramento do Bisfenol A, que é um composto químico que é prejudicial aos seres vivos do planeta.

Fazer um levantamento maior das mamadeiras comercializadas no comércio local, aumentando assim a quantidade de amostras analisadas.

7. Referências Bibliográficas

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA): Resolução RE nº 899 de 29/05/2003.

AL-SAIDI, H. M.; ADEL A.A. EMARA, A. A. A.; The recent developments in dispersive liquid-liquid microextraction for preconcentration and determination of inorganic analytes; **Journal of Saudi Chemical Society** (2014) 18, 745–761

ALSHANA U, LUBBAD I, GOGER N, COK I, TAMER U, ERTAS N. Dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic drop combined with counter-electroosmotic flow normal stacking mode in capillary electrophoresis for the determination of bisphenol a in water and urine samples. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**. 2013;36(20):2855-70

ANDERSON, D. J. ; BROZEK, E. M. ; COX, K. J. ; PORUCZNIK, C. A. ; WILKINS, D. G. ; Biomonitoring method for bisphenol A in human urine by ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry ; **Journal of Chromatography B**, 953–954 (2014) 53–61.

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

BAGHDADI, M.; SHEMIRANI, F.; Cold-induced aggregation microextraction: A novel sample preparation technique based on ionic liquids; **Analytica Chimica Acta** 613 (2008) 56–63.

BASHEER, C.; LEE, H. K. Analysis of endocrine disrupting alkylphenols, chlorophenols and bisphenol a using hollow fiber-protected liquid-phase microextraction coupled with injection port-derivatization gas chromatography–mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, v. 1057, p. 163-169, Sept. 2004a.

BASHEER, C.; LEE, H. K.; TAN, K. S. Endocrine disrupting alkylphenols and bisphenol a in coastal waters and supermarket seafood from Singapore. **Mar. Poll.Bull.**, v. 48, p. 1145-1167, Apr. 2004b.

BERALDO, D. A. S.; Desenvolvimento e Validação de método analítico para a análise de Bisfenol A e nonilfenol em águas superficiais da cidade de Americana, SP – Dissertação de Mestrado, USP –São Carlos, SP, 2012

BERTONA, P.; WUILLOUD. R. G.; Highly selective ionic liquid-based microextraction method for sensitive trace cobalt determination in environmental and biological samples; **Analytica Chimica Acta** 662 (2010) 155–162.

BOLZ, U.; KÖRNER, W.; HAGENMAIER, H. Development and validation of a GC/MS method for determination of phenolic xenoestrogens in aquatic samples. **Chemosphere**, v. 40, p. 929-935, May 2000.

BROWNE, D. J. et al. CE with a boron-doped diamond electrode for trace detection of endocrine disruptors in water samples. *Electrophoresis*, v. 34, n. 14, p. 2025–2032, 2013.

BUCCINII, G. S.; BENÍCIOI, M. H. DA.; VENANCIO, S. I.; Determinantes do uso de chupeta e mamadeira. *Rev Saúde Pública* 2014;48(4):571-571

CALDAS, S. S.; ZANELLA, R.; GONÇALVES, F. F.; PRIMEL, E. G.; PRESTES, O. D.; MARTINS, M. L.; Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas; **Quim. Nova**, v. 34, p.1604-1617, Sep. 2011.

CAO, X.; CORRIVEAU, J. Migration of bisphenol a from polycarbonate baby and water bottles into water under severe conditions. **J. Agric. Food Chem.**, v. 56, p. 6378.

CHAVES, S. K.; Determinação dos desreguladores endócrinos bisfenol-A, β -estradiol, 17 α - etinilestradiol e estrona no Rio Paraíba do Sul – Dissertação de mestrado, USP – Lorena – SP, 2016.

CHEN, T. C.; SHUE, M. F.; YEH, Y. L.; KAO, T. J. Bisphenol A occurred in Kao-Pin River and its tributaries in Taiwan. **Environ. Monit. Assess.**, v. 161, p. 135-145, Jan. 2010.

CORREIA, C. C.; FONTOURA, M. A influência da exposição ambiental a disruptores endócrinos no crescimento e desenvolvimento de crianças e adolescentes. *Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo*, p. 1–7, 2015.

COUTINHO, L. F. M. ; LANÇAS, F. M. ; Cromatografia líquida capilar: 1. Principais características da técnica. *Scientia Chromatographica* 2011; 3(2):115-130

CUNHA, S.C.; PENA, A.; FERNANDES, J.O.; Dispersive liquid–liquid microextraction followed by microwave-assisted silylation and gas chromatography–mass spectrometry analysis for simultaneous trace quantification of bisphenol A and 13 ultraviolet filters in wastewaters; **Journal of Chromatography A**, 1414 (2015) 10–21

DHAINI, H. R.; NASSIF, R. M. Exposure assessment of endocrine disruptors in bottled drinking water of Lebanon. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 186, n. 9, p. 5655–5662, 2014.

ESCUADERO, L. B.; MARTINIS, E.M.; OLSINA, R. A.; WUILLOUD, R. G.; Arsenic speciation analysis in mono-varietal wines by on-line ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction; **Food Chemistry**. 138 (2013) 484–490.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) (2006) Opinion of the scientific panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) related to 2,2-bis(4- hydroxyphenyl)propane. **EFSA J** 428:1–6

FREIRE, G.V.; Determinação de agrotóxicos em amostras de água empregando microextração líquido-líquido dispersiva e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas – Dissertação de Mestrado – InQui/UFMS – Campo Grande-MS. 2015

GE, J.; CONG, J.; SUN, Y.; LI, G.; ZHOU, Z.; QIAN, C.; LIU, F. Determination of Endocrine Disrupting Chemicals in Surface Water and Industrial Wastewater from. Beijing, **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 84, p. 401–405, Mar. 2010.

GHISELI, G. **Avaliação da qualidade das águas destinadas ao abastecimento público na região de Campinas**: ocorrência e determinação de interferentes endócrinos (IE) e produtos farmacêuticos e de higiene pessoal (PFHP). 2006. 190 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006

GHISELLI, G.; JARDIM, W. F. Interferentes endócrinos no ambiente. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, p. 695-706, jun. 2007.

GONZÁLEZ, N. S.; GRANA, E. C.; CAROUA, I. T.; LORENZO, S. M.; MAHÍA, P. L.; RODRÍGUEZ, D. P. 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). **Journal of Chromatography A**, A Coruna, v. 1223, p. 1– 8, Dec. 2011.

GUYTON, A. C; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 12ª Edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A, 2011. 973 p.

H. HE et al Dispersive liquid–liquid microextraction for the determination of phenols by acetonitrile stacking coupled with sweeping-micellar electrokinetic chromatography with large-volume injection.**Journal of Chromatography A**, 1361 (2014) 291–298

HAERI, S. A. ; Bio-sorption based dispersive liquid–liquid microextraction for the highly efficient enrichment of trace-level bisphenol A from water samples prior to its determination by HPLC; **Journal of Chromatography B**, 1028 (2016) 186–191

HAMID, H.; ESKICIOGLU, C. Fate of estrogenic hormones in wastewater and sludge treatment: A review of properties and analytical detection techniques in sludge matrix. *Water Research*, v. 46, n. 18, p. 5813–5833, 2012.

HARRIS, Daniel. C. *Análise Química Quantitativa*. 8. ed. Rio de Janeiro: LTC – Livros Técnicos e Científicos Editora S.A. 2012.

HAUPT, K. Molecularly imprinted polymers in analytical chemistry. *The Analyst*, Cambridge, v. 126, p. 747-756, 2001.

HENNION, M. Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. **J. Chromatogr. A**, v. 856, p. 3-54, Sep. 1999.

HU, X.; PENG, J.; LIU, J.; JIANG, G.; JÖNSSON, J. A.; Evaluating the impacts of some environmentally relevant factors on the availability of bisphenol A with negligible-depletion SPME; **Chemosphere** 65 (2006) 1935–1941.

HWANG, C.; LEE, W. Chromatographic characteristics of cholesterol-imprinted polymers prepared by covalent and non-covalent imprinting methods. *Journal of Chromatography A*, Amsterdam, v. 962, p. 69-78, 2002.

ISHII, D. Introduction to Microscale High-Performance Liquid Chromatograph. New York: VCH Publisher, 1988.

JAIN, A.; VERMA, K. K. Recent advances in applications of single-drop microextraction: A review. *Analytical Chimica Acta*, 706, 37-65, 2011.

JAKIMSKA, A.; HUERTA, B.; BARGANSKA, Z.; WASIK, A. K.; MOZAZ, S. R.; BARCELÓ, D. Development of a liquid chromatography–tandem mass spectrometry procedure for determination of endocrine disrupting compounds in fish from Mediterranean rivers. **Journal of Chromatography A**, Gdansk, v. *in press*, Jul. 2013.

JARDIM, I. C. S. F.; Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas; **Scientia Chromatographica** Vol.2, Nº1, 13-25, 2010.

JEANNOT, M. A.; CANTWELL, F. F. Solvent microextraction into a single drop. **Anal. Chem.**, v. 68, p. 2236 – 2240, Jul. 1996.

JIA S.; LI J.; SO-RA, P.; RYU, Y.; PARK IL HO, PARK, J. H., HONG SOON-SUN, KWON S.W., LEE J. Combined application of dispersive liquid-liquid microextraction based on the solidification of floating organic droplets and charged aerosol detection for the simple and sensitive quantification of macrolide antibiotics in human urine. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 2013, 86, 204–213.

KAMALABADI, M.; MOHAMMADI, A.; ALIZADEH, N.; Polypyrrole nanowire as na excelente solid phase microextraction fiber for bisphenol A analysis in food samples followed by ion mobility spectrometry; **Talanta** 156-157 (2016) 147–153.

KOCÚROVÁ, L.; IOSEPH S. BALOGH, I. S.; ŠANDREJOVÁ, J.; ANDRUCH, V.; Recent advances in dispersive liquid–liquid microextraction using organic solvents lighter than water. A review; **Microchemical Journal** 102 (2012) 11–17.

LEANDRO, F. Z.; BISFENOL A: Validação de método e ocorrência em água superficial e tratada da cidade de Araraquara. 2006. Dissertação Mestrado, USP – Araraquara. 2006

LIMA, D. M. D. Metodologia para quantificação e avaliação da partição de agrotóxicos no estuário do Rio Jaguaribe-Ce. Dissertação - Mestrado, Universidade Federal do Ceará. 2011

LIN, C. Y.; FUH, M. R.; HUANG, S. D. Application of Liquid-Liquid-Liquid Microextraction and High-Performance Liquid Chromatography for the Determination of Alkylphenols and Bisphenol-A in Water. **Journal Sep. Science**. 2011, 34 (4), 428–435.

LIU, S.; XIE, Q.; CHEN, J.; SUN, J.; HE, H.; ZHANG, X.; Development and comparison of two dispersive liquid–liquid microextraction techniques coupled to high performance liquid chromatography for the rapid analysis of bisphenol A in edible oils; **Journal of Chromatography A**, 1295 (2013) 16–23

LÓPEZ-DARIAS, J.; MÓNICA 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** 80 (2010) 1611–1618

MALTEZ, H. F.; Desenvolvimento de metodologias analíticas baseadas em sistemas de pré-concentração empregando extração em fase sólida e microextração com gota única para determinação de metais-traço em amostras aquosas ambientais – Tese de Doutorado, UFSC – Florianópolis – SC, 2007.

MARTÍNS, J. ; SANTOS, J. L.; APARICIO, I., ALONSO, E. Determination of hormones, a plasticizer, preservatives, per- fluoroalkylated compounds, nad a flame retardant in water samples by ultrasound-assisted dispersive liquid–liquid microextraction based on the solidification of a floating organic drop. *Talanta*, 143, 335–343, 2015

MONTAGNER, T. A.; *Desenvolvimento e validação de método de análise de bisfenol a em amostras de saliva humana por CG-EM. 2013. 102 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande. 2013*

MOREIRA, M. A.; ANDRÉ, L. C.; CARDEAL, Z. L.; Analysis of plasticiser migration to meat roasted in plastic bags by SPME–GC/MS; **Food Chemistry** 178 (2015) 195–200.

NAM, S. H.; SEO, Y. M.; KIM, M. G. 2010. Bisphenol a migration from polycarbonate baby bottle with repeated use. **Chemosphere**, v. 79, p. 949–952, May, 2010.

NOVOTNY, M.; ISHII, D.; *Microcolumn Separations*. Amsterdam: Elsevier, 1985.

OLIVEIRA, A. R. M.; MAGALHÃES, I. R. S.; SANTANA, F. J. M.; BONATO, P. S. Microextração em fase líquida (Ipme): fundamentos da técnica e aplicações na análise de fármacos em fluidos biológicos. *Quim. Nova*, Vol. 31, No. 3, 637-644, 2008.

PRWEB – ONLINE VISIBILITY FROM VOCUS. Global BPA Production to Exceed 5.4 Min Tonnes by 2015, According to In-demand Report by Merchant Research & Consulting. London, UK(PRWEB) April 14, 2014. Disponível em:< <http://www.prweb.com/releases/2014/04/prweb11761146.htm>>. Acesso em: 29 nov. 2014.

PUSVASKIENE, E.; JANUSKEVIC, B.; PRICHODKO, A.; VICKACKAITE, V.; Simultaneous derivatization and dispersive Liquid–Liquid microextraction for fatty acid GC determination in water. **Chromatographia**, 2009, 69, 3-4.

REZAEI, M.; YAMINI, Y.; SHARIATI, S.; ESRAFI, 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**, 1216 (2009) 1511–1514.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, v. 27, p. 771-780, 2004.

RIDGWAY, K.; LALLJIE, S. P. D.; SMITH, R. M. Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods. **J. Chromatogr. A**, Bedfordshire, v. 1153, p. 36-53, Feb. 2007.

ROCHA, B. A.; DACOSTA, B. R. B.; ALBUQUERQUE, N. C. P.; B, OLIVEIRA, A. R. M.; SOUZA, J. M. O.; AL-TAMEEMI, M.; CAMPIGLIA, A. D.; C, JR, F. B.; A fast method for bisphenol A and six analogues (S, F, Z, P, AF, AP) determination in urine samples based on dispersive liquid-liquid microextraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry ; **Talanta** **154** (2016) p.511–519.

ROCHESTER, J. R. Bisphenol A and human health: A review of the literature. *Reproductive Toxicology*, v. 42, p. 132–155, 2013.

RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; ALDA, M. J. L.; BARCELÓ, D. Monitoring of estrogens, pesticides and bisphenol a in natural waters and drinking water treatment plants by solid-phase extraction-liquid chromatography-mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, v. 1045, p. 85-92, June 2004.

SALGUEIRO-GONZÁLEZ, N.; CONCHA-GRANA, E.; TURNES-CAROUA, I.; MUNIATEGUI-LORENZO, S.; LÓPEZ-MAHÍAA, 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); **Journal of Chromatography A** 1223 (2012) 1–8.

SETA, D. D.; MINDER, I.; DESSÌ-FULGHERI, F.; FARABOLLINI, F. Bisphenol A exposure during pregnancy and lactation affects maternal behavior in rats. **Brain Research Bulletin**, Siena, v. 65, p. 255-260, Dec. 2005.

SHI,Y.; HAO WU, H.; WANG, C.; GUO, X.; DU, J.; DU, L.; Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in coffee and tea samples by magnetic solid-phase extraction coupled with HPLC–FLD; **Food Chemistry** 199 (2016) 75–80.

SPADOTO, M.; Análise dos efeitos tóxicos do nonilfenol e do bisfenol A em organismos de água doce - Dissertação de Mestrado, USP –São Carlos, SP, 2013.

TOXIPEDIA – Bisfenol A. Disponível em:
<<http://toxipedia.org/display/toxipedia/Bisphenol-A>>. Acesso em: 18 Jan. 2016

TRUJILLO-RODRIGUEZ, M. J.; ROCIO-BAUTISTA, P.; VERONICA PINO, V.; ANA M. AFONSO, A. M.; Ionic liquids in dispersive liquid-liquid microextraction; **Trends in Analytical chemistry** 51 (2013) 87–106

VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F.; RIEDO, C. R. F. Análise quantitativa por cromatografia.2006. Disponível em: <<http://chemkeys.com/br/2003/10/17/analise-quantitativa-por-cromatografia/>>. Acesso em: 18 jan. 2016.

W. PAN, H. XU, Y. CUI, D. SONG, Y.-Q. FENG, Improved liquid–liquid–liquid microextraction method and its application to analysis of four phenolic compounds in water samples **J. Chromatogr. A** 1203 (2008) 7–12.

WANG, S.; OAKES, K. D.; BRAGG, L. M.; PAWLISZYN, J.; DIXON, G.; SERVOS, M. R.; Validation and use of in vivo solid phase micro-extraction (SPME) for the detection of emerging contaminants in fish; *Chemosphere* 85 (2011) 1472–1480.

X. LI et al. Simultaneous determination and assessment of 4-nonylphenol, bisphenol A and triclosan in tap water, bottled water and baby bottles **Environment International** 36 (2010) 557–562.

XU, L.; BASHEER, C.; LEE, H. K. Developments in single-drop microextraction. **J. Chromatogr. A**, v. 1152, p. 184-192, Jun. 2007.

YANG F.J. Microbore Column Chromatography. New York: Marcel Dekker, 1989.

YANTZI, E.; PSILLAKIS, E.; TYROVOLA, K.; KALOGERAKIS, N. Vortex-assisted liquid–liquid microextraction of octylphenol, nonylphenol and bisphenol a. **Talanta**. v. 80, p. 2057-2062, Nov. 2010.

ZHANG, Q.; LI, G.; XIAO, X.; Acrylamide-modified graphene for online micro-solid-phase extraction coupled to high-performance liquid chromatography for sensitive analysis of heterocyclic amines in food samples; **Talanta** 131 (2015) 127–135.

ZHAO F. Q.; LI, J.; ZENG, B. Z.; Coupling of ionic liquid-based headspace singledropmicroextraction with GC for sensitive detection of phenols. **J. Sep. Sci.** 31 (2008) 3045–3049.

ZIMMERS, S. M.;BROWNE,E. P.; PATRICK W. O'KEEFE,P.W.; ANDERTON,D.L.; KRAMER,L.; DAVID A. RECKHOW, D. A.; ARCARO, K. F.; Determination of free Bisphenol A (BPA) concentrations in breast milk of U.S. women using a sensitive LC/MS/MS method. **Chemosphere** 104 (2014) 237–243.