



FURG

Tese de Doutorado

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO
SIMULTÂNEA DE FÁRMACOS, FILTROS UV E BIOCIDAS
EM MATRIZES AMBIENTAIS UTILIZANDO
VA-MSPD E HPLC-ESI-(QqLIT)-MS/MS**

KARINA LOTZ SOARES

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE FÁRMACOS, FILTROS UV E BIOCIDAS EM MATRIZES AMBIENTAIS UTILIZANDO VA-MSPD E HPLC-ESI- (QqLIT)-MS/MS

por

KARINA LOTZ SOARES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental da Universidade Federal do Rio Grande (RS), como requisito parcial para obtenção do título de **DOCTOR EM QUÍMICA**.

PPGQTA

Rio Grande, RS - Brasil

2019

Universidade Federal do Rio Grande - FURG
Escola de Química e Alimentos
Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Defesa de Tese

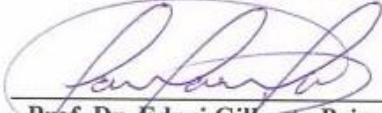
**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO
SIMULTÂNEA DE FÁRMACOS, FILTROS UV E BIOCIDAS EM
MATRIZES AMBIENTAIS UTILIZANDO VA-MSPD E HPLC-
(QQLIT)-ESI-MS/MS**

Elaborado por

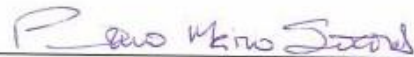
Karina Lotz Soares

Como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Química

Comissão Examinadora



Prof. Dr. Ednei Gilberto Primel (FURG)
(Presidente-Orientador)



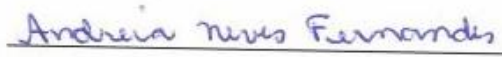
Prof. Dr. Bruno Meira Soares (FURG)



Prof. Dr. Fábio Ferreira Gonçalves (FURG)



Prof.ª Dr.ª Liziara da Costa Cabrera (UFFS)



Prof.ª Dr.ª Andréia Neves Fernandes (UFRGS)

Rio Grande, 24 de maio de 2019.

“Se consegui enxergar tão longe foi porque me
apoiei nos ombros de outros gigantes”. (Isaac Newton)
Ao professor Ednei e todos meus colegas do LACOM

“Nossa vida é um caminho cheio de incertezas,
as quais ninguém é capaz de prever, por isso
mais importante do que as coisas que se tem na
vida é quem temos na vida”. (Osmar Damian Prestes)

Dedico esse trabalho aos meus pais Valdomiro e Vera

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao professor Dr. **Ednei Gilberto Primel** por todas as oportunidades que me foram dadas desde a graduação. Por todas as portas abertas, e pelas fechadas também, mas com um “taca ficha” se tornaram fáceis de abrir. Pelos puxões de orelha que me desafiaram a evoluir e por sempre confiar no meu trabalho. Muito obrigada por toda orientação durante esses 7 anos mas principalmente por me incentivar a sair da zona de conforto. Sem dúvidas meu maior exemplo profissional, o senhor merece todo meu respeito e admiração.

Aos professores da banca do exame de qualificação e defesa **Daiane Dias, Bruno Meira, Osmar Prestes, Andréia Fernandes, Fábio Gonçalves e Liziera Cabrera** pela disposição em participar e por todas as sugestões dadas ao trabalho. Vocês são exemplos profissionais para mim.

Ao professor Dr. **Gilberto Fillmann** pela oportunidade de aprender um pouco mais e por contribuir com minha formação. Agradeço a oportunidade de ter recebido a bolsa de doutorado do projeto Ciências do Mar, isso mostra que também confia no meu trabalho. Obrigada!

À professora Dra. **Silvia Díaz Cruz** por me aceitar como sua aluna sem mesmo me conhecer. Agradeço imensamente toda confiança no meu trabalho, todas as oportunidades de aprendizado, por me permitir fazer parte de um novo grupo de pesquisa, por todas as conversas e por todos os desafios. Foi indescritível a experiência, eu jamais esquecerei tudo o que vivenciei na Espanha. Você é um exemplo profissional que eu gostaria que todos meus colegas tivessem a oportunidade de conhecer.

À **Sergi** por toda ajuda durante esses 7 anos no LACOM. Por impulsionar o meu trabalho, por todas as contribuições, por entender meus momentos e principalmente por ter tido tanta paciência, muitas vezes tendo que desenhar para que eu pudesse entender. Obrigada Sergi!

Muito obrigada ao meu professor, colega e amigo **Bruno Meira**. Sempre me incentivando a enfrentar novos desafios e encorajando meus medos para que se tornassem uma realidade muito melhor. Na tua calma e no teu silêncio eu aprendi como me superar dentro e fora do laboratório. Muito obrigada pela oportunidade de aprender contigo, Bruno.

Aos maiores amores da minha vida eu dedico tudo o que conquistei. Meus pais **Valdomiro e Vera**, todo meu esforço, toda coragem, a saudade que muitas vezes me machucou, cada medo e obstáculo superado foi vencido por conta do apoio

incondicional de vocês. Todos elogios que recebi e recebo até hoje são como esse trabalho: para vocês.

À minha irmã **Laís** e minhas sobrinhas **Paolla e Isadora**. Juntamente com meus pais tornaram minha base muito mais forte para que eu pudesse seguir em busca dos meus sonhos. O trabalho que me deu essa tese não chega nem perto da saudade que senti de vocês para que ela pudesse se realizar. Vocês são minha motivação para continuar todos os dias em busca de algo melhor.

À todos meus colegas e amigos do **LACOM**, sem exceção. Os que chegarem, os que foram embora e os que estão comigo ao longo desses 7 anos. Valeu por todos momentos de discussão, de descontração, os cafés compartilhados, por sempre me acolherem com tanto carinho muitas vezes respeitando meus dias de “bad vibes”. Essa tese é nossa!

Aos colegas e amigos que fiz no **CSIC-IDAEA** em Barcelona. Não teve um dia que eu não tenha aprendido algo com vocês. Pessoas de muitos lugares diferentes do mundo que fizeram o meu mundo melhor. Profissionais que eu jamais vou esquecer, os valores e a educação de vocês deveriam ser um modelo para todos que se encorajam a seguir nessa caminhada.

À minha amiga **Lizi**, por ser meu porto seguro dentro do laboratório durante tanto tempo. Passamos por tanta coisa juntas que se fosse escrever com certeza redigiria uma nova tese. Com introdução, justificativa, resultados e discussão, mas o mais importante: com a conclusão de que tudo vale a pena quando temos amizade, carinho e muita força para seguir em frente. Quem dera o mundo tivesse mais pessoas como tu, Lizi.

À **Maris** minha eterna parceira de lodo. Nunca entendi o que tu mais sentia por mim, carinho ou paciência. Obrigada por sempre me ajudar com tanta cautela e por cada olhar que me fez seguir em frente.

Elisane, minha parceira de MSPD. Nem que eu viva mil anos vou conseguir me desculpar por ter vomitado em ti naquele avião. Sem palavras por todo carinho que sempre teve comigo, toda paciência, toda coragem que intuitivamente tu sempre me passou. Contigo aprendi valores que jamais vou esquecer.

À minha grande amiga **Gabriela**. Ter realizado grande parte da pós-graduação ao teu lado fez tudo ser mais fácil, mas a tua saída foi sem dúvidas um dos momentos mais difíceis. Obrigada por me ensinar que viver não cabe no Lattes!

À professora, amiga e também um grande exemplo, **Liziara**. Mesmo de longe sempre me enviando muita força, tirando minhas dúvidas e me impulsionando a nunca desistir. Sortudos são os alunos que tem a oportunidade de aprender diariamente contigo.

Muito mais do que títulos, artigos ou certificados, ao grande presente que o LACOM que deu: meu amor **Jahir**. Um dos meus maiores incentivadores, mesmo na distância sempre se fez presente dentro do meu coração. Contigo aprendi que amizade é um amor que nunca morre.

À minha amiga **Ana Paula**, juntas desde a graduação, todas histórias nos fizeram mulheres muito mais fortes. Sem teu apoio e sem teus puxões de orelha talvez eu não estivesse chegado tão longe. Obrigada por tudo, tu és tudo para mim.

Às minhas amigas **Mariana, Camilas, Tamires, Nathalia, Flávia, Carol, Antônio, Michele, Thais, Luiza e Nathalia** que sempre me impulsionaram e acreditaram em mim muitas vezes mais do que eu mesma. Por sempre estarem ao meu lado me lembrando que muito mais importante que métodos analíticos de preparo de amostra é a amizade que temos umas com as outras. Obrigada por compreenderem a minha ausência nas jantãs e nos nossos encontros que sempre foram especiais demais para mim. Essa tese também é de vocês!

Aos meus eternos amigos do laboratório **Kolbe**, minha primeira base dentro de um laboratório de Química. À todos vocês, muito obrigada por contribuírem com o que eu sou hoje. Em especial à **Mari, Renata, Tamara e Daiane**, vocês são parte da minha família e eu amo incondicionalmente vocês.

À minha mais nova família **Álvaro Daiane e Willian**, que se tornaram peça fundamental no meu retorno ao Brasil e na etapa final da tese. Valeu por todo incentivo, paciência e espaço concedido na mesa de estudos, na casa mas principalmente dentro do coração de vocês.

Às meninas da limpeza, em especial **Marli e dona Ana**. Não somente pela limpeza do espaço de trabalho, mas também por me receberem todos os dias com um novo sorriso. Vocês também fazem parte do meu coração e do meu trabalho.

À todos os demais familiares, amigas e amigos que torceram e me auxiliaram em mais uma etapa.

À **FURG**, minha única residência fixa durante 10 anos ininterruptos. Pela oportunidade do ensino totalmente público, gratuito e de qualidade durante toda graduação, mestrado e doutorado. Me faltam palavras para agradecer todas oportunidades que me foram dadas dentro da Instituição.

Aos professores do **curso de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental**, que participaram e contribuíram com minha formação.

À **Rosane**, funcionária da PPGQA, por todas atenções às minhas solicitações.

Aos órgãos de fomento **CAPES e CNPq** por todo auxílio financeiro durante a realização deste trabalho. Em especial ao **projeto Ciências do Mar da CAPES** pela possibilidade de realizar o doutorado sanduíche na Espanha.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE TABELAS	14
LISTA DE ABRACIATURAS E SIMBOLOS.....	16
1 INTRODUÇÃO.....	22
2 HIPÓTESE.....	26
3 OBJETIVOS.....	27
3.1 Objetivo geral	27
3.2 Objetivos específicos	27
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
4.1 Fármacos, produtos de cuidado pessoal e filtros UV	27
4.2 Biocidas anti-incrustantes	35
4.3 Cromatografia líquida acoplada à Espectrometria de Massas	53
4.4 O processo analítico e o preparo de amostra	59
4.4.1 Métodos de preparo de amostra para determinação de fármacos, produtos de cuidado pessoal e filtros UV em matrizes ambientais.....	60
4.4.2 Métodos de preparo de amostra para determinação de biocidas anti-incrustante em matrizes ambientais	65
4.4.3 Dispersão da Matriz em Fase Sólida.....	71
5 MATERIAIS E MÉTODOS	81
5.1 Instrumentação	81
5.2 Reagentes, solventes e materiais	82
5.3 Preparo das soluções analíticas	83
5.4 Limpeza da vidraria.....	84
5.5 Seleção dos analitos de estudo	84
5.6 Amostragem.....	90
5.6.1 Amostras de sedimento	90
5.6.2 Amostras de peixe	90
5.7 Condições instrumentais do HPLC-ESI-(QqLIT)-MS/MS	90
5.8 Uso de padrão interno.....	101
5.9 Avaliação da técnica de VA-MSPD para a extração multirresíduo de compostos orgânicos em sedimento.....	102
5.9.1 Escolha do solvente.....	103
5.9.2 Escolha do suporte sólido.....	103

5.10	Avaliação da técnica de VA-MSPD para a extração multirresíduo de compostos orgânicos em peixe.....	103
5.10.1	Escolha do solvente.....	104
5.10.2	Escolha do suporte sólido.....	104
5.11	Validação	104
5.11.1	Limite de Detecção e Limite de Quantificação.....	104
5.11.2	Curvas de calibração e linearidade.....	105
5.11.3	Exatidão e precisão	105
5.11.4	Efeito matriz.....	105
5.12	Aplicabilidade	106
5.13	Tratamento dos resíduos gerados	106
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	107
6.1	Condições instrumentais	107
6.2	Avaliação dos principais parâmetros de extração por VA-MSPD para determinação multirresíduo em sedimento	108
6.2.1	Escolha do solvente.....	108
6.2.2	Suporte sólido.....	114
6.3	Validação	118
6.3.1	Limite de Detecção e Limite de Quantificação.....	118
6.3.2	Curvas de calibração e linearidade.....	119
6.3.3	Exatidão e precisão	124
6.3.4	Efeito matriz.....	129
6.4	Aplicabilidade do método para amostras de sedimento	131
6.5	Comparação com outros trabalhos da literatura para sedimento	140
6.6	Avaliação dos principais parâmetros de extração por VA-MSPD para determinação multirresíduo em peixe	143
6.6.1	Preparo de amostra	143
6.6.2	Solvente.....	143
6.6.3	Suporte sólido.....	146
6.7	Validação	148
6.7.1	Limite de Detecção e Limite de Quantificação.....	148
6.7.2	Curvas de calibração e faixa linear	149
6.8	Exatidão e precisão.....	153
6.8.1	Efeito matriz.....	157

6.8.2	Aplicabilidade do método para amostras de tecidos de peixe	158
6.9	Comparação com outros trabalhos da literatura para tecidos de peixe	163
7	Conclusões	165
8	Sugestões para trabalhos futuros	165
9	Experiência adquirida durante o período do doutorado sanduíche.....	166
10	Referências bibliográficas	167

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação do número de publicações envolvendo fármacos, filtros UV e biocidas anti-incrustantes. Base de dados: sciencedirect. Palavras chaves acessadas: Fármacos, contaminantes orgânicos e preparo de amostra; Filtros UV, contaminantes orgânicos e preparo de amostra; biocidas anti-incrustantes, contaminantes orgânicos e preparo de amostra. Acesso realizado em 13/04/2019.	25
Figura 2 - Estrutura geral das benzofenonas	30
Figura 3 - Derivados da benzofenona	30
Figura 4 - Estrutura do EtPABA.....	31
Figura 5 - Derivados do ácido <i>p</i> -aminobenzóico	31
Figura 6 - Estrutura geral dos benzotriazóis.....	33
Figura 7 - Estrutura do metilparabeno.....	33
Figura 8 - Estrutura da Flumequina.....	34
Figura 9 - Estrutura de uma quinolona (ácido nalidíxico)	34
Figura 10 - Estrutura geral das tetraciclinas.....	34
Figura 11 - Esquema representativo das etapas da MSPD original (Adaptado de (Barker <i>et al.</i> , 1989).....	71
Figura 12 - Representação do número de publicações envolvendo MSPD durante o período de 2009 a 2019. Base de dados: sciencedirect. Palavra-chave acessada: <i>matrix solid phase dispersion</i> . Acesso realizado em 15/04/2019....	72
Figura 13 - Esquema representativo da MSPD original. (MSPD assistida por ultrassom (UA-MSPD), MSPD assistida por vórtex (VA-MSPD) e MSPD associada magneticamente (MA-MSPD) Adaptado de (Tu e Chen 2018)	73
Figura 14 - Esquema representativo da VA-MSPD. Adaptado de (Caldas <i>et al.</i> , 2013)	74
Figura 15 - HPLC-ESI-(QqLIT)-MS/MS utilizado no IDAEA-CSIC.....	82
Figura 16 - Cromatograma total dos compostos do estudo monitorados no modo positivo (ESI+).....	107
Figura 17 - Cromatograma total dos compostos do estudo monitorados no modo negativo (ESI-)	108
Figura 18 - Percentual de compostos que apresentaram recuperações <50%, entre 70 e 120% e >140%, utilizando diferentes solventes (Condições utilizadas: 2 g de amostra de sedimento, 0,25 g de C18 como suporte sólido e 5 mL de solvente. 1 minuto de agitação em vórtex e 10 minutos de centrifugação a 4000 rpm), n=3.....	109
Figura 19 - Percentual de compostos que apresentaram recuperações <50%, entre 70 e 120% e >140%, utilizando diferentes suportes sólidos (Condições utilizadas: 2 g de amostra de sedimento, 0,25 g de suporte sólido e 5 mL de metanol como solvente de extração. 1 minuto de agitação em vórtex e 10 minutos de centrifugação a 4000 rpm), n=3.	114

Figura 20 - Procedimento da VA-MSPD otimizada para sedimento.....	118
Figura 21 - Cromatograma da AVO na amostra de sedimento do estaleiro de Rio Grande, RS.	135
Figura 22 - Percentual de compostos que apresentaram recuperações <50%, entre 70 e 120% e >140%, utilizando diferentes solventes de extração (Condições utilizadas: 0,5 g de amostra de peixe liofilizado, 2 g de C18 como suporte sólido e 5 mL de solvente de extração. 1 minuto de agitação em vórtex e 10 minutos de centrifugação a 4000 rpm), n=3	144
Figura 23 - Percentual de compostos que apresentaram recuperações <50%, entre 70 e 120% e >140%, utilizando diferentes suportes sólidos (Condições utilizadas: 0,5 g de amostra de peixe liofilizado, 2 g de suporte sólido e 5 mL de metanol como solvente de extração). 1 minuto de agitação em vórtex e 10 minutos de centrifugação a 4000 rpm), n=3.	147
Figura 24 - Procedimento da VA-MSPD otimizada para peixe.....	148

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Propriedades físico-químicas dos principais biocidas anti-incrustantes e seus produtos de degradação, nomenclatura IUPAC, classe química, estrutura, aplicação e modos de ação (Adaptado de (Sánchez-Rodríguez <i>et al.</i> , 2012)..	38
Tabela 2 - Ecotoxicidade do irgarol frente à água e algumas espécies aquáticas	45
Tabela 3 - Concentrações de Irgarol e M1 detectadas em amostras de água de diversos ambientes costeiros	46
Tabela 4 - Legislação de alguns países para os biocidas (Crommentuijn <i>et al.</i> , 2000)	52
Tabela 5 - Concentração máxima permitida estabelecida pelas autoridades holandesas (Crommentuijn <i>et al.</i> , 2000).....	52
Tabela 6 - Limites máximos para alguns biocidas anti-incrustantes estabelecidos por países da União Europeia em sedimentos (Cresswell <i>et al.</i> , 2006)	53
Tabela 7 - Principais características de alguns estudos que determinam PPCPs em matrizes ambientais	61
Tabela 8 - Principais características de estudos que determinam biocidas anti-incrustantes e alguns de seus produtos de degradação em matrizes ambientais	66
Tabela 9 - Estudos que utilizam a MSPD para extração de diferentes analitos em matrizes alimentícias e ambientais.....	76
Tabela 10 - Comparação das principais características dos métodos de preparo de amostra mencionados nesse trabalho (Adaptado de (Liu <i>et al.</i> , 2015)	80
Tabela 11 - Analitos selecionados para estudo (nome usual), nomenclatura IUPAC, Número CAS, classe, massa molecular (MM), Log Kow e solubilidade em água	85
Tabela 12 - Tempo de retenção (t_R , em minutos), transições monitoradas, modo de ionização, voltagem do cone (VC), energia de colisão (EC), potencial de saída da célula de colisão (CxP) e padrão interno correspondente utilizado para cada composto em estudo	93
Tabela 13 - Condições empregadas no sistema cromatográfico.....	99
Tabela 14 - Gradiente de eluição utilizado no modo ESI+, vazão de 0,3 mL min ⁻¹	100
Tabela 15 - Gradiente de eluição empregadas no modo ESI-, vazão de 0,3 mL min ⁻¹	100
Tabela 16 - Padrões internos utilizados, transições monitoradas, voltagem do cone (VC), energia de colisão (EC), potencial de saída da célula de colisão (CxP), tempo de retenção (t_R em minutos) e modo de ionização correspondente para cada composto em estudo	101
Tabela 17 - Coeficientes de correlação das curvas analíticas preparadas no solvente e no extrato da matriz, Limite de Detecção instrumental (LOD _i), Limite	

de Quantificação instrumental (LOQ_i), Limite de Detecção do método (LOD_m), Limite de Quantificação do método (LOQ_m) e efeito matriz (EM) de todos os analitos de estudo	121
Tabela 18 - Recuperações (%) e Desvio Padrão Relativo (%) em termos de repetibilidade e precisão intermediária para as amostras de sedimento fortificadas em 3 níveis.....	126
Tabela 19 - Concentrações dos compostos de estudo nas amostras de sedimento analisadas ($ng\ g^{-1}$)	132
Tabela 20 - Somatório das concentrações dos compostos de estudo nas amostras de sedimento analisadas ($ng\ g^{-1}$).....	134
Tabela 21 - Características e breve descrição dos pontos de coleta das amostras de sedimentos analisadas.....	138
Tabela 22 - Comparação com outros trabalhos da literatura para amostras ambientais sólidas.....	141
Tabela 23 - Coeficientes de correlação das curvas analíticas preparadas no solvente e no extrato da matriz, Limite de Detecção instrumental (LOD_i), Limite de Quantificação instrumental (LOQ_i), Limite de Detecção do método (LOD_m), Limite de Quantificação do método (LOQ_m) e efeito matriz (EM %) de todos os analitos de estudo	150
Tabela 24 - Recuperações (%) e Desvio Padrão Relativo (%) em termos de repetibilidade e precisão intermediária para peixe em 3 níveis.....	154
Tabela 25 - Concentrações dos compostos de estudos nas amostras de peixe analisadas ($ng\ g^{-1}$).....	159
Tabela 26 - Somatório das concentrações dos compostos de estudos nas amostras de tecidos de peixe ($ng\ g^{-1}$)	160
Tabela 27 - Comparação com outros trabalhos da literatura para tecidos de peixe	163

LISTA DE ABRAVIATURAS E SIMBOLOS

AFS – Sistemas Anti-incrustantes em Navios, do inglês *Antifouling System Convention*

BTR – Benzotriazóis, do inglês *benzotriazole*

BT – Benzotiazóis, do inglês *benzotiazole*

BTs – Butílicos, do inglês *butiltin*

BSA – Benzenosulfonamidas, do inglês *benzenosulfonamide*

CE – Energia de colisão, do inglês *colision energy*

CSIC – Consejo Superior de Investigaciones Cientificas

COT – Carbono Orgânico Total

C18 – Sílica modificada com hidrocarbonato linear C₁₈, octadecilsilano

DBT – Dibutilestanho, do inglês *dibutiltin*

DCM – Diclorometano

DLLME – Microextração líquido-líquido dispersiva, do inglês *dispersive liquid-liquid microextraction*

DLLME-SFO – Microextração líquido-líquido dispersiva com solidificação da gota orgânica flutuante, do inglês *dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic drop*

DPhT – Difenilestanho, do inglês *difeniltin*

EM – Efeito Matriz, do inglês *matrix effect*

EP – Potencial de entrada, do inglês *entrance potential*

EPA – Agência de Proteção Ambiental, do inglês *Environmental Protection Agency*

ESI – Ionização por eletrospray, do inglês *electrospray ionization*

ETA – Estação de Tratamento de Água

ETE – Estação de Tratamento de Esgoto

GC – Cromatografia Gasosa, do inglês *gas chromatography*

GC-ECD – Cromatografia Gasosa acoplada ao detector de captura de elétrons, do inglês *gas chromatography with electron capture detector*

GC-FID – Cromatografia Gasosa com detector por ionização em chama, do inglês *gas chromatography with flame ionization detector*

GC-FPD – Cromatografia Gasosa acoplada ao detector fotométrico de chama, do inglês *gas chromatography with flame photometric detector*

GC-MS – Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de massas, do inglês *gas chromatography with mass spectrometry detector*

GC-MS/MS – Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de massas sequencial, do inglês *gas chromatography tandem mass spectrometry*

HPLC-DAD – Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos, do inglês *high pressure liquid chromatography with diode array detector*

HPLC-UV – Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector ultravioleta, do inglês *high performance liquid chromatography with ultraviolet detector*

HPLC-(QqLIT)-ESI-MS/MS – Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de massas em série com analisador de armadilha de íons e ionização por eletrospray, do inglês *high performance liquid chromatography with mass spectrometry in tandem and ion trap analyzer with electrospray ionization*

HRMS – Espectrometria de Massas de Alta Resolução, do inglês *High Resolution Mass Spectrometry*

IDAEA – Instituto de Diagnostico Ambiental y Estudios del Agua

IMO – Organização Marítima Internacional, do inglês *International Maritime Organization*

IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*

K_{ow} – Coeficiente de partição octanol-água

LC – Cromatografia Líquida, do inglês *liquid chromatography*

LC-MS – Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial, do inglês *liquid chromatography tandem mass spectrometry*

LOD – Limite de Detecção, do inglês, *Limit of Detection*

LOQ – Limite de Quantificação, do inglês, *Limit of Quantification*

m/z – razão massa-por-carga

MA-MSPD – Dispersão da Matriz em Fase Sólida Associada Magneticamente, do inglês *Magnetic-Associated Matrix Solid Phase Dispersion*

MAE – Extração Assistida por Micro-ondas, do inglês *Microwave Assisted Extraction*

MeCN – Acetonitrila

MBT – Monobutilestanho, do inglês *monobutiltin*

MM – Massa molecular

MPC – Concentração máxima permitida, do inglês *Maximum permissible concentration*

MPhT – Monofenilestanho, do inglês *monofeniltin*

MS – Espectrometria de Massas, do inglês *Mass Spectrometry*

MSh – Agitação mecânica, do inglês *Mechanical Shaking*

MSPD – Dispersão da Matriz em Fase Sólida, do inglês *Matrix Solid Phase Dispersion*

N.e – Não encontrado

NI – Ionização negativa, do inglês *negative ionization*

N.R – Não reportado

OTs – Compostos organoestânicos, do inglês *organotin compounds*

pH – potencial hidrogeniônico

PI – Ionização positiva, do inglês *positive ionization*

PCPs – Produtos de Cuidado Pessoal, do inglês *Personal Care Products*

PPCPs – Fármacos e Produtos de Cuidado Pessoal, do inglês *Pharmaceuticals and Personal Care Products*

PLE – Extração com Líquido Pressurizado, do inglês *Pressurized Liquid Extraction*

QuEChERS – *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe*

r – coeficiente de correlação linear

rpm – Rotações por minuto

RSD – Desvio Padrão Relativo, do inglês *Relative Standard Deviation*

s/n – relação sinal-ruído

SD-DLLME – Microextração líquido-líquido dispersiva com solvente demulsificante, do inglês *solvent-based de-emulsification dispersive liquid-liquid microextraction*

SPE – Extração em Fase Sólida, do inglês *Solid Phase Extraction*

SPME – Microextração em Fase Sólida, do inglês *Solid Phase Microextraction*

SRM – Monitoramento de reações selecionadas, do inglês *selected reaction monitoring*

TBT – Tributilestanho, do inglês *tributiltin*

TIC – Cromatograma de Íon Total, do inglês *Total Ion Chromatogram*

$t_{1/2}$ – tempo de meia vida

TPhT – Trifenilestanho, do inglês *tripheniltin*

t_R – tempo de retenção

UA-MSPD – Dispersão da Matriz em Fase Sólida Assitada por Ultrassom, do inglês *Ultrasound Assisted Matrix Solid Phase Dispersion*

UAE – Extração Assistida por Ultrassom, do inglês *ultrasound-assisted extraction*

UE – União Européia

US-EPA – Agência de Proteção Ambiental dos Estado Unidos, do inglês *United States of Environmental Protection Agency*

UHPLC – Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência, do inglês *Ultra High Performance Liquid Chromatography*

TFA – Ácido trifluoracético, do inglês *trifluoroacetic ácido*

UV – Ultravioleta

VA-MSPD – Dispersão da Matriz em Fase Sólida Assitada por Vórtex, do inglês *Vortex-Assisted Matrix Solid Phase Dispersion*

VOCs – Compostos Orgânicos Voláteis, do inglês, *Volatile Organic Compounds*

RESUMO

Título: DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE FÁRMACOS, FILTROS UV E BIOCIDAS EM MATRIZES AMBIENTAIS UTILIZANDO VA-MSPD E HPLC-ESI-(QqLIT)-MS/MS

Autor: Karina Lotz Soares

Orientador: Prof. Dr. Ednei Gilberto Primel

Fármacos, produtos de cuidado pessoal e biocidas anti-incrustantes de 3ª geração fazem parte de um grupo de contaminantes orgânicos amplamente estudados em diferentes compartimentos ambientais ao redor do mundo. Para que seja possível suas determinações, se faz necessário o uso de preparo de amostra, onde técnicas miniaturizadas têm recebido atenção por parte dos Químicos Analíticos. Essas técnicas minimizam a utilização de massa de amostra, volume de solvente e por consequência a geração de resíduos dentro do laboratório. Entretanto, o acoplamento das técnicas miniaturizadas com a possibilidade de determinação de compostos de diferentes classes e propriedades físico-químicas é considerado um desafio. Com isso, o desafio e contribuição desse trabalho foi o estudo da Dispersão da Matriz em Fase Sólida Assistida por Vórtex (VA-MSPD, do inglês *Vortex Assisted-Matrix Solid Phase Dispersion*) na busca de uma técnica miniaturizada, rápida, e que possibilitasse a extração simultânea de um grupo selecionado de 59 compostos orgânicos em sedimento e tecidos de peixe. Em ambos métodos desenvolvidos as determinações foram realizadas por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial com analisador de armadilha de íons. Nas condições otimizadas do método desenvolvido para sedimento utilizou-se 2 g de massa de amostra isenta de suporte sólido e 5 mL de metanol como solvente de extração. Os limites de quantificação do método ficaram entre 0,42 e 36,83 ng g⁻¹. Para o método desenvolvido para diferentes tecidos de peixe a condição otimizada utilizou 0,5 g de massa de amostra, 2 g de sílica como suporte sólido e 5 mL de metanol como solvente. Para esse método os limites de quantificação do método ficaram entre 3,31 e 137,51 ng g⁻¹. Os valores de recuperação de ambos métodos ficaram entre 70 e 120%, com RSD ≤ 20% para a maioria dos analitos de estudo. A quantificação foi realizada por padronização interna e foram encontrados alguns dos compostos nas amostras de sedimento na faixa de 1,55 a 69,69 ng g⁻¹ e na faixa de 24,16 a 21039,2 ng g⁻¹ nos diferentes tecidos de peixe. Comparados com outros métodos da literatura, os métodos propostos nesse trabalho apresentaram sensibilidade, seletividade, além de serem mais rápidos, simples e fácil execução.

Palavras-chaves: PPCPs; VA-MSPD; sedimento; peixe; cromatografia líquida.

ABSTRACT

Title: DEVELOPMENT OF METHODS FOR SIMULTANEOUS DETERMINATION OF DRUGS, UV FILTERS AND BIOCIDES IN ENVIRONMENTAL MATRIXES USING VA-MSPD AND HPLC-ESI-(QqLIT)-MS/MS

Author: Karina Lotz Soares

Advisor: Prof. Dr. Ednei Gilberto Primel

Drugs, personal care products and the third generation of antifouling booster biocides are part of a group of organic contaminants widely studied in different environmental compartments around the world. For its determination, it's necessary to use sample preparation, where miniaturized techniques have received attention from Analytical Chemists. These techniques minimize the use of sample mass, solvent volume and consequently the generation of waste within the laboratory. However, the coupling of miniaturized techniques with the possibility of determination of compounds of different classes and physical-chemical properties is considered a challenge. Thus, the challenge and contribution of this work was the study of Vortex Assisted-Matrix Solid Phase Dispersion (VA-MSPD) in the search for a miniaturized, fast technique that extraction of a selected group of 59 organic compounds in sediment and fish tissues. In both developed methods determinations were performed by liquid chromatography coupled to sequential mass spectrometry with ion trap analyzer. Under optimized conditions of the method developed for sediment was used 2 g of solid support free sample mass and 5 mL of methanol as the extraction solvent. The limits of quantification of the method were between 0.42 and 36.83 ng g⁻¹. For the method developed for different fish tissues the optimized condition used 0.5 g of sample mass, 2 g of silica as solid support and 5 mL of methanol as solvent. For this method the limits of quantification of the method were between 3.31 and 137.51 ng g⁻¹. The recovery values of both methods were between 70 and 120%, with RSD ≤ 20% for most study analytes. The quantification was performed by internal standardization and some of the compounds were found in the sediment samples in the range of 1.55 to 69.69 ng g⁻¹ and in the range of 24.16 to 21039.2 ng g⁻¹ in the different tissues of fish. Compared to other methods in the literature, the methods proposed in this study showed sensitivity, selectivity, and are faster, simpler and easier to perform.

Keywords: PPCPs; VA-MSPD; sediment; fish; liquid chromatographic.

1 INTRODUÇÃO

Fármacos e produtos de cuidado pessoal (PPCPs, do inglês *Pharmaceuticals and Personal Care Products*) como filtros UV, e os biocidas oriundos de sistemas anti-incrustantes estão sendo constantemente investigados em diferentes compartimentos ambientais como água (Agüera *et al.*, 2000, Giger *et al.*, 2006, Díaz-Cruz *et al.*, 2012, Caldas *et al.*, 2016, Serra-Roig *et al.*, 2016, Köck-Schulmeyer *et al.*, 2019), sedimentos (Gatidou *et al.*, 2007, Gago-Ferrero *et al.*, 2011, Batista-Andrade *et al.*, 2016), lodos (Yu *et al.*, 2011, Cerqueira *et al.*, 2018) e biota (Harino *et al.*, 2006, Gago-Ferrero *et al.*, 2015, Vieira *et al.*, 2018) em diferentes partes do mundo. De acordo com suas características e propriedades físico-químicas, alguns compostos apresentam afinidade pela fase orgânica, possuindo maior tendência de estarem aderidos aos sedimentos ou então às partículas presentes na coluna d'água (Martins *et al.*, 2018).

Os PPCPs, de modo geral, são compostos amplamente utilizados na medicina humana e veterinária no tratamento e/ou prevenção de doenças ou como promotores de crescimento (Pacheco-Silva *et al.*, 2014) e representam um importante grupo de contaminantes orgânicos considerados emergentes (Čelić *et al.*, 2018). Esses compostos podem, ainda, serem classificados como substâncias biologicamente ativas e podem causar impactos adversos aos ecossistemas e também à saúde humana (Cerqueira *et al.*, 2018). Outra classificação importante de ser mencionada com relação aos PPCPs são as classes químicas que esses compostos fazem parte. Dentre elas se destacam as benzofenonas, benzotriazóis, sulfonamidas, quinolonas, tetraciclina e os parabenos por conta do potencial de toxicidade que esses compostos apresentam ao meio ambiente.

Especificamente, em relação aos produtos de cuidado pessoal, os filtros UV merecem atenção. De acordo com um relatório exaustivo divulgado sobre a ocorrência de produtos de cuidado pessoal (PCPs, do inglês *and Personal Care Products*) os filtros UV apresentaram o maior crescimento de vendas, chegando a 13% na Europa entre os anos de 2002 a 2003 e movimentando cerca de \$1000 milhões. Estima-se que a tendência desse número é crescente (Jardim *et al.*, 2009).

Paralelamente à problemática dos PPCPS, a investigação dos biocidas oriundos dos sistemas anti-incrustantes está diretamente relacionada à bioincrustação marinha. Esta pode ser definida como um fenômeno biológico caracterizado pela colonização e/ou crescimento de organismos nas superfícies externas submersas na água do mar (Dafforn *et al.*, 2011). Adicionalmente, o processo biológico da bioincrustação pode acarretar desvantagens ao setor portuário, entre elas uma demanda maior na potência dos motores, e consequentemente, um aumento do consumo de combustível, bem como o aumento da frequência de docagens, gerando um incremento de custos e também resíduos gerados, aumento da taxa de corrosão e principalmente a introdução não intencional de espécies exóticas no ambiente aquático (Yebra *et al.*, 2004).

A fim de minimizar a problemática causada pela bioincrustação, que ocorre em todos os ambientes aquáticos, foram desenvolvidas tintas anti-incrustantes cuja composição contém compostos químicos com propriedades biocidas (Yebra *et al.*, 2004). Essas tintas são aplicadas nos cascos de navios a fim de evitar que algas, mexilhões e outros organismos se agreguem às embarcações e cujo princípio ativo é constituído por diversos compostos, entre eles os organoestânicos (OTs, do inglês *Organotin compounds*), como o Tributilestanho (TBT, do inglês, *Tributyltin*) e/ou Trifenilestanho (TPhT, do inglês, *Trifenyltin*) e mais atualmente, os co-biocidas de terceira geração, mundialmente estudados como diuron, irgarol, diclofluanida, DCOIT e TCMTB (Castro *et al.*, 2011). O termo biocida é definido como um agente químico com efeito desejado frente à organismos vivos, sendo um dos principais efeitos do uso de tais substâncias o envenenamento do sistema biológico, principalmente de moluscos e ostras, originando mutações e condenando espécies à extinção (Godoi *et al.*, 2003). Assim como os PPCPs, os biocidas estão sendo amplamente estudados ao redor do mundo por conta do impacto ambiental que sua presença pode acarretar.

As técnicas empregadas para determinação e quantificação de compostos orgânicos no meio ambiente são baseadas nas técnicas cromatográficas onde a Cromatografia Gasosa (GC, do inglês *Gas Chromatography*) e a Cromatografia Líquida (LC, do inglês *Liquid Chromatography*) merecem destaque por sua compatibilidade de determinação. Principalmente quando acopladas com

detector de espectrometria de massas (MS, do inglês *Mass Spectrometry*). Entretanto, devido aos avanços na tecnologia da instrumentação analítica, equipamentos com diferentes analisadores e de alta resolução também tem sido utilizados para determinação de compostos orgânicos. No que diz respeito à elucidação estrutural de produtos de degradação e/ou metabólitos de matrizes complexas, os de alta resolução merecem destaque por sua capacidade de identificação de moléculas não-alvo.

No que diz respeito à determinação dos compostos de diferentes classes e propriedades físico-químicas em matrizes sólidas, as técnicas de preparo de amostra comumente utilizadas são baseadas nas técnicas tradicionais que utilizam equipamentos de elevado grau de automação, elevada quantidade de massa de amostra, volume de solvente, por consequência uma elevada geração de resíduos dentro do laboratório, além do tempo de extração considerado exaustivo. Dentre essas técnicas se destacam a Extração por Líquido Pressurizado (PLE, do inglês *Pressurized Liquid Extraction*) (Gago-Ferrero *et al.*, 2011), Extração Assistida por Ultrassom (UAE, do inglês *Ultrasound-assisted Extraction*) (Turiel *et al.*, 2006) e a Extração Assistida por Micro-ondas (MAE, do inglês *Microwave-Assisted Extraction*) (Petrie *et al.*, 2016). Nesse sentido, a busca por métodos analíticos com menor custo, maior rapidez, de fácil execução e que apresentem características positivas à minimização da quantidade de solventes, merecem atenção.

Independente do método aplicado para investigação de compostos orgânicos como os fármacos, filtros UV e os biocidas e reafirmando o crescente número de trabalhos acerca dessa investigação, a Figura 1 apresenta uma representação dos últimos 10 anos, segundo uma das principais bases de dados científicas, que corrobora com a problemática envolvendo esses compostos.

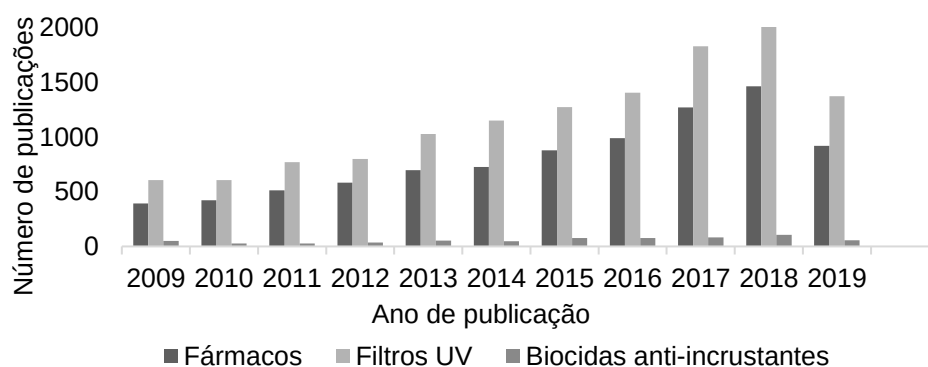


Figura 1 - Representação do número de publicações envolvendo fármacos, filtros UV e biocidas anti-incrustantes. Base de dados: sciencedirect. Palavras chaves acessadas: Fármacos, contaminantes orgânicos e preparo de amostra; Filtros UV, contaminantes orgânicos e preparo de amostra; biocidas anti-incrustantes, contaminantes orgânicos e preparo de amostra. Acesso realizado em 13/04/2019.

É possível perceber que os fármacos e os filtros UV apresentam maior número de estudos envolvendo contaminantes orgânicos e preparo de amostra. Entretanto, diante da problemática envolvendo os biocidas anti-incrustantes e o número reduzido de trabalhos a cerca desses compostos, a necessidade de estudos de investigação se reafirma.

Diante dos avanços das técnicas de extração, uma alternativa interessante, promissora e vantajosa quando comparada às convencionalmente utilizadas, é a Dispersão da Matriz em Fase Sólida (MSPD, do inglês *Matrix Solid Phase Dispersion*). O princípio básico da MSPD consiste na mistura e maceração da amostra juntamente com um suporte sólido de característica abrasiva e uma pequena quantidade de solvente orgânico (Barker *et al.*, 1989, Barker 2000). Entretanto, na tentativa de tornar a técnica mais robusta, menos suscetível a erros e menos poluente, a MSPD também passou por modificações (Caldas *et al.*, 2013), onde uma das modificações que se destaca é a MSPD assistida por vórtex (VA-MSPD, do inglês *Vórtex-Assisted Matrix Solid Phase Dispersion*). Essa modificação, proposta por Sebastià *et al.*, (2010) e adaptada por Caldas *et al.*, (2013) substitui a etapa de eluição nos cartuchos de SPE por agitação da mistura com um solvente em tubos de polipropileno. Essa modificação possibilita a minimização de problemas ocasionados na técnica original e não menos importante, minimiza a exposição do analista, uma vez que trabalha-se em

sistema fechado ao invés do sistema aberto onde o contato direto com o solvente é relativamente maior (Sebastià *et al.*, 2010, Caldas *et al.*, 2013).

Embora alternativos, métodos com características de miniaturização apresentam um desafio analítico por conta da dificuldade dos analitos serem extraídos simultaneamente (Caldas *et al.*, 2016). Vale ressaltar que adicionalmente ao método escolhido, é importante que o mesmo seja capaz de disponibilizar dados que permitam compreender aspectos como aportes de substâncias para o meio aquático, biodisponibilidade, condições de exposição dos organismos, toxicidade e comportamento ambiental (Castro *et al.*, 2011).

Diante do exposto, e em contrapartida às técnicas tradicionais, esse trabalho apresenta o desafio e contribuição do estudo da VA-MSPD como técnica de preparo de amostra com determinação por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial com ionização por eletrospray e analisador por armadilha de íons (HPLC-ESI-(QqLIT)-MS/MS) para análise de um grupo selecionado de 59 compostos orgânicos de diferentes classes e propriedades físico-químicas incluindo fármacos, filtros UV e os principais biocidas oriundos de sistemas anti-incrustantes em amostras de sedimento e tecidos de peixe. Esse grande grupo de compostos compreende 41 fármacos e produtos de cuidado pessoal, incluindo 7 dos seus produtos de degradação mais frequentes, 7 filtros UV e 4 biocidas anti-incrustantes. Adicionalmente, os métodos foram desenvolvidos buscando atingir exatidão e precisão aceitáveis para possível utilização em rotina de laboratório, colaborando assim com o desenvolvimento da Química Analítica e também da Química Verde.

2 HIPÓTESE

Com o intuito de contribuir com os avanços da Química Analítica Verde, a hipótese dessa tese é comprovar que técnicas de preparo de amostra miniaturizadas, como a VA-MSPD, quando em combinação com a cromatografia líquida e também incluindo equipamentos de alta resolução, são eficientes, reprodutíveis e podem ser utilizadas tanto quanto as técnicas tradicionais com exatidão e precisão aceitáveis para determinação de compostos de diferentes classes e propriedades físico-químicas em matrizes complexas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo geral desse trabalho foi o estudo e desenvolvimento de métodos analíticos multirresíduos para determinação de compostos orgânicos de diferentes classes e propriedades físico-químicas (fármacos, filtros UV, produtos de degradação, e os principais biocidas anti-incrustantes) em amostras de sedimento e peixe utilizando a VA-MSPD como preparo de amostra e determinação por HPLC-ESI-(QqLIT)-MS/MS. Para atender ao objetivo geral dessa tese foram propostos os seguintes objetivos específicos:

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Selecionar os compostos para estudo, considerando as propriedades físico-químicas, potencial de toxicidade, diferentes aplicações e a ocorrência em amostras ambientais;
- ✓ Otimizar os parâmetros instrumentais no HPLC-ESI-(QqLIT)-MS/MS para os compostos de estudo;
- ✓ Estudar o desempenho da VA-MSPD como técnica de extração em um método multirresíduo para sedimento e peixe;
- ✓ Estudar as condições de extração da VA-MSPD com foco nos tipos de solventes e suportes sólidos;
- ✓ Validar ambos métodos avaliando curva analítica, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão, exatidão e efeito matriz;
- ✓ Aplicar os métodos para verificar a ocorrência dos compostos em amostras de sedimento e diferentes tecidos de peixe;
- ✓ Disponibilizar dados de ocorrência de contaminação para a sociedade.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Fármacos, produtos de cuidado pessoal e filtros UV

Os produtos farmacêuticos, ou simplesmente fármacos, são compostos amplamente utilizados na medicina humana e veterinária no tratamento e/ou prevenção de doenças ou como promotores de crescimento (Pacheco-Silva *et al.*, 2014). Estes compostos representam um importante grupo de contaminantes orgânicos considerados emergentes (Čelić *et al.*, 2018).

Os PCPs compreendem um grande grupo heterogêneo de compostos orgânicos adicionados em diferentes produtos que são amplamente utilizados na vida humana diária (loções corporais, cremes dentais, cosméticos e até alimentos, por exemplo). Quando usados, os PCPs podem ser absorvidos pelo corpo e excretados ou lavados após a sua aplicação (Serra-Roig *et al.*, 2016). Esses compostos, incluindo alguns de seus produtos de transformação, podem atingir as estações de tratamento de resíduos, onde são parcialmente eliminados e retidos no lodo. Entretanto, uma fração importante também pode ser liberada para o meio aquático nos efluentes, ou ainda ficarem aderidos aos sedimentos (Cerqueira *et al.*, 2018).

Dentro do que abrange muitos dos PCPs amplamente utilizados, e de modo mais específico, os filtros solares, também conhecidos como filtros UV (UV-Fs, do inglês *UV filters*) merecem atenção por serem produtos utilizados como proteção para os seres humanos contra os efeitos nocivos da radiação solar UV. Além disso, também são usados como aditivos em materiais poliméricos que devem ser protegidos da interrupção iniciada pela luz solar, em produtos farmacêuticos, produtos de manutenção de veículos e outros bens industriais (Molins-Delgado *et al.*, 2018).

Os filtros UV alcançaram uma alta popularidade, uma vez que seu papel protetor contra o fotoenvelhecimento, fotocarcinogênese e fotoimunossupressão promovida pela radiação solar UV já foi demonstrado e comprovado (Serra-Roig *et al.*, 2016). Por conta disso, os filtros UV têm sido cada vez mais usados, e consequentemente estudados e detectados em diferentes compartimentos ambientais (Fent *et al.*, 2010, Gago-Ferrero *et al.*, 2011, Villa *et al.*, 2012, Barón *et al.*, 2013, Serra-Roig *et al.*, 2016, Mizukawa *et al.*, 2017). Estes compostos foram classificados como contaminantes emergentes, por, ainda, ser considerado escasso o conhecimento sobre sua ocorrência, destino e seus respectivos efeitos nos ecossistemas aquáticos. Além do mais, os contaminantes emergentes são classificados como poluentes persistentes porque são continuamente liberados no meio aquático através de duas vias: diretamente aos insumos como consequência das atividades recreativas e, principalmente, insumos indiretos das Estações de Tratamento de Águas como resultado do uso doméstico de PCPs, bem como resíduos industriais (Serra-Roig *et al.*, 2016).

De modo geral, os filtros UV apresentam algumas características típicas dos compostos orgânicos considerados emergentes, como, por exemplo, a fração aromática com uma cadeia lateral que pode apresentar diferentes níveis de insaturação. Alguns deles (como o 4-metilbenzilidenecânfora e etilexilmetoxicinamato) se encontram na forma de estereoisômeros (*E*) e (*Z*), embora na forma comercial seja a (*E*) (Molins-Delgado *et al.*, 2018).

Já foram relatados e encontrados resíduos de filtros UV orgânicos mais polares em diferentes tipos de amostras de água, incluindo água da torneira (Díaz-Cruz *et al.*, 2012). Entretanto, devido à alta lipofilicidade (principalmente valores de Log Kow entre 4 - 8) e a baixa biodegradabilidade, muitos destes compostos acabam atingindo os lodos de esgoto (Plagellat *et al.*, 2006, Cerqueira *et al.*, 2018) durante o tratamento de águas residuais e se acumulam em sedimentos (Zhang *et al.*, 2011) e podem, ainda, bioacumular em organismos vivos como biota (Gago-Ferrero *et al.*, 2013). Ademais, tem sido sugerido que a biomagnificação pode ocorrer através da cadeia alimentar (Serra-Roig *et al.*, 2016).

Quanto à legislação relacionada à esses compostos acima mencionados, os quadros de legislação são, geralmente, atualizados com o objetivo de avaliar os potenciais riscos ambientais e de saúde que os contaminantes emergentes podem causar. Como exemplo, na União Européia está sendo estabelecido uma estrutura preventiva para controlar a poluição das águas subterrâneas. Isto inclui procedimentos para avaliar o estado das águas e medidas para reduzir os níveis de poluentes, por parte dos componentes da *Water Framework Directive*, que tratam das águas subterrâneas. Entretanto, alguns compostos como os filtros UV e os parabenos, até agora não foram incluídos em nenhum desses regulamentos (Serra-Roig *et al.*, 2016).

Tendo em vista esses fatores, ressalta-se a importância do estudo da ocorrência desses compostos tanto em água, onde são encontrados com mais frequência, bem como em outros compartimentos ambientais como os sedimentos, com muito menos informações disponíveis na literatura e também amostras de peixes, que são considerados excelentes biomarcadores ambientais.

Ainda no que diz respeito aos fármacos, estes compreendem uma ampla variedade de classes químicas com diferentes modos de ação, como

terapêuticas, antibiótica/antimicrobiana, antiparasitária, inseticida, fungicida e outras. Dentre estas, os antimicrobianos podem ser, ainda, classificados como β -lactâmicos, tetraciclina e aminoglicosídeos. Já entre os antiparasitários podem ser citados os piretróides e organofosforados (Pacheco-Silva *et al.*, 2014).

Outras classes que também merecem destaque são as benzofenonas. Compostos como a benzofenona-1, benzofenona-3, benzofenona-4, 4-hidroxibenzofenona, 4,4'-dihidroxibenzofenona fazem parte do grupo dos filtros UV amplamente estudados e que apresentam atividade de desregulação endócrina comprovada (Valle-Sistac *et al.*, 2016). Esses compostos orgânicos da classe das benzofenonas estão sendo mundialmente estudados em compartimentos ambientais como água (Tarazona *et al.*, 2010), solo (Jeon *et al.*, 2006), sedimento (Zhang *et al.*, 2011) e também há relatos de estudos na literatura que investigaram sua presença, juntamente com outros compostos orgânicos, em amostras de placenta (Valle-Sistac *et al.*, 2016).

A Figura 2 apresenta uma estrutura geral das benzofenonas. De forma geral, essas moléculas apresentam um anel benzênico em sua estrutura, e dependendo dos outros substituintes na molécula, essa pode apresentar diferentes derivados, assim como ilustra a Figura 3, como a Benzofenona-3, Benzofenona-4. Vale ressaltar que esses compostos fazem parte dos filtros UV orgânicos regulados pela normativa CD 76/78/EEC (Européia 2009).

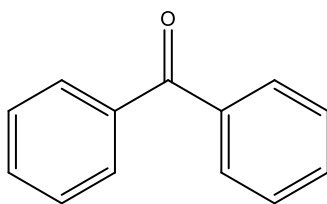


Figura 2 - Estrutura geral das benzofenonas

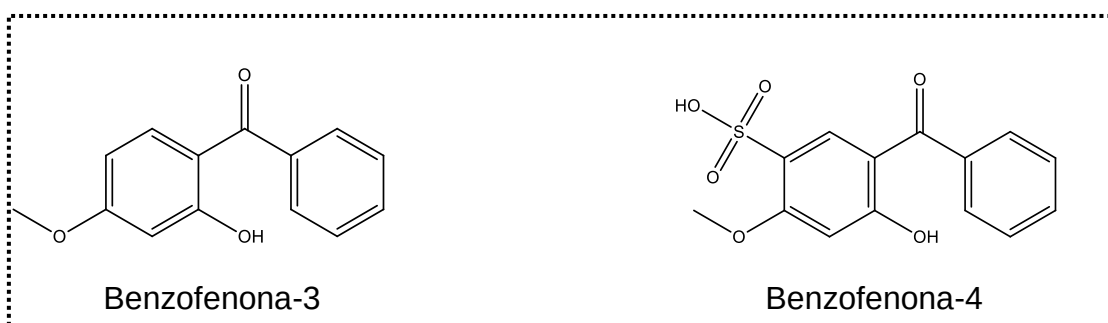


Figura 3 - Derivados da benzofenona

Outros derivados importantes de serem mencionados são os derivados de cinamato, como o etilexilmetoxicinamato (EHMC). Há estudos na literatura que comprovam que compostos como o EHMC e o ácido octildimetil *p*-aminobenzóico representam mais de 60% da ocorrência total em filtros UV. E Em estudos anteriores, foi investigada a avaliação a cerca do risco ecológico causado por esses compostos, onde foi comprovado que a probabilidade do EHMC causar efeitos tóxicos na reprodução em moluscos é superior a 84%, sugerindo riscos potenciais de filtros UV para organismos bentônicos e possíveis efeitos na teia alimentar. Entretanto, mais dados de toxicidade para organismos sedimentares são necessários para uma melhor avaliação dos riscos causados por esses compostos (Amine *et al.*, 2012, Tsui *et al.*, 2015).

Outro composto presente nesse trabalho e que está sendo amplamente investigado é o etil-4-(dimetilamino)benzoato, o EtPABA. Esse composto é derivado do ácido *p*-aminobenzóico, exemplificado estruturalmente na Figura 4. Adicionalmente, a Figura 5 apresenta alguns de seus derivados.

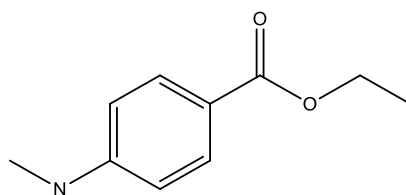


Figura 4 - Estrutura do EtPABA

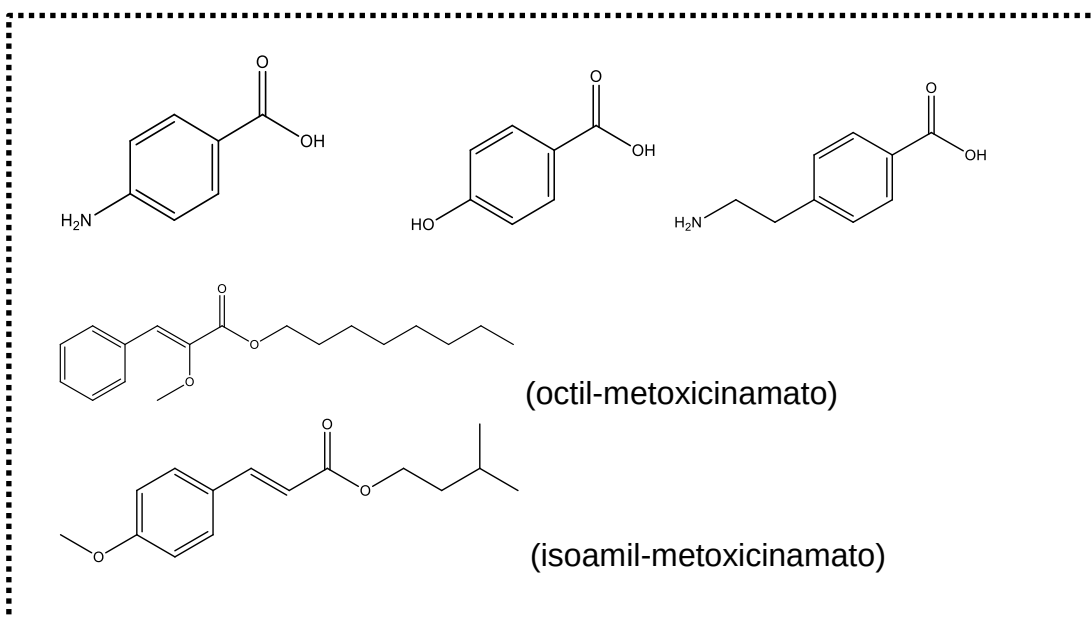


Figura 5 - Derivados do ácido *p*-aminobenzóico

O octil-metoxicinamato e o isoamil-metoxicinamato são compostos orgânicos presentes em alguns protetores solares e protetores labiais. O primeiro é, adicionalmente, um dos filtros solares mais utilizados mundialmente. É um éster formado a partir do ácido metoxicinâmico juntamente com o 2-etilhexanol e é insolúvel em água. Em menor número, o isoamil-metoxicinamato é também utilizado como ingrediente de protetores solares e é aprovado para uso na União Européia e, atualmente, está passando por avaliação de regulamentação nos Estados Unidos.

Outras classes importantes de serem mencionadas, e que estão presentes nesse trabalho são os benzotriazóis (BTR, do inglês *benzotriazole*), benzotiazóis (BT, do inglês *benzotiazole*) e as benzenosulfonamidas (BSA, do inglês *benzenosulfonamide*). Esses compostos fazem parte de um grande grupo de contaminantes ambientais amplamente investigados, e por conta da sua estrutura química são considerados de alto volume molecular tanto quanto seus principais derivados (Herrero *et al.*, 2014). Adicionalmente, essas classes são altamente solúveis em água e algumas também apresentam resistência à biodegradação, ou então, efeitos tóxicos a organismos secundários, como nos peixes (Seeland *et al.*, 2012).

Assim como os outros compostos anteriormente citados e que também fazem parte do grupo dos contaminantes emergentes, os benzotriazóis apresentam uma ampla utilização e diversas aplicações em produtos de consumo diário. Sendo assim, também podem atingir os compartimentos ambientais e são consideradas precárias as informações sobre a toxicidade desses compostos e seus principais derivados. Compostos como metilbenzotriazol e dimetilbenzotrizol, são aditivos de alta produção e também apresentam capacidade de bloquear a luz UV. Adicionalmente, estes compostos podem ser encontrados em plásticos, produtos têxteis (Rani *et al.*, 2017) e outros que são expostos à luz solar (Mizukawa *et al.*, 2017). Por conta disso têm sido amplamente estudados em matrizes como águas (Giger *et al.*, 2006, Jover *et al.*, 2009), solos e sedimentos (Cancilla *et al.*, 2003, McNeill e Cancilla 2009) e lodos (Kloepfer *et al.*, 2004, Fries 2011, Naccarato *et al.*, 2014).

A Figura 6 ilustra uma estrutura geral dos compostos da classe dos benzotriazóis. Estes são compostos heterocíclicos que contem 2 anéis fundidos e três átomos de N, com fórmula química genérica $C_6H_5N_3$.

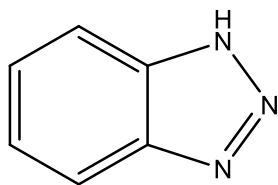


Figura 6 - Estrutura geral dos benzotriazóis

Ademais, alguns compostos derivados dos benzotriazóis, como o drometrizoltrisiloxano e o metilenbisbenzotriazolil, apresentam propriedades químicas e biológicas específicas, que os tornam úteis na indústria farmacêutica (Herrero *et al.*, 2014).

Outra classe importante de ser mencionada nesse trabalho são os parabenos. Compostos como propilparabeno, butilparabeno e benzilparabeno estão dentre os mais comumente usados na família de conservantes sintéticos. Devido à sua eficácia como antibacteriana e fungicida, seu baixo custo de produção e sua suposta baixa toxicidade, eles são usados em uma ampla gama de produtos (Serra-Roig *et al.*, 2016) e estão sendo mundialmente investigados em sedimentos e lodo de esgoto (Liao *et al.*, 2013) águas superficiais (Renz *et al.*, 2013) e biota (Xue e Kannan 2016). A Figura 7 ilustra a estrutura de um dos parabenos mais detectados nos compartimentos ambientais, o metilparabeno.

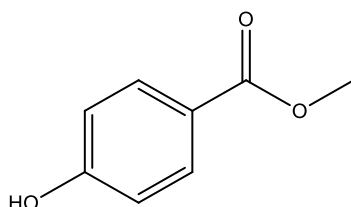


Figura 7 - Estrutura do metilparabeno

Os compostos da classe das fluorquinolonas, como a flumequina e as quinolonas, são derivadas do ácido nalidíxico e do ácido oxolínico e são alguns exemplos de agentes antimicrobianos. Especificamente, as fluorquinolonas apresentam um maior espectro de ação, ou atividade, sendo consideradas mais ativas contra patógenos aeróbios gram-negativos e de ação considerada intermediária para gram-positivos (Pacheco-Silva *et al.*, 2014). As Figuras 8 e 9 ilustram as estruturas da Flumequina e estrutura geral das quinolonas, respectivamente.

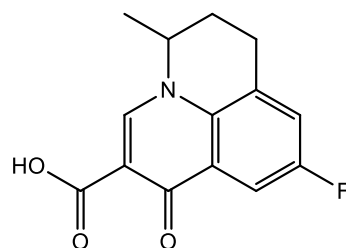


Figura 8 - Estrutura da Flumequina

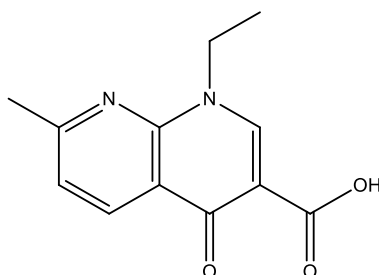


Figura 9 - Estrutura de uma quinolona (ácido nalidíxico)

Outra classe importante de ser mencionada quando se trabalha com a investigação dos PCPS são as tetraciclinas. Como exemplo, a oxitetraciclina, que são compostos orgânicos caracterizados, quimicamente, pela estrutura com quatro anéis parcialmente conjugados juntamente com o grupo funcional dos carboxiamidos. A Figura 10 ilustra um exemplo geral das tetraciclinas. Geralmente esses compostos são utilizados como antibióticos e/ou antimicrobianos para controlar infecções bacterianas.

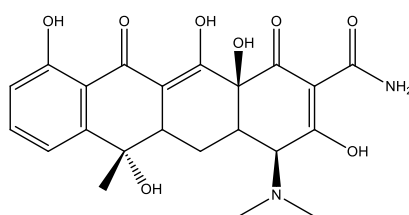


Figura 10 - Estrutura geral das tetraciclinas

As sulfonamidas são uma das classes mais importantes dentro do que abrange os PPCPs. Compostos como a sulfadiazina, sulfapiridina, sulfatiazol, assim como as quinolonas e os compostos nitrofuranos, são também alguns exemplos de agentes antimicrobianos. Especificamente, as sulfonamidas fazem parte de um grupo de medicamentos de baixo custo, utilizados no tratamento de infecções bacterianas com amplo espectro de ação (Zhang *et al.*, 2013). Esses

compostos competem com outra classe que também faz parte deste trabalho, o ácido *p*-aminobenzóico, impedindo a sua utilização pelos microorganismos na síntese do ácido fólico, considerado essencial para a síntese dos ácidos nucleicos (Pacheco-Silva *et al.*, 2014).

As sulfonamidas, as tetraciclinas, e também, mas em menor parte as quinolonas, são amplamente estudadas em matrizes como leite, ovos, mel e outras de origem animal (Agarwal 1992) por fazerem parte um grande grupo de medicamentos veterinários utilizados no combate de algumas doenças parasitárias (Xu e Li 2010).

Com relação as técnicas analíticas de preparo de amostra utilizadas para a determinação dos PPCPs em matrizes sólidas aquelas baseadas nas técnicas tradicionais como soxhlet (Bester 2003), SPE (Gómez *et al.*, 2006), UAE (Yu *et al.*, 2011) PLE (Vazquez-Roig *et al.*, 2010, Gago-Ferrero *et al.*, 2011) tem sido reportados na literatura. Entretanto, essas técnicas utilizam grande quantidade de amostra, grande volume de solventes orgânicos, tempos de extração considerados exaustivos, além de utilizarem equipamentos de elevado grau de automação, custo e uso de energia.

Vale ressaltar que um dos desafios que esse trabalho apresenta é a dificuldade de extração de um grande número de compostos com estruturas químicas complexas e diferentes funções orgânicas, como mostrado anteriormente alguns exemplos estruturais das classes que compõe os métodos desenvolvidos.

4.2 Biocidas anti-incrustantes

Não obstante aos PPCPs de modo geral, os biocidas oriundos de sistemas anti-incrustantes estão entre os compostos orgânicos amplamente estudados em todo o mundo, pois apresentam persistência ambiental e risco toxicológico à biota, uma vez que são incorporados em formulações de tintas com o intuito de evitar a bioincrustação marinha (Batista-Andrade *et al.*, 2018). Como a presença destes compostos pode apresentar efeitos adversos no meio ambiente, alguns estudos relatam sua presença em diferentes níveis de concentração, que podem chegar de 1700 até 7800 ng L⁻¹ (Diniz *et al.*, 2014).

Após o banimento mundial provocado pelo uso de tintas à base de compostos organoestânicos, a indústria naval buscou alternativas para este fim.

Surgindo assim, uma terceira geração de tintas anti-incrustantes a partir do ano de 1987, cuja composição básica contempla biocidas, denominados biocidas de reforço ou então, *booster biocides*, ou então simplesmente co-biocidas. Esta terceira geração contempla basicamente 16 novos compostos que estão homologados pela Organização Marítima Internacional (IMO, do inglês *International Maritime Organization*) e entram como uma alternativa ao uso disseminado de tintas anti-incrustantes à base de TBT (Castro *et al.*, 2011).

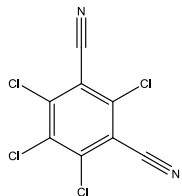
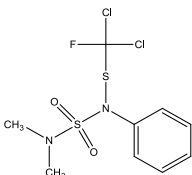
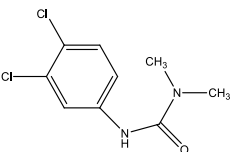
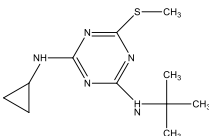
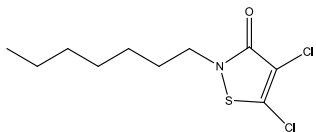
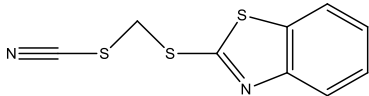
Estes novos compostos podem ainda, serem classificados (e/ou divididos) em suas classes principais. Os compostos orgânicos não metálicos (Irgarol, Diuron, Sea-Nine 211, Diclofluanida, Clorotalonil, Tiram, Busan, Densil e Trifenilborano Piridina), e os organometálicos (Cobre Piritona, Naftenato de Cobre, Zinco Piritona, Ziram e Maneb), e adicionalmente as substâncias inorgânicas (Óxido e Tiocianato de Cobre). Tais substâncias, em alguns casos, são utilizadas simultaneamente em uma mesma formulação comercial, com intuito de potencializar a ação da pintura. É o caso, por exemplo, em especial, do irgarol e diuron, dois dos compostos mais frequentemente usados e que apresentam, entretanto, efeitos tóxicos sobre microorganismos como macrófitas e comunidades de fitoplâncton, em níveis de concentração de $\mu\text{g L}^{-1}$ a ng L^{-1} (Diniz *et al.*, 2012).

Na grande maioria das tintas anti-incrustantes disponíveis no mercado mundial, esses compostos estão associados a uma matriz acrílica solúvel e visam atuar como biocidas ou potencializadores do efeito biocida gerado pelos metais que estão presentes nas formulações das tintas. Pode-se afirmar que esse tipo de associação promove taxas constantes de liberação dos biocidas ao longo do tempo, elevando assim a durabilidade dos revestimentos (Castro *et al.*, 2011). Por conta da grande utilização desses biocidas, muito embora alguns apresentem outras aplicabilidades, como o uso como agrotóxico na agricultura, após o banimento mundial dos OTs, estudos começaram a ser publicados relacionando a ampla utilização e ocorrência ambiental à áreas com intenso tráfego de embarcações.

A Tabela 1 apresenta algumas das principais propriedades físico-químicas dos biocidas de terceira geração, além de informações complementares no que diz respeito à seus modos de ação bem como seus respectivos produtos de degradação. Informações como Log K_{oc}, Log K_{ow},

tempo de meia vida e solubilidade em água são informações importantes de serem mencionadas e estudadas, pois auxiliam na exploração dos dados sobre esses compostos. Vale mencionar que compostos como o TCMTB e o clorotalonil, embora não estejam nos métodos desenvolvidos nesse trabalho, são mencionados na Tabela 1 por fazerem parte dos biocidas de 3ª geração mais estudados mundialmente.

Tabela 1 - Propriedades físico-químicas dos principais biocidas anti-incrustantes e seus produtos de degradação, nomenclatura IUPAC, classe química, estrutura, aplicação e modos de ação (Adaptado de (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2012))

	Biocida					
	Clorotalonil	Diclofluanida	Diuron	Irgarol	DCOIT	TCMTB
Nomenclatura IUPAC	2,4,5,6-Tetracloroisofталonitrila	N'-Dimetil-N-fenilsulfamida	1-(3,4-Diclorofenil)-3,3-dimetilurea	2-(Terc-butilamino)-4-ciclopropilamino)-6-(metiltio)-1,3,5-triazina	4,5-Dicloro-2- <i>n</i> -octil-3-(2 <i>H</i>)-isotiazolin-3-ona	2-(Tiocianometiltio)benzotiazol
Estrutura						
MM (g mol ⁻¹)	265,89	333,23	233,09	253,37	282,23	238,35
Classe	Cloronitrila	Sulfamida	Fenilamida	s-Triazina	Isotiazolona	Benzotiazol
Log Kow	2,64	3,7	2,85	2,38	2,85	3,3
Log Koc	N.e	3,1	2,3	3,3	4,2	2,7

	Biocida					
	Clorotalonil	Diclofluanida	Diuron	Irgarol	DCOIT	TCMTB
Solubulidade em água (a 25 °C em mg L⁻¹)	0,6 - 0,9	0,006 - 1,3	35 - 36,4	6,0 – 7,0	0,0065 – 14	10,4 – 45
t_{1/2} (em dias) na água do mar)	1,8 - 8	0,12 – 0,75	31,4 – 365	24 – 365	0,004 – 3	31 - 36
t_{1/2} (em dias) no sedimento	N.e	1,4	14	100 – 265	1,5	2,7
N° CAS	1897-45-6	1085-98-9	330-54-1	28159-98-0	64359-81-5	21564-17-0
Aplicação	Fungicida	Fungicida	Herbicida	Herbicida	Herbicida	Fungicida
Modo de ação	Inibidor do transporte de elétrons mitocondriais	Inibidor do transporte de elétrons	Inibidor do transporte de elétrons	Inibidor do transporte de elétrons	Inibidor do transporte de elétrons	Inibidor do transporte de elétrons mitocondriais

Biocida						
	Clorotalonil	Diclofluanida	Diuron	Irgarol	DCOIT	TCMTB
Principais produtos de degradação	Benzamida; Cloro-1,3-dicianobenzeno; Dicloro-1,3-dicianobenzeno; Tricloro-1,3-dicoanobenzeno 4-hodroxoclorotalonil; 2,5,6-tricloro-4-metoxiisoftalonitrila 2,4,5-tricloroisoftalonitrila Isoftalonitrila	N,N-dimetil-N'-fenil-sulfamida (DMSA) Ndiclorofluormetiltion-anilina; Anilina; Diclorofluormetano	1-(3-clorofenil)-3,1-dimetilurea (CPDU); 1-(3,4-diclorofenil)-3-metilurea (DCPMU); 1-(3,4-diclorofenil)urea (DCPU); 3,4-dicloroanalina (3,4-DCA); N-(3-clorofenil)-N-metilurea (mCPMU)	2-metiltio-4-tert-butilamino-6-amino-s-triazina (M1); 3-[4-tert-butilamino-6-metiltiol-s-triazin-2-ylamino]-propionaldeído (M2); N,N'-di-tert-butil-6-metiltiol-s-triazini-2,4-diamina (M3)	N-(n-octil) ácido malonamico; N-(n-octil) nidroxiopropionamida; N-(n-octil) acetamida; N-(n-octil) ácido oxâmico; N-(n-octil) ácido carbâmico	2-mercaptobenzotiazol (MBT); Benzotiazol (BT); 2-(metiltio)benzotiazol (MTBT)
*MM – Massa molecular; Log Kow – coeficiente de partição octanol-água; Log Koc – coeficiente de partição de carbono orgânico no solo; N.e - não encontrado; t _{1/2} - tempo de meia vida; N° CAS – Número de registro						

Assim como para os OTs, as diferenças nas propriedades físico-químicas dos co-biocidas podem ser determinantes em relação ao seu comportamento, mobilidade e transporte no meio ambiente. Entre as propriedades citadas na Tabela 1, tempo de meia vida no sedimento e na coluna d'água, solubilidade, coeficiente de partição octanol-água (Log Kow), coeficiente de partição carbono orgânico-solo (Log Koc) são fundamentais para prever o destino e transporte desses compostos no meio ambiente. Nesse contexto, é importante estimar o grau de mobilidade do composto no ambiente, ou seja, se há tendência do mesmo em se adsorver na matéria orgânica do sedimento ($\text{Log Koc} > 3$), bioconcentrar nos tecidos de organismos ($\text{Log Kow} > 3$) ou então se são facilmente carregados pela coluna d'água (alta solubilidade) (Abreu 2016).

Em relação a degradação dos biocidas, há diversos estudos na literatura que afirmam que estes compostos orgânicos podem gerar produtos de transformação, degradação e/ou metabólitos por diferentes vias possíveis de degradação. Há estudos que investigaram a degradação dos mesmos por vias de fotodegradação, hidrólise, degradação por microrganismos, biodegradação e outras. Esses estudos se diferem de acordo com a seleção dos analitos, a via de degradação escolhida bem como o tempo de monitoramento dos produtos gerados. Dentre as principais considerações desses estudos, alguns autores disponibilizam os mecanismos que geram os principais subprodutos, entretanto, muito embora se tenha conhecimento das vias de degradação, ainda são poucas as informações a respeito da toxicidade e dos problemas ambientais ocasionados pelos produtos de degradação que podem ser gerados.

O diuron é um composto com nome químico (3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea) pertencente ao grupo das feniluréias. Este composto orgânico não iônico não é utilizado somente e exclusivamente no sistema anti-incrustante, ele é também um herbicida amplamente utilizado em larga escala agrícola desde 1950 em diversas culturas agrícolas, mas principalmente no combate à ervas daninhas (Callow e Willingham 1996, Yebra *et al.*, 2004). O composto orgânico apresenta moderada solubilidade em água e Log Kow de 2,85, sendo considerado estável à oxidação e atuante no bloqueio da transferência de elétrons durante o processo da fotossíntese de diversas espécies. Seu uso como composto anti-incrustante se deu a partir de 1980, onde pequenas embarcações

(principalmente no Reino Unido) observaram sua eficiência diante de espécies de fitoplâncton e macroalgas (Readman 2006).

A taxa de hidrólise do diuron em pH neutro é considerada insignificante, mas pode aumentar frente a circunstâncias ácidas ou básicas. Estudos laboratoriais demonstraram que seu tempo de meia vida no ambiente aquático encontra-se entre 14 e 27 dias (Castro *et al.*, 2011). Adicionalmente, esse composto apresenta baixa adsorção no sedimento, particionando preferencialmente na fase aquosa da coluna d'água (Voulvoulis *et al.*, 2002). Essa afirmação pode ser feita com base em estudos realizados na mesma zona de amostragem, onde foram observadas concentrações mais elevadas na água em comparação à baixas concentrações encontradas no sedimento (Thomas *et al.*, 2000, Lamoree *et al.*, 2002). Adicionalmente, concentrações mais elevadas na água do mar do que quando comparadas às em água doce indicam que muito embora o composto possa ser usado com outros fins, a sua principal fonte está diretamente relacionada à utilização como agente anti-incrustante (Thomas *et al.*, 2000).

Em estudos de testes de toxicidade, o diuron apresentou toxicidade extremamente elevada para organismos do tipo fitoplâncton, em contrapartida apresentou baixa toxicidade para diversas espécies de invertebrados. Diante desses estudos, pode-se afirmar que o diuron compila com o fato de ter sido inicialmente desenvolvido para combate à ervas daninhas, tendo seu principal mecanismo de atuação associado à inibição da fotossíntese nos organismos considerados autotróficos (Castro *et al.*, 2011). Enquanto como metabólito, o diuron é absorvido pelos sistemas gastrointestinal e também pelo sistema respiratório. Em humanos, é metabolizado em horas por possíveis vias de hidroxilação e *n*-desalquilação, sendo então excretado pela urina. Em ratos e cães, estudos afirmam que cerca de metade da eliminação total do composto acontece pelas fezes. Adicionalmente, após a ingestão de diuron de nove meses a dois anos por ratos e cães, pouco armazenamento foi observado em qualquer tecido com os maiores níveis observados no fígado e rim (Hodge *et al.*, 1967).

Os produtos de degradação do diuron podem ser gerados por vias de degradação aeróbica, dando origem ao DCPMU, DCPU e principalmente o 3,4-DCA (ou somente DCA). Adicionalmente, a transformação do diuron pode ocorrer também por vias anaeróbicas, onde o CPDU também pode ser formado.

A degradação do diuron por fotodegradação também pode dar origem a esses mesmos produtos de degradação mencionados, entretanto de acordo com o comprimento de onda incidente podem ocorrer alterações na proporção dos produtos que podem ser gerados (Giacomazzi e Cochet 2004, Thomas 2009, Mestankova *et al.*, 2011).

Em estudos anteriores e preliminares, afim de estudar a degradação anaeróbica do diuron, Attaway *et al.*, (1982) investigaram a degradação do herbicida em diferentes meios em amostras de sedimento coletados em uma lagoa da região, onde todas as culturas investigadas degradaram completamente o diuron entre 17 e 25 dias de investigação. Os autores mencionaram o 3-(3-clorofenil)-1,1-dimetilurea como principal produto observado. Adicionalmente, nenhum outro produto foi detectado após 80 dias em cultura e o derivado metacoloro não foi mais degradado durante esse período (Attaway *et al.*, 1982).

Estudos mais recentes afirmam que o processo de degradação do diuron ocorre lentamente, principalmente na água. Como exemplo, Thomas *et al.* (2003) observaram que apenas 1% do diuron foi degradado depois de 42 dias presente na água do mar. Já outros autores estudaram a alta persistência desse composto no meio ambiente, onde os mesmos sugeriram um tempo de meia vida de até 1 ano em água. Enquanto isso, estudo realizado em amostras de sedimento, demonstrou a persistência do diuron uma vez que não foi observada degradação em um tempo de 14 dias de teste (Thomas *et al.*, 2003).

Muito embora o diuron apresente mais de uma possibilidade de geração de produto de transformação, alguns autores afirmam que seu principal produto de biodegradação, o 3,4-DCA, que apresenta maior toxicidade e também apresenta alta persistência em compartimentos ambientais como em solo, água e águas subterrâneas (Giacomazzi e Cochet 2004). De maneira geral, esses produtos de degradação que são gerados são mais instáveis e hidrofílicos que o próprio diuron e, muito embora sejam compostos químicos com menor persistência ambiental, também foram detectados em amostras de água e sedimento por diferentes autores (Thomas *et al.*, 2002, Gatidou *et al.*, 2007).

Resumidamente, os métodos analíticos de preparo de amostra e determinação cromatográfica utilizadas para determinação do diuron, bem como dos seus produtos de degradação e do restante dos biocidas citados nesse

trabalho, estão exemplificados na Tabela 8. Entretanto, é possível afirmar que de maneira geral, os métodos mais utilizados são aqueles baseados em técnicas tradicionais baseadas em extrações com solventes, na maioria solventes tóxicos, que demandam grande quantidade de reagentes, energia e tempo de extração. Já as determinações cromatográficas são baseadas na cromatografia líquida e cromatografia gasosa, onde diferem principalmente o tipo de detector utilizado bem como a otimização da parte cromatográfica.

Assim como o diuron, outro biocida amplamente estudado em diversas partes do mundo é o irgarol 1051. Comumente chamado apenas de irgarol, seu nome comercial é (2-metiltio-4-terc-butilamino-6-ciclopropilamino-s-triazina). Esse composto pertence ao grupo químico das triazinas e além de ser conhecido por sua eficiência como herbicida, foi registrado para uso como sistema anti-incrustante por vários anos, recebendo aprovação da EPA para uso nos EUA em 1995 sendo, mais tarde, registrado no ano de 1998 no mesmo país (Callow e Willingham 1996). Desde então, seu uso vem aumentando significativamente, e atualmente, o irgarol é um dos biocidas mais empregados em pinturas anti-incrustantes devido à elevada eficiência no combate à incrustação marinha. Em menor extensão, posterior à ele destacam-se o diuron, Sea-Nine 211, Zinco Piritiona e Zineb (Diniz *et al.*, 2012).

Dentre todos os biocidas de terceira geração, o irgarol é o composto orgânicos que apresenta o maior tempo de meia vida, podendo chegar até 250 dias nas partículas de sedimento e até 1 ano na coluna d'água (Hall Jr *et al.*, 1999, Thomas *et al.*, 2000). O biocida apresenta moderada solubilidade em água e baixa taxa de degradação nesse compartimento. Entretanto, a alta tendência de permanência do composto tanto na água quanto no sedimento é relacionada com a menor susceptibilidade à degradação de microorganismos (Sapozhnikova *et al.*, 2013) ainda que apresente solubilidade relativamente baixa, o particionamento preferencial do irgarol é pela fase dissolvida, mas também associado com o material particulado em suspensão (Konstantinou e Albanis 2004).

Em estudos de toxicidade, o irgarol demonstrou ter alta atividade contra algas (Callow e Willingham 1996), tendo um efeito mais pronunciado para diferentes organismos fitoplactônicos. Em relação à esses estudos de toxicidade, geralmente, são utilizados alguns termos mais específicos para identificar a

relação entre o efeito de uma substância e a dose na qual ela ocorre. Essas informações são obtidas a partir de estudos toxicológicos de tais substâncias em organismos testes. Como exemplo, a Tabela 2 apresenta alguns estudos realizados frente a toxicidade desse composto em espécies aquáticas.

Tabela 2 - Ecotoxicidade do irgarol frente à água e algumas espécies aquáticas

Organismo teste	Efeito tóxico	Concentração		Tempo	Referência
Águas e plantas aquáticas	<i>Enteromorfa intestinalis</i>	CE ₅₀	2,5 µg L ⁻¹	72 h	(Scarlett <i>et al.</i> , 1997)
	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> (<i>Selenastrum capricornuntum</i>)	CEb ₅₀	1,6 µg L ⁻¹	72 h	(Okamura <i>et al.</i> , 2000)
	<i>Lactuca sativa</i>	CEr ₅₀	> 50 µg L ⁻¹	5 dias	(Okamura <i>et al.</i> , 2000)
	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> (<i>Selenastrum capricornuntum</i>)	CE ₅₀	10,8 µg L ⁻¹	72 h	(Fernández-Alba <i>et al.</i> , 2002)
	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> (<i>Selenastrum capricornuntum</i>)	CE ₅₀	10 µg L ⁻¹	72 h	(Mezcua <i>et al.</i> , 2002)
	<i>Dunaliella tertiolecta</i>	CE ₅₀	1,1 µg L ⁻¹	96 h	(Gatidou <i>et al.</i> , 2007)
	<i>Navicula forcipata</i>	CE ₅₀	0,6 µg L ⁻¹	96 h	(Gatidou <i>et al.</i> , 2007)
	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	CE ₅₀	0,41 µg L ⁻¹	96 h	(Zhang <i>et al.</i> , 2008)

*CE₅₀ - Concentração que apresenta algum efeito no organismo nesse tempo

**CEr₅₀ - concentração na qual é observada uma inibição de 50% da taxa de crescimento

***CEb₅₀ - concentração na qual é observada uma redução de 50% da taxa de crescimento

De acordo com estudos anteriores que investigaram a presença do irgarol e de seus produtos de degradação, o biocida aparentemente permanece intacto por um período de até 36 dias em amostras de água, apresentando maior tendência em se particionar em amostras de sedimento. Entretanto, após esse período, o irgarol pode sofrer processo de biodegradação, fotodegradação ou ainda hidrólise química, resultando na *n*-desalquilação da molécula original, formando como produto de degradação o M1, M2 e M3 (Okamura et al., 2000, Okamura e Sugiyama 2004). O mecanismo de degradação do irgarol foi proposto por Sakkas et al. (2002), sendo a via de degradação predominante em água a ruptura e desmetilação do anel ciclopropil na estrutura original da molécula, o

que pode acontecer por ação microbiana (principalmente por fungos). Em estudos anteriores, Sakkas *et al.*, (2002) estudaram a fotodegradação do irgarol em amostras de água de mar, rio e lago sob condições naturais, simulando a irradiação solar nas amostras de água. Segundo os autores, a incidência de raios solares pode dar origem ao principal produto de degradação, o M1 (2-metiltiltio-4-tertbutilamino-6-amino-s-triazina) (Sakkas *et al.*, 2002, Zhang *et al.*, 2008). Alguns estudos da literatura afirmam que o M1 é o produto de degradação formado preferencialmente durante a degradação do irgarol em um tempo de meia vida de 82 dias na água do mar em um baixo valor de Koc. Essa observação corrobora com estudos que observaram maiores concentrações de M1 na coluna d'água e não em amostras de sedimento (Thomas *et al.*, 2002, Okamura *et al.*, 2003, Lam *et al.*, 2005, Gatidou *et al.*, 2007).

A Tabela 3, apresenta alguns dos estudos realizados em diferentes partes do mundo, onde pode-se notar que tanto o irgarol como o seu principal produto de degradação, o M1, tem sido amplamente estudado e foram detectados em diferentes compartimentos ambientais, em concentrações de até 4000 ng L⁻¹. Assim como o uso difundido do diuron, a grande presença do irgarol em amostras de água do mar pode ser atrelada a áreas onde é observado grande fluxo de embarcações, principalmente marinas e portos onde circulam embarcações de grande porte.

Tabela 3 - Concentrações de Irgarol e M1 detectadas em amostras de água de diversos ambientes costeiros

Local	Concentração detectada (µg L ⁻¹)	Referência
Barcelona, Espanha	0,007 – 0,3	(Ferrer <i>et al.</i> , 1997)
Côte d'Azur, França	0,1 – 1,7	(Readman <i>et al.</i> , 1993)
Delta do Ebro, Espanha	0,015 – 0,3	(Ferrer e Barceló 1999)
Tarragona, Espanha	0,05	(Pocurull <i>et al.</i> , 2000)
Reino Unido	1,4	(Thomas <i>et al.</i> , 2001)
Cingapura	3,2 – 4,0	(Basheer <i>et al.</i> , 2002)
Andaluzia, Espanha	0,05 – 1,0	(Mezcua <i>et al.</i> , 2002)

Local	Concentração detectada ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Referência
Epirus, Grécia	0,02 – 0,03	(Lambropoulou <i>et al.</i> , 2002)
Duch, Holanda	0,008 – 0,09	(Lamoree <i>et al.</i> , 2002)
Grécia	0,01 – 0,09	(Sakkas <i>et al.</i> , 2002)
Japão	0,26	(Okamura <i>et al.</i> , 2003)
Florida, USA	0,001 – 0,182	(Gardinali <i>et al.</i> , 2004)
Honk Kong	0,006 – 0,1	(YUN e HAO 2009)
Grécia	0,04 – 0,12	(Gatidou <i>et al.</i> , 2005)
Nápoles, Itália	0,003 – 0,029	(Di Landa <i>et al.</i> , 2006)
Hawaii	0,048	(Knutson <i>et al.</i> , 2006)
São Luiz do Maranhão, Brasil	3,81 ng mL ⁻¹	(DINIZ 2017)
Panamá	0,3 ng L ⁻¹	(Batista-Andrade <i>et al.</i> , 2016)
Rio Paraíba do Sul, Brasil	0,138	(Azevedo <i>et al.</i> , 2004)

Em estudos seguintes à determinação do M1, Lam *et al.*, (2005) estudaram a degradação do outro produto de degradação do irgarol, o 3-[4-tert-butilamino-6-metiltiol-s-triazina-2-amino]propionaldeído (M2). Os autores afirmaram que a ocorrência de tal produto de degradação em águas naturais não foi prevista nem pela mesma via de degradação do M1, ou seja, pela desalquilação do anel *n*-ciclopropil. Isso indica que o destino ambiental de irgarol no meio aquático é mais complicado do que o esperado (Lam *et al.*, 2005). Sendo assim, tendo em vista dessa nova descoberta, considera-se necessário continuar investigando a degradação do irgarol em diferentes tipos de águas, principalmente as naturais. Por conta disso, posteriormente, nossos estudos foram realizados acerca da investigação dos possíveis produtos gerados na degradação do irgarol. Lam *et al.*, (2009) prosseguiram os estudos de degradação do composto orgânico em água do mar. Os autores realizaram testes de fotodegradação, enfatizando na cinética da formação dos possíveis produtos de degradação. Nesse estudo, os autores concluíram que o M1 aparece quase imediatamente após a fotólise. Em contrapartida, o M2 só foi observado após um longo período de indução. Sendo assim, embora o M2 possa

ser facilmente decomposto em M1 (Lam et al., 2004), a geração de M1 e M2 a partir da degradação de irgarol parece seguir caminhos separados. Isso sugere a ideia original de que M2 é o intermediário direto na fotodegradação do irgarol a M1 (Lam et al., 2009). Adicionalmente, os autores enfatizam a importância do uso da alta resolução da espectrometria de massa para elucidação da estrutura química dos produtos investigados. Os autores designaram uma nova via de degradação, gerando como produto o M4 e afirmaram, ainda, que é provável que M4 seja um intermediário de M2. Entretanto, como considerações desse trabalho, os autores sugerem que novos estudos sejam realizados a respeito dos produtos de degradação que são e podem ser gerados através da molécula original, tendo em vista as diferentes possíveis vias para isso. Além do mais, como complemento, estudos de toxicidade ambiental também são sugeridos para que seja possível obter tantas informações a respeito da toxicidade ambiental desses compostos como se tem disponível para os principais biocidas até então mundialmente estudados.

Peñela et al., (2000) realizaram um estudo de fotodegradação do irgarol com o intuito de investigar seus possíveis produtos de degradação em diferentes matrizes ambientais e sob diferentes condições. Os autores estudaram a fotodegradação em água destilada, água do lençol freático e amostras de água do mar e utilizaram SPE com cartuchos de C18 para pré-concentração das amostras. Os autores observaram quatro subprodutos do irgarol com pesos moleculares diferentes através dos estudos de fotodegradação. Adicionalmente, os autores observaram 98% de degradação do irgarol nas amostras de água do mar, após 217 horas de irradiação solar, sendo o principal produto formado o M1 (Peñela et al., 2000). Adicionalmente, os autores sugeriram que novos estudos a respeito da determinação e estudos de toxicidade ambiental devem ser realizados para elucidar uma total informação a respeito não só dos biocidas, como também dos seus principais produtos de degradação em matrizes complexas, além de água, solos, sedimento e biota.

Juntamente com o diuron, o irgarol é um dos biocidas mais utilizados e investigados em compartimentos ambientais. Sua persistência possibilita a biomagnificação e a formação de metabólitos tóxicos para diferentes espécies de invertebrados. Entretanto, ainda são necessários estudos a respeito do

comportamento e destino ambiental tanto do irgarol bem como seus respectivos produtos de degradação.

Outro biocida importante a ser mencionado é o Sea-Nine 211. Esse composto é uma mistura comercial que possui 30% do princípio ativo 4,5-Dicloro-2-*n*-octil-4-isotiazolin-3-ona e geralmente é simplesmente chamado de DCOIT (Castro *et al.*, 2011). O DCOIT pertence ao grupo dos isotiazóis e foi sintetizado pela primeira vez pela empresa americana *Rohm and Haas* nos EUA (EUA, 1992). Diferentemente de outros compostos como diuron e irgarol, a utilização do DCOIT está atrelada especificamente à utilização como agente biocida do sistema anti-incrustante, e por conta disso, sua ocorrência ambiental está sempre relacionada às áreas de terminais portuários e marinas de navegação. Esse composto orgânico apresenta atividade comprovada contra uma ampla gama de bactérias, fungos, algas e invertebrados (Callow e Willingham 1996).

O DCOIT foi um dos primeiros compostos anti-incrustantes registrados pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US-EPA) em 1994, tendo recebido o selo verde dessa mesma agência em 1996, devido a sua rápida degradação (degradabilidade na água do mar com tempo de meia vida de aproximadamente 1 hora) e baixo fator de bioacumulação (Log K_{oc} de 4,2 particionamento preferencial nos sedimentos) (Callow e Willingham 1996) (EPA, 2016).

Alguns estudos realizados anteriormente afirmam que o DCOIT forma complexos extremamente estáveis com as partículas de sedimentos, tornando-se, assim, pouco biodisponível e, conseqüentemente, apresentando um baixo fator de bioacumulação para organismos aquáticos (Castro *et al.*, 2011).

A degradação do DCOIT pode acontecer através de vias aeróbicas ou anaeróbicas. No entanto, a ação de microorganismos nos sedimentos e na água do mar representa a principal via de transformação, podendo ser até 200 vezes mais rápida que as possíveis vias de degradação por fotólise ou hidrólise. De maneira geral, na degradação do composto original, a porção cíclica da molécula é oxidada e quebrada, o que reduz a toxicidade de seus respectivos produtos (em uma ordem de grandeza de 4 a 5 vezes) formando espécies alquiladas como o ácido *n*-octil oxâmico; 4,5-diclorotiazol e o ácido *n*-octil carbâmico (Thomas 2009).

Recentes estudos demonstraram que em pH extremos (muito ácido ou muito básico), temperaturas baixas e proteção da luz tendem a diminuir a permanência desse biocida nos compartimentos ambientais (Chen *et al.*, 2015). Já em estudos de toxicidade, o DCOIT apresenta elevada atividade antimicrobiana, sobretudo frente a bactérias, fungos e algas. Diferentemente do que foi comprovado para diuron e irgarol, seus níveis de toxicidade para espécies de fitoplâncton e zooplâncton são muito parecidos. Devido à alta degradabilidade e baixo fator de bioacumulação, o DCOIT vem sendo o biocida que apresenta menores danos ambientais, quando em comparação aos anteriormente já citados.

A diclofluanida (N,N-Dimetil-N-fenil-N-(diclorofluorometiltio)sulfamida) é um composto orgânico pertencente ao grupo dos organoclorados. Esse composto apresenta baixa solubilidade em água, e de acordo com suas principais propriedades físico-químicas, apresenta uma grande tendência de afinidade pelo material particulado dos compartimentos ambientais. Em relação à estudos toxicológicos realizados anteriormente frente à diferentes espécies, foi comprovado que a diclofluanida apresenta efeitos carcinogênicos e mutagênicos, além disso, esse composto possui uma toxicidade mais elevada sobre organismos unicelulares, os quais apresentam ciclo de vida mais rápido (Castro *et al.*, 2011).

Em ambientes aquáticos com pH em torno de 8, a diclofluanida apresenta maior tendência a adsorver ao material particulado e aos sedimentos. Além do mais, esse composto mostra uma rápida taxa de degradação em água, apresentando uma meia vida de poucas horas nessa matriz. Ao se degradar, diclofluanida origina a N,N-Dimetilaminossulfanilida (DMSA), sendo que os principais fatores envolvidos são a concentração de matéria orgânica, o pH do meio, a atividade microbiana e a incidência de luz. Este biocida é também suscetível à degradação anaeróbica em sedimento, o que representa uma forma significativa de sua remoção do ambiente (Castro *et al.*, 2011).

O TCMTB, ou 2-(tiocianometiltio)benzotiazol, é um composto orgânico pertencente ao grupo dos triazóis. Esse composto foi inicialmente formulado para ser utilizado como herbicida na agricultura e fungicida na indústria da madeira, bem como na de papéis e sementes. Posterior à isso teve ação moluscicida reconhecida, passando a ser utilizado como princípio ativo em

diferentes formulações no sistema de tintas anti-incrustantes (Hanssen e Henderson 1991).

Dentre as propriedades físico-químicas do TCMTB, algumas indicam que o mesmo pode se particionar preferencialmente na coluna d'água devido a moderada solubilidade que o composto apresenta. O Log Koc do TCMTB (2,7) não indica um forte particionamento no sedimento, principalmente quando há presença de matéria orgânica. Já o Log Kow também indica tendência de bioacumulação em organismos, muito embora não existam menções a ocorrência desses compostos em amostra de biota (Hanssen e Henderson 1991).

Dentre as principais vias de degradação dos biocidas, a degradação do TCMTB pode ocorrer via fotólise ou hidrólise, gerando a formação de compostos hidroxilados ou metilados. No entanto seus principais produtos de degradação (MBT e BT) já foram encontrados em diferentes compartimentos ambientais, inclusive em estação de tratamento de efluentes. Entretanto, a formação desses subprodutos, sobretudo o MBT, é especialmente importante para estudos em relação à toxicidade ambiental do TCMTB (Castro *et al.*, 2011).

Em estudos experimentais, a degradação desse biocida associada à fotólise que ocorre na coluna d'água é considerada mais eficiente, tendo sido encontrados em estudos anteriores, tempos de meia vida de até 1 dia. Já em sedimentos, a hidrólise e a ação microbiana podem chegar até 81 horas dependendo das condições do meio ambiente em que se encontram. Vale ressaltar, ainda, que a transformação desse biocida é similar à dos outros compostos e depende, ainda, da influência direta do pH, salinidade da água, força iônica do meio em que se encontra, radiação solar, além da concentração da matéria orgânica (Hanssen e Henderson 1991, van Wezel e Van Vlaardingen 2004)

Em comparação aos outros biocidas tradicionalmente estudados e detectados, como diuron e irgarol, poucos estudos enfatizam na determinação do TCMTB bem como seus produtos de degradação. Sendo assim, são poucas as informações a respeito da toxicidade desses compostos.

De maneira geral, em função da ampla utilização dos biocidas a nível mundial, o desenvolvimento de métodos analíticos que permitam detecção e quantificação dos compostos em ambientes marinhos, bem como em outros

compartimentos ambientais, é considerado de suma importância (Diniz *et al.*, 2012). Não tendo ainda, a informação de um método considerado padrão e/ou oficial para a determinação desses compostos em matrizes ambientais.

Depois do decreto da Comunidade Europeia em 1989, restringindo o uso de TBT e com a criação de uma nova classe de tintas anti-incrustantes baseadas na utilização dos denominados *booster biocides*, uma nova legislação restringindo o uso de algum destes compostos entrou em vigor. A Tabela 4 apresenta alguns dos países e suas legislações para os principais biocidas de estudo.

Tabela 4 - Legislação de alguns países para os biocidas (Crommentuijn *et al.*, 2000)

País	Diuron	Irgarol	Diclofluanida	DCOIT	TCMTB
Reino Unido	Proibido	Proibido	Permitido	Proibido	Proibido
França	Permitido	Permitido	Permitido	N.e	N.e
Grécia	Permitido	Permitido	Permitido	N.e	N.e
Espanha	Permitido	Permitido	Permitido	N.e	N.e
Suécia	N.e	Proibido	N.e	N.e	N.e
Dinamarca	Proibido	Proibido	N.e	Permitido	N.e
Holanda	Proibido	Proibido	N.e	N.e	N.e

*N.e – não encontrado

Uma das principais legislações utilizada como referência a nível mundial é a proposta pelas autoridades holandesas, que é baseada nos limites de risco nos compartimentos ambientais. A Tabela 5 apresenta informações sobre as concentrações máximas permitidas (MPC, do inglês, *Maximum Permissible Concentration*) de biocidas que são permitidas para compartimentos ambientais como água (van Wezel e Van Vlaardingen 2004) e a Tabela 6 mais algumas informações para sedimento.

Tabela 5 - Concentração máxima permitida estabelecida pelas autoridades holandesas (Crommentuijn *et al.*, 2000)

Biocida	MPC para água (ng L⁻¹)
Diuron	430
Irgarol	24
TCMTB	380

Tabela 6 - Limites máximos para alguns biocidas anti-incrustantes estabelecidos por países da União Europeia em sedimentos (Cresswell *et al.*, 2006)

Biocida	Reino Unido (EQS) ^a	Holanda (MPC) ^b	Noruega (EQC) ^c
Água do mar (ng L⁻¹)			
Irgarol	24	24	250
Diuron	100	430	3600
TCMTB	n.e	380	N.e
Sedimentos marinhos (ng g⁻¹)			
Irgarol 1051	N.e	1,4	2,5
Diuron	N.e	9,0	13

*N.e – não estabelecido

^a Padrões de qualidade ambiental (EQS, do inglês *Environmental quality standard*)

^b Concentração máxima permissível (MPC, do inglês *Maximum permissible concentration*)

^c Classificação de qualidade ambiental (EQC, do inglês *Environmental quality classification*)

4.3 Cromatografia líquida acoplada à Espectrometria de Massas

As técnicas cromatográficas de análise estão entre as principais técnicas de separação, especialmente na análise de substâncias presentes em matrizes complexas, tais como águas, produtos naturais, sedimentos, biota e outras. Isto se deve, principalmente, à sua capacidade de separação dos componentes presentes nas misturas em função da eficiência e do poder de resolução das colunas modernas (COLLINS *et al.*, 2006).

Desenvolvida há mais de um século, a Cromatografia Líquida é uma técnica analítica de separação de compostos muito bem estabelecida, podendo identificar e quantificar muitos compostos em uma só amostra. A grande aplicabilidade da técnica é atribuída a sua sensibilidade, capacidade de quantificação e de separação de moléculas não voláteis e termicamente frágeis, que constituem 80% dos compostos sintéticos naturais. Com inúmeras aplicações em vários campos da ciência e da análise química, é usada para a análise de uma enorme faixa de compostos orgânicos, desde pequenas moléculas como metabólitos e peptídeos, até moléculas grandes como as frágeis biomoléculas, por exemplo, as proteínas (Alba 2004).

O Espectrômetro de Massas é um dos detectores mais utilizados na Cromatografia Líquida, uma vez que é capaz de prover informação sobre a

composição qualitativa e quantitativa de compostos orgânicos em misturas complexas; as estruturas de uma grande variedade de espécies moleculares, assim como a razão isotópica de átomos em amostras (Skoog *et al.*, 2017). As maiores vantagens em relação a outros detectores é o fato de ser altamente seletivo para o constituinte de interesse, podendo a separação cromatográfica não ser completa; permitir análises de substâncias não voláteis, o que não é possível na Cromatografia Gasosa sem a etapa de derivatização (COLLINS *et al.*, 2006), e melhor razão sinal/ruído, consequentemente melhor limite de quantificação (HARRIS, 2001).

O sistema básico de um espectrômetro de massas é composto por sistema de injeção da amostra, fonte de ionização, analisador/separador de massas, detector e sistema de aquisição de dados. Em cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS, do inglês *liquid chromatography coupled to mass spectrometry*) a amostra é inicialmente separada e depois detectada, o espectrômetro de massas faz isso produzindo partículas carregadas a partir dos analitos da amostra, e usando campos elétricos e/ou magnéticos para separar as partículas carregadas de acordo com sua relação massa/carga (m/z) (HARRIS 2001).

Na tentativa de minimizar os problemas encontrados no interfaceamento do sistema LC com MS foram desenvolvidas várias interfaces, nas quais, muitas vezes, também é realizada a ionização do analito por métodos que permitem a obtenção de íons a partir de moléculas sensíveis à temperatura e/ou pouco voláteis (ARDREY, 2003; CHIARADIA *et al.*, 2008). Por esse motivo muitos autores referem-se a algumas dessas interfaces simplesmente como fontes de ionização. As formas de ionização mais utilizadas no momento no acoplamento LC-MS, as quais operam à pressão atmosférica são: Electrospray (ESI, do inglês *Electrospray Ionization*), Ionização Química à Pressão Atmosférica (APCI, do inglês *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) e Ionização por Fótons à Pressão Atmosférica (APPI, do inglês *Atmospheric Pressure Photon Ionization*). Dentre estas, o Electrospray é, de longe, a forma de ionização mais empregada no acoplamento LC-MS, seguida da APCI. A ionização por fótons, APPI é mais recente, sendo a terceira forma de ionização mais empregada nesta técnica (COLLINS *et al.*, 2006).

De forma geral, a ESI permite a criação de íons na pressão atmosférica ao invés de vácuo. Neste processo, a amostra é dissolvida em um solvente, e pressurizada em um tubo capilar feito de aço inox, ao qual é aplicada uma voltagem tipicamente entre 3.000 e 5.000 V. Como resultado, o líquido emerge do capilar à pressão atmosférica, na forma de um aerosol. As gotículas formadas são dessolvatadas e os íons fluem para o espectrômetro de massas induzidos pelos efeitos da atração eletrostática e pelo vácuo (LANÇAS 2009). Adicionalmente, o uso da ESI é preferível para a análise de compostos bastante polares ou iônicos, termolábeis, ou com massa molecular elevada. Compostos não polares ou de polaridade muito baixa tendem a apresentar melhor ionização empregando-se APPI, enquanto que os pouco polares e de polaridade intermediária geralmente dão bons resultados com APCI.

O eluente da coluna cromatográfica, após ser ionizado, é direcionado para o analisador de massas, os quais separam os íons de acordo com a razão m/z . As características de construção e operação diferem de um analisador para outro, assim como seus benefícios e limitações. Uma vez que existe hoje uma grande diversidade de analisadores de massas, a escolha do mais apropriado deve ser efetuada considerando-se a aplicação (como faixa de massas desejada), desempenho (como capacidade de resolução) e custo (em função do tipo de analisador, um MS para o acoplamento LC-MS pode variar desde algumas dezenas de milhares de dólares, até valores superiores a um milhão de dólares). Em função destes fatores, não existe um analisador de massas o qual seja ideal para todas as aplicações. Cada um deles possui diferentes características, resoluções e preço. Sendo que o usuário deve analisar com cuidado, cada um deles antes de decidir qual usar para aplicação (LANÇAS 2009). Existem diferentes tipos de analisadores de massas, sendo os mais utilizados para detecção o triplo quadrupolo (QqQ), o modo sequencial (massas em série, MS/MS, ou tandem), por tempo de voo (TOF, do inglês *Time-of-Flight*) e o de armadilha de íons (IT, do inglês *ion trap*).

De maneira geral, o quadrupolo é o analisador de massas mais popular no momento devido, principalmente, à sua simplicidade, preço relativamente baixo, boa linearidade em análises quantitativas, além da facilidade de ser entendido e operado. Os analisadores de massas quadrupolo usam quatro eletrodos (barras) em forma de bastão paralelos organizados em um quadrado

para gerar campos elétricos que filtram os íons com base em sua m/z enquanto se deslocam pelos eletrodos. Em determinadas magnitudes e frequências, apenas íons com a massa selecionada atingem o detector. Alterando os campos elétricos, as massas de todos os íons podem ser varridas sequencialmente, de baixa para alta ou vice-versa, gerando um espectro de massas. Um íon de massa específica com determinada m/z será estável, e pode passar pelo quadrupolo somente quando uma combinação específica de corrente contínua e rádio frequência é aplicada. Os quadrupolos são, portanto, chamados de filtros de massas (SKOOG & LEARY, 1992).

O Monitoramento de Reações Seleccionadas (SRM, do inglês *Selected Reaction Monitoring*) é o modo mais comum de utilizar em triplo quadrupolo (QqQ) para análises quantitativas, permitindo maior sensibilidade e seletividade. O primeiro quadrupolo filtra um íon precursor específico de interesse, íons gerados na fonte são selecionados para produzir um íon produto por colisão através do processo chamado de colisão de dissociação induzida (CID). Os íons produtos gerados são transferidos ao terceiro quadrupolo, onde apenas uma m/z específica passa. Todos os outros são filtrados no terceiro. O espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo, é formado pela junção de três quadrupolos em sequência, onde no primeiro um íon selecionado é separado da corrente de íons vinda da fonte de íons, no segundo este íon sofre nova fragmentação por colisão com íons de N₂ ou Ar e no terceiro quadrupolo seleciona-se então um dos fragmentos iônicos formados para enviar ao detector (HARRIS, 2001).

Muito bem estabelecida e complementar à LC, a Espectrometria de Massas em série (sequencial ou Tandem), é a técnica espectrométrica que, ao invés de utilizar apenas um analisador de massas para separar os íons de mesma razão m/z gerados na fonte de ionização, utiliza dois ou mais estágios de análise de massa (Q1 e Q2). Quando acoplada à cromatografia, é amplamente utilizada na detecção de compostos a baixas concentrações em matrizes complexas, uma vez que possibilita o aumento na detectabilidade e reduz a interferência espectral de compostos presentes na matriz. Em outras palavras, o MS/MS é um arranjo (Sistema) que ao invés de utilizar apenas um analisador de massas para separar os íons de mesma m/z gerados na fonte de ionização, utiliza dois estágios (MS1 e MS2), onde um deles é usado para isolar os íons de interesse e o outro é usado para estabelecer uma relação entre este

íon de interesse isolado e outros íons que foram gerados a partir da sua composição induzida.

Quando a análise rotineira da MS sozinha não é suficiente para desvendar a identidade de um composto desconhecido, técnicas ortogonais que podem ser prontamente realizadas na MS são empregadas para facilitar a elucidação estrutural. Como por exemplo, analisadores de massa do tipo TOF baseiam-se no princípio de que, como os íons são gerados na mesma fonte de ionização do espectrômetro de massas, eles possuem a mesma energia cinética, de maneira que as suas velocidades serão apenas diferenciadas pelas suas massas (velocidade é inversamente proporcional à raiz quadrada da massa do íon). Por isso, neste analisador de massas, os íons produzidos na fonte de ionização do espectrômetro são acelerados através de um tubo de vóo para serem identificados, uma vez que o tempo que levam para atravessá-lo está relacionado com a m/z de cada íon (ARDREY, 2003; CHIARADIA et al., 2008). O analisador TOF tem sido utilizado por oferecer melhor resolução e detectabilidade do que os do tipo quadrupolo convencional, sendo aplicado para identificação e quantificação de metabólitos desconhecidos de fármacos.

Paralelo ao sucesso dos analisadores de massa, o do tipo aprisionadores ou armadilha de íons também tem recebido destaque. Esses analisadores são também denominados de quadrupolo tridimensional ou quadrupolo “íon trap”, enquanto que os outros quadrupolos são denominados simplesmente quadrupolos ou, alternativamente, quadrupolos lineares. Nos analisadores do tipo “íon trap” um eletrodo hiperbólico na forma de um anel (denominado “ring electrode”) é colocado entre dois eletrodos hiperbólicos denominados, eletrodos “end cap”. Uma voltagem de corrente alternada, de amplitude variável e com frequência ao redor de 1 MHz, é aplicada ao “ring electrode”, enquanto que os eletrodos “end cap” são aterrados. Os dois eletrodos “end cap” apresentam um orifício no centro, onde o eletrodo superior permite a passagem dos íons provenientes da fonte de ionização (eletrodo de entrada) que são direcionados para o “ring electrode”, enquanto que o orifício do eletrodo de saída serve para direcionar os íons ejetados para detecção (LANÇAS 2009). No íon trap a região “Q3” pode ser operada como um espectrômetro de massa convencional ou um espectrômetro de massa com armadilha de íons. Resumidamente, este tipo de analisador é denominando como um quadrupolo tridimensional que “captura”

todos os íons que são introduzidos em seu interior e os mantêm “aprisionados” até que uma determinada radiofrequência seja aplicada (ARDREY, 2003). Na literatura científica, os trabalhos que utilizam esse tipo de analisador possuem diferentes definições, como por exemplo LC-QTrap-MS/MS (do inglês *Hybrid Quadrupole-Linear Ion Trap-Mass Spectrometry*), HPLC-(QqLIT)-MS/MS (do inglês *High Performance Liquid Chromatography-(Quadrupole-Linear Ion Trap)-Tandem Mass Spectrometry*, HPLC-ESI-(QqLIT)-MS/MS (do inglês *High Performance Liquid Chromatography-with Electrospray Ionization-(Quadrupole-Linear Ion Trap)-Tandem Mass Spectrometry*) ou também, mas com menor frequência, Linear ion trap hybrid triple-quadrupole instrument (QTRAP) coupled to conventional liquid chromatography.

Em relação ao detector, este é o último módulo de um espectrômetro de massas. Assim como o analisador é considerado o coração de um espectrômetro de massas, o detector pode ser entendido como seus olhos. O detector registra a carga induzida ou a corrente produzida quando um íon atravessa uma superfície ou atinge sua superfície. No caso de um equipamento que possa efetuar uma varredura de massas, o sinal produzido no detector durante uma varredura em função da m/z ou posição do íon na varredura, irá gerar um espectro de massas (LANÇAS 2009).

Ainda em relação ao sucesso do acoplamento da LC com MS, um equipamento que merece destaque é o UPLC-Orbitrap-MS. Este é o mais novo instrumento para espectrometria de massas de alta resolução (HRMS, do inglês *high resolution mass spectrometry*). Foi comprovado que uma maior resolução em massa pode fornecer uma maior seletividade de amostras complexas e além disso, esse tipo de espectrometria de massa com tecnologia de alta resolução oferece vantagens em sensibilidade analítica e especificidade sobre outras técnicas, além da exatidão e precisão de massas, alta resolução, tecnologia Orbitrap e principalmente a análise de moléculas e compostos não alvo, e também pode realizar simultaneamente análises quali e quantitativas. Em contrapartida, a desvantagem atenuada ao sucesso do Orbitrap é o alto custo do equipamento e como consequência o alto custo da análise.

É importante ressaltar que a elucidação estrutural baseada na análise rotineira do MS é às vezes inadequada para atribuir a identidade do desconhecido, por conta disso, alternativamente, técnicas ortogonais são

necessárias para auxiliar a identificação. Além disso, obter o máximo de conhecimento possível sobre parâmetros experimentais e propriedades físico-químicas dos compostos originais é pivô para a atribuição de identidade de novos metabólitos. Nesse sentido, LC-Orbitrap-MS e LC-TOF-MS produzem dados semelhantes em varredura completa de modo de aquisição, espectro de massas de compostos não alvo (Martínez Bueno *et al.*, 2007) e por essas razões estão sendo utilizados com sucesso na triagem e elucidação estrutural, e melhorias recentes na sensibilidade e faixa dinâmica levaram à utilização para análise quantitativa à níveis traço de contaminação em amostras ambientais e também de alimentos (Wang *et al.*, 2012, Hoff *et al.*, 2014, Arsand *et al.*, 2018, Casado *et al.*, 2018, Saito-Shida *et al.*, 2018).

Por fim, as determinações que são realizadas utilizando LC-MS/MS tornaram-se uma grande ferramenta analítica na determinação de contaminantes orgânicos, em função do excelente acoplamento entre LC e MS, que possibilitou o desenvolvimento de métodos que possuem maior seletividade e detectabilidade, onde uma riqueza de informações estruturais pode ser fornecida pela LC. Com base nas capacidades supracitadas de certos analisadores na atribuição de composição elementar e sua função CID, LC-ESI/APCI-MS provou ser uma ferramenta indispensável no futuro da Química Analítica Ambiental.

4.4 O processo analítico e o preparo de amostra

O preparo de amostra é considerado uma etapa crítica do desenvolvimento de um método analítico, seja durante a análise qualitativa ou quantitativa dos analitos (Marube *et al.*, 2015). Os principais objetivos do preparo da amostra são, portanto, o enriquecimento e a extração dos analitos, remoção de interferentes da amostra e a transformação da estrutura dos analitos para uma melhor detectabilidade. Todas estas etapas auxiliam na obtenção de resultados adequados em termos de precisão e detectabilidade do método analítico (Prestes *et al.*, 2013, Xu *et al.*, 2016).

Em contrapartida aos avanços na instrumentação analítica, os quais proporcionam uma excelente detectabilidade e seletividade, ainda se faz necessário uma etapa de preparo de amostra antes da introdução da amostra no equipamento. Esta etapa vem ganhando força para determinação de compostos

em níveis traços em amostras ambientais, onde se destacam a LLE e SPE (Ramos 2012). Entretanto, com o aprimoramento das técnicas desenvolvidas para determinação de diferentes compostos em matrizes ambientais, as técnicas de preparo de amostra vêm ganhando destaque principalmente por conta da busca por minituarização através de métodos que mantenham exatidão, precisão e rapidez. A seleção e otimização da técnica de preparo de amostra geram aspectos fundamentais no processo analítico, podendo afetar a exatidão dos dados finais (Ramos 2012).

4.4.1 Métodos de preparo de amostra para determinação de fármacos, produtos de cuidado pessoal e filtros UV em matrizes ambientais

De forma geral, e como mencionado anteriormente, os métodos analíticos comumente utilizados para determinação dos PPCPs em matrizes ambientais são baseados nas técnicas tradicionais que muitas vezes utilizam equipamentos com elevado grau de automação, elevada massa de amostra, volume de solvente, o que gera uma significativa quantidade de resíduos dentro do laboratório. A Tabela 7 apresenta alguns exemplos de trabalhos que utilizaram preparo de amostra para determinação dos PPCPs em matrizes ambientais. Iniciando pelo método oficial da EPA que utiliza a UAE, os demais trabalhos estão organizados por ordem cronológica de acordo com o ano em que foram publicados. Com isso, é possível perceber a evolução das técnicas, métodos, bem como a evolução na instrumentação analítica que possibilitou um aumento significativo na detectabilidade desses compostos.

Tabela 7 - Principais características de alguns estudos que determinam PPCPs em matrizes ambientais

Matriz	Analitos	Preparo de amostra	Determinação	LOD	Observações	Referência
Solos, sedimentos e biosólidos	60 PPCPs	UAE	HPLC-MS/MS	0,1 - 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$	Método oficial 1964 da US-EPA. Muitas etapas. Separação das amostras em duas alíquotas (ácida e básica)	(EPA 2007)
Água	18 antibióticos	SPE	LC-MS/MS	20 - 50 ng L^{-1}	Várias colunas e solventes	(Hirsch <i>et al.</i> , 1998)
Água e efluente	13 Sulfonamidas	SPE	LC-MS/MS	0,2 - 3,7 $\mu\text{g L}^{-1}$	Sulfametoxazol e sulfadiazina foram detectados em concentrações entre 30 - 2000 ng L^{-1} e 10 - 100 ng L^{-1}	(Hartig <i>et al.</i> , 1999)
Solo	PPCPs	PLE e SPE	LC-APCI-MS/MS	80,2 - 1,6 $\mu\text{g kg}^{-1}$	-	(Schlüsener <i>et al.</i> , 2003)

Matriz	Analitos	Preparo de amostra	Determinação	LOD	Observações	Referência
Efluentes hospitalares	PPCPs	SPE	LC-ESI-MS/MS	0,2 µg L ⁻¹	Extração a pH 7-8	(Löffler e Ternes 2003)
Efluentes	Antimicrobianos	SPE	LC-ESI-MS/MS	0,001 - 0,008 µg L ⁻¹	Extração a pH 3 e 6	(Miao <i>et al.</i> , 2004)
Águas	Antimicrobianos e metabólitos	SPE	LC-MS/MS	-	-	(Díaz-Cruz e Barceló 2006)
Sedimento	PPCPs	UAE	LC-MS/MS	3 ng g ⁻¹ ; 20 ng g ⁻¹ (LOQ)	-	(Joss <i>et al.</i> , 2006)
Peixe	23 fármacos e 2 metabólitos	SLE	LC-MS/MS	0,47 - 10,4 ng g ⁻¹ (LOQ)	4 fármacos detectados em 100% das amostras	(Ramirez <i>et al.</i> , 2007)
Águas	9 Sulfonamidas e 1 metabólito	SPE	LC-QqLIT-MS/MS	0,01 - 461 ng L ⁻¹	-	(Díaz-Cruz <i>et al.</i> , 2008)
Água de superfície	Antibióticos	SPE	UHPLC-ESI-MS/MS	10 ng L ⁻¹ (LOQ)	17 compostos detectados	(Tamtam <i>et al.</i> , 2008)
Sedimento	Fármacos	PLE-SPE	LC-QqLIT-MS/MS	0,04 ng g ⁻¹	Detectados abaixo do LOQ	(Jelić <i>et al.</i> , 2009)
Sedimento	Fármacos	PLE-SPE	LC-ESI-MS/MS	4 ng g ⁻¹	Detectados na faixa de 5,95 ng g ⁻¹	(Vazquez-Roig <i>et al.</i> , 2010)
Água de rio e água da torneira	Analgésicos e anti-inflamatórios	DLLME	LC-ESI-MS/MS	0,5 - 10 ng L ⁻¹	Não observado efeito de matriz	(Zgoła-Grześkowiak 2010)

Matriz	Analitos	Preparo de amostra	Determinação	LOD	Observações	Referência
Água	19 sulfonamidas e 1 metabólito	SPE-Online	LC-QqLIT-MS/MS	0,05 - 0,2 ng L ⁻¹	Sulfametoxazol e sulfapiridina foram os mais detectados (80% e 71% respectivamente)	(García-Galán <i>et al.</i> , 2010)
Sedimento	Filtros UV	PLE	UPLC-MS/MS	0,5 - 15 ng g ⁻¹	Limpeza com alumina	(Gago-Ferrero <i>et al.</i> , 2011)
Lodo de ETE	Filtros UV	PLE	UPLC-ESI-MS/MS	0,2 - 60 ng g ⁻¹	-	(Gago-Ferrero <i>et al.</i> , 2011)
Água	Fármacos e agrotóxicos	SPE	LC-MS/MS	0,006 - 0,208 µg L ⁻¹	Alguns fármacos e pesticidas foram detectados, mas abaixo do LOQm	(Maldaner e Jardim 2012)
Água	Fármacos	SPME	LC-ESI-MS/MS	2 - 13 ng L ⁻¹	-	(Togunde <i>et al.</i> , 2012)
Sedimento	12 fármacos	MSPD	LC-MS/MS	0,125 - 500 ng g ⁻¹	-	(Pavlović <i>et al.</i> , 2012)
Água da torneira, suco, refrigerante e bebida energética	Fármacos	HF-LPME	UPLC-MS/MS	0,5 - 1,25 µg L ⁻¹	Ácido salicílico e diclofenaco detectados em todas amostras	(Zhang <i>et al.</i> , 2013)
Peixe	Filtros UV	PLE	LC-MS/MS	0,1 - 6 ng g ⁻¹	Detectou 240 ng g ⁻¹ de EHMC	(Gago-Ferrero <i>et al.</i> , 2013)

Matriz	Analitos	Preparo de amostra	Determinação	LOD	Observações	Referência
Água, sedimento e mexilhão	PPCPs e alquilfenóis	SPE	LC-MS/MS	-	35% dos PPCPs foram detectados	(Klosterhaus <i>et al.</i> , 2013)
Peixe	20 fármacos	PLE	UHPLC-MS/MS	0,03 - 0,50 ng g ⁻¹	9 compostos de 5 famílias terapêuticas foram detectados	(Huerta <i>et al.</i> , 2013)
Peixe	15 fármacos	VA-MSPD	LC-ESI-MS/MS	5 - 1000 ng g ⁻¹ (LOQ)	-	(Hertzog <i>et al.</i> , 2015)
Água	Fármacos	DLLME-SFO	LC-MS/MS	50 - 500 ng L ⁻¹	-	(Marube <i>et al.</i> , 2015)
Água	58 PPCPs	SD-DLLME	LC-ESI-MS/MS	0,0125 - 1,25 µg L ⁻¹ (LOQ)	-	(Caldas <i>et al.</i> , 2016)
Água	16 PCPs	SPE-Online	HPLC-MS/MS	N.R	1980 ng L ⁻¹ de MeBZT e 1500 ng L ⁻¹ de BZT	(Serra-Roig <i>et al.</i> , 2016)
Água	58 PPCPs	SD-DLLME	LC-ESI-MS/MS	0,0125 - 1,25 µg L ⁻¹ (LOQ)	-	(Caldas <i>et al.</i> , 2016)
Águas	16 PCPs	SPE	HPLC-QqLIT-ESI-MS/MS	-	-	(Serra-Roig <i>et al.</i> , 2016)
Águas	PPCPs	SPE	LC-Orbitrap-MS	-	Um banco de dados de 65 produtos de transformação de amoxicilina e ampicilina foi construído	(Arsand <i>et al.</i> , 2018)
Águas superficiais	PPCPs	SPE-Online	HPLC-APPI-MS/MS	-	-	(Molins-Delgado <i>et al.</i> , 2018)

Matriz	Analitos	Preparo de amostra	Determinação	LOD	Observações	Referência
Lodo de ETE	19 fármacos, 4 PCPs e 4 produtos de degradação	VA-MSPD	LC-ESI-MS/MS	1,25 - 1250 ng g ⁻¹	PPCPs foram detectados em concentrações entre 2,5 e 5400 ng g ⁻¹	(Cerqueira <i>et al.</i> , 2018)
Água, sedimento e peixe	26 PPCPs	SPE e PLE	LC-MS/MS	-	-	(Díaz-Cruz <i>et al.</i> , 2019)

N.R – Não reportado; LC-MS/MS – cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial, do inglês *liquid chromatography coupled to mass spectrometry in tandem*; HPLC-DAD - cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos, do inglês *high pressure liquid chromatography with diode array detector*; HPLC-UV - cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector ultravioleta, do inglês *high performance liquid chromatography with ultraviolet detector*; UHPLC-ESI-MS/MS - cromatografia líquida de ultra-alta performance acoplada a espectrometria de massas sequencial com fonte de ionização de eletrospray, do inglês *ultra high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry in tandem with electrospray ionization source*; LC-HRMS – cromatografia líquida de alta resolução, do inglês *liquid chromatography with high resolution mass spectrometry*; DLLME - microextração líquido-líquido dispersiva, do inglês *dispersive liquid-liquid microextraction*

4.4.2 Métodos de preparo de amostra para determinação de biocidas anti-incrustante em matrizes ambientais

Assim como para os PPCPs, alguns dos trabalhos publicados para os biocidas anti-incrustantes de 3ª geração estão exemplificados na Tabela 8. Os estudos mencionados estão organizados por ordem cronológica de acordo com o ano de publicação, onde muito embora e ao contrário aos PPCPs, os biocidas não apresentem um método oficial, a maioria dos trabalhos constantemente utilizados também são baseados nas técnicas tradicionais.

Tabela 8 - Principais características de estudos que determinam biocidas anti-incrustantes e alguns de seus produtos de degradação em matrizes ambientais

Matriz	Biocidas	Preparo de amostra	Determinação	LOD	Observações	Referência
Águas de marina	OTs and irgarol	LLE	GC-MS	0,5 ng L ⁻¹	-	(Tolosa e Readman 1996)
Água doce, sedimento e biota	Irgarol	SPE	HPLC-UV-DAD GC-MS	HPLC: 1.7 - 3 ng g ⁻¹ GC-MS: 0,2 - 0,3 ng g ⁻¹	Etapa de limpeza com florisil	(Toth <i>et al.</i> , 1996)
Água do mar e sedimento	Diuron, irgarol e outros compostos	Água do mar: SPE Online Sedimento: Soxhlet	LC-APCI-MS	Água: 0,03 µg L ⁻¹ (irgarol), 0,05 µg L ⁻¹ (diuron)	10 h. de extração	(Ferrer <i>et al.</i> , 1997)
Água do mar	Irgarol	SPE	GC-MS GC-MS/MS	0,1 - 1 ng L ⁻¹	Discos de SDB	(Steen <i>et al.</i> , 1997)
Água do mar	Diuron e irgarol	ELISA e SPE	LC-DAD LC-APCI-MS	0,020 e 0,001 µg L ⁻¹	-	(Ferrer <i>et al.</i> , 1997)
Água	Clorotalonil, cloro1,3-dicianobenzeno, dicloro-1,3-dicianobenzeno e tricloro-1,3-dicianobenzeno	SPE	GC-EI-MS	N.R	Estudo de fotodegradação e estabilidade	(Peñuela e Barceló 1998)
Água	Diuron, DCOIT, TCMTB e TCMS piridina	SPE	HPLC-APCI-MS	1 - 5 ng L ⁻¹	-	(Thomas 1998)
Sedimento marinho	Diuron, irgarol, M1, diclofluanida, demetlidiuron, 1(3,4-diclorofenil)urea) e DCOIT	Extração ultrasônica metanólica	HPLC-APCI-MS	0,2 - 1,6 µg kg ⁻¹	Etapa de limpeza com cartuchos Isolute ENV	(Thomas 1998)
Água do mar	Irgarol	LLE	GC-MS	N.R	DCM	(Liu <i>et al.</i> , 1999)
Algas verdes e água do mar	Irgarol	Água: SPE Tecido: extração com solvente	GC-MS e GC-MS/MS	Água: 1 - 5 ng mL ⁻¹ Tecido: 2 ng g ⁻¹	Irgarol foi detectado em 9 dos 10 locais amostrados	(Scarlett <i>et al.</i> , 1999)
Água do mar	Diuron, irgarol, clorotalonil, diclofluanida e TCMTB	SPE Online	LC-DAD LC-APCI-MS	2 - 10 ng L ⁻¹	-	(Ferrer e Barceló 1999)
Água	Diuron, irgarol, clorotalonil, diclofluanida, TCMTB e DCOIT	SPE	LC-APCI-MS GC-MS	5 - 25 ng L ⁻¹	Diferentes adsorventes na SPE	(Piedra <i>et al.</i> , 2000)

Matriz	Biocidas	Preparo de amostra	Determinação	LOD	Observações	Referência
Sedimento	Diuron, irgarol, M1 e OTs	OTs: Modificado de Waldock <i>et al.</i> (1989) Biocidas: extração com solvente	GC-FPD e LC-APCI-MS	0,1 - 0,001 µg g ⁻¹	-	(Thomas <i>et al.</i> , 2000)
Água do mar	Diclofluanida, diuron, demetilldiuron, 1-(3,4-diclorofenil)urea], (2-tiocianometiltio)benzotiazol, clorotalonil, DCOIT, irgarol e (2-metiltio-4- <i>tert</i> -butilamino-s-triazina)	SPE	HPLC-APCI-MS	1 - 20 ng L ⁻¹	-	(Martínez <i>et al.</i> , 2000)
Água de rio e água do mar	Irgarol, diclofluanida e 4-cloro-3-metilfenol	SPE-Online	GC-MS	10 - 200 ng L ⁻¹	-	(Pocurull <i>et al.</i> , 2000)
Água e sedimento	Diuron, irgarol, clorotalonil e diclofluanida	Modificado de Voulvoulis <i>et al.</i> (1999)	GC-MS	Água: 0,2 µg L ⁻¹ Sedimento: 5 µg g ⁻¹	Extração simultânea com DCM e acetona	(Voulvoulis <i>et al.</i> , 2000)
Água do mar	Irgarol	LLE	GC-MS	N.R	DCM	(Sargent <i>et al.</i> , 2000)
Sedimento marinho	Diuron e irgarol	MSh e UAE	LC-MS/MS	1 - 10 ng L ⁻¹	-	(Thomas <i>et al.</i> , 2000)
Água do mar e sedimento	Irgarol e seus produtos de degradação	SPE-Online	LC-APCI-MS	0,002 - 0,005 µg L ⁻¹	Cartuchos poliméricos	(Ferrer e Barceló 2001)
Água	Diuron, demetilldiuron, 1(3,4-diclorofenil)urea, clorotalonil, DCOIT, irgarol, (2-tiocianometiltio)benzotiazol,(2-metiltio-4- <i>tert</i> .-butilamino-s-triazin)	SPE	HPLC-APCI-MS	1 - 20 ng L ⁻¹	-	(Martinez e Barceló 2001)
Água do mar	Diclofluanida, diuron e irgarol	SPE Online	LC-MS	5 - 400 ng L ⁻¹	-	(Gimeno <i>et al.</i> , 2001)
Sedimento (liofilizado e peneirado)	Diuron, irgarol, diclofluanida, DCOIT, (dimetildiuron, 3,4(diclorofenil)ureia e M1	Extração com ultrassom	LC-APCI-MS	0,2 - 1,6 µg kg ⁻¹	Etapa de limpeza por SPE	(Martinez e Barceló 2001)
Água do mar	Irgarol, clorotalonil, diclofluanida, DCOIT e TCMTB	SPE	GC-MS/MS	0,05 - 50 ng L ⁻¹	-	(Hernando <i>et al.</i> , 2001)
Sedimento marinho (liofilizado)	Diuron e irgarol	PLE	GC-MS	12 - 17 ng L ⁻¹	Diclorometano: acetona 1:1; v/v)	(Comber <i>et al.</i> , 2002)

Matriz	Biocidas	Preparo de amostra	Determinação	LOD	Observações	Referência
Sedimento	Irgarol, diclofluanida e clorotalonil	Modificado de Hela and Albanis (1998)	GC-ECD GC-FTD GC-MS GC-ECD (efeito da matéria orgânica dissolvida – DOM) GC-MS	GC-MS: 0,7 - 3 ng g ⁻¹ GC-ECD: 1,5 - 2,5 ng g ⁻¹ GC-FTD: 0,4 ng g ⁻¹	Etapa de limpeza com florisil	(Albanis <i>et al.</i> , 2002)
Águas Naturais (mar, rio e lago)	Clorotalonil, cloro1,3-dicianobenzeno, dicloro-1,3-dicianobenzeno, tricloro-1,3-dicanobenzeno e benzamida	LLE e SPE		0,05 mg L ⁻¹	Etapa de limpeza por SPE, como Konstantinou <i>et al.</i> (2001)	(Sakkas <i>et al.</i> , 2002)
Água do mar	Irgarol	LLE	GC-MS	1 ng L ⁻¹	Cloreto de metileno	(Gardinali <i>et al.</i> , 2002)
Água e sedimento	Diuron, irgarol, M1, DCPMU, DCPU e DCA	Água: SPE Sedimento: Modificado de Thomas <i>et al.</i> (2000)	HPLC-APCI-MS and GC-MS	0,1 µg kg ⁻¹	-	(Thomas <i>et al.</i> , 2002)
Sedimento do Mediterrâneo	Irgarol	SFE	GC-EI-MS	3 ng g ⁻¹	Metanol e TFA	(Carrasco <i>et al.</i> , 2003)
Água	Diuron e outros analitos de outras classes	SPE	LC-ESI-MS	2 ng L ⁻¹	Análise multiresíduo	(Loos <i>et al.</i> , 2003)
Sedimento marinho	Irgarol, clorotalonil, diclofluanida e DCOIT	SPME	GC-MS	0,5 - 25 ng g ⁻¹	Água:acetona (5% v/v)	(Lambropoulou <i>et al.</i> , 2003)
Sedimentos e partículas suspensas	DCOIT	SPE	GC-MS/MS	5 ng L ⁻¹	-	(Steen <i>et al.</i> , 2004)
Sedimento marinho	Diuron, irgarol, M1, DCPMU, DCPU e DCA	Extração ultrassônica metanólica	LC-DAD	1,7 - 4 ng g ⁻¹	Etapa de limpeza com SPE	(Gatidou <i>et al.</i> , 2004)
Sedimento marinho	Diclofluanida e DMSA	MSh	GC-MS	3 - 10 ng L ⁻¹	Acetona	(Hamwijk <i>et al.</i> , 2005)
Água do mar	Diuron, irgarol, M1, DCPMU, DCPU e DCA	SPE	LC-DAD	0,005 µg L ⁻¹ (DCPMU) 0,026 µg L ⁻¹ (M1)	-	(Gatidou <i>et al.</i> , 2005)
Sedimento e mexilhão	Diuron, irgarol, M1, DCOIT, diclofluanida e and piritionas	Extração com solvente	LC-ESI-MS/MS	0,24 - 1,1 µg kg ⁻¹	Muitas etapas	(Harino <i>et al.</i> , 2006)

Matriz	Biocidas	Preparo de amostra	Determinação	LOD	Observações	Referência
Água	Irgarol, clorotalonil, diclofluanida e terbutrin	SPE	GC-MS	1 ng L ⁻¹	-	(Carbery <i>et al.</i> , 2006)
Sedimentos superficiais	OTS, irgarol, DCOIT, clorotalonil, diclofluanida e folpete	OTs: Modificado de Astruc <i>et al.</i> (1992)	GC-FPD GC-NPD	OTS: 1,1 - 4 ng g ⁻¹	Muitas etapas e etapa de limpeza por SPE para os biocidas	(Cassi <i>et al.</i> , 2008)
Solo e água	Clorotalonil e seus produtos de degradação	SPE	GC e LC-MS	0,1 - 1 µg L ⁻¹ 0,05 e 0,02 µg g ⁻¹ 0,001 – 0,005 µg g ⁻¹	Cartuchos hidrofóbicos para o isolamento de analitos	(Kazos <i>et al.</i> , 2008)
Água e sedimento	Irgarol e M1	Água: SPE Sedimento: PLE	LC-MS/MS	Água: 1 ng L ⁻¹ Sedimento: 1 ng g ⁻¹	Estudos de exposição	(Sapozhnikova <i>et al.</i> , 2009)
Biota (liofilizada)	Irgarol e seus produtos de degradação	Sonicação	LC-ESI-MS/MS	5 - 18,3 pg g ⁻¹	Acetona	(Tsang <i>et al.</i> , 2009)
Sedimento (líoilizado, moído e peneirado)	Diuron, irgarol, diclofluanida e TCMTB	MAE	LC-MS/MS	0,1 - 0,3 ng g ⁻¹	-	(Sánchez-Rodríguez <i>et al.</i> , 2011)
Sedimento	Diuron e irgarol	MAE	LC-MS/MS	0,1 e 0,3 ng g ⁻¹	Etapas de limpeza por SPE	(Sánchez-Rodríguez <i>et al.</i> , 2011)
Água do mar e sedimento	Diuron, irgarol e M1	Água: SPE Sedimento: PLE	LC-MS/MS	Água 1 ng L ⁻¹ (irgarol e M1) 2 ng L ⁻¹ (diuron) Sedimento: 0,3 ng L ⁻¹	-	(Sapozhnikova <i>et al.</i> , 2013)
Sedimento	Diuron, irgarol e DCOIT	MS	LC-MS/MS	N.R	-	(Kim <i>et al.</i> , 2014)
Tecido de peixe	Diuron e irgarol	MAE e SPE	LC-MS/MS	0,34 - 0,44 ng g ⁻¹	Metanol	(Franco-Barrios <i>et al.</i> , 2014)
Sedimentos, organismos marinhos e água	Diuron e irgarol	MSh e SPE	HPLC-UV	0,6 - 1,4 ng g ⁻¹	-	(Kaonga <i>et al.</i> , 2015)
Sedimento	Diuron, irgarol e DCOIT	MS, UAE e SPE	LC-MS/MS	N.R	-	(Kim <i>et al.</i> , 2015)
Sedimento	Irgarol	UAE e DLLME	GC-MS	N.R	-	(Saleh <i>et al.</i> , 2016)

Matriz	Biocidas	Preparo de amostra	Determinação	LOD	Observações	Referência
Água	Diuron, irgarol, TCMTB, diclofluanida e DCOIT	SPE	LC-MS/MS	0,3 - 2,7 ng L ⁻¹ (LOD) 0,8 - 8 ng L ⁻¹ (LOQ)	-	(Batista-Andrade <i>et al.</i> , 2016)
Zebrafish (<i>Danio rerio</i>)	Clorotalonil e 4-hidroxiclorotalonil	Modificado de Lawrence (2007) e Shi <i>et al.</i> , (2008)	Q-TOF UPLC-MS/MS	0,045 e 0,050 ng L ⁻¹	Estudos de degradação (concentração de exposição foi de 50 µg L ⁻¹)	(Zhang <i>et al.</i> , 2016)
Sedimento	Diuron, irgarol, TCMTB, DCOIT e diclofluanida	VA-MSPD	LC-MS/MS	0,5 - 5 ng L ⁻¹ (LOQ)	-	(Caldas <i>et al.</i> , 2018)
Sedimento marinho	Irgarol, TCMTB, DCOIT, diclofluanida e OTs	VA-MSPD	LC-MS/MS	0,08 – 0,75 ng L ⁻¹ (LOD) 0,25 – 2,5 ng L ⁻¹ (LOQ)	Etanol	(Batista-Andrade <i>et al.</i> , 2018)
Tecido de peixe	Diuron e irgarol	VA-MSPD	LC-MS/MS	5 - 50 ng g ⁻¹ (LOQ)	Etanol	(Vieira <i>et al.</i> , 2018)
Água do mar	Diuron, irgarol e outros pesticidas	SPE	LC-MS/MS	Diuron: 0,02 ng L ⁻¹ Irgarol: 0,05 ng L ⁻¹	-	(Köck-Schulmeyer <i>et al.</i> , 2019)

N.R - Não reportado; TFA - Ácido trifluoracético; MSh - Mechanical Shaking (agitação mecânica) ; HPLC-APCI-MS - cromatografia líquida de alta performance com ionização química de pressão atmosférica acoplada a espectrometria de massa sequencial, do inglês *high-performance liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization with mass spectrometry in tandem*; LC-DAD - cromatografia líquida com detector por arranjo de diodos, do inglês *liquid chromatography with diode array detector*; GC-FPD - cromatografia gasosa acoplada ao detector fotométrico de chama, do inglês *gas chromatography with flame photometric detector*; GC-ECD – cromatografia gasosa acoplada ao detector de captura de elétrons, do inglês *gas chromatography with electron capture detector*; GC-MS - cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, do inglês *gas chromatography with mass spectrometry detector*; GC-FID, cromatografia gasosa com detector por ionização em chama, do inglês *gas chromatography with flame ionization detector*

Diante do contexto do aprimoramento das técnicas de preparo de amostra que buscam apresentar características de baixo custo, associado aos preceitos da Química Analítica Verde, uma das alternativas que busca atender à esses requisitos é a MSPD.

4.4.3 Dispersão da Matriz em Fase Sólida

A MSPD é uma técnica analítica de preparo de amostra originalmente desenvolvida por Barker *et al.*, (1989) para extração de resíduos de drogas em tecidos bovinos (Barker *et al.*, 1989). Desde então, assim como outras técnicas de extração, a MSPD vem ganhando bastante destaque de pesquisadores no ramo da Química Analítica, com diversas aplicações em diferentes matrizes.

A técnica se baseia na mistura de amostras viscosas, sólidas ou semi-sólidas com um suporte sólido, como sílica ou o seu derivado funcionalizado como grupos octadecilsilano (C18). Estes suportes são, geralmente, os mesmos utilizados no empacotamento de cartuchos de SPE. Estes materiais tem a funcionalidade de adsorver os analitos presentes em amostras líquidas. Enquanto que na MSPD, o suporte sólido é macerado juntamente com a amostra, com o auxílio de almofariz e pistilo. A característica principal da MSPD é a força mecânica promovida na maceração da amostra juntamente com o suporte sólido, que tem a função de promover o rompimento da estrutura física original da amostra, quebrando assim, em uma menor granulometria para ser extraída com solvente apropriado (Barker 2000). A Figura 11 ilustra as etapas da MSPD original, desenvolvida em 1989.

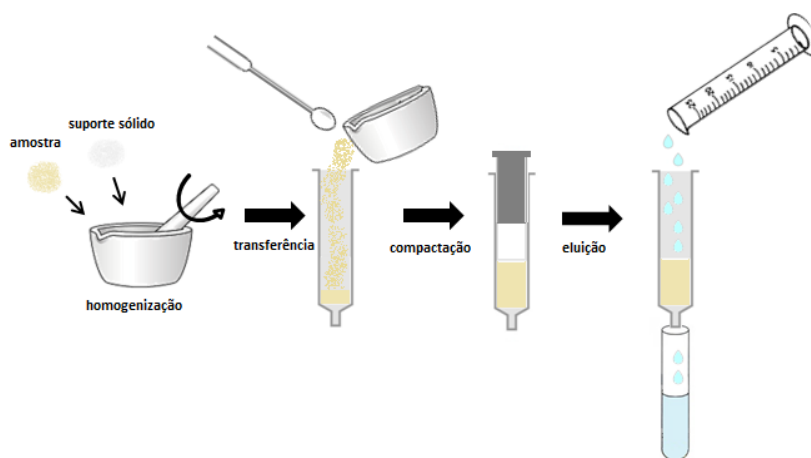


Figura 11 - Esquema representativo das etapas da MSPD original (Adaptado de (Barker *et al.*, 1989))

Uma característica da MSPD original que merece atenção é a etapa de eluição, já que esta pode acontecer em materiais como seringas ou a mistura já macerada empacotada em cartuchos de SPE. Essa etapa merece destaque uma vez que podem acontecer algumas situações que possivelmente comprometam a eficiência da técnica, como caminhos preferenciais que os analitos podem percorrer, ocasionando altos RSDs, ou então a possível retenção nos cartuchos de SPE enquanto os demais constituintes são eluídos em uma etapa de eluição com um solvente adequado (Duarte *et al.*, 2013).

Desde o ano em que foi originalmente desenvolvida, em 1989, até o presente momento, o número de publicações disponíveis na literatura envolvendo a técnica de MSPD é crescente. Afim de comprovar essa tendência relacionada à técnica, a Figura 12 apresenta uma representação realizada através da busca em uma das principais bases de dados científicas, no período dos últimos 10 anos envolvendo a palavra-chave “*matrix solid phase dispersion*”.

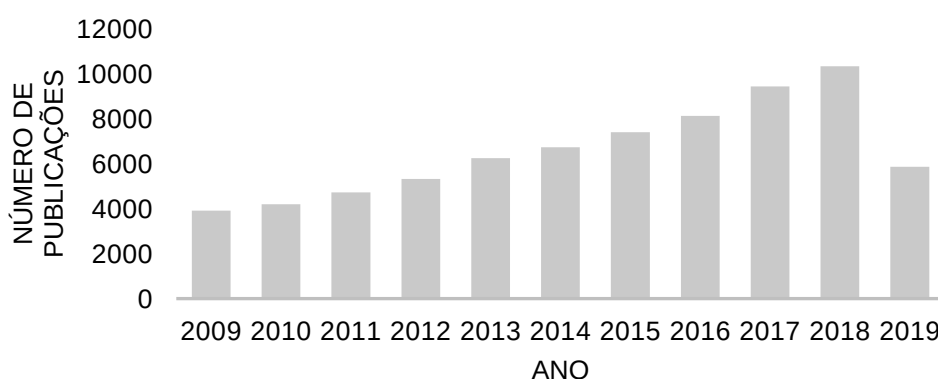


Figura 12 - Representação do número de publicações envolvendo MSPD durante o período de 2009 a 2019. Base de dados: sciencedirect. Palavra-chave acessada: *matrix solid phase dispersion*. Acesso realizado em 15/04/2019

É possível observar que o número de publicações acerca dessa técnica é crescente, e isso é visto como um ponto positivo no que diz respeito aos avanços das técnicas de preparo de amostra e atenção por parte dos Químicos Analíticos, uma vez que aponta que técnicas miniaturizadas, como a MSPD, tem recebido atenção por parte da comunidade científica e estima-se que essa tendência continue crescente.

Embora a técnica original apresente algumas vantagens frente às técnicas tradicionalmente utilizadas, buscando melhorias na etapa de extração, como a minimização de problemas ocasionados na etapa de extração, bem como a diminuição do tempo durante o empacotamento, menor exposição do analista frente a grandes volumes de solvente e variações decorrentes deste procedimento, alguns autores já propuseram algumas modificações na técnica original. No esquema representativo da Figura 13 é possível observar algumas dessas modificações.

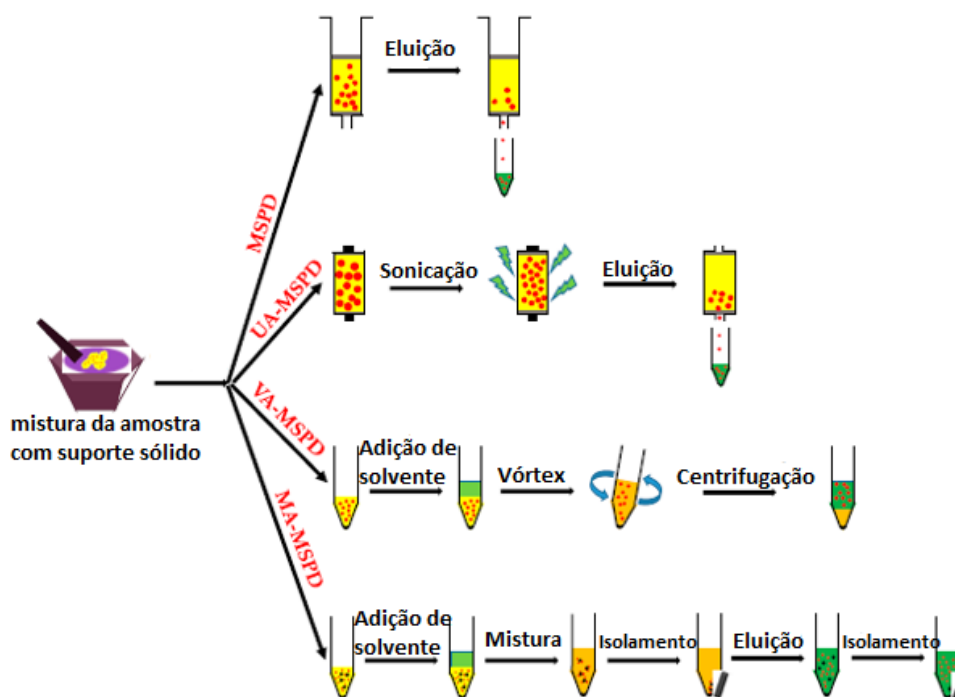


Figura 13 - Esquema representativo da MSPD original. (MSPD assistida por ultrassom (UA-MSPD), MSPD assistida por vórtex (VA-MSPD) e MSPD associada magneticamente (MA-MSPD) Adaptado de (Tu e Chen 2018)

Em 2010, Sebastià *et al.*, propuseram modificações na técnica original para extração de compostos como aflatoxinas. Os autores objetivaram substituir a etapa de extração nos cartuchos de SPE por transferência direta da mistura macerada para tubos de vidro com fundo cônico, seguido de agitação e centrifugação (Sebastià *et al.*, 2010). Baseado no trabalho de Sebastià *et al.*, em 2013 Caldas *et al.*, propuseram adaptações na MSPD, através da extração de agrotóxicos em fígado de peixe e hepatopâncreas de siri com determinação por GC-MS. A Figura 14 ilustra o esquema representativo da adaptação proposta neste trabalho. Onde, após a dispersão da amostra com C18, a mistura foi

colocada em tubos de propileno de 50 mL e neste foi adicionado o solvente de eluição. As recuperações para este método demonstraram a eficiência de otimização. Essa proposta de modificação, denominada nesse trabalho de MSPD *assistida por vórtex* (VA-MSPD) apresenta vantagens significativas diante o método original, pois eliminam as principais desvantagens da etapa de eluição dos cartuchos de SPE, minimizando, assim, as possíveis interferências, além de minimizar o tempo total de extração e exposição do analista a grandes volumes de solventes, os quais tradicionalmente são utilizados na SPE (Caldas *et al.*, 2013).

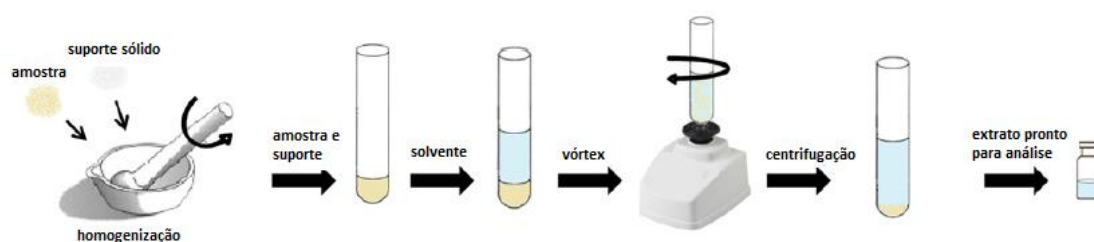


Figura 14 - Esquema representativo da VA-MSPD. Adaptado de (Caldas *et al.*, 2013)

Essa modificação tende a minimizar os possíveis problemas ocasionados na etapa de compactação, tornando a técnica ainda mais simples, barata e robusta (Sebastià *et al.*, 2010, Caldas *et al.*, 2013). A VA-MSPD tem sido aplicada a diferentes tipos de compostos orgânicos em sedimentos (Caldas *et al.*, 2018), lodos (Soares *et al.*, 2017, Cerqueira *et al.*, 2018), amostras de peixes (Duarte *et al.*, 2013, Hertzog *et al.*, 2015, Vieira *et al.*, 2018) e outros compartimentos ambientais (Rombaldi *et al.*, 2015). Vale ressaltar que essa modificação também tem sido utilizada para determinação de outros compostos, como por exemplo, espécies de mercúrio em tecidos de peixe (Duarte *et al.*, 2013).

Frente as vantagens já citadas pela modificação da técnica original, a VA-MSPD também pode apresentar algumas desvantagens, como por exemplo, a grande manipulação da amostra, o tempo de maceração necessário além do número de variáveis possíveis de serem otimizadas. Entretanto, essas desvantagens tem sido contornadas pelo possível uso de ferramentas relacionadas à estatística multivariada, que auxilia no sentido de extrair o maior número de informações com rapidez aliado ao menor número de experimentos possível.

A combinação das técnicas miniaturizadas juntamente com a capacidade analítica de determinação de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas é apresentada como uma ferramenta promissora na determinação de compostos orgânicos em matrizes ambientais. No entanto, durante os últimos anos e devido à necessidade de criar métodos multirresíduos, novas metodologias baseadas em cromatografia líquida de alta performance acoplada a espectrometria de massas em série e diferentes técnicas de ionização foram desenvolvidas e utilizadas mundialmente (Molins-Delgado *et al.*, 2018).

A Tabela 9 apresenta alguns exemplos de estudos que utilizaram a MSPD como preparo de amostra, onde é possível observar a aplicabilidade da MSPD em diferentes tipos de matrizes tanto alimentícias como ambientais (Barker, 2000; Souza *et al.*, 2013), onde podem ser destacados o desenvolvimento e aprimoramento da técnica para determinação de diferentes compostos.

Tabela 9 - Estudos que utilizam a MSPD para extração de diferentes analitos em matrizes alimentícias e ambientais

Matriz	Analitos	Suporte sólido	Solvente de extração	Determinação	Referência
Tecido bovino	Fármacos	C18	Metanol	HPLC-MS/MS	(Barker <i>et al.</i> , 1989)
Frutas	Fungicidas	C18	Acetato de etila	LC-ESI-MS/MS	(Wang <i>et al.</i> , 2007)
Carne	Medicamentos veterinários	MIP	Metanol:ácido acético (9:1, v/v)	UPLC-DAD	(Wang <i>et al.</i> , 2017)
Tecidos de peixe		C18	Acetonitrila	LC-MS/MS	(Escarrone <i>et al.</i> , 2014)
Peixe	15 fármacos	Terra diatomácea	Metanol	LC-MS/MS	(Hertzog <i>et al.</i> , 2015)
Solo	HPAs	PTS-MgO	DCM	HPLC-DAD	(Tan <i>et al.</i> , 2017)
Lodo de ETE	27 HPAs	Alumina	DCM	GC-MS	(Sánchez-Brunete <i>et al.</i> , 2007)
Sedimento	Biocidas anti-incrustantes	C18	Etanol	LC-MS/MS	(Batista-Andrade <i>et al.</i> , 2016)
Algas	Agrotóxicos	Na ₂ SO ₄	Hexano e acetato de etila	GC-MS	(García-Rodríguez <i>et al.</i> , 2012)
Cascas de frutas	Flavonóides	Peneiras moleculares	Metanol	UPLC-UV	(Cao <i>et al.</i> , 2016)
Lodo de ETE	PPCPs	-	Metanol	LC-MS/MS	(Cerqueira <i>et al.</i> , 2018)
Lodo de ETA	15 agrotóxicos	Quitina	Acetato de etila	GC-MS	(Soares <i>et al.</i> , 2017)

Matriz	Analitos	Suporte sólido	Solvente de extração	Determinação	Referência
Tecido de mexilhão dourado	11 agrotóxicos e 9 PPCPs	Concha de mexilhão	Acetato de etila	LC-MS/MS	(Rombaldi <i>et al.</i> , 2015)
Pão e biscoito	Acrilamida	SiO ₂ -MIP	MeCN:Metanol (50:50, v/v)	HPLC-UV	(Arabi <i>et al.</i> , 2016)
Tecido de peixe	Biocidas anti-incrustantes	Concha de mexilhão	Etanol	LC-MS/MS	(Vieira <i>et al.</i> , 2018)
Pulmão humano	Agrotóxicos	Florisil	Hexano e diclorometano	GC-ECD	(Rallis <i>et al.</i> , 2012)
Tecido de boi	Agrotóxicos	C18	Acetonitrila	HPLC-DAD	(Valencia e de Llasera 2011)
Tecido de porco	Fluorquinolonas, carbamatos e organofosforados	C18	Hexano e acetonitrila	HPLC-DADA	(Wang <i>et al.</i> , 2011)
Sedimento marinho	Biocidas anti-incrustantes	C18	Metanol	LC-MS/MS	(Caldas <i>et al.</i> , 2018)
Solo	Agrotóxicos organofosforados	Florisil	DCM	GC-NPD	(Shen <i>et al.</i> , 2006)
Frutas e vegetais	Carbamatos	Areia	Água	LC-MSMS	(Bogialli, <i>et al.</i> , 2004)
Frango	Sulfonamidas	Alumina	Etanol e água	LC-MS/MS	(Kishida, <i>et al.</i> , 2001)
Peixe (fígado e músculo)	Micotoxinas	C18	Metanol e água	LC-MS/MS	(Laganà <i>et al.</i> , 2003)
Frutas	31 Agrotóxicos	MWCNTs	Acetona e hexano (50:50, v/v)	GC-MS	(Fang <i>et al.</i> , 2009)
Polpa de côco	Agrotóxicos	C18	Acetonitrila e hexano	GC-MS	(Acosta-Tejada <i>et al.</i> , 2011)

Matriz	Analitos	Suporte sólido	Solvente de extração	Determinação	Referência
Lodos	Agrotóxicos organofosforados	Alumina	DCM	GC-MS	(Sanchez-Brunete, <i>et al.</i> , 2008)
Solo	HPAs	Florisil	Hexano e acetona	LC-MS	(Pena <i>et al.</i> , 2007)
Solo	Agrotóxicos	Florisil	Acetona	GC-NPD	(Shen <i>et al.</i> , 2007)
Poeria	Filtros UV	C18	MeCN	GC-MS/MS	(Negreira <i>et al.</i> , 2009)
Frutos do mar	Espécies de Arsênio	C18	Água e metanol (50:50, v/v)	HPLC-ICP-MS	(Moreda-Piñeiro <i>et al.</i> , 2008)
Peixe	Espécies de Mercúrio	Sílica	NaCl e HCl	GC-MS	(Duarte <i>et al.</i> , 2013)
Cebola	Aflotoxinas	Casca de arroz e terra diatomácea	Clorofórmio e metanol	LC-MS	(CARVALHO <i>et al.</i> , 2012)
Abelha	Agrotóxicos e metabólitos	C18	Metanol	LC-MS/MS	(Totti <i>et al.</i> , 2006)

*Multi-walled carbon nanotubes - Nanotubos de carbono de paredes múltiplas, do inglês *Multi-walled carbon nanotubes*; HPA – hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

É possível observar, de acordo com a Tabela 9, que a técnica de MSPD apresenta versatilidade e robustez uma vez que tem sido aplicada para extração de diferentes analitos em diferentes tipos de matrizes, sejam elas ambientais ou alimentícias. Adicionalmente, além de ser robusta e versátil, a técnica tem sido reportada em todos os trabalhos aqui citados com precisão e exatidão aceitáveis, tanto quanto as outras técnicas tradicionalmente e usualmente reportadas na literatura.

A Tabela 10 apresenta, de forma geral, uma comparação das principais características das técnicas utilizadas para determinação de compostos orgânicos diferentes tipos de matrizes. Diante disso, a MSPD merece destaque e o fator chave para ser considerada uma técnica de sucesso se deve a sua flexibilidade, versatilidade, baixo custo de materiais e rapidez de execução. Além do mais, a técnica pode possibilitar a extração e limpeza em uma pequena alíquota da amostra, com a possível adição de outros materiais que podem minimizar a influência de interferentes. Como, por exemplo, matrizes que contenham alto teor de gorduras, a escolha do suporte sólido, além de romper a estrutura física da amostra, também pode reter seletivamente os interferentes (Capriotti *et al.*, 2013).

Tabela 10 - Comparação das principais características dos métodos de preparo de amostra mencionados nesse trabalho (Adaptado de (Liu *et al.*, 2015))

Características	Soxhlet	Extração por Ultrassom	LLE ^a	PLE ^b	MAE ^c	SPE ^d	SPME ^e	MSPD ^f	DLLME ^g
Tipo de matriz	S/L	S/L	L	S	S	S/L	S/L/G	S	L
Pré-tratamento da amostra	Sim	Não	Não	Sim	Sim	Não	Sim	Sim/Não	Não
Limpeza entre duas amostras	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	Não	Sim/Não	Não
Pressão	Não	Não	Não	Sim	Não	Sim	Não	Não	Não
Temperatura	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Não
Volume de solvente (mL)	200 – 500	100 – 300	50 – 500	15 – 45	25 – 50	50 – 100	2 – 10	5 – 100	0,1 – 10
Tempo de extração	4 – 48 h	0,5 – 1 h	12 – 48 h	12 – 20 min	0,5 – 1 h	1 – 4 h	5 – 90 min	0,5 – 2 h	5 – 20 min
Extração com solvente e extração simultânea	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	Não	Não	Não
Extração sequencial	Não	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não	Sim
Extração com purificação online	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	Não
Mudança de solvente automaticamente	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não

S - Sólido; **L** - Líquido; **G** – Gasoso; ^a Liquid-Liquid extraction; ^b Pressurized liquid extraction; ^c Microwave assisted extraction; ^d Solid-phase extraction; ^e Solid-phase microextraction; ^f Matrix solid-phase dispersion; ^g Dispersive liquid-liquid microextraction

Adicionalmente, a MSPD se destaca como uma técnica interessante no preparo de amostras no que confere as principais vantagens aqui já citadas, além do uso de pequenos volumes de solvente e alta eficiência de extração (Caldas *et al.*, 2013).

5 MATERIAIS E MÉTODOS

O desenvolvimento experimental desse trabalho foi realizado no Instituto de Diagnostico Ambiental y Estudios del Agua (IDAEA), do Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), em Barcelona, Espanha sob orientação da professora Dra. Sílvia Díaz Cruz. Essa parte do estudo, contemplada como Doutorado Sandúiche, foi financiada pela CAPES (Projeto Ciências do mar II N° 1988/2014) durante o período de julho de 2018 a fevereiro de 2019.

O CSIC é a maior instituição de pesquisa pública da Espanha e a terceira maior da Europa, sendo um de seus institutos em Barcelona o IDAEA. O IDAEA é dedicado ao estudo de mudanças naturais e antropogênicas que ocorrem em ecossistemas da geosfera utilizando ferramentas químicas e geoquímicas, especificamente aquelas que têm a ver com o aumento da toxicidade em organismos e seres humanos. Esta instituição se dedica em dois departamentos, Geociências e Química Ambiental, onde juntos possuem aproximadamente 174 pesquisadores agrupados, e ambos possuem uma alta capacidade para realizar análises químicas, estudos ambientais e geoquímicos. Entre eles, encontra-se o Laboratório de Dioxina com a maior trajetória profissional em toda a Espanha, além de um parque instrumental em cromatografia e espectrometria de massa que o coloca em uma posição de liderança a nível europeu (CSIC 2019, IDAEA 2019). O grupo de pesquisa da Química Ambiental do IDAEA, subdivide-se entre os laboratórios de solos, ruídos e líquidos, sendo este último onde o presente trabalho foi realizado.

5.1 Instrumentação

A determinação analítica neste estudo foi desenvolvida em um equipamento 4000 QTRAP™ acoplado a um sistema de espectrometria de massas de armadilha de íons triplo quadrupolo híbrido (HPLC-ESI-(QqLIT)-MS/MS) (Applied Biosystems-Sciex from Foster City, Ca, USA), equipado com um sistema HPLC

contendo um auto amostrador Alias, um injetor em “loop”, e duas bombas binárias com um seletor de solvente de quatro canais para cada (Figura 15).



Figura 15 - HPLC-ESI-(QqLIT)-MS/MS utilizado no IDAEA-CSIC

5.2 Reagentes, solventes e materiais

Padrões analíticos de alta pureza (96 – 99,9%) Benzofenona-4 (BP4), Benzofenona-3 (BP3), Benzofenona-2 (BP2), Benzofenona-1 (BP1), etil-4-(dimetil-amino)benzoato (EtPABA), 1,2,3-Benzotriazol (BZT), dimetilbenzotriazol (DMBZT), ofloxacina, ácido nalidíxico, ácido oxolínico, sulfadiazina (SDZ), sulfamerazina (SMR), sulfadimetoxina (SDM), trimetoprima, ácido mefenâmico, diclofenaco, norfluoxetina (NorFXT), cafeína, 2-(2-Benzotriazol-2-yl)-p-cresol (UVP), metilparabeno (MePB), etilparabeno (EPB), butilparabeno (BuPB), propilparabeno (PrBP), benzilparabeno (BPB), avobenzona (AVO), flumequina (FLU), succinil-sulfatiazol, N⁴-acetilsulfadiazina (acSDZ), N⁴-acetilsulfamerazina (acSMR), N⁴-acetilsulfametazina (acSMZ), sulfametoxazol (SMX), N⁴-acetilsulfametoxazol (acSMX), sulfapiridina (SPY), N⁴-acetilsulfapiridina (acSPY), gemfibrozila, naproxeno, ibuprofeno (IBU), Cetoprofeno, acetaminofeno, carbamazepina (CBZ), carbamazepina-10,11-epóxi (CBZ-10,11-epóxi), atenolol, N-desmetilvenlafaxina (N-desVFX), ácido salicílico e cafeína foram obtidos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). 4-hidroxibenzofenona (4HB), 4,4'-dihidroxibenzofenona (4DHB), 4-metilbenzilidenecâmfora (4MBC) e etilexilmetoxicinamato (EHMC), foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha). 5-metil-1H-benzotriazol (MeBT) foi fornecido pela TCI (Zwijndrecht,

Bélgica). Sulfaquinoxalina (SQX), sulfatiazol (STZ) e sulfisomidin, foram obtidos pela Fluka (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha). Irgarol, diuron, DCOIT, e diclofluanida foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Brasil). Padrões analíticos deuterados BP3-d5, 4MBC-d4, carbamazepina-d10, diclofenaco-d4, BZT-d4, flumequina-13C, sulfametazina-d4, trimetoprima-d3, gemfibrozila-d6, ácido mefenâmico-d3, BePB-d4, IBU-d3 e naproxeno-d3 foram adquiridos da CDN isotopes (Quebec, Canada). Ácido salicílico-d6 foi obtido da Sigma Aldrich (Steinheim, Alemanha) e acetaminofeno-d4 foi obtido da TRC.

Os suportes sólidos florissil, alumina e sílica foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha). C18 foi utilizado dos cartuchos da Isolute, contendo 500 mg de sorvente com capacidade de 3 mL cada um.

Os solventes água, metanol (MeOH), acetonitrila (MeCN), acetato de etila (EtAc), e diclorometano (DCM), todos de grau HPLC ou superior foram obtidos da J.T. Baker (Deventer, Holanda). Ácido fórmico (98%) e acetato de amônio ($\geq 96\%$) foram obtidos da Merck. Nitrogênio e Argônio (99,995%), foram fornecidos pela Air Liquide (Barcelona, Espanha).

Outros materiais empregados no estudo incluem, centrífuga A 5810R Eppendorf (Madrid, Espanha), vórtex-mixer Reax Control (Heildolph, Schwabach, Alemanha), balanças analíticas, micropipetas automáticas com volume variável (10 - 5000 μL) e vidrarias geral de laboratório (béquers, balões volumétricos de diferentes volumes, espátulas, pipetas, frascos de vidro âmbar, vials de 2 mL e outros).

5.3 Preparo das soluções analíticas

As soluções estoque dos padrões foram preparados por pesagem de massa apropriada para o preparo de uma solução com concentração de 100 mg L^{-1} e dissolvidas em metanol. Foi preparada uma solução trabalho com todos os padrões dos compostos na concentração de 1 mg L^{-1} também em metanol. A partir desta solução trabalho, foram realizadas as diluições necessárias para o estudo.

A solução contendo a mistura dos compostos isotopicamente marcados utilizados como padrões internos foi preparada de modo semelhante às soluções estoque e trabalho, onde foram preparadas por pesagem de massa apropriada e dissolvidas em metanol. Diluições sucessivas foram realizadas ao longo do

estudo. Todas as soluções, estoque, trabalho e dos padrões internos, foram armazenadas a -20 ° C, protegidas da luz.

5.4 Limpeza da vidraria

Algumas vidrarias utilizadas no trabalho (espátulas, balões volumétricos, béquers, provetas) foram lavadas após o uso com água abundante, água destilada, etanol e acetona. Entretanto, a grande maioria da vidraria de rotina do laboratório, incluindo os vials de 2 mL utilizados no HPLC eram descartados após o uso. Essa prática é comumente realizada no laboratório com o intuito de evitar contaminação e é de praxe dentro do grupo de pesquisa do IDAEA-CSIC.

5.5 Seleção dos analitos de estudo

Os analitos selecionados para o estudo foram escolhidos de acordo com uma revisão na literatura, onde a grande maioria dos estudos investigam compostos com muito mais frequência em amostras de água, sendo muito menos estudos focados para sedimentos. Ademais, o desenvolvimento de um método multirresíduo para sedimento (contendo fármacos, filtros UV e produtos de degradação) era uma necessidade do grupo de pesquisa.

Os compostos selecionados para o estudo, nome químico, número CAS ou número de registro (RN, do inglês *register number*), família química e algumas propriedades físico-químicas como solubilidade em água, coeficiente de partição octanol-água (Log Kow) são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 - Analitos selecionados para estudo (nome usual), nomenclatura IUPAC, Número CAS, classe, massa molecular (MM), Log Kow e solubilidade em água

Nome usual (Analito)*	Nomenclatura IUPAC	Número CAS	Classe	MM (g mol ⁻¹)	Log Kow	Solubilidade em água (a 25 °C em g L ⁻¹)
Benzofenona-3	2-Hidroxi-4-metoxibenzofenona	131-57-7	Benzofenonas	228,07	3,79	0,21
Benzofenona-1	2,4-Dihidroxibenzofenona	131-56-6	Benzofenonas	214,06	3,17	0,39
Benzofenona-2	2,2',4,4'-Tetrahidroxibenzofenona	131-55-5	Benzofenonas	246,05	2,78	0,09842
Benzofenona-4	Ácido 5-benzoil-4-hidroxi-2-metoxibenzeno sulfônico	4065-45-6	Benzofenonas	N.e**	0,37	0,65
2,2'-Dihidroxi-4- metoxibenzofenona	2,2'-Dihidroxi-4-metoxibenzofenona	131-53-3	Benzofenonas	244,07	3,82	N.e
4-Hidroxibenzofenona	4-Hidroxibenzofenona	1137-42-4	Benzofenonas	198,06	3,02	0,41
4,4'- Dihidroxibenzofenona	4,4'-Dihidroxibenzofenona	611-99-4	Benzofenonas	214,06	2,55	0,60
Avobenzona	1-(4-terc-butilfenil)-3-(4- metoxifenil)propano-1,3-diona	70356-09- 1	Benzofenonas	310,15	N.e	N.e

Octinoxato	2-Etilhexil- <i>trans</i> -4-metoxi cinamato	83834-59-7 5466-77-3	Derivados de cinamato	290,18	65,80	0,00015
Enzacameno	3-(4-Metilbenzilideno)câmfora	36861-47-9	Derivados de cânfora	254,16	4,95	0,00510
Benzocaina	Etil 4-aminobenzoato Etil <i>p</i> -aminobenzoato	94-09-7	Derivados do ácido <i>p</i> -aminobenzóico	165,07	1,86	131
Benzotriazol	1,2,3-Benzotriazol	95-14-7	Benzotriazóis	119,04	1,23	20
Metilbenzotriazol	5-Metil-1H-benzotriazol	136-85-6	Benzotriazóis	133,06	1,89	5
Dimetilbenzotriazol	5,6-Dimetil-1H-benzotriazol	4184-79-6	Benzotriazóis	165,09	2,06	N.e
Hidroxifenilbenzotriazol	2-(5-terc-Butil-2-hidroxifenil)-benzotriazol	3147-76-0	Derivados dos benzotriazóis	267,13	3,24	0,01359
Metilparabeno	Metil 4-hidroxibenzoato	99-76-3	Parabenos	152,04	N.e	N.e
Etilparabeno	Etil 4-hidroxibenzoato	120-47-8	Parabenos	166,06	N.e	N.e
Propilparabeno	Propil 4-hidroxibenzoato	94-13-3	Parabenos	180,07	N.e	N.e
Butilparabeno	Butil 4-hidroxibenzoato	94-26-8	Parabenos	194,09	N.e	N.e
Flumequina	Ácido 9-Fluor-5-metil-1-oxo-1,5,6,7-tetrahidropirido[3,2,1]quinolina-2-carboxílico	42835-25-6	Fluorquinolonas	261,25	N.e	2,19
Ácido nalidíxico	Ácido 1-Etil-7-metil-4-oxo-1,4-dihidro-1,8-naftiridina-3-carboxílico	389-08-2	Quinolonas	232,23	1,41	0,1
Ácido oxolínico	Ácido 5-Etil-8-oxo-5,8-dihidro-[1,3]dioxolo[4,5-g]quinoline-7-carboxílico	14698-29-4	Quinolonas	261,23	N.e	N.e
Succinil-Sulfatiazol	Ácido 4-oxo-4-[4-(1,3-tiazol-2-Isulfamoil)anilino]butanóico	116-43-8	Sulfonamidas	355,38	N.e	0,0514
Sulfadiazina	4-amino-N-pirimidin-2-lbenzenosulfonamida	68-35-9	Sulfonamidas	250,27	N.e	0,077

N ⁴ -acetilsulfadiazina	N-[4-(pirimidin-2-ylsulfamoil)fenil]acetamida	127-74-2	Sulfonamidas	292,31	N.e	N.e
Sulfamerazina	4-amino-N-(4-metilpirimidin-2)benzenosulfonamida	127-79-7	Sulfonamidas	264,30	N.e	0,202 (a 20 °C)
N ⁴ -acetilsulfamerazina	N-[4-[(4-metilpirimidin-2)sulfamoil]fenil]acetamida	127-73-1	Sulfonamidas	306,34	N.e	>0,046
N ⁴ -acetilsulfametazina	N-[4-[(4,6-dimetilpirimidin-2)sulfamoil]fenil]acetamida	100-90-3	Sulfonamidas	320,36	N.e	N.e
Sulfametoxazol	4-amino-N-(5-metil-1,2-oxazol-3)benzenosulfonamida	723-46-6	Sulfonamidas	253,27	N.e	0,61 (a 37 °C)
N ⁴ -acetilsulfametoxazol	4-Acetilamino-N-(5-metil-3-isoxazolil)benzenosulfonamida	21312-10-7	Sulfonamidas	295,31	N.e	N.e
Sulfametoxipiridazina	4-amino-N-(6-metóxipiridazin-3)benzenosulfonamida	80-35-3	Sulfonamidas	280,30	N.e	N.e
Sulfapiridina	4-amino-N-piridina-2-benzenosulfonamida	144-83-2	Sulfonamidas	249,28	N.e	0,268
N ⁴ -acetilsulfapiridina	N-[4-(piridina-2-sulfamoil)fenil]acetamida	19077-98-6	Sulfonamidas	291,32	N.e	N.e
Sulfaquinoxalina	4-amino-N-quinoxalin-2-lbenzenosulfonamida	59-40-5	Sulfonamidas	300,33	1,68	0,0075
Sulfatiazol	4-amino-N-(1,3-tiazol-2)benzenosulfonamida	72-14-0	Sulfonamidas	255,31	0,05	0,373
Sulfisomidin	4-amino-N-(2,6-dimetilpirimidin-4)benzenosulfonamida	515-64-0	Sulfonamidas	278,33	N.e	N.e
Sulfadimetoxina	4-amino-N-(2,6-dimetóxipirimidin-4)benzenosulfonamida	122-11-2	Sulfonamidas	310,32	N.e	0,343
Trimetoprima	5-[(3,4,5-trimetóxifenil)metil]pirimidine-2,4-diamino	738-70-5		290,32	0,91	0,4

Acetaminofen	N-(4-hidroxyfenil)acetamida	103-90-2	Anti-inflamatório	151,16	N.e	14
Atenolol	Ácido 2-[4-[2-hidroxy-3-(propan-2-ylamino)propoxy]fenil]acetamida	29122-68-7	B-bloqueadores	266.34	0,16	13,3
Gemfibrozila	5-(2,5-dimetilfenoxi)-2,2-dimetilpentanóico	25812-30-0	Reguladores lipídicos	250.33	4,77	0,0278
Cetoprofeno	Ácido 2-(3-benzoilfenil)propanóico	22071-15-4	Analgésicos	254.28	N.e	0,0213
Ácido mefenâmico	Ácido 2-(2,3-dimetilanilino)benzoico	61-68-7	Analgésicos	241.29	N.e	0,02 (a 30 °C)
Naproxen	(2S)-2-(6-metóxinaphthalen-2-il)propanóico	22204-53-1	Anti-inflamatórios	230.26	3,18	0,0159
Carbamazepina	benzo[b][1]benzazepina-11-carboxamida	298-46-4	Antiepilépticos	236,27	2,45	0,0177
Carbamazepina-10,11-epóxi	Carbamazepina-10,11-epóxi	36507-30-9	Antiepilépticos	252,27	N.e	N.e
Norfluoxetina	3-fenil-3-[4-(trifluorometil)fenoxi]propan-1-amina	83891-03-6	Antidepressivos	295,30	N.e	N.e
Ofloxacina	Ácido 9-fluor-3-metil-10-(4-metilpiperazin-1-il)-7-oxo-2,3-dihidro-7H-[1,4]oxazino[2,3,4-ij]quinolina-6-carboxílico	82419-36-1	Fluoroquinolonas	361,37	-0,39	0,0283
Cafeína	Ácido 1,3,7-trimetilpurina-2,6-diona	58-08-2	Estimulantes	194,19	-0,07	21,6
Ciprofloxacina	1-ciclopropyl-6-fluoro-4-oxo-7-piperazin-1-quinolina-3-carboxílico	85721-33-1	Fluoroquinolonas	331,34	0,28	30 (a 20 °C)
N-desmetilvenlafaxina	N-desmetilvenlafaxino		Antidepressivos	263,38	N.e	N.e
Ácido salicílico	Ácido 2-hidroxibenzóico	N.e	Anti-septicos	N.e	N.e	N.e
Ibuprofeno	Ácido (RS)-2-(4-(2-metilpropil)fenil)propanóico	N.e	Anti-inflamatório	N.e	N.e	N.e

Diuron	1-(3,4-Diclorofenil)-3,3-dimetilurea	330-54-1	Feniluréia, Biocida e herbicida	233,09	2,82	35 – 36,4
Irgarol	2-(Terc-butilamino)-4-ciclopropilamino)-6-(metiltio)-1,3,5-triazina	28159-98-0	s-trizina, biocida e herbicida	253,37	2,8 – 4,1	6,0 – 7,0
DCOIT	4,5-Dicloro-2- <i>n</i> -octil-3-(2 <i>H</i>)-isotiazolin-3-ona	64359-81-5	Isotiazolona, Biocida e herbicida	282,23	2,85	0,0065 - 14
Diclofluanida	N'-Dimetil-N-fenilsulfamida	1085-98-9	Organoclorado, Biocida e fungicida	333,23	2,8 – 3,7	0,006 – 1,3

*A definição dos acrônimos referente a cada composto se encontra na seção 5.2 dessa tese

**N.e, não encontrado

5.6 Amostragem

5.6.1 Amostras de sedimento

As amostras de sedimento foram coletadas pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Microcontaminantes Orgânicos e Ecotoxicologia Aquática (CONECO-FURG) no Sistema Estuarino de Santos e São Vicente (SP) com o auxílio de uma draga tipo Eckman com o apoio de parceiros da Rede Nacional de Estudos em Anti-incrustantes (RNEA). As amostras foram coletadas em áreas sob influência de atividade marítima e com a presença de sedimentos finos. Foram coletadas as camadas superficiais em 7 pontos diferentes nessa região, considerando a existência de fontes potenciais de biocidas anti-incrustantes (terminais portuários e marinas). Após a coleta, os sedimentos foram transportados ao laboratório, liofilizados e caracterizados pela granulometria e teor de carbono orgânico.

5.6.2 Amostras de peixe

As amostras de peixe foram coletadas pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Microcontaminantes Orgânicos e Ecotoxicologia Aquática (CONECO-FURG) e pertenciam a espécie *Micropogonias furnieri* (nome comum: corvina). Os tecidos foram reunidos de um grupo de peixes com as seguintes características: comprimento cabeça-início nadadeira caudal meio: $11,25 \pm 1,99$ cm, coletados com o auxílio de uma rede de arrasto na Vila da Barra em Rio Grande, RS. Após, as amostras foram transportadas ao laboratório, separados nos respectivos tecidos analisados e liofilizadas.

5.7 Condições instrumentais do HPLC-ESI-(QqLIT)-MS/MS

As condições empregadas neste estudo foram baseadas em trabalhos prévios desenvolvidos por (Gago-Ferrero *et al.*, 2011, Gago-Ferrero *et al.*, 2013, Serra-Roig *et al.*, 2016). Vale ressaltar que estes foram desenvolvidos para análise de alguns filtros UV e PCPs; e neste estudo além destes compostos foram inseridos os biocidas anti-incrustantes (diuron, irgarol, DCOIT e diclofluanida).

A separação cromatográfica foi realizada com uma coluna analítica Purospher® STAR® HR R-18 (50 mm × 2,0 mm, 5 µm) obtida da Merck. Os dados obtidos foram adquiridos e interpretados pelo software Analyst versão 1.4.2 (Applied Biosystems).

A eluição dos compostos em estudo no sistema HPLC foi realizada em uma vazão 0,3 mL min⁻¹ com as fases móveis selecionadas para cada modo de ionização. No modo positivo, a fase móvel utilizada consistiu de uma mistura de água ultrapura e metanol (ambos com 0,1% de ácido fórmico). No modo de ionização negativo (NI, do inglês *negative ionization*), a fase móvel utilizada foi composta por água ultrapura e metanol (ambos com 5 mM de acetato de amônio). O volume de injeção foi de 20 µL em ambos os modos, em todas as análises.

A detecção no MS/MS foi realizada sob o monitoramento de reações selecionadas (SRM, do inglês *Selected Reaction Monitoring*) modo utilizado para obter a sensibilidade máxima para a detecção dos compostos alvo, sendo os íons molecular e precursor selecionados e monitorados para cada analito. As transições mais abundantes e as segundas mais abundantes foram utilizadas para quantificação e confirmação, respectivamente.

As infusões diretas no espectrômetro de massas com soluções analíticas de 250 ng mL⁻¹ foram realizadas individualmente, afim de otimizar as melhores condições de fragmentação dos íons monitorados. Para isto foram avaliados os seguintes parâmetros: modo de ionização (positivo ou negativo), voltagem do cone para selecionar o íon precursor, energia de colisão para fragmentar o íon precursor e gerar os íons produto, temperatura da fonte, temperatura e vazão do gás de dessolvatação para secagem do solvente e potencial de saída de célula de colisão. Essa etapa é considerada determinante para selecionar os íons a serem monitorados bem como a quantificação dos compostos de estudo.

Para ambos modos, as principais condições gerais de operação foram fixadas. No modo positivo, foram as seguintes: voltagem do capilar: 5000 V, temperatura da fonte de dessolvatação: 700 °C, pressão do gás de dessolvatação: 30 psi, pressão da fonte 1: 50 psi, pressão da fonte 2: 60 psi, potencial de entrada: 10 V. Para o modo negativo, foram como segue: voltagem do capilar: -4000 V, temperatura da fonte de dessolvatação: 500 °C, pressão do

gás de dessolvatação 20 psi, pressão da fonte 1: 50 psi, pressão da fonte 2: 60 psi e potencial de entrada: -10 V.

A Tabela 12 apresenta os principais parâmetros e as transições selecionadas no modo SRM. Esses parâmetros foram otimizados por infusão com soluções analíticas, como citado anteriormente, no espectrômetro de massas para cada composto. Tal como acima referido e de acordo com os requisitos mais exigentes em matéria de confirmação espectrométrica de massa atualmente definidos na UE (Decisão 2002/657 / CE da Comissão), duas transições têm de ser registradas para cada analito, a fim de obter um número suficiente de pontos de identificação para uma confirmação adequada.

Tabela 12 - Tempo de retenção (t_R , em minutos), transições monitoradas, modo de ionização, voltagem do cone (VC), energia de colisão (EC), potencial de saída da célula de colisão (CxP) e padrão interno correspondente utilizado para cada composto em estudo

Analito	t_R (min)	Transições	VC (V)	EC (eV)	CxP (eV)	Modo de ionização	Padrão interno correspondente
BP3	11,18	229>151*	40	25	12	[M+H] ⁺	BP3-d5
		229>105	40	27	16		
BP1	10,05	215>137*	40	27	10	[M+H] ⁺	BP3-d5
		215>105	40	29	6		
BP2	8,89	247>137*	46	25	8	[M+H] ⁺	BP3-d5
		247>109	46	45	8		
BP4	6,60	307>227*	-50	-34	-15	[M-H] ⁻	Gemfibrozila-d6
		307>211	-50	-46	-9		
4HB	9,49	199>121*	40	25	8	[M+H] ⁺	BP3-d5
		199>105	40	27	8		
4DHB	8,47	215>121*	45	27	8	[M+H] ⁺	BP3-d5
		215>93	45	45	60		
DHMB	10,33	245>121*	43	27	12	[M+H] ⁺	BP3-d5
		245>151	43	29	8		
AVO	12,94	311>135*	40	25	15	[M+H] ⁺	BP3-d5
		311>161	40	25	15		
4MBC	9,85	255>105*	61	41	6	[M+H] ⁺	4MBC-d4
		255>212	61	29	14		
EHMC	12,75	291>179*	51	13	4	[M+H] ⁺	4MBC-d4
		291>161	51	25	10		
EtPABA	8,57	166>138*	41	20	10	[M+H] ⁺	4MBC-d4

Analito	t _R (min)	Transições	VC (V)	EC (eV)	CxP (eV)	Modo de ionização	Padrão interno correspondente
BZT	7,24	166>120	41	25	28	[M+H] ⁺	BZT-d4
		120>65*	56	31	4		
		120>92	56	25	16		
MeBZT	8,27	134>79*	46	29	10	[M+H] ⁺	BZT-d4
		134>95	46	35	14		
DMBZT	8,89	148>77*	56	39	2	[M+H] ⁺	BZT-d4
		148>93	56	27	6		
UVP	12,47	226>120*	46	25	10	[M+H] ⁺	BZT-d4
		226>107	46	19	18		
BePB	7,99	227>92*	-65	-26	-9	[M-H] ⁻	BePB-d4
		227>136	-65	-22	-1		
BuPB	8,03	193>137*	-55	-22	-5	[M-H] ⁻	BePB-d4
		193>92	-55	-34	-13		
PrPB	7,68	179>92*	-60	-30	-13	[M-H] ⁻	BePB-d4
		179>137	-60	-24	-5		
MePB	6,90	151>92*	-45	-28	-7	[M-H] ⁻	BePB-d4
		151>136	-45	-20	-9		
Flumequina	9,37	262>244*	51	29	14	[M+H] ⁺	Flumequina-13C
		262>202	51	45	10		
Ofloxacina	7,63	362>318*	56	29	18	[M+H] ⁺	Sulfametazina-d4
		362>261	56	41	18		
Ciprofloxacina	6,80	332>288*	91	27	14	[M+H] ⁺	Trimetoprima-d3
		332>231	91	51	4		
Ácido nalidíxico	9,13	233>215*	61	19	14	[M+H] ⁺	Flumequina-13C

Analito	t _R (min)	Transições	VC (V)	EC (eV)	CxP (eV)	Modo de ionização	Padrão interno correspondente
Ácido oxolínico	9,37	233>187	61	37	12	[M+H] ⁺	Flumequina-13C
		262>244*	36	25	12		
		262>216	36	41	16		
Succinil-Sulfatiazol	6,68	356>256*	71	25	16	[M+H] ⁺	Sulfametazina-d4
		356>192	71	33	16		
SDZ	5,23	251>156*	46	27	10	[M+H] ⁺	Sulfametazina-d4
		251>108	46	30	8		
acSDZ	6,42	293>134*	65	30	12	[M+H] ⁺	Sulfametazina-d4
		293>198	65	30	12		
SMR	5,93	265>156*	61	27	8	[M+H] ⁺	Sulfametazina-d4
		265>92	61	47	6		
acSMR	6,77	307>134*	60	35	8	[M+H] ⁺	Sulfametazina-d4
		307>110	60	35	8		
SMZ	8,73	279>59*	36	27	4	[M+H] ⁺	Sulfametazina-d4
		279>87	36	19	14		
acSMZ	7,04	321>134*	86	35	4	[M+H] ⁺	Sulfametazina-d4
		321>124	86	35	4		
SMX	7,06	254>108*	56	27	10	[M+H] ⁺	Sulfametazina-d4
		254>156	56	25	10		
acSMX	7,80	296>198*	60	30	10	[M+H] ⁺	Sulfametazina-d4
		296>134	60	30	10		
SMPZ	6,68	281>126*	66	27	12	[M+H] ⁺	Sulfametazina-d4
		281>156	66	27	14		
SPY	5,65	250>156*	51	28	12	[M+H] ⁺	Sulfametazina-d4

Analito	t _R (min)	Transições	VC (V)	EC (eV)	CxP (eV)	Modo de ionização	Padrão interno correspondente
acSPY	6,52	250>92	51	31	6	[M+H] ⁺	Sulfametazina-d4
		292>134*	70	30	8		
		292>198	70	30	8		
SQX	8,20	301>156*	76	25	10	[M+H] ⁺	Sulfametazina-d4
		301>92	76	47	12		
STZ	5,49	256>156*	40	25	14	[M+H] ⁺	Sulfametazina-d4
		256>92	40	25	10		
Sulfisomidin	6,42	279>124*	76	33	8	[M+H] ⁺	Sulfametazina-d4
		279>186	76	23	14		
SDM	8,03	311>356*	76	31	8	[M+H] ⁺	Sulfametazina-d4
		311>92	76	31	6		
Trimetoprima	6,15	291>230*	76	33	20	[M+H] ⁺	Trimetoprim-d3
		291>261	76	35	12		
Gemfibrozilaa	8,47	249>121*	-50	-26	-23	[M-H] ⁻	Gemfibrozila-d6
		249>127	-50	-12	-21		
Ácido mefenâmico	11,46	242>224*	46	23	22	[M+H] ⁺	Ácido mefenâmico - d3
		242>209	46	41	14		
Naproxeno	7,18	229>169*	-30	-40	-9	[M-H] ⁻	Naproxen-d3
		229>170	-30	-22	-1		
IBU	7,86	205>159*	-30	-10	-41	[M-H] ⁻	IBU-d3
		205>161	-30	-14	-35		
Cetoprofenoo	9,78	255>105*	66	33	18	[M+H] ⁺	BP3-d5
		255>209	66	25	10		
Diclofenaco	7,70	295>251*	-40	-16	-7	[M-H] ⁻	Diclofenaco-d4

Analito	t _R (min)	Transições	VC (V)	EC (eV)	CxP (eV)	Modo de ionização	Padrão interno correspondente
Acetaminofeno	5,21	295>215	-40	-30	-19	[M+H] ⁺	Trimetoprim-d3
		152>110*	71	23	18		
		152>65	71	45	10		
CBZ	9,18	237>194*	61	29	14	[M+H] ⁺	Carbamazepina-d10
		237>192	61	31	12		
CBZ-10,11-epóxi	8,34	253>180*	36	35	12	[M+H] ⁺	Carbamazepina-d10
		253>151	36	109	10		
Atenolol	4,43	267>116*	46	31	8	[M+H] ⁺	Trimetoprima-d3
		267>133	46	39	22		
N-desVFX	6,93	264>58*	31	57	18	[M+H] ⁺	Trimetoprima-d3
		264>133	31	39	46		
Ácido salicílico	4,76	137>93*	-50	-18	-1	[M-H] ⁻	Ácido salicílico-d6
		137>65	-50	-40	-3		
Cafeína	6,79	195>109*	56	31	8	[M+H] ⁺	Trimetoprima-d3
		195>138	56	29	10		
Diuron	9,80	233>72*	81	39	12	[M+H] ⁺	BP3-d5
		233>46	81	37	0		
Irgarol	9,96	254>198*	61	25	12	[M+H] ⁺	BZT-d4
		254>68	61	69	10		
		254>83*	61	41	4		
DCOIT	11,76	282>169	66	21	10	[M+H] ⁺	BP3-d5
		282>43*	66	51	0		
		282>57	66	33	8		

Analito	t_R (min)	Transições	VC (V)	EC (eV)	CxP (eV)	Modo de ionização	Padrão interno correspondente
		333>123*	61	37	8		
Diclofluanida	10,50	333>223	61	17	8	[M+H] ⁺	Carbamazepina-d10

*- Transições usadas para quantificação

Tabela 13 - Condições empregadas no sistema cromatográfico

Parâmetros	HPLC-ESI-(QqLIT)-MS/MS
Coluna analítica	Purosher® STAR® HR R-18 (50 mm × 2.0 mm, 5 µm)
Fases móveis	Modo positivo: H ₂ O com 0,1% (v/v) de ácido fórmico (A), MeOH com 0,1% (v/v) de ácido fórmico (B) Modo negativo: H ₂ O com 5 mM de acetato de amônio (A), MeOH com 5 mM de acetato de amônio (B)
Volume de injeção	20 µL
Fonte de ionização	ESI
Detector	Espectrômetro de massas com analisador de armadilha de íons

De forma geral, as fases móveis mais utilizadas em cromatografia de fase reversa são as misturas metanol e água ou acetonitrila e água. Com ajuste da força cromatográfica e a seletividade da fase móvel escolhida até a obtenção de resolução suficiente para que ocorra a separação de todos os picos cromatográficos. A adição de modificadores como o ácido fórmico, acético, acetato de amônio e amônia, por exemplo, é realizada com o intuito de favorecer o processo de ionização dos analitos através do ajuste do pH do meio, melhorando suas interações com a fase móvel e estacionária. Adicionalmente, o controle do pH do meio também pode ser realizado através do uso de fases móveis tamponadas (Alba 2004).

Nesse trabalho, os solventes empregados como fase móvel foram água e metanol em ambos modos. No modo positivo água e metanol foram acidificados com ácido fórmico, já no modo negativo os mesmos solventes foram utilizados com acetato de amônio. De forma geral e como citado anteriormente, juntamente com a água, o metanol é considerado um dos solventes mais utilizados em fase reversa, e dentre os modificadores da fase móvel, o ácido acético e o ácido fórmico merecem destaque por sua capacidade de favorecer a ionização. Analitos altamente polares e com muitos substituintes em sua estrutura, como os que fazem parte desse trabalho, tendem a apresentar melhores respostas na cromatografia líquida de fase reversa devido a maior solubilidade em fases móveis aquosas assim como a interação favorecida com as fases estacionárias

mais utilizadas, como C18 e C8, resultando em uma maior eficiência e melhora da resolução cromatográfica (Alba 2004, LANÇAS 2009).

As Tabelas 14 e 15 apresentam as condições de eluição empregadas no modo de ionização positivo e negativo, respectivamente, bem como o gradiente utilizado durante todas as análises cromatográficas.

Tabela 14 - Gradiente de eluição utilizado no modo ESI+, vazão de 0,3 mL min⁻¹

Tempo (min)	H₂O com 0,1% de ácido fórmico (%)	MeOH com 0,1% de ácido fórmico (%)
0	95	5
7	25	75
10	0	100
15	0	100
17	95	5
23	95	5

Tabela 15 - Gradiente de eluição empregadas no modo ESI-, vazão de 0,3 mL min⁻¹

Tempo (min)	H₂O com 5 mM de acetato de amônio	MeOH com 5 mM de acetato de amônio
0	95	5
3	50	50
6	10	90
13	0	100
17	0	100
18	95	5
20	95	5

De forma geral, os compostos como os da classe das benzofenonas, sulfonamidas e benzotriazóis são ionizados no modo positivo pois possuem a tendência a ganhar um próton através do uso de modificadores como os ácidos carboxílicos. Já compostos como o ácido salicílico e os parabenos, os quais possuem o grupo hidroxila em suas estruturas, são ionizados no modo negativo

pois apresentam a tendência de perder um próton através da utilização de modificadores básicos (LANÇAS 2009).

5.8 Uso de padrão interno

Para avaliação do uso de padrão interno, foram construídas duas curvas analíticas. Uma apenas comparando as áreas de cada analito, e outra, as áreas obtidas divididas pela área do respectivo composto marcado isotopicamente utilizado para cada analito.

Os padrões internos utilizados nesse trabalho, no modo positivo e modo negativo foram BP3-d5, 4MBC-d4, BZT-d4, Flumequina-13C, Sulfametazina-d4, Trimetoprima-d3, Carbamazepina-d10, Gemfibrozila-d6, Ácido mefenâmico-d3, BePB-d4, IBU-d3, Naproxeno-d3, Ácido salicílico-d6, Diclofenaco-d4 e Acetaminofeno-d4. A Tabela 16 apresenta os padrões internos utilizados e suas respectivas informações cromatográficas usadas durante todo o estudo.

Tabela 16 - Padrões internos utilizados, transições monitoradas, voltagem do cone (VC), energia de colisão (EC), potencial de saída da célula de colisão (CxP), tempo de retenção (t_R em minutos) e modo de ionização correspondente para cada composto em estudo

Padrão interno	Transições	VC (V)	EC (V)	CxP (eV)	t_R (min)	Modo de ionização
BP3-d5	234>151	36	27	12	9,2	[M-H] ⁺
4MBC-d4	259>216	76	27	14	10,8	[M-H] ⁺
BZT-d4	124>96	81	25	6	4,5	[M-H] ⁺
Flumequina-13C	265>247	51	31	20	6,7	[M-H] ⁺
Sulfametazina-d4	283>96	26	35	5	4,6	[M-H] ⁺
Trimetoprima-d3	294>230	72	35	10	3,9	[M-H] ⁺
Carbamazepina-d10	247>204	71	29	18	8,3	[M-H] ⁺
Gemfibrozila-d6	257>239	26	9	14	9,2	[M-H] ⁺
Ácido mefenâmico-d3	245>227	66	17	8	10,9	[M-H] ⁺
BePB-d4	231>40	-60	-25	-10	6,4	[M-H] ⁻
Gemfibrozila-d6	255>121	-60	-24	-21	6,7	[M-H] ⁻
Ácido mefenâmico-d3	243>199	-65	-22	-35	5,0	[M-H] ⁻
IBU-d3	208>164	-25	-15	-15	5,4	[M-H] ⁻
Naproxeno-d3	232>171	-25	-40	-13	4,3	[M-H] ⁻
Ácido salicílico-d6	142>98	-40	-28	-11	3,4	[M-H] ⁻
Diclofenaco-d4	299>255	-45	-18	-21	5,1	[M-H] ⁻

Padrão interno	Transições	VC (V)	EC (V)	CxP (eV)	t _R (min)	Modo de ionização
Acetaminofeno-d4	154>11	-65	-26	-15	3,3	[M-H] ⁻

5.9 Avaliação da técnica de VA-MSPD para a extração multirresíduo de compostos orgânicos em sedimento

A VA-MSPD foi otimizada afim de obter recuperações na faixa de 70 a 120% com RSD menor ou igual a 20% para todos os compostos em estudo. Como o foco do trabalho inicialmente era a determinação dos biocidas, o estudo partiu das condições estabelecidas no estudo de Batista-Andrade *et al.*, (2016), onde os autores utilizaram a VA-MSPD como técnica de preparo de amostra para extração de diuron, irgarol, TCMTB e DCOIT em amostras de sedimento.

Entretanto embora o objetivo inicial fosse a determinação dos biocidas, o escopo do trabalho foi expandido e a inserção de outros analitos de diferentes classes exigiu que algumas condições da técnica fossem avaliadas.

As condições iniciais empregadas no estudo foram: 2 g de amostra, 0,25 g de C18 como suporte sólido e 5 mL do solvente de extração. Logo após, a mistura macerada foi transferida para um tubo de polipropileno de 15 mL, agitado em vórtex por 1 minuto e centrifugado por 10 minutos a 4000 rpm. Por fim, uma alíquota do extrato foi retirada para injeção no sistema cromatográfico (Batista-Andrade *et al.*, 2016).

Vale ressaltar que todos os testes de otimização desse trabalho, tanto para sedimento como para peixe, foram realizados levando em consideração um tempo de 30 minutos de interação entre a solução contendo todos os compostos de estudo e as amostras e em triplicata onde cada réplica foi injetada 3 vezes no sistema cromatográfico. Além do mais, as amostras foram fortificadas com uma solução de todos os analitos em metanol a 50 ng mL⁻¹ para avaliação das recuperações. A escolha do nível de fortificação foi definida por ser uma concentração intermediária nas curvas de calibração avaliadas. Adicionalmente, após a obtenção dos extratos, foi adicionado em cada vial a mistura dos padrões internos, citados anteriormente, em uma concentração de 50 ng mL⁻¹.

5.9.1 Escolha do solvente

Devido a diferença de polaridade e propriedades físico-químicas dos compostos, e com base em uma ampla revisão na literatura, foram avaliados solventes com diferentes polaridades, sendo eles: metanol, etanol, acetato de etila e acetonitrila. Além disso, estes solventes vêm sendo empregados para extração de compostos similares ao deste estudo em matrizes sólidas como sedimento.

5.9.2 Escolha do suporte sólido

Após a escolha do solvente de extração, diferentes suportes sólidos foram testados na VA-MSPD, entre eles o C18, florissil, alumina, sílica e um material polimérico (Strata-X). Adicionalmente, um experimento empregando apenas o sedimento sem suporte sólido, também foi realizado, onde para isso, 2 g de sedimento foi macerado por 5 minutos sem suporte sólido.

5.10 Avaliação da técnica de VA-MSPD para a extração multirresíduo de compostos orgânicos em peixe

Assim como no método desenvolvido para sedimento, a VA-MSPD foi otimizada afim de obter recuperações na faixa entre 70 a 120% com RSD menor ou igual a 20% para a maioria dos compostos do estudo. Como essa etapa do trabalho foi realizada posterior ao estudo desenvolvido para sedimento, as condições iniciais foram baseadas no estudo anterior. Entretanto, considerando que para matrizes de biota a massa de amostra que se obtém é muito pequena, esse fator foi levando em consideração na condição inicial do estudo de otimização para peixes. Com isso, as condições iniciais empregadas foram: 0,5 g de massa de amostra, 2 g de suporte sólido e 5 mL de solvente de extração. Vale ressaltar que as etapas de otimização e validação foram realizadas com uma amostra de músculo de peixe liofilizado. Otimizado e validado, o método foi aplicado para músculo, brânquias, estômago e fígado da espécie *Micropogonias furnieri* (nome comum: corvina).

5.10.1 Escolha do solvente

Nesta etapa, foram avaliados os solventes que apresentaram as melhores recuperações quando avaliados para a extração dos mesmos compostos nas amostras de sedimento.

5.10.2 Escolha do suporte sólido

Os suportes sólidos escolhidos para otimização da VA-MSPD em peixe foram C18, florisil, sílica, alumina. Adicionalmente, um experimento com a amostra sem suporte sólido foram testados e avaliados em termos de recuperação.

5.11 Validação

Nesse trabalho, ambos métodos analíticos foram validados segundo as principais figuras de mérito dos guias de validação (SANTE 2017, INMETRO 2018). Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) (instrumental e do método), curvas analíticas, faixa linear, exatidão (recuperação), precisão (repetibilidade e precisão intermediária) e, adicionalmente, efeito matriz (%) (ME, do inglês *matrix effect*) foram avaliados.

5.11.1 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Os limites de detecção e limites de quantificação foram determinados como a menor concentração de composto injetado que produziu uma relação sinal-ruído (S/N) com relação de 3 (LOD) e 10 (LOQ), respectivamente.

Os limites instrumentais foram obtidos através da curva de calibração preparada no solvente (metanol). Logo após a obtenção dos limites instrumentais (em ng mL⁻¹), foi considerado o volume de solvente e massa de amostra utilizada na VA-MSPD para obtenção dos limites do método (em ng g⁻¹). Os valores foram comprovados experimentalmente, e foram considerados como verdadeiros uma vez que as amostras fortificadas obtiveram recuperações entre 70 e 120% com RSD ≤20% para a maioria dos compostos (SANTE 2017).

5.11.2 Curvas de calibração e linearidade

Devido às diferentes respostas analíticas dos compostos de estudo, as curvas analíticas de calibração responderam em diferentes faixas de concentração. As curvas foram construídas com pelo menos 5 níveis de calibração para cada analito e foram preparadas através da dissolução da solução padrão contendo os analitos de estudo, construída no solvente (metanol) e no extrato da matriz (peixe e sedimento) após extração por VA-MSPD e foram avaliadas em relação ao coeficiente de correlação linear (r).

5.11.3 Exatidão e precisão

A exatidão foi avaliada por ensaios de recuperação, determinados em três níveis diferentes de concentração, em triplicata de extração e triplicatas de injeção. Para isso, foram adicionadas às amostras de sedimento quantidades conhecidas da mistura contendo os compostos de estudo, e após as amostras passaram pelo processo de extração (INMETRO 2018).

A precisão foi calculada em termos de repetibilidade (RSD_r) e precisão intermediária (RSD_{pi}). Para a repetibilidade, as amostras de sedimento foram fortificadas em 3 diferentes níveis seguindo o procedimento de extração, e injetadas no mesmo dia, pelo mesmo analista e nas mesmas condições no sistema cromatográfico. A precisão intermediária foi realizada de modo semelhante, entretanto o procedimento de extração foi realizado em dias diferentes.

5.11.4 Efeito matriz

O efeito matriz de cada composto foi avaliado comparando o coeficiente angular das curvas analíticas de calibração preparadas em solvente (metanol) e no extrato da VA-MSPD. Em teoria, e de acordo com Economou *et al.*, (2009) o efeito matriz geralmente é reconhecido como uma supressão ou enriquecimento do sinal analítico devido aos componentes da matriz, e tem sido amplamente estudado e reconhecido como uma fonte de erro na análise quantitativa de LC-MS/MS. Nesse trabalho, o efeito matriz foi calculado como descreve a equação 1. Vale ressaltar que ambas as curvas de calibração continham a mistura de padrões internos em uma concentração fixa de 50 ng mL⁻¹.

$$EM (\%) = \frac{\text{Coeficiente angular (X1)} - \text{Coeficiente angular (X2)}}{\text{Coeficiente angular (X2)}} \times 100 \quad (1)$$

Onde:

X1 – coeficiente angular da curva de calibração obtida pela injeção das soluções analíticas de cada analito preparada no extrato da matriz;

X2 – coeficiente angular da curva de calibração obtida pela injeção das soluções analíticas de cada analito preparada no solvente (metanol);

Os efeitos devidos aos componentes da matriz foram classificados de acordo com o aumento ou supressão do sinal em %. São considerados baixos para uma faixa de supressão/aumento de sinal de $\pm 20\%$, médio para faixas de $\pm 20\%$ e $\pm 50\%$ e alto para valores superior a 50% ou inferior a -50% (Economou *et al.*, 2009).

5.12 Aplicabilidade

Após validação dos métodos, estes foram aplicados em amostras de sedimento e em tecidos de peixes (brânquias, estômago e fígado). As amostras de sedimento foram coletadas em diferentes pontos de amostragem na região de Santos (SP, BR) pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Microcontaminantes Orgânicos e Ecotoxicologia Aquática (CONECO) e no Estaleiro Irmãos Fernandes de Rio Grande pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Análises de Compostos Orgânicos e Metais (LACOM). Os peixes analisados pertenciam a espécie *Micropogonias furnieri* (nome comum: corvina). Esses tecidos foram reunidos de um grupo de peixes com as seguintes características: comprimento cabeça-início nadadeira caudal meio: $11,25 \pm 1,99$ cm, coletados com rede de arrasto na Vila da Barra em Rio Grande, RS.

5.13 Tratamento dos resíduos gerados

Os resíduos gerados durante este trabalho foram colocados em frascos rotulados e devidamente identificados para posterior disposição final por parte do IDAEA-CSIC.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Condições instrumentais

A fonte de ionização a pressão atmosférica (API) utilizada foi a ESI devido a moderada polaridade da maioria dos analitos, onde, geralmente, é a interface mais indicada para compostos neutros e polares, que podem ser protonados ou desprotonados em condições apropriadas de pH. Adicionalmente, a ESI é geralmente a fonte preferida para compostos como os agrotóxicos e os PPCPs, uma vez que é uma técnica mais branda que a APCI é menos suscetível a degradações térmicas uma vez que a ionização ocorre direto na fase líquida a temperaturas quase ambiente (LANÇAS 2009).

Estabelecidas as condições cromatográficas, um cromatograma no modo de íons totais da separação foi obtido para os compostos de estudo, em ambos modos (positivo e negativo) separadamente. A Figura 16 ilustra o cromatograma no modo positivo e a Figura 17 no modo negativo, respectivamente. Ambos foram obtidos pela injeção de solução contendo todos os compostos em metanol a 700 ng mL^{-1} .

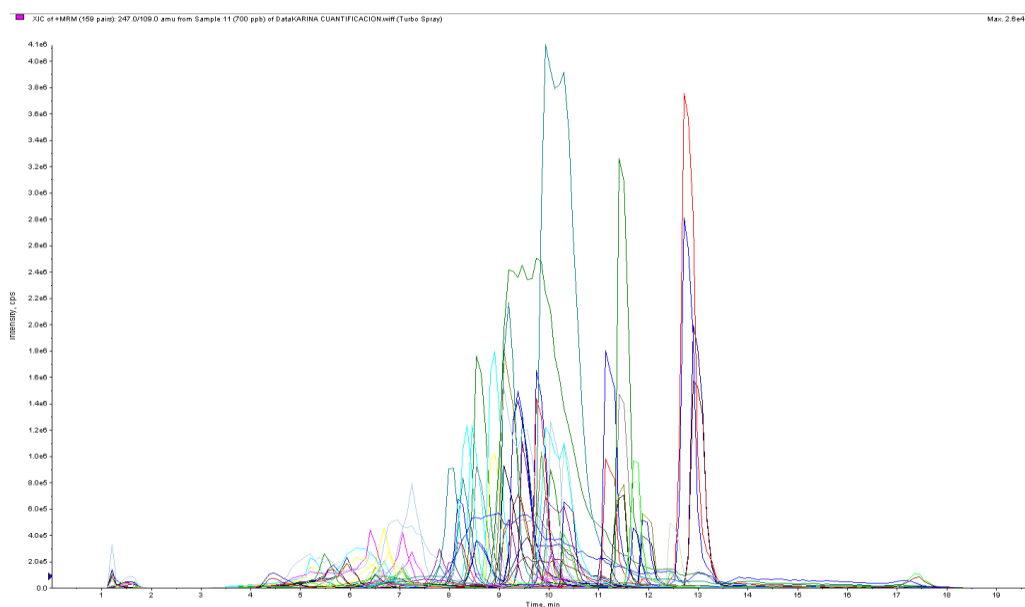


Figura 16 - Cromatograma total dos compostos do estudo monitorados no modo positivo (ESI+)

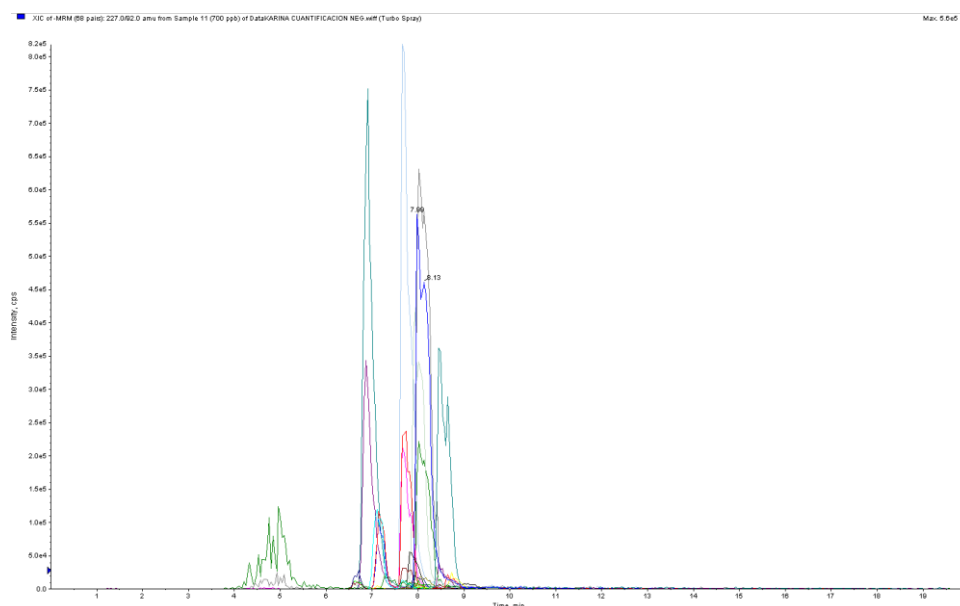


Figura 17 - Cromatograma total dos compostos do estudo monitorados no modo negativo (ESI-)

É possível observar, de acordo com os cromatogramas, que vários compostos obtiveram tempos de retenção próximos ou então, coeluíram. A falta de resolução em um cromatograma pode ser um problema em cromatografia líquida quando acoplada a detectores tradicionais como UV, por exemplo, ou DAD. Uma vez que são específicos o suficiente quando as diferenças espectrais são pequenas, prejudicando a quantificação. Entretanto, o emprego da LC-MS/MS pode contornar esses problemas de separação cromatográfica, pois o detector de massas em série quando utilizado no modo SRM é altamente seletivo, não sendo assim, a coeluição, uma problemática frente a quantificação (LANÇAS 2009, Prestes *et al.*, 2009).

6.2 Avaliação dos principais parâmetros de extração por VA-MSPD para determinação multirresíduo em sedimento

6.2.1 Escolha do solvente

Como primeiro teste para extração dos 59 compostos de estudo metanol, etanol, acetonitrila e acetato de etila foram testados como solventes de extração em combinação com C18 como suporte sólido na VA-MSPD. Vale ressaltar que a única variável alterada nessa etapa foi o tipo de solvente, o volume dos mesmos permaneceu constante (5 mL). Os resultados foram avaliados por

respostas de recuperação e o percentual de compostos que apresentou recuperação <50%, entre 70 e 120% e >140% pode ser observado na Figura 18.

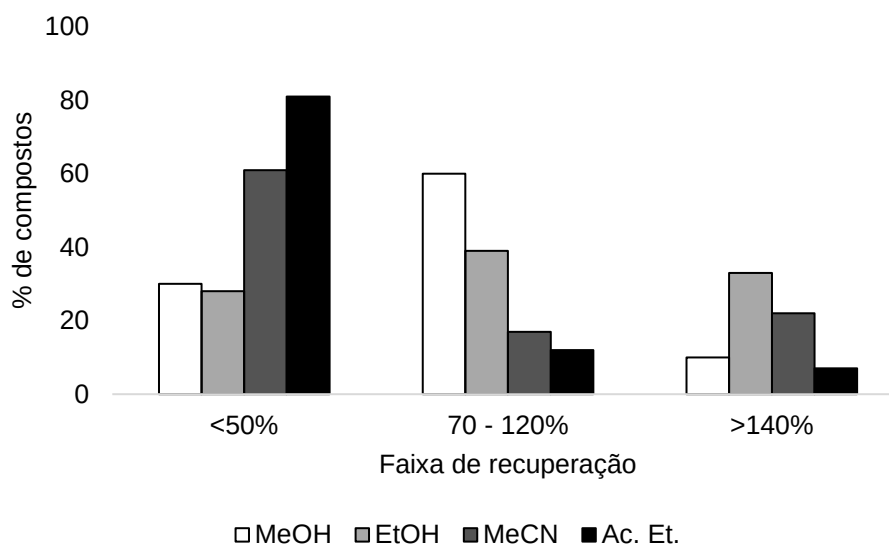


Figura 18 - Percentual de compostos que apresentaram recuperações <50%, entre 70 e 120% e >140%, utilizando diferentes solventes (Condições utilizadas: 2 g de amostra de sedimento, 0,25 g de C18 como suporte sólido e 5 mL de solvente. 1 minuto de agitação em vórtex e 10 minutos de centrifugação a 4000 rpm), n=3.

Um fator chave que dever ser levado em consideração na evolução das técnicas de preparo de amostra, como as miniaturizadas, é o uso dos solventes para extração dos compostos. Segundo Anastassiades *et al.*, (2003), desde a década de 1980, preocupações ambientais e de saúde atrelado ao uso de solventes clorados levaram ao desenvolvimento de muitos novos métodos, onde o uso desses solventes foi minimizado ou evitado (Anastassiades *et al.*, 2003). Com isso, em contrapartida ao uso de solventes clorados como diclorometano, clorofórmio e outros como hexano e THF, o acetato de etila se destaca por ser um dos resultados na evolução do uso de solventes nos avanços das técnicas de preparo de amostra dos últimos 20 anos (Lehotay *et al.*, 2010). Uma vez que é considerado um solvente não mutagênico, além de ser biodegradável e não bioacumulável, não apresenta periculosidade ao meio ambiente (Prat *et al.*, 2014).

Dependendo dos analitos e da matriz estudada, o acetato de etila apresenta como principais vantagens a extração de compostos com diferentes polaridades e a extração de menor quantidade de coextrativos presentes

naturalmente em amostras com alto teor de gorduras e pigmentos (Lehotay *et al.*, 2001). Entretanto, uma desvantagem atribuída a esse solvente é que alguns compostos mais polares não se dividem prontamente no acetato, e com essa finalidade são adicionadas quantidades significativas de Na_2SO_4 nos procedimentos. Adicionalmente, co-solventes polares como metanol e etanol têm sido utilizados para aumentar a polaridade na fase orgânica pretendida (Anastassiades *et al.*, 2003). Quando testado como solvente de extração para os 59 compostos de estudo em sedimento, o acetato de etila apresentou respostas de recuperação abaixo da faixa entre 70 e 120% para aproximadamente 80% dos compostos. Analitos com caráter mais apolar e mediantemente polar como os filtros UV BP3, BP1, 4HB, 4DHB, DHMB, gemfibrozila, ácido mefenâmico, naproxeno, diclofenaco, atenolol e o biocida diuron apresentaram recuperações entre 79 a 120% provavelmente por apresentarem uma faixa de Log Kow próxima ao desse solvente. Compostos mais polares ficaram de fora da faixa pretendida.

Outro solvente testado na extração dos 59 compostos de estudo foi a acetonitrila. Esse teste apresentou respostas dentro da faixa recomendada de 70 a 120% para aproximadamente 40% dos analitos. O comportamento dos compostos variou bastante quando testado esse solvente na extração, além do mais, os valores de RSD (%) ficaram superiores a 20%. Visto que os analitos desse estudo apresentam uma ampla faixa de polaridade, esses compostos, geralmente, não apresentam afinidade por solventes fortemente polares e que não apresentam capacidade de interação, como a acetonitrila, que apresenta Kow de -0,34. Entretanto, de acordo com outros estudos, como por exemplo, para extração de analitos da classe das sulfonamidas, como SQX (Kow de 0,22), Hoff *et al.*, (2014) utilizaram 10 mL de acetonitrila na extração de amostras biológicas. Os resultados de recuperação obtidos pelos autores (70%) a partir da utilização da acetonitrila como solvente possibilitou, adicionalmente, a investigação da presença de metabólitos e outros produtos de degradação nas amostras analisadas (Hoff *et al.*, 2014). Esse resultado corrobora com o obtido nesse trabalho, pois, embora de forma geral as respostas não tenham sido alcançadas dentro da faixa para a maioria dos analitos, para SQX a recuperação foi de 94%.

Adicionalmente, alguns trabalhos da literatura realçam a toxicidade da acetonitrila quando comparada com outros solventes, como acetona ou acetato de etila, por exemplo. Sendo essa uma das razões para evitar o uso desse solvente em métodos multirresíduos (Anastassiades *et al.*, 2003).

Quando testado o metanol como solvente de extração para os 59 analitos de estudo, esse solvente apresentou respostas de recuperação entre 72 e 121% para aproximadamente 64% dos compostos analisados. De modo geral, e provavelmente devido à polaridade dos compostos variar de média a alta, o metanol, por ser o solvente com polaridade mais semelhante a maioria dos compostos de estudo, proporcionou as melhores respostas de extração. Compostos extremamente polares como os da classe das benzofenonas como BP2, BP3, as sulfonamidas SDZ, SMZ, acSMX compostos como a, atenolol, ácido salicílico, cafeína e DCOIT apresentaram recuperações abaixo de 70%, já outros mais apolares e mediantemente polares como 4HB, 4DHB, DMBZT e os parabenos BuPB e MePB obtiveram valores de recuperações fora da faixa aceitável. Embora, de forma geral, o metanol tenha apresentado melhores respostas de recuperação, a natureza polar dos compostos que ficaram fora da faixa de recuperação esperada, além de sua alta solubilidade em água faz com que a extração específica desses compostos seja extremamente difícil. Por conta disso, compostos com essas características e propriedades físico-químicas semelhantes a estes são amplamente investigados em matrizes aquosas.

Em estudos anteriores que também avaliaram a extração de compostos semelhantes aos deste estudo, também foram testados solventes mediantemente polares nas técnicas de preparo de amostras. Casado *et al.*, (2015) utilizaram metanol na extração de 8 antibióticos em lodo utilizando a MSPD como preparo de amostra e etapa de limpeza por SPE. Embora os autores tenham obtido recuperações (70 a 118%) e limites de quantificação do método (5 a 8 ng g⁻¹) semelhantes ao deste estudo, utilizaram 10 mL de solvente (0,5% em NH₃) para extração de apenas 8 analitos da mesma classe (Casado *et al.*, 2015).

Cerqueira *et al.*, (2018) testaram metanol, etanol e acetonitrila na extração de 27 PPCPs (PrPB, 4HB, 4DHB, gemfibrozila, ibuprofeno e diclofenaco em comum com este estudo) em amostras de lodo de estação de tratamento de esgoto utilizando a VA-MSPD como preparo de amostra e determinação por LC-

MS/MS. Como resultado, os autores também selecionaram metanol como solvente de extração, obtendo recuperações entre 45 e 120% para os compostos de estudo e justificaram sua escolha com base na relação de polaridade entre o solvente e a maioria dos compostos analisados (Cerqueira *et al.*, 2018).

Gago-Ferrero *et al.*, (2011) utilizaram metanol na extração de compostos polares, mas somente da classe dos filtros UV em amostras de sedimento. Muito embora os autores tenham alcançado recuperações dentro da faixa recomendada e limites semelhantes ao deste estudo (1 a 15 ng g⁻¹), o volume de metanol utilizado foi 25 mL e a técnica de preparo de amostra utilizada foi a PLE, técnica esta que demanda um elevado grau de automação e gera uma quantidade significativa de resíduos no laboratório (Gago-Ferrero *et al.*, 2011).

Como alternativa à utilização de solventes, alguns trabalhos da literatura relatam a utilização de misturas de diferentes solventes, entre eles o metanol. Como exemplo, Albero *et al.*, (2012) utilizaram uma mistura de metanol e acetato de etila (90:10, v/v) para extração de parabenos e alguns metabólitos em lodo de Madrid (Espanha). Os autores obtiveram recuperações entre 80 e 125% e RSD entre 3 e 12% para os compostos analisados (Albero *et al.*, 2012). Autores do mesmo grupo de pesquisa também utilizaram a mistura de acetonitrila e metanol (90:10, v/v) para extração de hormônios em matrizes sólidas e como resultado do método obtiveram recuperações entre 80 e 110% com RSD entre 5 e 8% (Albero *et al.*, 2013).

O sucesso do metanol como solvente de extração em diferentes técnicas de preparo de amostra está atrelado a sua capacidade de interação com compostos polares por conta de ser um solvente polar prótico. Solventes polares próticos, como o metanol e o etanol, possuem altas constantes dielétricas (ϵ) e isso é um bom indicador da probabilidade de interagir com analitos com característica polar, favorecendo a extração através da capacidade de formação de ligações de hidrogênio. De forma geral, a constante dielétrica é considerada um parâmetro importante para prever o comportamento e medir a polaridade de um solvente (WAKAI *et al.*, 2005).

Para os biocidas anti-incrustantes, trabalhos anteriores também avaliaram diferentes solventes nas técnicas estudadas. Estudos com metanol (Carrasco *et al.*, 2003, Caldas *et al.*, 2018), etanol (Batista-Andrade *et al.*, 2018), acetonitrila (Harino *et al.*, 2006), diclorometano e/ou acetona (Sargent *et al.*, 2000, Connelly

et al., 2001, Comber *et al.*, 2002) para extração dos compostos em diferentes amostras de sedimentos foram reportados. Entretanto, de forma geral, o número de compostos e as classes químicas que fazem parte desses trabalhos são relativamente inferiores ao que este estudo propõe, e adicionalmente, os volumes utilizados nesses trabalhos também são relativamente maiores quando em comparação ao volume de metanol utilizado em todo trabalho, ou seja, 5 mL. O baixo volume de solvente torna uma característica positiva uma vez que possibilita a redução dos resíduos gerados no laboratório.

Complementar aos solventes testados nesse trabalho, outro solvente avaliado na extração dos compostos de estudo foi o etanol. Quando testado como solvente de extração para os 59 analitos de estudo em sedimento, etanol foi o segundo solvente que apresentou os melhores resultados de recuperação entre 70 e 120% para aproximadamente 40% dos analitos. Compostos mediantemente polares como os filtros UV como BP1, BP2, 4HB, 4DHB, DHMB, AVO e EHMC foram os compostos, da mesma classe, que apresentaram recuperações entre 71 a 117%, com RSD menor que 19%. Etanol também é um solvente polar prótico, com constante dielétrica de 24,5, entretanto menos polar que o metanol e provavelmente por conta dessa característica mediantemente polar tenha conseguido extrair os compostos como os filtros UV.

Embora o etanol tenha apresentado respostas de recuperação dentro da faixa aceitável para um número de compostos inferiores ao metanol, os resultados obtidos com esse solvente são interessantes do ponto de vista da Química Analítica Verde. Visto que o etanol apresenta uma menor toxicidade ao analista quando em comparação a outros solventes convencionalmente utilizados como hexano, acetonitrila, diclorometano, metanol e acetato de etila. Além do mais, o fato de compostos que apresentam um potencial de toxicidade terem sido extraídos com etanol corrobora com o sucesso dos princípios da Química Verde e pode ser considerado peça fundamental no futuro da Química Analítica.

De maneira geral, metanol foi o solvente que apresentou os melhores resultados, e com isso, foi escolhido como solvente de extração por ter alcançado a faixa de recuperação de 70 a 120% para aproximadamente 60% dos analitos. Entretanto, com o objetivo de aumentar ainda mais o número de

compostos com recuperações dentro da faixa, após a seleção do solvente, foi também avaliado o suporte sólido utilizado na VA-MSPD.

Vale ressaltar que um importante fator que deve ser levado em consideração é que métodos analíticos com um número expressivo de compostos com propriedades físico-químicas distintas, ou seja, multirresíduos, são considerados mais trabalhosos de serem desenvolvidos, uma vez que os analitos apresentam diferentes polaridades e propriedades como solubilidade, volatilidade, valores de pKa e Log Kow e mesmo assim devem, preferencialmente, serem extraídos simultaneamente.

6.2.2 Suporte sólido

Após a seleção do metanol como solvente de extração, diferentes suportes sólidos foram testados na VA-MSPD a fim de aumentar o número de compostos com recuperação entre 70 e 120%. Assim, outros suportes sólidos como florisil, sílica, alumina, Strata-X, sedimento sem suporte sólido, além do C18 inicialmente utilizado, foram testados. As respostas foram avaliadas em termos de recuperação e podem ser observadas como ilustra a Figura 19.

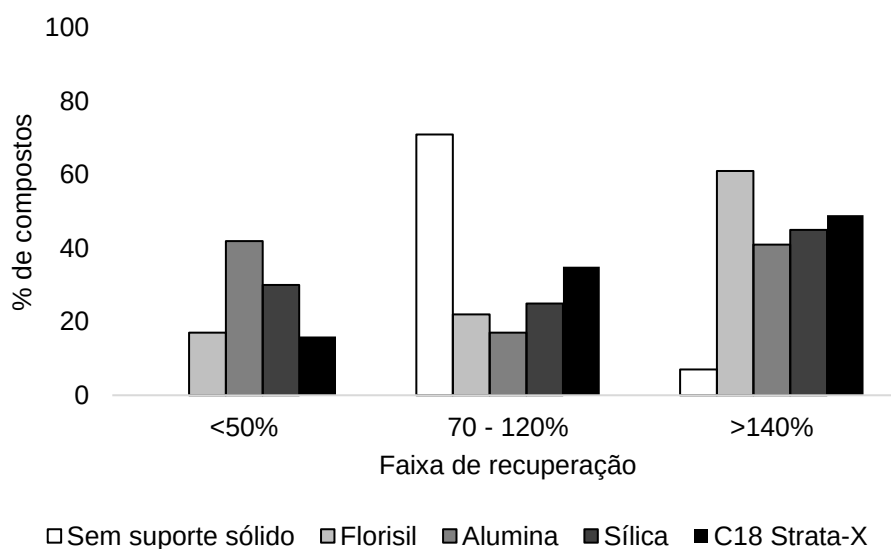


Figura 19 - Percentual de compostos que apresentaram recuperações <50%, entre 70 e 120% e >140%, utilizando diferentes suportes sólidos (Condições utilizadas: 2 g de amostra de sedimento, 0,25 g de suporte sólido e 5 mL de metanol como solvente de extração. 1 minuto de agitação em vórtex e 10 minutos de centrifugação a 4000 rpm), n=3.

O suporte sólido é considerado uma das variáveis mais estudadas e otimizadas na técnica de MSPD. Uma vez que a escolha dessa variável depende das características da matriz, dos compostos de estudo bem como da relação com a escolha do solvente de extração (Barker 2000). De modo geral, há diferentes opções de materiais com características abrasivas que comumente estão sendo estudados e avaliados na MSPD. Adicionalmente, dependendo da seleção do suporte sólido, o mecanismo de quebra da estrutura física original da amostra pode ser afetado e não ocorrer da mesma maneira que a originalmente descrita para o C18 (Capriotti *et al.*, 2010).

Materiais clássicos como C18, o suporte mais utilizado desde o desenvolvimento da técnica original (Barker *et al.*, 1989), florisil (Rallis *et al.*, 2012), sílica (Aquino e Navickiene 2009), alumina (Míguez-Framil *et al.*, 2010), concha de mexilhão dourado (Rombaldi *et al.*, 2015), quitina (Soares *et al.*, 2017), terra diatomácea (Hertzog *et al.*, 2015) e areia (Bogialli *et al.*, 2008), apresentam vasta aplicabilidade em diversos trabalhos com a MSPD (Caldas *et al.*, 2013). O sucesso da utilização do C18 em muitos trabalhos com a MSPD, em diferentes matrizes se deve ao fato da possibilidade de remoção de compostos apolares, como substâncias graxas e lipídios, sendo recomendado para matrizes que apresentam teor de gordura superior a 2%. A possível interação entre os compostos apolares e o material se dá através de forças de Van der Waals e a utilização do C18 ou então a combinação deste com outros materiais, como o PSA, pode ser usada para tornar o método mais efetivo na remoção de matrizes que contenham alto teor de gordura (KINSELA *et al.*, 2009).

O florisil (silicato de magnésio ativado) é um dos materiais utilizados como suporte sólido na MSPD com o intuito de reter lipídios não polares, co-extrativos, corantes, aminas, hidroxilas e carbonilas através de mecanismos polares de interação como ligações de hidrogênio e outras (Kurz *et al.*, 2019). Nesse trabalho, para extração dos 59 compostos do sedimento, as recuperações quando foi utilizado florisil ficaram entre 90 e 119% para 17% dos compostos. Alguns compostos como BP2, DHMB e o succinil-sulfatiazol apresentaram recuperações abaixo de 70%, e de forma geral, o restante dos analitos apresentou recuperações ultrapassando 140%.

Quando utilizada alumina (óxido de alumina) como suporte sólido na VA-MSPD as recuperações ficaram entre 75 e 114% para 14% dos analitos. Assim como observado para o florissil, o restante dos compostos de estudo apresentou recuperações fora da faixa recomendada e esse comportamento indica que embora esses materiais sejam óxidos metálicos e considerados abrasivos, possuem ampla faixa de reatividade. Adicionalmente, o fato de não ter extraído os compostos dentro da faixa pode levar a crer que estes materiais possam estar interagindo seletivamente com a amostra ou então, embora tenha sido aplicada uma força mecânica na MSPD, esses materiais não apresentaram capacidade de romper a estrutura física original da amostra para proporcionar a extração dos compostos de estudo.

A sílica (dióxido de silício) é outro material abrasivo estudado como suporte sólido na MSPD. Quando utilizada para extração dos 59 compostos no sedimento, a sílica apresentou recuperações entre 70 e 118% para 31% dos analitos. Recuperações acima de 140% foram observadas para compostos mais polares, principalmente para os filtros UV, chegando a 160% para 4HB, por exemplo.

Quando o material polimérico Strata-X foi avaliado como suporte sólido, as recuperações ficaram entre 70 e 119% para aproximadamente 30% dos compostos analisados. Os filtros UV, principalmente compostos da classe das benzofenonas, foram os compostos que apresentaram melhores respostas de recuperação. Já outros como as sulfonamidas e os biocidas, obtiveram recuperações muito além da faixa aceitável. O Strata-X é um material polimérico que possui em sua estrutura grupos hidrofílicos como a presença do grupo pirrolidina e grupos hidrofóbicos como o estireno. A presença desses dois grupos pode propiciar a interação com outros compostos por ligações de hidrogênio ou possibilidade de interação por ligações pi-pi e dipolo-dipolo, respectivamente, diminuindo assim, a tendência nas respostas de recuperação.

Uma alternativa interessante e também avaliada nesse trabalho, foi a não utilização de suporte sólido na VA-MSPD. Essa possibilidade se mostra promissora uma vez que a própria matriz, quando macerada, pode ser considerada abrasiva, o que além de diminuir os custos atribuídos à técnica também diminui a quantidade de geração de resíduos dentro do laboratório. Para extração dos 59 compostos de estudo, quando testada apenas a amostra

macerada (2 g) e logo a adição do metanol como solvente de extração, os resultados de recuperações ficaram entre 70 e 120 para aproximadamente 71% dos compostos de estudo. Embora alguns compostos não tenham ficado dentro dessa faixa, apresentaram respostas próximas ao esperado, como os filtros UV BP1 e BP2 que apresentaram recuperações de 125% e 123% respectivamente. Já os ácidos da família das quinolonas como o ácido nalidíxico e o ácido oxolínico apresentaram respostas de 65% e 65% com RSD de 5% e 14%, respectivamente. Das sulfonamidas, SPY e SQX obtiveram recuperações um pouco maiores que o esperado, chegando a 130% para ambos. Dos biocidas, todos (diuron, irgarol, DCOIT e diclofluanida) apresentaram respostas de recuperação entre 71 e 115% com RSD menores que 18%.

Esse resultado, da não utilização de suporte sólido, corrobora com os resultados obtidos por outros autores em estudos anteriores. Como exemplo, Cerqueira *et al.*, (2018) testaram diferentes suportes sólidos para extração de 27 PPCPS em lodo de estação de tratamento de esgoto utilizando a VA-MSPD como preparo de amostra. Após otimizado o método, os autores optaram por não utilizar suporte sólido na técnica e atribuíram esse resultado à caracterização realizada na amostra, onde foi observada a presença de óxidos (abrasivos) na própria matriz. Além do mais, os autores também avaliaram o efeito matriz durante o desenvolvimento do estudo afim de verificar se o suporte sólido utilizado também poderia estar atuando paralelamente na etapa de limpeza do método (Cerqueira *et al.*, 2018).

Por fim, tendo atingido a faixa de recuperação aceitável para a maioria dos analitos, a técnica de VA-MSPD otimizada nesse estudo seguiu conforme exemplifica a Figura 20. Tendo o método otimizado, seguiu-se para a etapa de validação onde foram avaliadas as principais figuras de mérito.

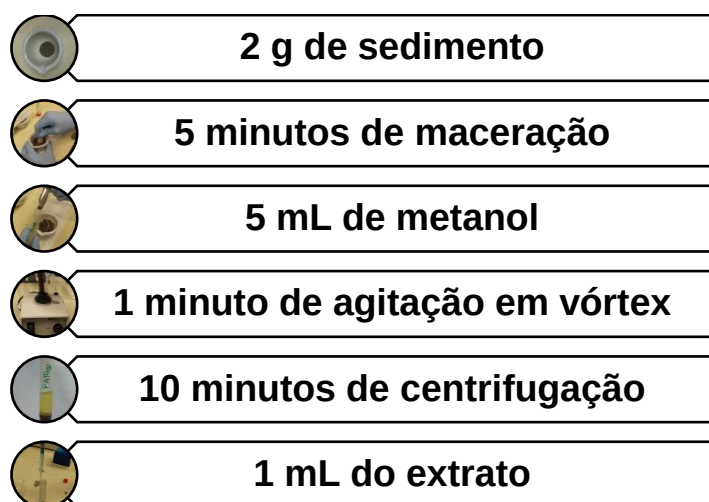


Figura 20 - Procedimento da VA-MSPD otimizada para sedimento

6.3 Validação

6.3.1 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

A Tabela 17 apresenta os limites obtidos nesse trabalho. De forma geral, os limites de quantificação instrumentais variaram de 0,21 a 14,73 ng mL⁻¹. Uma vez estabelecidos os limites de quantificação do instrumento, para obtenção dos limites de quantificação do método foi considerado o fator de conversão da técnica de preparo de amostra utilizada, onde é levado em consideração a relação entre o volume de solvente (5 mL) e a massa de amostra utilizada (2 g). Obtendo assim, um fator de 2,5 x na VA-MSPD. Sendo assim, os valores dos limites de quantificação do método proposto para sedimento ficaram entre 0,42 e 36,83 ng g⁻¹ para todos os analitos de estudo.

Os valores dos limites encontrados nesse estudo corroboram com os que tem sido encontrados em outros trabalhos, para amostras ambientais como solo e sedimento em todo o mundo. Para PPCPs, Cerqueira *et al.*, (2018) utilizaram a VA-MSPD em lodo com determinação por LC-MS/MS e obtiveram limites de quantificação do método entre 1,25 e 1250 ng g⁻¹ (Cerqueira *et al.*, 2018). Para filtros UV, Gago-Ferrero *et al.*, (2011) utilizaram a PLE como técnica de preparo de amostra em amostras de sedimento. Os autores obtiveram LOD entre 0,5 e 15 ng g⁻¹ e encontraram os compostos de estudo em 95% das amostras analisadas. Dentre eles BP3, o produto de degradação 4DHB e outros em concentrações entre 4,4 e 27 ng g⁻¹ (Gago-Ferrero *et al.*, 2011). Mizukawa *et al.*,

(2017) obtiveram limites de quantificação do método entre 0,8 e 52 ng g⁻¹ para filtros UV e alguns benzotriazóis em amostras de sedimento do Brasil utilizando PLE como preparo de amostra. Os autores encontraram BP1, BP3, BP4, 4HB, 4DHB, BP8, 4MBC, EtPABA, 1HBT, ODPABA, MeBT, TBHPBT em concentrações de até 322,2 ng g⁻¹ (Mizukawa *et al.*, 2017).

A Comissão Europeia recomenda, por exemplo, no guia de validação para análise de resíduos de agrotóxicos, que os LOQm sejam menores ou então iguais aos limites máximos permitidos pelos padrões de qualidade ambiental (SANTE 2017). Para os biocidas, os limites podem ser comparados com os estabelecidos por países como Reino Unido, Holanda e Noruega, onde para sedimento os limites de risco ambiental para diuron e irgarol são 9 e 1,4 ng g⁻¹, respectivamente. Nesse trabalho, foi obtido 2,87 e 1,44 ng g⁻¹ como LOQ do método para os mesmos analitos, respectivamente.

Ainda como exemplo para os biocidas, Martinez & Barceló (2011) desenvolveram um método para extração de diclofluanida, diuron, irgarol, demetildiuron, 1-(3,4-diclorofenil) uréia, DCOIT e (2-metiltio-4-terc-butilamin-s-triazina) em amostra de sedimentos marinhos. Os autores realizaram uma extração metanólica com ultrassom e etapa de limpeza em cartuchos de SPE, seguida de análise por HPLC-APCI-MS. Como resultado obtiveram recuperações entre 54 e 109% e limites de quantificação do método entre 0,2 e 1,6 ng g⁻¹ e detectaram diuron e irgarol a 136 e 88 ng g⁻¹, respectivamente. Embora os autores tenham obtido limites e nível de detecção semelhantes ao desse trabalho, o método descrito era tedioso, com muitas etapas e uma significativa quantidade de resíduos gerada (Martinez e Barceló 2001).

Batista-Andrade *et al.*, (2016) obtiveram limites de quantificação do método entre 1,25 e 2,50 ng g⁻¹ (Batista-Andrade *et al.*, 2016). Já Caldas *et al.*, (2018) encontraram limites entre 0,5 e 5 ng g⁻¹ (Caldas *et al.*, 2018) ambos trabalhos utilizando VA-MSPD em amostras de sedimentos entretanto apenas para 5 analitos (biocidas).

6.3.2 Curvas de calibração e linearidade

A Tabela 17 apresenta os resultados das curvas de calibração preparadas no solvente (metanol) e no extrato da matriz, onde a maioria respondeu de formas distintas de acordo com as características de cada composto analisado.

De forma geral, as curvas analíticas foram construídas na faixa de 1 a 1000 ng mL⁻¹, sempre garantindo que cada curva obtivesse pelo menos cinco níveis de concentração avaliados. De modo geral, o coeficiente de correlação das curvas de calibração construídas no solvente variaram de 0,9979 a 0,9999, já nas curvas preparadas no extrato da matriz, os coeficientes variaram entre 0,9700 e 0,9849.

A linearidade corresponde à capacidade do método de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração dos analitos em estudo, dentro de uma determinada faixa de resposta. De forma geral, os resultados obtidos, nas curvas de calibração avaliadas estão dentro da faixa recomendada por órgãos regulamentadores como o INMETRO, que recomenda que os coeficientes tenham que ser maiores de 0,90 e próximos a um para garantir linearidade dos resultados encontrados (INMETRO 2018).

Tabela 17 - Coeficientes de correlação das curvas analíticas preparadas no solvente e no extrato da matriz, Limite de Detecção instrumental (LOD_i), Limite de Quantificação instrumental (LOQ_i), Limite de Detecção do método (LOD_m), Limite de Quantificação do método (LOQ_m) e efeito matriz (EM) de todos os analitos de estudo

Analito	r solvente	LOD_i (ng mL⁻¹)	LOQ_i (ng mL⁻¹)	r matriz	LOD_m (ng g⁻¹)	LOQ_m (ng g⁻¹)	EM (%)
BP3	0,9999	0,27	0,89	0,9987	0,67	2,23	2,19
BP1	0,9999	0,52	1,74	0,9994	1,31	4,35	-1,60
BP2	0,9999	0,59	1,98	0,9993	1,49	4,95	16,12
BP4	0,9999	1,00	3,32	0,9935	2,50	8,31	60,66
4HB	0,9996	0,98	3,25	0,9992	2,44	8,13	-18,08
4DHB	0,9998	0,81	2,69	0,9849	2,02	6,71	69,74
DHMB	0,9999	0,41	1,38	0,9996	1,03	3,44	-29,98
AVO	0,9996	0,38	1,28	0,9998	0,96	3,19	80,33
4MBC	0,9999	0,20	0,66	0,9998	0,49	1,65	-14,74
EHMC	0,9994	4,42	14,73	0,9999	11,06	36,83	-17,58
EtPABA	0,9999	0,38	1,26	0,9998	0,94	3,14	-17,43
BZT	0,9999	0,25	0,83	0,9997	0,62	2,07	71,28
MeBZT	0,9998	0,38	1,28	0,9995	0,96	3,20	100,66
DMBZT	0,9999	0,35	1,18	0,9997	0,88	2,94	106,42
UVP	0,9992	0,32	1,07	0,9997	0,80	2,67	57,11
BePB	0,9998	0,54	1,80	0,9999	1,35	4,50	8,47
BuPB	0,9999	0,38	1,25	0,9999	0,94	3,13	-0,68
PrPB	0,9999	0,53	1,77	0,9999	1,33	4,43	7,97
MePB	0,9998	0,56	1,86	0,9997	1,40	4,66	5,79
Flumequina	0,9997	0,80	2,66	0,9999	1,99	6,64	-11,47
Ofloxacina	0,9999	1,24	4,12	0,9997	3,09	10,3	-50,06

Analito	r solvente	LODi (ng mL⁻¹)	LOQi (ng mL⁻¹)	r matriz	LODm (ng g⁻¹)	LOQm (ng g⁻¹)	EM (%)
Ciprofloxacina	0,9979	0,25	0,83	0,9994	0,62	2,07	-99,15
Ácido nalidíxico	0,9999	0,33	1,09	0,9999	0,82	2,73	2,99
Ácido oxolínico	0,9995	0,21	0,72	0,9997	0,54	1,79	-9,75
Succinil-Sulfatiazol	0,9999	0,13	0,43	0,9999	0,32	1,07	14,01
SDZ	0,9997	0,24	0,79	0,9999	0,60	1,99	-30,74
acSDZ	0,9999	0,73	2,43	0,9999	1,82	6,07	72,80
SMR	0,9999	0,45	1,50	0,9997	1,13	3,76	-6,71
acSMR	0,9999	0,09	0,29	0,9999	0,22	0,72	-5,78
SMZ	0,9999	0,05	0,17	0,9976	0,13	0,42	99,94
acSMZ	0,9999	0,13	0,44	0,9999	0,33	1,09	19,69
SMX	0,9997	0,07	0,24	0,9997	0,18	0,60	21,70
acSMX	0,9998	0,16	0,55	0,9998	0,41	1,37	-1,89
SMPZ	0,9999	0,06	0,21	0,9999	0,16	0,53	26,47
SPY	0,9999	0,10	0,34	0,9999	0,26	0,86	45,28
acSPY	0,9997	0,08	0,28	0,9997	0,21	0,70	6,07
SQX	0,9997	0,17	0,57	0,9999	0,43	1,43	50,00
STZ	0,9999	2,07	6,91	0,9998	5,19	17,28	-8,66
Sulfisomidin	0,9999	2,28	7,59	0,9996	5,70	18,99	34,13
SDM	0,9999	0,62	2,06	0,9999	1,54	5,14	58,22
Trimetoprima	0,9999	0,62	2,08	0,9999	1,56	5,20	-100,00
Gemfibrozila	0,9999	0,26	0,86	0,9999	0,65	2,16	9,84
Ácido mefenâmico	0,9999	0,46	1,55	0,9998	1,16	3,86	11,66
Naproxeno	0,9999	0,19	0,63	0,9999	0,47	1,58	-27,66
IBU	0,9999	0,66	2,22	0,9999	1,66	5,54	-100,01

Analito	r solvente	LODi (ng mL⁻¹)	LOQi (ng mL⁻¹)	r matriz	LODm (ng g⁻¹)	LOQm (ng g⁻¹)	EM (%)
Cetoprofeno	0,9999	0,15	0,48	0,9999	0,36	1,21	-15,14
Diclofenaco	0,9999	1,40	4,66	0,9888	3,50	11,64	-100,00
Acetaminofeno	0,9999	0,44	1,48	0,9999	1,11	3,70	-100,00
CBZ	0,9999	0,75	2,50	0,9999	1,87	6,24	-1,44
CBZ-10,11-epóxi	0,9999	2,02	6,72	0,9999	5,04	16,8	-100,00
Atenolol	0,9999	0,17	0,55	0,9999	0,41	1,38	-100,00
NorFXT	0,9994	0,96	3,20	0,9999	2,40	8,00	100,00
N-desVFX	0,9998	0,47	1,56	0,9999	1,17	3,91	-98,76
Ácido salicílico	0,9999	0,57	1,89	0,9984	1,42	4,72	-89,33
Cafeína	0,9999	0,35	1,18	0,9973	0,89	2,96	-99,28
Diuron	0,9996	0,34	1,15	0,9998	0,86	2,87	-9,13
Irgarol	0,9996	0,17	0,57	0,9998	0,43	1,44	103,53
DCOIT	0,9998	0,21	0,71	0,9998	0,53	1,78	24,76
Diclofluanida	0,9999	0,30	0,99	0,9999	0,75	2,48	-51,29

*Faixa linear: 1 – 1000 ng mL⁻¹ para todos os compostos avaliados

Através dos dados obtidos por conta da construção das curvas analíticas de calibração, e análise das equações das retas no instrumento é possível concluir que o modelo de regressão linear é adequado para as determinações analíticas realizadas no estudo, uma vez que a maioria dos compostos presentes nas soluções analíticas apresentou coeficiente de correlação de no mínimo de 0,99. Este parâmetro está de acordo com as orientações da ANVISA e do INMETRO e todos os compostos analisados apresentaram faixa linear entre 1 e 1000 ng mL⁻¹.

6.3.3 Exatidão e precisão

A eficiência da técnica de VA-MSPD para extração dos 59 analitos de estudo foi acompanhada e avaliada de acordo com as respostas em termos de recuperação (%). Assim como sugere os principais guias de validação, recuperações entre 70 e 120% são considerados adequadas e satisfatórias. Entretanto, a faixa de 60 a 140% pode ser também considerada e aceita quando se trabalha com análises multirresíduos (SANTE 2017, INMETRO 2018).

Afim de avaliar a exatidão do método desenvolvido, as amostras de sedimento foram fortificadas em três diferentes níveis de concentração, sendo eles o LOQ, 5 vezes o LOQ e 10 vezes o LOQ de cada analito. Após a fortificação das amostras, as mesmas passaram pelo processo de extração segundo a VA-MSPD otimizada, como mostrada anteriormente na Figura 20. Os resultados foram avaliados em termos de recuperação e podem ser observados na Tabela 18, onde são apresentados todos os resultados obtidos para os compostos de estudo.

Na precisão intermediária a maioria dos compostos de estudo apresentou resposta de recuperação dentro da faixa recomendada. Exceto alguns compostos como BP2, BP4, 4DHB, AVO, BZT, SMR, SPMZ, SPY, SDM, gemfibrozila, cetoprofenoo, naproxeno e CBZ que apresentaram recuperações abaixo de 70% entre 58 e 69%. Além do mais, na precisão intermediária, esses resultados ficaram dentro da faixa e variaram de 68 a 121% para os mesmos analitos.

De forma geral, a VA-MSPD apresentou precisão dentro da faixa recomendada pelos guias regulamentadores, onde a maioria dos compostos de estudo apresentou RSD menor ou igual a 20%. Para a repetibilidade os valores

obtidos ficaram entre 0,1 e 21% e entre 0,3 e 21% para a precisão intermediária. Exceto alguns compostos que excederam um pouco a faixa de 20%, como os filtros UV BP3, 4HB, 4DHB, DHMB, EHMC. Embora alguns compostos tenham apresentado recuperações superiores a 120% ou inferiores a 70% e RSD maiores que 20%, estes estão em menor número quando levado em consideração a gama de compostos que compreendem o método multirresíduo.

Vale ressaltar que alguns fatores devem ser levados em consideração no estudo de um método multirresíduo, como por exemplo, as diferentes classes e propriedades físico-químicas que os analitos apresentam, bem como diferentes faixas de polaridades, solubilidades, volatilidades, valores de pKa e Log Kow, além da necessidade de os mesmos serem extraídos simultaneamente. Complementar à esses fatores, vale ressaltar que de acordo com o guia de validação da SANTE, a faixa de recuperação entre 60 e 140% pode ser considerada e aceita para recuperações quando se trabalha com análises multirresíduos (SANTE 2017). Adicionalmente, esses resultados anômalos não comprometem a exatidão e precisão do método desenvolvido e corroboram com os resultados encontrados na literatura para determinação de compostos similares em métodos multirresíduos.

Tabela 18 - Recuperações (%) e Desvio Padrão Relativo (%) em termos de repetibilidade e precisão intermediária para as amostras de sedimento fortificadas em 3 níveis

Analito	Repetibilidade						Precisão intermediária					
	LOQ		5 LOQ		10 LOQ		LOQ		5 LOQ		10 LOQ	
	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)
BP3	72,5	23,4	75,8	9,7	125,9	0,7	111,2	3,4	61,4	0,6	102,2	11,0
BP1	128,9	20,7	129,8	13,3	102,8	7,5	128,5	1,2	60,3	10,1	115,0	4,8
BP2	n.q	1,6	74,0	1,6	121,4	4,9	79,0	8,8	115,5	0,3	34,0	1,1
BP4	69,4	21,5	69,3	25,7	123,5	33,1	56,2	38,6	70,7	29,4	121,5	24,6
4HB	95,2	25,0	130,8	18,1	81,8	5,0	86,1	4,8	111,2	1,5	124,6	6,2
4DHB	n.q	22,4	106,6	26,1	68,8	11,1	77,9	6,7	101,3	5,9	121,9	6,3
DHMB	71,7	21,1	64,8	5,6	70,7	8,6	112,9	4,1	115,8	9,8	149,9	5,1
AVO	69,7	10,0	94,0	15,9	121,8	12,2	91,5	5,4	70,6	12,2	123,5	4,2
4MBC	120,7	11,6	79,7	14,8	66,2	0,9	71,5	1,1	100,2	2,4	136,5	3,8
EHMC	123,2	4,5	87,2	21,3	100,7	1,1	62,2	1,8	100,3	1,2	80,7	6,4
EtPABA	74,7	19,4	61,3	8,7	107,5	10,3	53,6	4,5	111,6	12,0	69,6	5,4
BZT	69,4	17,6	124,9	26,5	103,8	26,0	116,6	8,8	114,1	1,5	113,6	16,9
MeBZT	72,6	12,8	78,6	4,7	116,0	23,7	88,4	8,0	74,8	7,5	69,9	13,0
DMBZT	81,2	3,4	65,5	1,4	84,1	49,8	95,9	14,7	113,4	4,0	81,3	15,5
UVP	86,9	16,5	75,8	4,6	112,5	8,9	55,0	11,8	69,2	21,5	118,4	17,4
BePB	73,7	8,1	111,8	8,4	74,5	7,0	63,7	9,9	84,5	2,2	110,3	5,6
BuPB	73,0	4,7	68,6	7,5	70,2	6,1	79,0	9,5	95,8	8,6	82,0	0,8
PrPB	89,1	5,0	94,5	22,4	86,5	11,1	86,0	9,4	111,2	8,3	53,1	0,1
MePB	85,0	6,8	78,4	11,5	65,8	17,2	69,9	6,7	103,5	0,3	89,1	2,0
Flumequina	71,3	7,7	75,6	10,0	60,8	9,7	77,5	18,3	84,0	8,0	124,8	2,8

Analito	Repetibilidade						Precisão intermediária					
	LOQ		5 LOQ		10 LOQ		LOQ		5 LOQ		10 LOQ	
	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)
Ofloxacina	80,3	4,2	130,5	26,6	124,9	12,4	99,6	1,8	78,4	15,2	78,7	2,2
Ciprofloxacina	136,5	4,6	82,2	10,0	72,2	9,0	89,6	19,0	122,2	3,9	80,8	2,0
Ácido nalidíxico	121,6	6,0	123,3	9,6	75,6	11,5	122,8	31,4	87,8	7,3	95,8	6,6
Ácido oxolínico	80,7	18,0	62,2	24,8	75,0	7,7	95,1	21,0	121,4	4,8	81,8	1,8
Succinil-Sulfatiazol	84,8	10,0	79,9	4,2	122,8	4,7	77,4	1,5	69,4	2,2	120,3	4,6
SDZ	78,8	18,9	102,9	29,2	121,7	20,5	129,9	10,8	63,2	12,5	104,2	7,9
acSDZ	n.q	10,8	124,7	6,1	85,6	13,8	115,7	4,2	80,5	13,0	97,7	6,3
SMR	n.q	17,3	122,4	23,6	81,9	24,4	80,2	4,0	84,5	12,2	122,4	6,9
acSMR	121,3	15,3	69,4	5,3	99,9	22,0	91,2	25,4	54,9	3,3	117,9	21,3
SMZ	74,8	9,0	70,0	7,0	83,3	11,3	99,8	14,8	77,9	11,2	95,8	2,0
acSMZ	129,7	20,6	89,5	3,7	129,7	5,8	80,6	12,0	82,0	16,6	125,7	8,7
SMX	132,7	6,3	78,3	9,1	131,0	5,8	68,6	14,3	97,1	12,4	145,7	24,5
acSMX	124,4	0,2	70,0	6,6	105,4	7,0	128,5	23,2	73,0	16,3	110,6	8,1
SPMZ	n.q	18,4	88,0	3,0	122,3	5,4	79,3	9,9	89,5	4,6	129,9	20,4
SPY	n.q	10,0	74,4	3,3	111,6	14,9	120,9	2,9	88,8	25,3	138,1	18,9
acSPY	77,5	4,4	49,3	6,8	71,3	0,1	117,2	25,3	94,4	5,6	81,1	3,2
SQX	86,7	8,5	97,6	11,1	105,6	20,0	88,8	14,3	108,2	17,6	156,5	7,4
STZ	112,5	2,4	72,6	26,2	115,7	8,7	128,7	13,5	90,0	23,5	101,7	18,0
Sulfisomidim	75,4	11,9	74,4	26,3	65,7	3,8	64,1	3,7	79,0	3,8	122,0	0,2
SDM	n.q	1,6	103,7	4,3	91,8	4,3	80,3	16,1	99,9	15,0	141,3	15,3
Trimetoprim	88,9	17,5	78,5	16,7	98,8	21,5	93,3	8,1	120,7	3,8	103,8	11,5
Gemfibrozilaa	n.q	14,4	68,3	15,3	68,5	5,8	131,3	21,1	168,2	2,0	136,3	6,4

Analito	Repetibilidade						Precisão intermediária					
	LOQ		5 LOQ		10 LOQ		LOQ		5 LOQ		10 LOQ	
	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)
Ácido mefenâmico	135,7	10,1	95,8	9,3	123,1	25,3	62,3	2,5	83,1	14,4	117,7	17,0
Naproxen	123,5	17,1	65,3	5,4	112,0	18,9	126,4	5,1	69,6	20,1	116,0	12,9
IBU	84,4	5,4	78,9	17,5	111,8	17,9	87,9	25,3	131,3	10,8	63,9	105,5
Cetoprofenoo	n.q	3,7	74,0	10,9	106,5	11,0	68,4	7,4	68,3	3,2	121,3	22,7
Diclofenaco	120,1	4,2	111,5	25,7	59,4	17,9	62,0	16,4	78,1	23,1	89,2	3,9
Acetaminofen	75,4	7,4	74,8	24,2	102,6	27,2	86,8	6,9	74,1	16,5	111,9	16,1
CBZ	n.q	0,3	103,6	12,8	103,2	9,4	88,1	1,4	93,4	1,3	127,0	24,7
CBZ-10,11-epóxi	n.q	13,1	73,3	13,5	109,3	2,1	89,1	1,8	82,1	2,7	116,4	5,2
Atenolol	117,3	0,6	92,0	1,7	138,1	1,5	69,8	0,5	87,6	7,3	53,2	0,5
Nor-FXT	120,9	17,7	93,4	0,3	70,1	14,7	129,5	6,5	49,9	1,6	101,3	6,6
N-desVFX	71,0	4,2	131,4	16,4	66,3	13,3	66,9	5,1	51,8	1,9	94,1	6,5
Ácido salicílico	87,9	8,0	80,5	4,4	98,8	12,5	110,0	20,0	67,4	24,4	89,6	11,0
Cafeína	88,9	10,0	115,3	0,4	122,3	13,7	128,4	0,4	90,0	7,9	134,6	4,7
Diuron	74,6	6,3	123,9	26,8	108,6	3,2	77,2	3,7	120,4	0,9	102,4	6,9
Irgarol	119,8	5,0	92,3	4,4	111,8	27,8	81,2	15,0	106,6	19,4	138,1	28,3
DCOIT	125,4	2,3	116,9	17,8	100,2	2,4	95,0	4,2	112,5	4,2	93,1	18,7
Diclofluanida	71,6	14,8	104,4	26,3	86,6	6,0	123,9	2,7	85,7	0,4	122,8	4,3

*n.q – não quantificado com confiança nos níveis de fortificação avaliados

6.3.4 Efeito matriz

O efeito matriz foi avaliado pela comparação das inclinações das curvas analíticas preparadas no solvente (metanol) e no extrato da matriz, ambas levando em consideração a presença dos padrões internos anteriormente relatados para cada composto. Em teoria, e de acordo com Economou *et al.*, (2009) o efeito matriz, é geralmente, reconhecido como supressão ou enriquecimento do sinal analítico devido aos possíveis interferentes presentes na matriz. Adicionalmente, o efeito de matriz tem sido amplamente estudado e reconhecido como uma fonte de erro na análise quantitativa em LC-MS/MS, principalmente quando a quantificação utilizada é a padronização externa. Os efeitos devidos aos componentes da matriz foram classificados de acordo com o aumento ou supressão do sinal em % e são considerados baixos para uma faixa de supressão/aumento de sinal de $\pm 20\%$, médio para faixas de $\pm 20\%$ e $\pm 50\%$ e alto para valores superiores a 50% ou inferior a -50% (Economou *et al.*, 2009). Nesse trabalho para sedimento, 60% dos compostos apresentaram efeito de matriz baixo ou médio, onde aproximadamente 50% dos compostos foram influenciados negativamente, resultando em uma supressão de sinal na ionização. O restante dos analitos apresentou efeito de matriz significativo, ultrapassando 50 ou -50%.

Para a adequada determinação dos compostos, na parte da quantificação, são necessárias e sugeridas técnicas de calibração apropriadas para compensar as alterações de sinal e minimizar a variabilidade dos resultados (Martins *et al.*, 2016). Dentre as opções disponíveis, cada uma apresenta suas vantagens e desvantagens. A curva de calibração na matriz é a mais utilizada por ser considera mais simples. Entretanto, para utilização desse tipo de calibração, é imprescindível que a matriz seja isenta dos compostos de estudo (amostra em branco), e muitas vezes, em rotina de laboratório isso é uma dificuldade de obtenção. Diante disso, outras opções se sobressaem, como a calibração por extração processual, onde as amostras (em branco) são extraídas nas concentrações da curva de calibração. Entretanto, esse tipo de calibração, exige mais extrações, pelo menos uma de cada nível de calibração e, conseqüentemente, aumenta o tempo de análise e os custos analíticos (SANTE 2017). O que é contraditório quando se defende métodos miniaturizados. Outra

alternativa é a calibração por adição padrão, onde cada amostra deve ser analisada pela segunda vez com concentração conhecida de cada composto e a concentração na amostra é calculada a partir da relação entre as duas análises (Tuzimski e Sherma 2015). Esse tipo de calibração é muito utilizada quando não se tem disponível nenhuma amostra em branco adequada, e embora compense baixas recuperações e efeitos de matriz, a etapa de fortificação deve ser realizada para cada amostra, tornando uma tarefa trabalhosa e demorada (Tuzimski e Sherma 2015).

Outra alternativa, a utilizada nesse trabalho, é a calibração utilizando padrão interno deuterado (Martins *et al.*, 2016), que utiliza a razão de resposta entre o analito e o padrão interno correspondente, fornecendo uma média prática de correção para variações do instrumento e desvio (Rubert *et al.*, 2012, Tuzimski e Sherma 2015). Em teoria, o padrão interno deve ser quimicamente estável e mostrar o mesmo comportamento do analito correspondente.

Para métodos multirresíduos, recomenda-se usar mais de um padrão interno. Entretanto, uma desvantagem desse tipo de calibração é a disponibilidade de vários padrões de isótopos deuterados, que são muito caros e para a maioria dos contaminantes orgânicos não estão disponíveis comercialmente (Tuzimski e Sherma 2015, SANTE 2017). Este trabalho utilizou 16 padrões internos deuterados, praticamente um composto para cada classe que contempla os métodos multirresíduos. Adicionalmente, quando o efeito de matriz é considerado insignificante (menor ou igual a 20%), curvas de calibração no solvente podem ser usadas, evitando a necessidade de calibrações mais trabalhosas (Martins *et al.*, 2016).

Poucos estudos focam os esforços na discussão das técnicas de calibração apropriadas para compensar interferências e perdas de recuperações ocasionadas por co-extrativos presentes nas amostras. Mais recentemente uma nova abordagem de calibração denominada calibração de adição padrão diluída, com base em diluições sucessivas de um extrato obtido de uma amostra em branco tem sido estudada com o intuito de compensar os efeitos de matriz e baixas recuperações em um método multirresíduo. Entretanto esse novo método ainda está em fase de estudos para ser utilizado em trabalhos de rotina (Martins *et al.*, 2016).

6.4 Aplicabilidade do método para amostras de sedimento

Após otimização e validação da VA-MSPD, o método proposto foi aplicado em diferentes amostras de sedimentos do Brasil. 7 amostras de sedimento da região de Santos, SP (pontos de amostragem: São Vicente, Alemoa, pier, balsa, terminal 1, 2 e 3) e uma amostra de sedimento coletada no Estaleiro Irmãos Fernandes em Rio Grande, RS. As amostras passaram pelo processo de extração proposto, otimizado e validado nesse trabalho utilizando 2 g do sedimento liofilizado, macerados em grau e pistilo por 5 minutos, adicionados 5 mL de metanol, agitação em vórtex por 1 minuto e centrifugação por 10 minutos a 4000 rpm. Após, uma alíquota de cada um dos extratos foi retirada para análise e a quantificação foi realizada através da curva de calibração construída no solvente utilizando a mistura dos padrões internos.

A Tabela 19 apresenta todos os resultados para as amostras analisadas e a Tabela 20, apresenta resumidamente, o somatório das concentrações obtidas para as 8 amostras de sedimento.

Tabela 19 - Concentrações dos compostos de estudo nas amostras de sedimento analisadas (ng g⁻¹)

Analitos	LOQm (ng g ⁻¹)	São vicente 2	Alemoa	Pier pesca	Balsa	Terminal 1	Terminal 2	Terminal 3	Estaleiro de Rio Grande
BP3	2,23	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d
BP1	4,35	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d
4HB	8,13	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d
DHMB	3,44	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d
AVO	3,19	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	7,75
4MBC	1,65	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d
EHMC	36,8	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d
EtPABA	3,14	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d
MeBZT	3,20	N.d	3,48	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d
DMBZT	2,94	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d
UVP	2,67	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d
BePB	4,50	N. d	N. d	N. d	N. d	N. d	N. d	N. d	N. d
BuPB	3,13	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d
PrPB	4,43	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d
MePB	4,66	12,63	69,69	44,19	12,09	38,00	21,30	36,56	5,79
Flumequina	6,64	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d
Ofloxacina	10,3	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d
Ciprofloxacina	2,07	N. d	N. d	N. d	9,54	N. d	N. d	N. d	N. d
Ácido nalidíxico	2,73	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d
Ácido oxolinico	1,79	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d
Succinil- Sulfatiazol	1,07	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d
SDZ	1,99	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d

Analitos	LOQm (ng g ⁻¹)	São vicente 2	Alemoa	Pier pesca	Balsa	Terminal 1	Terminal 2	Terminal 3	Estaleiro de Rio Grande
acSMR	0,72	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d
SMZ	0,42	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d
acSMZ	1,09	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d
SMX	0,60	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d
acSMX	1,37	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d
acSPY	0,70	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d
SQX	1,43	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d
STZ	17,2	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d
Sulfisomidin	18,9	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d
Trimetoprim	5,20	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d
Ácido mefenâmico	3,86	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d
Naproxen	1,58	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d
IBU	5,54	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d
Diclofenaco	11,6	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d
Acetaminofen	3,70	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d
Atenolol	1,38	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d
Nor-FXT	8,00	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d	N.d
N-desVFX	3,91	N. d	N. d	N. d	N. d	N. d	N. d	N. d	N. d
Ácido salicílico	4,72	N. d	N. d	N. d	N. d	N. d	N. d	N. d	N. d
Cafeína	2,96	N. d	N. d	N. d	N. d	N. d	N. d	N. d	N. d
Diuron	2,87	N. d	N. d	N. d	N. d	N. d	N. d	N. d	N. d
Irgarol	1,44	N. d	N. d	1,51	<LOQ	1,63	N. d	1,55	2,18
DCOIT	1,78	11,55	6,50	5,02	6,70	10,42	7,46	41,14	9,18
Diclofluanida	2,48	N. d	N. d	N. d	N. d	N. d	N. d	N. d	N. d

*N.d – Não detectado
 **<LOQ – abaixo do limite de quantificação do método

Tabela 20 - Somatório das concentrações dos compostos de estudo nas amostras de sedimento analisadas (ng g⁻¹)

Amostra	ΣUVFs	ΣPBs	ΣFármacos	ΣBiocidas	ΣOutros	ΣTOTAL
São vicente 2	0	12,63	0	11,55	0	24,19
Alemoa	3,48	69,69	0	6,505	0	79,67
Pier pesca	0	44,19	0	6,542	0	50,73
Balsa	0	12,09	0	6,702	0	18,79
Terminal 1	0	38,00	0	12,05	0	50,05
Terminal 2	0	21,30	0	7,464	0	28,76
Terminial 3	0	36,56	0	42,69	0	79,25
Estaleiro de Rio Grande	0	5,79	0	11,36	0	17,15

Como exemplo geral de um dos compostos detectados em uma das 8 amostras de sedimento analisadas, a Figura 21 apresenta um cromatograma comparativo da avobenzona (AVO). O pico obtido na amostra de sedimento do estaleiro de Rio Grande foi comparado com o padrão no solvente na concentração de 10 ng mL⁻¹ e é possível perceber que em ambos cromatogramas coincide o tempo de retenção e o perfil cromatográfico da AVO, levando a crer que o resultado elucidado é realmente positivo.

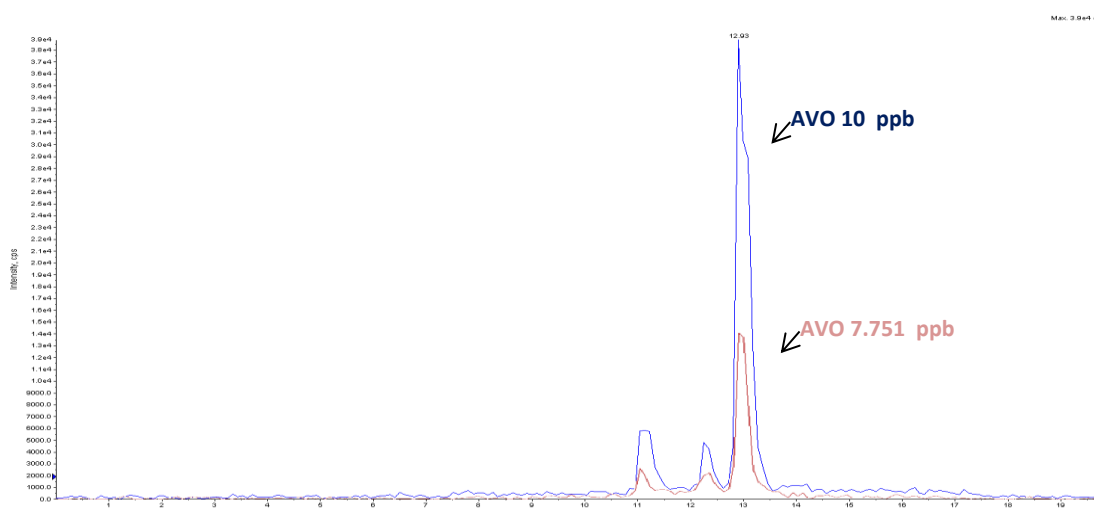


Figura 21 - Cromatograma da AVO na amostra de sedimento do estaleiro de Rio Grande, RS.

A AVO é um contaminante emergente, produto de transformação do BP3, e um dos compostos utilizados nos protetores solares que estão sendo atualmente investigados no meio ambiente (Trebše *et al.*, 2016). Esse composto já foi detectado em concentrações semelhantes em diferentes amostras ambientais como por exemplo água (Pietrogrande e Basaglia 2007, Kalister *et al.*, 2016), solo e sedimento (Peng *et al.*, 2017, Mitchelmore *et al.*, 2019) e inclusive nos próprios cosméticos (Kapalavavi *et al.*, 2012, Kim *et al.*, 2012). Adicionalmente, alguns trabalhos da literatura tem estudado a degradação da AVO por experimentos de fotodegradação afim de compreender os efeitos de estabilidade que esse composto e suas possíveis vias de degradação podem ocasionar no meio ambiente (Chatelain e Gabard 2001, Mturi e Martincigh 2008, Afonso *et al.*, 2014).

Outro composto detectado em uma das amostras coletadas na região de Santos foi o MeBZT. Além de ser investigado em sedimentos, esse composto, da classe dos benzotriazóis, tem sido detectado também em águas. No ano de 2005, Weiss e Reemtsma detectaram o MeBZT em água de superfície e subterrânea da Alemanha em concentrações $<0,01$ a $3,4 \mu\text{g L}^{-1}$ (Weiss e Reemtsma 2005). Um composto detectado em 100% das amostras analisadas foi o metilparabeno, em uma faixa de concentração de $5,79$ a $69,69 \text{ ng g}^{-1}$. O metilparabeno é um conservante amplamente utilizado em diferentes indústrias e tem sido estudado e detectado em diferentes tipos de amostras. Em estudos como o de Liao *et al.*, (2013), os autores detectaram a presença de diferentes parabenos entre eles MePB, EtPB, PrPB, BuPB e BzPB em concentrações entre $0,70$ a $95,70 \text{ ng g}^{-1}$ em amostras de sedimento e lodo de esgoto nos Estados Unidos, Japão e Coréia (Liao *et al.*, 2013). Mizukawa *et al.*, (2017) estudaram a presença de filtros UV em amostras de sedimento do Brasil e além do metilparabeno, outros compostos similares ao desse estudo, como BP1, BP3, BP4, 4HB, 4DHB, BP8, 4MBC, EtPABA, 1HBT, ODPABA, MeBT, TBHPBT, também foram detectados na faixa de $322,2 \text{ ng g}^{-1}$ (Mizukawa *et al.*, 2017).

Um dos fármacos da classe das fluoroquinolonas, a ciprofloxacina, foi detectada na amostra de sedimento da balsa de Santos. Esse composto já foi detectado em estudos anteriores de investigação, como exemplo, no trabalho de Miao *et al.*, (2004) três compostos da classe das quinolonas foram encontradas nos efluentes de estação de tratamento de esgoto. Ciprofloxacina, ofloxacina e norfloxacina foram detectados, onde a ciprofloxacina foi o composto detectado com maior frequência e em uma média de concentração de $0,118 \mu\text{g L}^{-1}$ (Miao *et al.*, 2004). Alguns autores afirmam que de acordo com o comportamento de compostos semelhantes na estrutura química, amostras aquosas podem subestimar a presença da ciprofloxacina no ambiente (Cordova-Kreylos e Scow 2007).

De modo geral, as fontes contaminação por parte dos compostos emergentes no ambiente aquático são variadas. Porém o lançamento de esgoto sanitário e de efluentes das estações de tratamento de esgoto nos corpos aquáticos são consideradas, ainda, as fontes mais significativas. Dos biocidas anti-incrustantes, o irgarol foi detectado em 4 amostras coletadas em Santos, sendo uma abaixo do limite de quantificação do método e nas amostras restantes

em concentrações entre 1,55 e 1,52 ng g⁻¹. Na amostra coletada em Rio Grande esse composto foi detectado em uma concentração de 2,18 ng g⁻¹. Além do irgarol, outro biocida proveniente dos sistemas anti-incrustantes e, assim como o metilparabeno, detectado em 100% das amostras de sedimento analisadas foi o DCOIT. A presença do biocida variou de 5,02 a 41,14 ng g⁻¹. Corroborando com a Tabela 21, que apresenta as principais características das amostras analisadas, segundo uma breve descrição de onde as mesmas foram coletadas, todas são oriundas do sistema estuarino onde o tráfego de embarcações é considerado intenso. O que leva a crer que a presença dos biocidas anti-incrustantes como irgarol e DCOIT pode estar diretamente relacionada com o grande fluxo de embarcações e que, possivelmente, estas ainda estejam utilizando esses compostos nas formulações das tintas anti-incrustantes.

Além do mais, o DCOIT apresenta propriedades físico-químicas como baixa solubilidade em água (0,0065 mg L⁻¹ a 25 °C) e um elevado coeficiente de partição entre a água e o carbono orgânico no solo (Log K_{oc} de 4,2) que indicam o particionamento preferencial desse composto no material particulado (em suspensão) e sedimentos (Yebra *et al.*, 2004). Complementar à essas informações, o tempo de meia vida que esse composto apresenta, leva a crer que o mesmo pode ser degradado nos seus respectivos produtos de degradação por diferentes vias. Entretanto, são poucos os estudos da literatura que relatam a investigação de produtos de degradação dos biocidas provenientes dos sistemas anti-incrustantes. Sendo assim, é considerado de suma importância a avaliação da ocorrência desse tipo de composto, bem como o restante das classes químicas que fazem parte desse trabalho, para verificar os níveis de contaminação bem como as causas recentes no meio ambiente.

Tabela 21 - Características e breve descrição dos pontos de coleta das amostras de sedimentos analisadas

Sistema Estuarino de Santos e São Vicente, SP						
Ponto de amostragem	Longitude (O)	Latitude (S)	Profundidade (m)	Breve descrição	% Finos	% COT
Pier do Pescador	46° 18' 10,82"	23° 59' 30,75"	3,2	Desembocadura do estuário (barcos de pesca) e turismo, no canal de acesso ao porto	17,35	0,850
Balsa	46° 17' 40,27"	23° 59' 15,40"	2,0	Tráfego intenso de embarcações usadas no transporte de veículos e passageiros (canal de acesso ao porto)	22,17	1,300
Terminal 1	46° 18' 22,85"	23° 56' 55,88"	7,0	Pier de atracação do Porto de Santos	37,21	3,030
Terminal 2	46° 19' 39,83"	23° 55' 31,16"	6,0	Pier de atracação para barcos de pesca	32,54	2,670
Terminal 3	46° 22' 9,11"	23° 55' 7,56"	7,0	Pier de atracação do Porto de Santos	39,41	2,840
Alemoa	46° 17' 11,80"	23° 58' 34,55"	4,5	Região interna do estuário de Santos com pier de atracação para embarcações do transporte de derivados de petróleo	65,11	3,450
São Vicente 2	46° 25' 30,36"	23° 57' 7,24"	3,0	Canal do estuário de São Vicente (próximo à manguezal). Pequenas embarcações de pesca e laser	14,82	1,060

*% Finos – % de partículas de silte e argila encontrada no total da amostra analisada

**% COT – % de Carbono Orgânico Total

Algumas propriedades das amostras de sedimentos analisadas, como as que estão na Tabela 21, % de carbono orgânico total, a % de partículas finas de silte e argila presentes nas amostras, além do pH, a salinidade dos locais de amostragem, a hidrodinâmica bem como o tempo de residência dos compostos nas áreas estudadas podem influenciar na disponibilidade dos compostos avaliados.

Outros estudos anteriores também detectaram os biocidas anti-incrustantes em amostras de sedimento. Batista-Andrade *et al.*, (2016) detectaram concentrações <0,25 a 2,83 ng g⁻¹ de irgarol; 2,42 a 14,06 ng g⁻¹ de o diuron; e 2,42 a 81,60 ng g⁻¹ de DCOIT. Adicionalmente, os autores relacionaram os níveis de DCOIT encontrados à presença de partículas de tintas anti-incrustantes em duas amostras de sedimentos analisadas (Batista-Andrade *et al.*, 2016). Outros estudos anteriores que também investigaram os biocidas anti-incrustantes relacionaram a presença dos compostos detectados com locais de grande fluxo de embarcações em marinas (Gough *et al.*, 1994; Bowman *et al.*, 2003; Sapozhnikova *et al.*, 2013).

De forma geral e complementar aos compostos encontrados, não foi observada a presença de alguns compostos como o BP1, BP3, EHMC, compostos das classes das sulfonamidas e alguns benzotriazóis nas amostras de sedimentos analisadas. A não presença desses compostos e comportamento pode ser relacionado a hidrofobicidade dos analitos (Log Kow < 3), onde alguns também apresentem alta solubilidade em água, assim como o BP1 e alguns de seus metabólitos, e por conta disso, a probabilidade de serem encontrados na coluna d'água é relativamente maior. Entretanto, é considerado de importante relevância a investigação e avaliação da ocorrência desses compostos em diferentes compartimentos ambientais, em conjunto com seus possíveis produtos de degradação que podem ser gerados, a fim de verificar de forma completa os níveis de contaminação bem como as causas recentes desses compostos no meio ambiente.

Esses resultados aqui apresentados fornecem um método de extração mais simples, rápido, barato, através da utilização de uma técnica de preparo de amostra miniaturizada com possível determinação simultânea para compostos orgânicos com diferentes classes e propriedades e, adicionalmente, podem contribuir e/ou melhorar o processo de controle de qualidade, bem como o

monitoramento ambiental de compostos como os biocidas e os protetores solares, por exemplo.

6.5 Comparação com outros trabalhos da literatura para sedimento

Afim de comparar o estudo realizado, otimizado e validado com outros trabalhos disponíveis na literatura que investigam a presença de compostos semelhantes em matrizes sólidas e ambientais como solo, sedimento e lodos, a Tabela 22 apresenta, de forma comparativa, as principais características de alguns trabalhos da literatura e o proposto nessa tese. Onde é possível perceber que o trabalho se destaca no que diz respeito ao desafio analítico da determinação simultânea de compostos com diferenças nas suas propriedades, além do mais, os resultados obtidos na quantificação das amostras foram possíveis através do uso de apenas 2 g de massa de amostra e 5 mL de metanol como solvente.

Tabela 22 - Comparação com outros trabalhos da literatura para amostras ambientais sólidas

Matriz	Analitos	Preparo de amostra	Massa de amostra (g)	Volume de solvente (mL)	Determinação	LOQ	Referência
Sedimento	Filtros UV	PLE	1	25	UPLC-MS/MS	0,5 – 15 ng g ⁻¹ (LOD)	(Gago-Ferrero <i>et al.</i> , 2011)
Lodo de ETE	Fármacos	QuEChERS	2	10	LC-TOF-MS	1 – 2500 ng g ⁻¹ (LOD)	(Peysson e Vulliet 2013)
Lodo de ETE	19 fármacos, 4 PCPs e 4 produtos de degradação	VA-MSPD	2	5	LC-ESI-MS/MS	1,25 – 1250 ng g ⁻¹	(Cerqueira <i>et al.</i> , 2018)
Lodo de ETE	20 PPCPs	UAE	0,1	8	HPLC-MS/MS	0,1 – 3 ng g ⁻¹	(Yu <i>et al.</i> , 2011)
Solo e sedimento	Fármacos	PLE-SPE	3	30	LC-ESI-MS/MS	-0,1 – 23 ng g ⁻¹	(Vazquez-Roig <i>et al.</i> , 2010)
Sedimento	12 fármacos	MSPD	5	5	LC-MS/MS	0,125 – 500 ng g ⁻¹	(Pavlović <i>et al.</i> , 2012)
Sedimento	5 biocidas anti-incrustantes	VA-MSPD	2	5	LC-ESI-MS/MS	0,25 – 2,50 ng g ⁻¹	(Batista-Andrade <i>et al.</i> , 2016)

Matriz	Analitos	Preparo de amostra	Massa de amostra (g)	Volume de solvente (mL)	Determinação	LOQ	Referência
Sedimento	59 compostos incluindo fármacos, filtros UV e biocidas anti-incrustantes	VA-MSPD	2	5 mL	HPLC-QqLIT-ESI-MS/MS	0,42 - 36,83 ng g ⁻¹	Este trabalho

*N.R – não reportado

6.6 Avaliação dos principais parâmetros de extração por VA-MSPD para determinação multirresíduo em peixe

6.6.1 Preparo de amostra

A VA-MSPD foi otimizada afim de obter recuperações na faixa de 70 a 120% com RSD menor ou igual a 20% para a maioria dos compostos do estudo na matriz de peixe. Como essa etapa do trabalho foi realizada posterior ao estudo anteriormente desenvolvido para sedimento e exatamente para os 59 mesmos analitos, esta etapa foi baseada no estudo anterior. Entretanto, considerando que peixe é uma matriz ambiental muitas vezes estudada e utilizada como biomarcador, e as amostras são mais difíceis de serem obtidas (quando em comparação a outras matrizes ambientais com água e sedimento, por exemplo), por conta disso, geralmente a massa de amostra utilizada é relativamente menor. No estudo da VA-MSPD otimizada para sedimento a massa de amostra utilizada foi 2 g, para peixe partiu-se da massa de amostra utilizada na técnica original com proporção de 1:4 (massa de amostra:massa de suporte sólido). Ou seja, os estudos de otimização foram realizados utilizando 0,5 g de peixe liofilizado, macerados com de 2 g de suporte sólido e 5 mL de solvente.

6.6.2 Solvente

Como o estudo para as amostras de tecido peixe foi baseado no desenvolvido anteriormente para sedimento, para otimização foram testados, inicialmente, os dois solventes que apresentaram melhores respostas para os mesmos analitos, no caso, metanol e etanol, em combinação com C18 como suporte sólido. As respostas foram avaliadas em termos de recuperações e a Figura 23 apresenta os resultados separados por percentual de compostos que recuperaram <50%, entre 70 e 120% e >140% para os compostos de estudo.

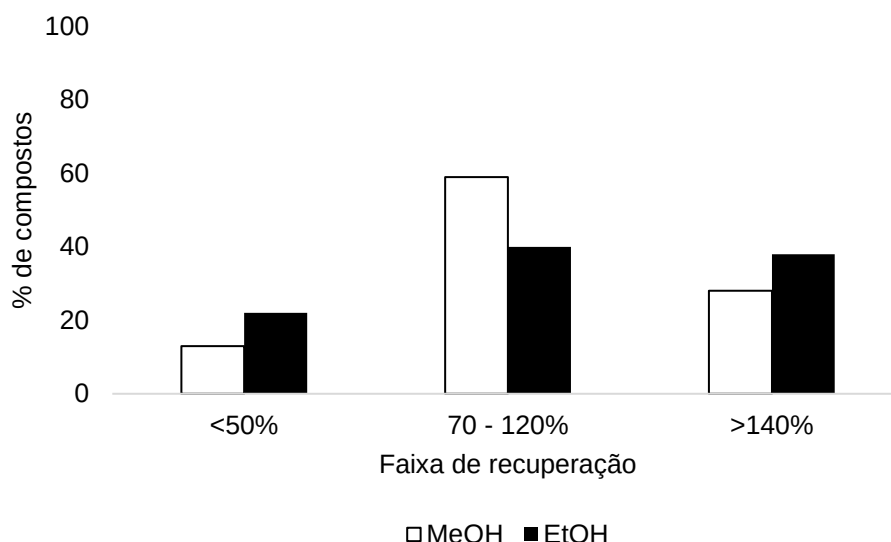


Figura 22 - Percentual de compostos que apresentaram recuperações <50%, entre 70 e 120% e >140%, utilizando diferentes solventes de extração (Condições utilizadas: 0,5 g de amostra de peixe liofilizado, 2 g de C18 como suporte sólido e 5 mL de solvente de extração. 1 minuto de agitação em vórtex e 10 minutos de centrifugação a 4000 rpm), n=3

O metanol é um solvente polar prótico e a tendência de extrair os mesmos analitos na faixa recomendada era esperada. Assim como no estudo desenvolvido para sedimento, metanol apresentou as melhores respostas de recuperação entre 70 e 120% para aproximadamente 60% dos analitos de estudo. Esse solvente tem sido comumente utilizado na extração em outros trabalhos que investigam a presença de PPCPs em matrizes de biota, como peixe. Em 2008, Kwon *et al.*, utilizaram metanol para extração de 17 PPCPs, entre eles carbamazepina, diazepam, simvastatina e oxibenzona em fígado de peixe. Os autores utilizaram LLE como preparo de amostra e etapa de limpeza por SPE e analisaram os extratos por LC-MS/MS. Como resultado, os autores obtiveram recuperações dentro da faixa recomendada com limites de quantificação do método entre 4,2 e 12,3 ng g⁻¹. Não foram encontrados a maioria os analitos nas amostras onde o método foi aplicado, entretanto diazepam foi detectado em 100% das amostras de fígado de peixe em concentrações que variaram de 23 e 110 ng g⁻¹ (Kwon *et al.*, 2008).

Ramirez *et al.*, (2007) investigaram a presença de 23 fármacos de diferentes polaridades, incluindo 2 principais metabólitos, em tecido de peixe.

Para isso, os autores testaram diferentes solventes na extração dos analitos, entre eles metanol foi o solvente que apresentou as melhores respostas de recuperação dentro da faixa de 70 a 121%. Como consequência, os limites de detecção do método foram $<6 \text{ ng g}^{-1}$ para a maioria dos analitos. Os autores aplicaram o método em amostras de peixes em um fluxo dominado por efluentes, onde difenidramin, diltiazem, carbamazepina e norfluoxetina foram detectados em 100% das amostras em concentrações que variaram de 0,11 a 5,14 ng g^{-1} (Ramirez *et al.*, 2007).

Gago-Ferrero *et al.*, (2013) testaram diferentes solventes, entre eles metanol, água, acetato de etila, diclorometano e diferentes misturas e proporções entre eles para extração de filtros UV em amostras de peixe utilizando PLE como preparo de amostra. Embora não tenha sido selecionado para o método otimizado, os autores afirmaram que quando utilizado metanol, os extratos ficaram muito mais limpos e o efeito de matriz foi menor (Gago-Ferrero *et al.*, 2013).

No trabalho de Hertzog *et al.*, (2015) os autores testaram as principais variáveis na técnica de preparo de amostra, entre elas diferentes solventes e combinações entre eles (metanol, metanol acidificado, metanol:água, metanol:água acidificada e acetonitrila) para extração de um grupo selecionado de 15 fármacos em amostras de peixes por VA-MSPD e LC-ESI-MS/MS. Dentre os selecionados para teste, metanol foi o solvente que apresentou as melhores respostas de recuperação (50 a 128%) e por consequência foi utilizado na otimização e validação do método, em um volume de 5 mL (Hertzog *et al.*, 2015).

Du *et al.*, (2012) investigaram a presença de 15 fármacos e 2 principais metabólitos em tecidos de peixe utilizando 8 mL da mistura ácido acético e metanol. Os autores obtiveram recuperações entre 49 e 89% com RSD entre 9 e 13% para os compostos de estudo e detectaram alguns dos compostos no filé e no fígado de uma das amostras analisadas (Du *et al.*, 2012).

Huerta *et al.*, (2013) estudaram a presença de 20 fármacos utilizando PLE como preparo de amostra e metanol como solvente de extração em tecidos de peixe. Os autores obtiveram respostas de recuperação dentro da faixa aceitável e afirmaram que esse foi o primeiro trabalho que detectou diclofenaco nos tecidos de peixe da região (Huerta *et al.*, 2013).

No estudo de Ramirez *et al.*, (2007), os autores avaliaram a presença de 23 fármacos e 2 metabólitos em tecidos de peixe. Foram estudadas as principais variáveis do método desenvolvido, dentre elas 10 diferentes solventes foram testados e as melhores respostas de recuperação foram obtidas quando utilizado a mistura de ácido acético e metanol (Ramirez *et al.*, 2007).

Adicionalmente ao metanol, etanol também foi o solvente polar prótico escolhido para teste na extração dos 59 compostos em peixe. Por conta das vantagens e do potencial que o etanol apresenta, estudos anteriores também testaram esse solvente para extração de compostos semelhantes aos desse estudo em matriz de biota.

Vieira *et al.*, (2018) utilizaram etanol para extração dos biocidas anti-incrustantes diuron e irgarol em músculo de três espécies distintas de peixe utilizando VA-MSPD como preparo de amostra e determinação por LC-MS/MS. Os autores utilizaram 5 mL de etanol, obtiveram respostas de recuperação entre 87 e 105% e denominaram o método desenvolvido de “*environmentally friendly*” por conta da utilização desse solvente menos tóxico ao meio ambiente (Vieira *et al.*, 2018).

Assim como no estudo desenvolvido para sedimento, o solvente que apresentou melhores respostas foi o metanol, com recuperações entre 70 e 120% para a maioria dos analitos. Entretanto, mesmo que tenham sido alcançadas recuperações dentro da faixa recomendável para 60% dos analitos, a variável suporte sólido foi otimizada, em conjunto com o metanol, afim de aumentar ainda mais o número de compostos com recuperações dentro da faixa recomendada.

6.6.3 Suporte sólido

Após a seleção do metanol para extração dos compostos de estudo, afim de aumentar o número de analitos com recuperações dentro da faixa recomendada, diferentes suportes sólidos foram testados na VA-MSPD para extração dos 59 compostos em peixe. C18, florisil, sílica, alumina e, ainda, amostra sem suporte sólido foram testados. As respostas foram avaliadas em termos de recuperação e os resultados, do percentual de compostos que recuperaram nas faixas descritas, podem ser observados na Figura 23.

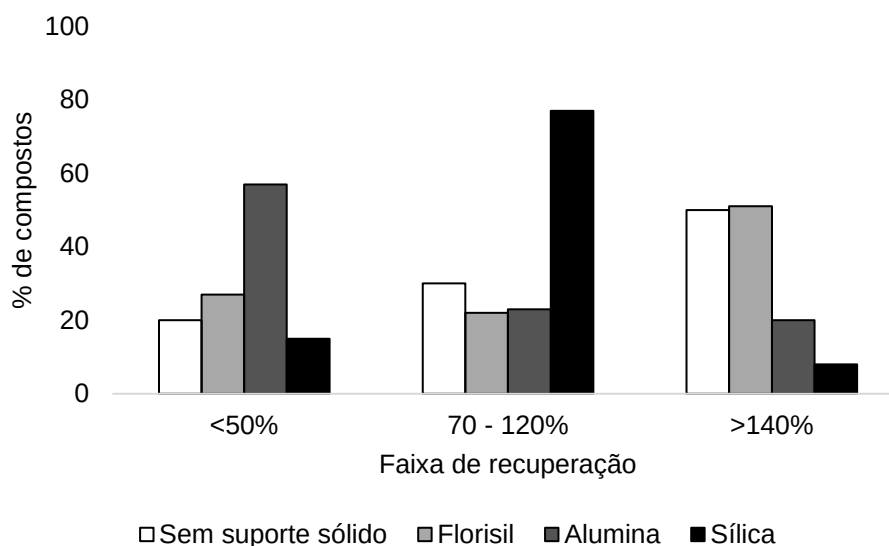


Figura 23 - Percentual de compostos que apresentaram recuperações <50%, entre 70 e 120% e >140%, utilizando diferentes suportes sólidos (Condições utilizadas: 0,5 g de amostra de peixe liofilizado, 2 g de suporte sólido e 5 mL de metanol como solvente de extração). 1 minuto de agitação em vórtex e 10 minutos de centrifugação a 4000 rpm), n=3.

Em comparação ao estudo do sedimento anteriormente realizado, onde a VA-MSPD obteve melhores respostas sem a presença de suporte sólido, para matriz de peixe foi observado comportamento distinto. Quando não utilizado suporte sólido as recuperações ficaram abaixo de 50% ou então, para a maioria dos compostos, superiores a 140%. Quando testados florisil e alumina, as recuperações excederam 140%. Em contrapartida, quando utilizado a sílica, recuperações entre 70 e 120% foram obtidas para a maioria dos analitos de estudo.

Em consonância com outros trabalhos que utilizaram MSPD como técnica de preparo de amostra na extração de fármacos em peixe, Hertzog *et al.*, (2015) testaram suportes sólidos convencionais e alternativos como C18, florisil, terra diatomácea, quitina e quitosana na VA-MSPD. Após testes de otimização visando respostas de recuperação na faixa de 70 a 120%, os autores selecionaram a terra diatomácea como melhor suporte (Hertzog *et al.*, 2015).

Em comum com outros estudos, Duarte *et al.*, (2013) também testaram diferentes suportes sólidos na VA-MSPD para extração de espécies de mercúrio em amostra de peixe. Como resultado, as melhores respostas foram obtidas

quando utilizada a sílica como suporte sólido e assim como nesse trabalho, a característica polar que esse material abrasivo apresenta, juntamente com o auxílio da força física aplicada na maceração, pode ser atribuída a esses resultados (Duarte *et al.*, 2013).

Tendo a maioria dos compostos de estudo atingido a faixa de recuperação, a Figura 24 ilustra o procedimento da VA-MSPD otimizada para aplicação em diferentes tecidos de peixe.

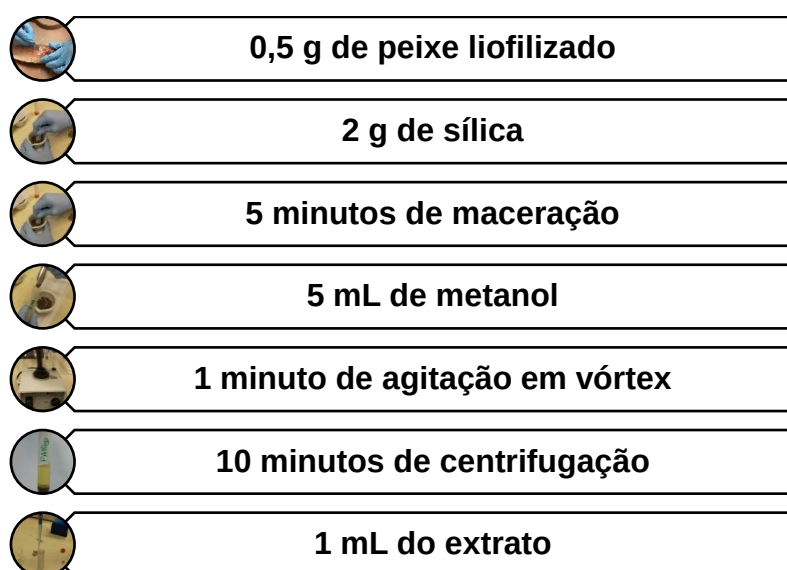


Figura 24 - Procedimento da VA-MSPD otimizada para peixe

6.7 Validação

6.7.1 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Assim como no estudo para sedimento, os limites de detecção e quantificação foram obtidos através da injeção da mistura dos padrões preparados no solvente (metanol) e no extrato da matriz, avaliando a relação sinal ruído de 10 para o LOQ e 3 para o LOD. Assim como ilustra a Tabela 23, e de modo geral, os limites de quantificação instrumentais variaram de 0,33 a 13,75 ng mL⁻¹. Sequencialmente, uma vez estabelecidos os limites de quantificação do instrumento, foi considerado o fator de conversão da VA-MSPD, onde é levado em consideração a relação entre o volume de solvente (5 mL) e a massa de amostra utilizada na otimização (0,5 g). Obtendo assim, um fator de

10 x na VA-MSPD e como consequencia os valores dos limites de quantificação do método proposto ficaram entre 3,31 e 137,51 ng g⁻¹.

Os valores dos limites encontrados nesse trabalho são similares, estão de acordo, ou então são menores quando em comparação aos que tem sido encontrados em outros trabalhos de preparo de amostra para .Gago-Ferrero *et al.*, (2013) obtiveram limite de detecção entre 0,1 e 6 ng g⁻¹ utilizando PLE como preparo de amostra para extração de compostos da mesma classe de filtros UV em peixe (Gago-Ferrero *et al.*, 2013). Hertzog *et al.*, (2015) obtiveram LOQ do método entre 5 e 1000 ng g⁻¹ para extração de apenas 15 fármacos de amostras de peixe utilizando VA-MSPD e LC-MS/MS (Hertzog *et al.*, 2015). Para os biocidas, Vieira *et al.*, (2018) obtiveram LOQs entre 5 e 625 ng g⁻¹ quando utilizada a VA-MSPD em tecido de peixe (Vieira *et al.*, 2018, Vieira *et al.*, 2018).

6.7.2 Curvas de calibração e faixa linear

A Tabela 23 apresenta os resultados das curvas de calibração preparadas no solvente e no extrato da matriz. É possível observar que estas responderam de formas distintas de acordo com as características de cada analito. De forma geral, as curvas foram construídas na faixa de 1 a 1000 ng mL⁻¹ sempre garantindo que cada curva obtivesse pelo menos cinco níveis de concentração avaliados, e como resultado geral os coeficientes de correlação das curvas no solvente variaram de 0,9974 a 0,9999, já nas curvas preparadas no extrato da matriz, os coeficientes variaram entre 0,9700 e 0,9999.

Os resultados obtidos, de forma geral, nas curvas avaliadas estão dentro da faixa recomendada por órgãos regulamentadores como o INMETRO, que recomenda que os coeficientes tenham que ser maiores de 0,90 e próximos a um para garantir linearidade dos resultados encontrados (INMETRO 2018).

Tabela 23 - Coeficientes de correlação das curvas analíticas preparadas no solvente e no extrato da matriz, Limite de Detecção instrumental (LOD_i), Limite de Quantificação instrumental (LOQ_i), Limite de Detecção do método (LOD_m), Limite de Quantificação do método (LOQ_m) e efeito matriz (EM %) de todos os analitos de estudo

Analitos	r solvente	LOD_i (ng mL⁻¹)	LOQ_i (ng mL⁻¹)	r matriz	LOD_m (ng g⁻¹)	LOQ_m (ng g⁻¹)	EM (%)
BP3	0,9999	0,40	1,33	0,9997	3,98	13,27	-7,89
BP1	0,9994	0,98	3,27	0,9999	9,81	32,67	-12,26
BP2	0,9999	0,18	0,59	0,9999	1,76	5,87	-16,01
BP4	0,9995	0,67	2,23	0,9999	6,70	22,32	-64,88
4HB	0,9996	0,60	2,01	0,9999	6,03	20,09	-12,23
4DHB	0,9995	0,47	1,56	0,9994	4,68	15,59	-9,35
DHMB	0,9989	0,69	2,32	0,9999	6,95	23,15	28,45
AVO	0,9999	0,47	1,56	0,9700	4,68	15,59	83,21
4MBC	0,9998	0,67	2,23	0,9994	6,70	22,30	-1,64
EHMC	0,9967	1,68	5,61	0,9998	16,83	56,05	43,43
EtPABA	0,9998	0,69	2,31	0,9999	6,93	23,07	-100,00
BZT	0,9999	0,46	1,53	0,9989	4,61	15,34	-75,77
MeBZT	0,9999	0,43	1,45	0,9999	4,34	14,46	-100,00
DMBZT	0,9998	0,28	0,94	0,9982	2,81	9,37	-71,06
UVP	0,9992	0,29	0,98	0,9830	2,95	9,83	-96,53
BePB	0,9996	0,25	0,82	0,9999	2,45	8,17	14,75
BuPB	0,9998	0,31	1,04	0,9999	3,14	10,44	23,91
PrPB	0,9990	0,48	1,59	0,9999	4,77	15,89	51,20
MePB	0,9998	0,38	1,25	0,9999	3,76	12,54	58,06
Flumequina	0,9998	0,24	0,78	0,9986	2,36	7,85	1,61
Ofloxacina	0,9998	0,31	1,02	0,9998	3,07	10,22	-66,70

Analitos	r solvente	LODi (ng mL ⁻¹)	LOQi (ng mL ⁻¹)	r matriz	LODm (ng g ⁻¹)	LOQm (ng g ⁻¹)	EM (%)
Ciprofloxacina	0,9986	2,08	6,93	0,9979	20,82	69,33	-71,94
Ácido nalidíxico	0,9999	0,31	1,02	0,9997	3,06	10,20	-9,34
Ácido oxolínico	0,9996	0,32	1,08	0,9985	3,23	10,76	-17,88
Succinil-sulfatiazol	0,9999	0,36	1,19	0,9997	3,58	11,91	-21,83
SDZ	0,9999	0,39	1,29	0,9998	3,86	12,86	-9,92
acSDZ	0,9999	0,33	1,11	0,9998	3,33	11,08	18,43
SMR	0,9998	0,31	1,02	0,9998	3,07	10,22	5,56
acSMR	0,9999	0,29	0,96	0,9999	2,89	9,64	50,21
SMZ	0,9994	1,11	3,69	0,9989	11,07	36,87	-20,01
acSMZ	0,9999	0,32	1,06	0,9999	3,20	10,64	56,59
SMX	0,9997	0,38	1,25	0,9998	3,77	12,54	24,74
acSMX	0,9998	0,43	1,42	0,9998	4,27	14,22	8,67
SMPZ	0,9999	0,27	0,89	0,9999	2,66	8,87	29,60
SPY	0,9999	0,29	0,98	0,9998	2,95	9,83	0,76
acSPY	0,9999	0,27	0,89	0,9999	2,67	8,90	53,43
SQX	0,9998	0,42	1,40	0,9999	4,19	13,96	73,91
STZ	0,9999	0,56	1,85	0,9994	5,56	18,50	-18,59
Sulfisomidin	0,9998	0,29	0,97	0,9999	2,90	9,66	-9,77
SDM	0,9996	0,33	1,11	0,9999	3,32	11,06	81,44
Trimetoprima	0,9996	0,88	2,95	0,9968	8,86	29,49	-91,54
Gemfibrozila	0,9999	0,26	0,86	0,9997	2,59	8,62	-35,53
Ácido mefenâmico	0,9997	0,41	1,35	0,9999	4,06	13,53	-15,50
Naproxeno	0,9998	0,32	1,06	0,9987	3,18	10,58	-75,63
IBU	0,9998	0,31	1,02	0,9998	3,07	10,22	25,76

Analitos	r solvente	LODi (ng mL⁻¹)	LOQi (ng mL⁻¹)	r matriz	LODm (ng g⁻¹)	LOQm (ng g⁻¹)	EM (%)
Cetoprofeno	0,9997	0,50	1,66	0,9998	4,99	16,61	65,99
Diclofenaco	0,9980	3,43	11,44	0,9959	34,36	114,42	20,47
Acetaminofeno	0,9998	1,32	4,39	0,9909	13,19	43,91	-95,97
CBZ	0,9999	0,10	0,33	0,9999	0,99	3,31	16,89
CBZ-10,11-epóxi	0,9996	0,17	0,57	0,9999	1,72	5,74	-10,42
Atenolol	0,9992	1,41	4,71	0,9991	14,13	47,05	-100,00
Nor-FXT	0,9974	0,66	2,19	0,9993	6,58	21,91	-54,77
N-desVFX	0,9991	0,96	3,20	0,9979	9,62	32,04	-89,03
Ácido salicílico	0,9998	0,31	1,00	0,9999	3,07	10,00	-36,73
Cafeína	0,9994	1,45	4,83	0,9951	14,50	48,29	-87,49
Diuron	0,9996	0,88	2,93	0,9996	8,81	29,34	45,71
Irgarol	0,9996	0,33	1,11	0,9992	3,32	11,07	-73,13
DCOIT	0,9985	0,70	2,33	0,9991	7,00	23,29	-58,35
Diclofluanida	0,9997	0,37	1,22	0,9984	3,67	12,22	-33,33

*Faixa linear: 1 – 1000 ng mL⁻¹ para todos os compostos avaliados

6.8 Exatidão e precisão

A eficiência da técnica de VA-MSPD para extração dos compostos em estudo foi acompanhada e avaliada de acordo com a recuperação (em %). Assim como sugere os principais órgãos regulamentadores valores de recuperação entre 70 e 120% são considerados adequadas e satisfatórias (INMETRO 2018). Sendo assim, a repetibilidade foi avaliada dentro dessa faixa esperada. Assim como as amostras de sedimento, as de peixe também foram fortificadas em três diferentes níveis de concentração, sendo eles o LOQ, 5 vezes o LOQ e 10 vezes o LOQ de cada analito.

Após a fortificação das amostras, as mesmas passaram pelo procedimento de extração segundo a VA-MSPD otimizada (0,5 g de peixe liofilizado, 2 g de sílica e 5 mL de metanol) e os resultados foram avaliados em termos de recuperação. A precisão do método foi expressa em Desvio Padrão Relativo (RSD, em %), onde a VA-MSPD apresentou precisão dentro da faixa recomendada pelos órgãos regulamentadores, onde a maioria dos compostos de estudo apresentou RSD menor ou igual a 20%. Para a repetibilidade os valores obtidos ficaram entre 0,13 e 21% e entre 0,27 e 21% para a precisão intermediária.

A Tabela 24 apresenta todos os resultados obtidos para todos os compostos de estudo e embora alguns compostos tenham apresentado recuperações superiores a 120%, ou inferiores a 70% e RSD maiores que 20%, estes são minoria quando levado em consideração a gama de compostos e o desafio analítico que compreendem um método multirresíduo. Esses resultados anômalos não comprometem a exatidão e precisão do método desenvolvido, onde outros guias de validação também esses resultados na faixa de recuperação (SANTE 2017).

Tabela 24 - Recuperações (%) e Desvio Padrão Relativo (%) em termos de repetibilidade e precisão intermediária para peixe em 3 níveis

Analito	Repetibilidade						Precisão intermediária					
	LOQ		5 LOQ		10 LOQ		LOQ		5 LOQ		10 LOQ	
	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)
BP3	78,9	23,5	109,9	24,0	120,9	2,4	82,1	3,7	111,2	18,8	105,0	0,2
BP1	89,0	20,9	79,0	15,1	117,6	8,1	76,5	4,9	119,0	3,0	127,9	3,1
BP2	n.q	7,4	62,6	16,8	91,2	3,1	68,1	4,9	99,9	7,9	86,2	18,6
BP4	70,2	2,0	113,5	2,5	91,1	7,0	84,3	3,2	72,2	2,1	68,6	0,1
4HB	92,7	6,6	120,9	1,1	119,9	1,4	93,6	0,1	97,9	5,3	85,6	4,2
4DHB	97,9	14,2	100,5	15,7	114,3	15,4	81,3	3,8	86,3	1,7	95,8	1,6
DHMB	98,5	24,2	91,9	22,2	124,2	0,7	71,0	3,4	83,2	5,7	71,0	0,4
AVO	86,7	16,9	89,3	4,0	99,4	11,5	121,5	10,9	121,6	12,9	127,4	7,1
4MBC	95,5	13,1	97,6	17,1	109,8	7,5	71,6	21,7	113,2	3,7	119,7	16,8
EHMC	83,6	4,1	108,1	9,1	73,9	4,5	86,4	14,3	99,0	9,9	90,4	10,2
EtPABA	112,5	11,3	127,3	22,7	121,8	22,4	109,0	9,8	102,1	20,3	85,4	24,0
BZT	n.q	15,8	75,3	14,5	81,1	3,1	77,1	5,4	69,6	17,0	102,2	19,3
MeBZT	124,6	6,6	129,8	20,9	129,9	13,4	111,9	0,4	101,8	1,6	91,7	2,9
DMBZT	n.q	9,9	64,9	19,2	68,9	4,3	72,0	0,3	91,9	1,0	88,8	1,2
UVP	93,0	4,6	99,2	5,2	88,7	9,7	72,0	1,3	72,0	0,5	91,9	3,9
BePB	n.q	10,5	104,0	3,4	125,5	0,5	76,1	4,2	118,3	3,3	115,3	0,1
BuPB	n.q	10,5	119,1	5,7	111,7	2,6	69,8	4,2	87,3	0,3	70,8	0,3
PrPB	84,2	8,3	112,9	4,7	115,2	0,3	84,5	3,6	84,1	0,9	88,7	0,1
MePB	94,8	4,0	123,9	3,6	108,5	6,2	71,7	0,1	76,9	0,4	67,0	1,5
Flumequina	86,3	1,8	79,7	9,6	118,6	14,5	81,7	2,5	61,5	1,8	91,1	1,3
Ofloxacin	83,8	19,1	119,0	12,3	110,2	14,5	110,5	23,2	111,9	0,6	92,0	0,5
Ciprofloxacin	129,4	11,2	120,3	7,4	110,6	4,6	121,5	12,6	111,0	7,7	99,6	0,6

Analito	Repetibilidade						Precisão intermediária					
	LOQ		5 LOQ		10 LOQ		LOQ		5 LOQ		10 LOQ	
	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)
Ácido nalidíxico	n.q	11,7	83,1	7,5	119,0	1,6	111,6	3,8	71,5	7,9	111,2	1,0
Ácido oxolínico	94,3	0,7	79,4	8,8	120,7	15,1	91,7	2,2	81,5	1,0	94,1	1,2
Succinil-sulfatiazol	74,4	4,5	71,2	9,3	123,2	8,8	81,9	1,2	91,8	3,1	91,6	0,6
SDZ	63,1	4,5	80,7	24,4	114,4	22,4	61,9	0,8	81,7	0,3	71,5	6,6
acSDZ	73,3	9,9	106,9	10,9	144,1	11,5	77,8	0,3	91,7	7,5	82,4	6,3
SMR	91,6	13,3	60,4	22,0	113,8	12,8	92,8	0,1	71,6	1,3	92,3	9,0
acSMR	79,6	18,2	122,6	12,2	96,9	19,7	111,8	0,2	101,6	3,9	81,3	10,4
SMZ	n.q	7,1	90,7	3,4	95,2	2,4	69,6	2,2	78,6	5,4	77,6	0,6
acSMZ	78,3	4,6	115,0	11,9	100,9	11,4	71,8	0,6	91,6	14,1	84,1	14,7
SMX	89,9	2,8	73,9	3,8	142,7	26,2	88,6	1,0	61,6	3,7	72,3	12,7
acSMX	90,3	12,2	99,8	10,6	127,8	9,1	97,6	1,4	81,7	4,9	101,5	5,3
SMPZ	81,7	3,5	75,6	12,8	118,4	14,6	111,0	0,6	71,6	9,8	61,2	7,9
SPY	n.q	10,2	67,0	14,7	118,3	7,5	95,4	0,5	81,6	1,5	81,3	9,4
acSPY	70,1	16,1	105,7	13,5	127,7	6,9	81,8	1,3	71,6	4,6	101,1	6,6
SQX	71,8	0,8	116,4	34,6	118,3	1,6	61,8	0,5	91,7	6,1	77,4	7,2
STZ	82,3	2,3	84,6	12,9	117,4	11,9	81,9	0,5	61,7	1,2	77,5	8,6
Sulfisomidin	99,9	22,8	94,1	9,4	111,8	24,9	71,9	0,2	71,7	2,2	91,5	3,9
SDM	72,3	0,6	115,7	20,6	139,6	5,0	101,7	0,6	101,5	8,3	111,1	10,4
Trimetoprim	95,7	8,9	91,1	7,4	71,4	9,3	91,5	2,7	89,6	0,7	77,9	9,7
Gemfibrozila	94,9	23,1	100,4	6,7	127,9	13,4	85,1	13,4	104,2	5,8	129,8	0,6
Ácido mefenâmico	116,7	5,2	91,3	1,2	87,9	13,2	111,8	5,0	91,6	0,6	91,2	9,9
Naproxeno	81,3	4,5	77,3	0,7	119,3	7,1	85,6	14,5	92,7	7,0	127,3	4,5
IBU	123,3	8,6	101,1	2,8	85,4	4,7	120,7	21,1	76,7	14,2	106,6	12,1

Analito	Repetibilidade						Precisão intermediária					
	LOQ		5 LOQ		10 LOQ		LOQ		5 LOQ		10 LOQ	
	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)
Cetoprofeno	n.q	3,6	104,1	6,2	124,6	3,7	110,9	0,1	92,0	0,3	91,4	1,5
Diclofenaco	77,6	14,2	76,3	13,8	111,8	2,1	86,9	14,2	103,9	17,4	67,3	6,7
Acetaminofeno	89,5	6,3	83,6	5,3	82,0	1,4	96,4	0,5	88,6	0,2	99,6	1,6
CBZ	87,0	4,9	101,2	16,5	137,3	22,0	91,8	0,2	71,4	8,9	81,0	2,5
CBZ-10,11-epóxi	99,9	0,9	81,8	12,5	129,2	3,4	71,8	1,1	61,4	2,9	101,0	2,2
Atenolol	n.q	3,5	61,8	0,1	73,1	12,9	110,5	5,3	101,5	20,1	85,0	12,5
Nor-FXT	88,2	3,9	65,2	1,6	110,0	10,8	91,8	0,8	71,6	4,5	99,3	3,3
N-desVFX	86,4	3,2	87,8	5,2	79,8	13,4	111,4	23,6	98,6	7,6	77,5	1,7
Ácido salicílico	101,9	24,5	103,8	22,1	120,5	26,9	121,2	20,8	85,1	14,6	112,1	13,7
Cafeína	n.q	5,9	61,8	13,8	111,4	11,2	61,7	0,3	78,5	4,3	101,5	4,3
Diuron	70,1	1,1	110,6	36,6	126,1	19,0	111,9	0,2	71,9	0,7	82,8	0,4
Irgarol	71,0	35,9	113,0	23,9	85,1	11,9	71,9	5,7	81,8	2,2	91,7	1,7
DCOIT	102,4	9,5	86,5	5,8	103,8	19,9	81,3	4,2	77,6	4,9	88,1	0,5
Diclofluanida	104,1	9,8	108,8	10,8	68,3	13,0	77,9	2,6	80,3	5,2	99,7	10,1

*n.q – Não quantificado com confiança nos níveis de fortificação avaliados

6.8.1 Efeito matriz

O efeito de matriz pode ser causado pelos próprios constituintes presentes nas amostras, onde também deve ser levado em consideração as características físico-químicas dos analitos (como polaridade e solubilidade) e dos componentes da matriz (teor de água, gordura, proteínas, pigmentos, entre outros) (SANTE 2017).

Nesse trabalho, o efeito matriz foi avaliado pela comparação das curvas de calibração preparadas no solvente (metanol) e no extrato da matriz. Vale ressaltar que todas as curvas foram construídas e avaliadas sob a presença das misturas dos padrões internos anteriormente relatados.

Em teoria, e de acordo com Economou *et al.*, (2009) o efeito matriz geralmente é reconhecido como supressão ou enriquecimento do sinal analítico devido aos componentes presentes na matriz. Adicionalmente, o efeito de matriz tem sido amplamente estudado e reconhecido como uma fonte de erro na análise quantitativa em LC-MS/MS, principalmente quando a quantificação utilizada é a padronização externa. Os efeitos devidos aos componentes da matriz foram classificados de acordo com o aumento ou supressão do sinal em %. São considerados baixos para uma faixa de supressão/aumento de sinal de $\pm 20\%$, médio para faixas de $\pm 20\%$ e $\pm 50\%$ e alto para valores superiores a 50% ou inferior a -50% (Economou *et al.*, 2009).

De modo geral, nesse trabalho, o estudo multirresíduo desenvolvido para peixe, apresentou efeito de matriz baixo ou médio para 58% dos compostos, o restante dos compostos apresentou efeito de matriz com valores superiores ou inferiores a 50%, caracterizando como valores altos.

O efeito de matriz é comumente observado para matrizes que apresentam alta complexidade analítica como os peixes. Em estudos anteriores, alguns autores também observaram efeito de matriz para essa mesma matriz, onde para efeitos de compensação, alguns utilizam, adicionalmente, etapas de limpeza como a SPE posterior ao método desenvolvido (Pavlovic *et al.*, 2012).

Em um estudo realizado por Ramirez *et al.*, (2007), os autores desenvolveram um método para análise de 25 fármacos em peixe, onde além dos diferentes solventes e proporções entre eles, diferentes pH, e efeito matriz foram avaliados para todos os casos. Como resultado, o efeito matriz observado

foi maior do que o obtido pelo método proposto e nesse sentido, os autores relataram três possibilidades distintas de realizar a quantificação em casos onde o efeito matriz é elevado, sendo a utilização de padrões interno a mais indicada para compensação desses efeitos. Entretanto, na indisponibilidade de padrões internos com características semelhantes aos compostos de estudo, a quantificação por adição de padrão e a calibração por superposição na matriz são alternativas plausíveis de serem utilizadas (Ramirez *et al.*, 2007).

6.8.2 Aplicabilidade do método para amostras de tecidos de peixe

Após otimização e validação da VA-MSPD, o método proposto foi aplicado em diferentes tecidos de peixe, todos liofilizados. Músculo, fígado, estômago e brânquias foram os tecidos analisados da espécie *Micropogonias furnieri* (nome comum: corvina). Esses tecidos foram reunidos de um grupo de peixes com as seguintes características: comprimento cabeça-início nadadeira caudal meio: $11,25 \pm 1,99$ cm, coletados com rede de arrasto na Vila da Barra em Rio Grande, RS.

Trabalhos anteriores desenvolvidos no grupo já demonstraram a robustez da VA-MSPD frente a aplicabilidade em diferentes espécies e tecidos de peixe (Hertzog *et al.*, 2015, Vieira *et al.*, 2018), comprovando a robustez verificada para aplicabilidade neste trabalho.

Assim como para as amostras de sedimento anteriormente analisadas, as amostras de peixe passaram pelo processo de extração utilizando a VA-MSPD proposta nesse trabalho (0,5 g de amostra liofilizada, 2 g de sílica e 5 mL de metanol) e foram quantificadas utilizando a curva de calibração no solvente (metanol) com a presença da mistura dos padrões internos anteriormente relatados.

A Tabela 25 apresenta os resultados encontrados para as amostras analisadas, onde foi detectada a presença de alguns compostos de estudo em altas concentrações e outros abaixo do limite de quantificação do método, enquanto a Tabela 26 apresenta o somatório das concentrações.

EtPABA e ácido salicílico foram encontrados em 100% dos tecidos. 4HB também, porém no músculo, estômago e brânquias abaixo do LOQ do método. Alguns resultados podem estar relacionados com as características dessa matriz onde o método foi aplicado. Embora tenha sido aplicado em diferentes tecidos

do mesmo peixe, a composição da matriz de diferentes espécies de peixes pode variar significativamente e é dependente de fatores como espécie, idade, peso, habitat natural, época da captura, entre outros. De uma forma geral, a composição dos peixes apresenta cerca de 60 a 90% de água, 8 a 23% de proteína e 0,5 a 25% de lipídios (de Queiroz ANDRADE *et al.*, 2009).

Tabela 25 - Concentrações dos compostos de estudos nas amostras de peixe analisadas (ng g⁻¹)

Analitos	LOQ (ng g⁻¹)	Músculo	Fígado	Estômago	Brânquias
BP3	13,27	N.d	<LOQ	N.d	N.d
BP1	32,67	N.d	N.d	N.d	N.d
BP4	22,32	N.d	N.d	N.d	N.d
4HB	20,09	<LOQ	39,49	<LOQ	<LOQ
4DHB	15,59	<LOQ	N.d	N.d	N.d
DHMB	23,15	N.d	N.d	N.d	N.d
AVO	15,59	<LOQ	N.d	N.d	N.d
4MBC	22,30	N.d	N.d	N.d	N.d
EHMC	56,05	N.d	N.d	N.d	N.d
EtPABA	23,07	2839,7	8320,2	21039,2	13186,0
MeBZT	14,46	N.d	N.d	N.d	N.d
UVP	9,83	N.d	N.d	N.d	N.d
PrPB	15,89	N.d	N.d	N.d	N.d
MePB	12,54	24,16	N.d	N.d	N.d
Flumequina	7,85	<LOQ	N.d	N.d	N.d
Ofloxacina	10,22	<LOQ	N.d	N.d	N.d
Ciprofloxacina	69,33	N.d	N.d	N.d	N.d
Ácido oxolínico	10,76	<LOQ	N.d	N.d	<LOQ
Succinil- sulfatiazol	11,91	N.d	N.d	N.d	N.d
SDZ	12,86	N.d	N.d	N.d	N.d
acSDZ	11,08	N.d	N.d	N.d	N.d
SMR	10,22	N.d	N.d	N.d	N.d
acSMR	9,64	N.d	N.d	N.d	N.d
SMZ	36,87	N.d	N.d	N.d	N.d
acSMZ	10,64	N.d	N.d	N.d	N.d
SMX	12,54	N.d	N.d	N.d	N.d
acSMX	14,22	N.d	N.d	N.d	N.d
SMPZ	8,87	N.d	N.d	N.d	N.d
SPY	9,83	N.d	N.d	N.d	N.d

Analitos	LOQ (ng g⁻¹)	Músculo	Fígado	Estômago	Brânquias
acSPY	8,90	N.d	N.d	N.d	N.d
SQX	13,96	N.d	<LOQ	N.d	N.d
STZ	18,50	N.d	N.d	N.d	N.d
Sulfisomidin	9,66	N.d	N.d	N.d	N.d
SDM	11,06	<LOQ	N.d	N.d	N.d
Trimetoprim	29,49	N.d	N.d	N.d	N.d
Gemfibrozila	8,62	N.d	N.d	N.d	N.d
Ácido					
mefenâmico	13,53	N.d	N.d	N.d	N.d
Naproxen	10,58	N.d	N.d	N.d	N.d
IBU	10,00	N.d	N.d	N.d	N.d
Diclofenaco	114,4	N.d	N.d	N.d	N.d
Acetaminofen	43,91	N.d	N.d	N.d	N.d
CBZ	3,31	N.d	N.d	N.d	N.d
CBZ 10,11-epóxi	5,74	N.d	N.d	N.d	N.d
Nor-FXT	21,91	N.d	N.d	N.d	N.d
N-desVFX	32,04	N.d	N.d	N.d	N.d
Ácido salicílico	10,22	123,63	67,74	63,76	57,30
Diuron	29,34	N.d	N.d	N.d	N.d
Irgarol	11,07	N.d	<LOQ	N.d	N.d
DCOIT	23,29	<LOQ	N.d	N.d	<LOQ
Diclofluanida	12,22	N.d	N.d	N.d	N.d

*N.d – Não detectado

**<LOQ – abaixo do limite de quantificação do método

Tabela 26 - Somatório das concentrações dos compostos de estudos nas amostras de tecidos de peixe (ng g⁻¹)

Tecido	ΣUVFs	ΣPBs	ΣFármacos	ΣBiocidas	ΣOutros	ΣTOTAL
Músculo	2839,7	24,16	123,6	0	0	2987,5
Fígado	8359,7	0	67,7	0	0	8427,5
Estômago	21039,2	0	63,7	0	0	21102,9
Brânquias	13186,0	0	57,3	0	0	13243,3

Dos filtros UV o BP3 foi encontrado abaixo do limite de quantificação do método, entretanto seus principais metabólitos como o 4HB foi encontrado no fígado, EtPABA em todos tecidos analisados e BZT no fígado. Esses resultados levam a crer que o BP3 passe por processo de metabolização na espécie,

possibilitando a detecção dos seus produtos de transformação em concentrações maiores do que o composto original.

Dos compostos da classe dos parabenos, metilparabeno foi detectado em altas concentrações em todos os tecidos analisados. Dos fármacos, alguns como a flumequina, ofloxacina, ácido oxalínico, SQX, SDM foram encontrados em diferentes tecidos, porém abaixo do limite de quantificação do método. Outro composto detectado e que chamou atenção por conta das concentrações encontradas foi o ácido salicílico, detectado em 100% dos tecidos analisados.

Em comum com outros estudos, Wille *et al.*, (2011) investigaram a presença de diversos compostos (14 agrotóxicos, 10 compostos perfluorados e 11 fármacos) e detectaram a presença de ácido salicílico, ofloxacina, propranolol, paracetamol e carbamazepina em peixes da espécie *Mytilus edulis*. Vale ressaltar que nesse trabalho o ácido salicílico foi encontrado em quase todas as amostras analisadas em níveis de até 490 ng g⁻¹. Em estudos anteriormente desenvolvidos pelo mesmo grupo de pesquisa, foi observada a presença do ácido salicílico em diversos tipos de águas, o que pode explicar a presença deste composto nas amostras onde as espécies de peixe analisadas foram coletadas. Além disso, as concentrações de ácido salicílico observadas mostraram grandes variações ao longo do tempo e localização (Wille *et al.*, 2011).

De forma geral, estudos anteriores realizados com diferentes espécies de peixes na presença de fármacos comprovam que os efeitos gerados são variados. Alteração na reprodução é uma característica comum, além de alterações fisiológicas em órgãos como fígado, cérebro e brânquias. Sendo que há estudos na literatura que propiciam a crer que compostos como os fármacos quando presentes em altas concentrações no meio ambiente podem causar efeitos adversos ao homem, por consumo de água ou então pela presença dos mesmos em organismos aquáticos (Cunningham *et al.*, 2009).

Dos biocidas analisados, apenas irgarol e DCOIT foram detectados, porém abaixo do LOQ do método. Outros trabalhos também investigaram a presença desses compostos em diferentes tecidos de peixes. Franco-Barrios *et al.*, (2014) encontraram altos níveis de irgarol (6,9 ng g⁻¹) no fígado, enquanto o diuron foi encontrado no músculo (1,41 ng g⁻¹). Os autores afirmaram que novos estudos devem ser realizados em regiões tropicais e subtropicais para

biomonitorar continuamente os biocidas durante longos períodos de tempo (Franco-Barrios *et al.*, 2014).

Em outros trabalhos não foram encontrados os biocidas de interesse nas amostras de peixe analisadas provavelmente por conta dos limites de quantificação do método serem muito altos (Vieira *et al.*, 2018).

De forma geral, é considerado de suma importância a avaliação da ocorrência de compostos emergentes, como fármacos e filtros UV e os biocidas para verificar os níveis de contaminação bem como as causas recentes no meio ambiente. Além do mais, informações a respeito da metabolização desses compostos em diferentes tecidos de biota são importantes de serem avaliadas pois é escasso o número de informações na literatura a respeito disso.

A Tabela 27 apresenta uma breve comparação e algumas informações de trabalhos disponíveis na literatura que investigaram a presença de compostos orgânicos em amostras de peixe. Onde, é possível perceber que uma das vantagens que o método desenvolvido apresenta é a pouca quantidade de amostra utilizada, onde muito embora possa ter gerado limites de quantificação do método maiores do que os obtidos para as amostras de sedimento, por exemplo, possibilitou a aplicação em tecidos que estão presentes em menores quantidades, como fígado, estômago e as brânquias.

6.9 Comparação com outros trabalhos da literatura para tecidos de peixe

Tabela 27 - Comparação com outros trabalhos da literatura para tecidos de peixe

Matriz	Analitos	Preparo de amostra	Massa de amostra (g)	Volume de solvente (mL)	Determinação	LOQ	Referência
Peixe	Filtros UV	PLE	1	200	LC-MS/MS	0,1 – 6 ng g ⁻¹ (LOD)	(Gago-Ferrero <i>et al.</i> , 2013)
Peixe	Diuron e irgarol	VA-MSPD	0,5	5	LC-ESI-MS/MS	0,5 e 50 ng g ⁻¹	(Vieira <i>et al.</i> , 2018)
Peixe	Fármacos	VA-MSPD	0,5	5	LC-ESI-MS/MS	5 – 1000 ng g ⁻¹	(Hertzog <i>et al.</i> , 2015)
Peixe	23 fármacos e 2 metabólitos	SLE	1	8	LC-MS/MS	<6 ng g ⁻¹	(Ramirez <i>et al.</i> , 2007)
Peixe	20 fármacos	PLE	1	10	UHPLC-MS/MS	0,1 – 0,98 ng g ⁻¹	(Huerta <i>et al.</i> , 2013)
Peixe	11 fármacos	PLE e SPE	1	30 de DCM	LC/MS/MS	0,08 – 1,19 ng g ⁻¹	(Wang e Gardinali 2012)

Matriz	Analitos	Preparo de amostra	Massa de amostra (g)	Volume de solvente (mL)	Determinação	LOQ	Referência
Diferentes tecidos de peixe	59 compostos incluindo PPCPs, filtros UV e biocidas atni-incrustantes	VC-MSPD	0,5	5	HPLC-QqLIT-ESI-MS/MS	3,31 – 137,51 ng g ⁻¹	Este trabalho

7 Conclusões

Diante do que foi exposto neste trabalho, um método multirresíduo para determinação de 59 compostos de diferentes classes e propriedades físico-químicas, em sedimento e outro para peixe, utilizando a VA-MSPD foram estudados, otimizados e validados. Os métodos são promissores e apresentaram exatidão e precisão adequados para uso na determinação de diferentes compostos orgânicos.

Os resultados encontrados ao longo do trabalho através do uso das técnicas miniaturizadas possibilitaram a obtenção de limites de quantificação dentro do que tem sido reportado na literatura e corroboram com os dados obtidos por outros autores que utilizam técnicas tradicionais que, em contrapartida, utilizam grande volume de solvente e massa de amostra.

Os métodos desenvolvidos possibilitaram a determinação de alguns dos compostos de estudo em 8 diferentes amostras de sedimento na faixa de concentração de 1,55 a 69,69 ng g⁻¹. Já para o método multirresíduo para peixes, a faixa de concentração detectada nos diferentes tecidos foi de 24,16 a 21039,2 ng g⁻¹.

O acoplamento da técnica miniaturizada, VA-MPSD, juntamente com os preceitos da Química Analítica Verde, e a utilização de um equipamento de cromatografia líquida de alta sensibilidade são um passo importante e inovador no âmbito da Química Analítica e Química Ambiental. O desafio dos métodos serem multirresíduos, além das características de serem mais rápidos e de menor custo quando comparados as técnicas tradicionalmente utilizadas atenderam ao objetivo geral desse trabalho.

8 Sugestões para trabalhos futuros

Como sugestão e continuação para estudos futuros apartir desse trabalho, é sugerido que técnicas analíticas miniaturizadas como a VA-MSPD sejam utilizadas como rotina para determinação de compostos orgânicos em matrizes ambientais e complexas como tecidos de peixe e sedimentos. Além do mais, as características destas técnicas podem contribuir para a minimização dos métodos clássicos e exaustivos que demandam de grande quantidade de

solventes e reagentes químicos. Adicionalmente, as técnicas miniaturizadas podem ser utilizadas em conjunto com equipamentos de cromatografia de alta resolução para elucidação estrutural de produtos de transformação que são gerados e o possível impacto dos mesmos no meio ambiente.

9 Experiência adquirida durante o período do doutorado sanduíche

O doutorado sanduíche financiado pela CAPES (Projeto Ciências do Mar II N° 1988/2014) permitiu, além do desenvolvimento experimental citado ao longo dessa tese, outros conhecimentos indispensáveis adquiridos no grupo de pesquisa da professora Dra. Silvia Díaz Cruz. Além dos esforços realizados diante do objetivo geral, outras atividades também foram realizadas durante o período de estudo (10 de julho de 2018 à 13 de março de 2019). Durante esse período houve participação em seminários do grupo IDAEA, participação em mini-curso sobre gestão de resíduos, reuniões de grupo para discussão dos resultados, aprendizagem em novos equipamentos e trabalhos desenvolvidos em paralelo com essa tese.

Todos resultados dessa tese foram discutidos em conjunto com a professora e, no momento, estão em fase de escrita dos artigos científicos como produção dessa tese:

- ✓ Método multirresíduo para determinação de fármacos, produtos de cuidado pessoal, filtros UV e biocidas anti-incrustantes em amostras de sedimento por VA-MSPD e cromatografia líquida;
- ✓ Método multirresíduo para determinação de fármacos, produtos de cuidado pessoal, filtros UV e biocidas anti-incrustantes em diferentes tecidos de peixe por VA-MSPD e cromatografia líquida;
- ✓ Elucidação estrutural dos produtos de degradação de fármacos, produtos de cuidado pessoal, filtros UV e biocidas anti-incrustantes usando espectrometria de massas de alta resolução;
- ✓ Uma revisão geral de métodos analíticos de preparo de amostra para determinação de biocidas oriundos de sistemas anti-incrustantes em matrizes ambientais;

- ✓ Participação do trabalho da doutoranda Flor de María Flores que determinou filtros UV em diferentes amostras de sedimentos do Peru por VA-MSPD.

10 Referências bibliográficas

Abreu, F. E. L. BIOCIDAS ANTI-INCRUSTANTES DE TERCEIRA GERAÇÃO EM SEDIMENTOS SUPERFICIAIS DA COSTA BRASILEIRA, UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE. (2016)

Afonso, S., K. Horita, J. S. e Silva, I. Almeida, M. Amaral, P. Lobão, P. Costa, M. S. Miranda, J. C. E. da Silva and J. S. Lobo *Photodegradation of avobenzene: stabilization effect of antioxidants. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 140(2014). 36-40.

Agarwal, V. K. *High-performance liquid chromatographic methods for the determination of sulfonamides in tissue, milk and eggs. Journal of Chromatography A* 624(1-2) (1992). 411-423.

Agüera, A., L. Piedra, M. a. D. Hernando and A. R. Fernández-Alba *Multiresidue method for the analysis of five antifouling agents in marine and coastal waters by gas chromatography–mass spectrometry with large-volume injection. Journal of Chromatography A* 889(1-2) (2000). 261-269.

Alba, A. F. *Chromatographic-mass spectrometric food analysis for trace determination of pesticide residues*, Elsevier.(2004)

Albanis, T., D. Lambropoulou, V. Sakkas and I. Konstantinou *Antifouling paint booster biocide contamination in Greek marine sediments. Chemosphere* 48(5) (2002). 475-485.

Albero, B., R. A. Pérez, C. Sánchez-Brunete and J. L. Tadeo *Occurrence and analysis of parabens in municipal sewage sludge from wastewater treatment plants in Madrid (Spain). Journal of hazardous materials* 239(2012). 48-55.

Albero, B., C. Sánchez-Brunete, E. Miguel, R. A. Pérez and J. L. Tadeo *Analysis of natural-occurring and synthetic sexual hormones in sludge-amended soils by matrix solid-phase dispersion and isotope dilution gas chromatography–tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A* 1283(2013). 39-45.

Amine, H., E. Gomez, J. Halwani, C. Casellas and H. Fenet *UV filters, ethylhexyl methoxycinnamate, octocrylene and ethylhexyl dimethyl PABA from untreated wastewater in sediment from eastern Mediterranean river transition and coastal zones. Marine Pollution Bulletin* 64(11) (2012). 2435-2442.

Anastassiades, M., S. J. Lehotay, D. Štajnbaher and F. J. Schenck *Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. Journal of AOAC international* 86(2) (2003). 412-431.

Aquino, A. and S. Navickiene *MSPD procedure for determination of carbofuran, pyrimethanil and tetraconazole residues in banana by GC–MS. Chromatographia* 70(7-8) (2009). 1265.

Arabi, M., M. Ghaedi and A. Ostovan *Development of dummy molecularly imprinted based on functionalized silica nanoparticles for determination of acrylamide in processed food by matrix solid phase dispersion. Food chemistry* 210(2016). 78-84.

Arsand, J. B., R. B. Hoff, L. Jank, L. N. Meirelles, M. S. Díaz-Cruz, T. M. Pizzolato and D. Barceló *Transformation products of amoxicillin and ampicillin after photolysis in aqueous matrices: Identification and kinetics. Science of the total environment* 642(2018). 954-967.

Attaway, H., N. Camper and M. Paynter *Anaerobic microbial degradation of diuron by pond sediment. Pesticide Biochemistry and Physiology* 17(1) (1982). 96-101.

Azevedo, D. d. A., E. Gerchon and E. O. d. Reis *Monitoring of pesticides and polycyclic aromatic hydrocarbons in water from Paraíba do Sul River, Brazil. Journal of the Brazilian Chemical Society* 15(2) (2004). 292-299.

Barker, S. A. *Applications of matrix solid-phase dispersion in food analysis. Journal of Chromatography A* 880(1) (2000). 63-68.

Barker, S. A., A. R. Long and C. R. Short *Isolation of drug residues from tissues by solid phase dispersion. Journal of Chromatography A* 475(2) (1989). 353-361.

Barón, E., P. Gago-Ferrero, M. Gorga, I. Rudolph, G. Mendoza, A. M. Zapata, S. Díaz-Cruz, R. Barra, W. Ocampo-Duque and M. Páez *Occurrence of hydrophobic organic pollutants (BFRs and UV-filters) in sediments from South America. Chemosphere* 92(3) (2013). 309-316.

Basheer, C., K. Tan and H. Lee *Organotin and Irgarol-1051 contamination in Singapore coastal waters. Marine Pollution Bulletin* 44(7) (2002). 697-703.

Batista-Andrade, J. A., S. S. Caldas, R. M. Batista, I. B. Castro, G. Fillmann and E. G. Primel *From TBT to booster biocides: Levels and impacts of antifouling along coastal areas of Panama. Environmental Pollution* 234(2018). 243-252.

Batista-Andrade, J. A., S. S. Caldas, J. L. de Oliveira Arias, I. B. Castro, G. Fillmann and E. G. Primel *Antifouling booster biocides in coastal waters of Panama: first appraisal in one of the busiest shipping zones. Marine pollution bulletin* 112(1-2) (2016). 415-419.

Batista-Andrade, J. A., S. S. Caldas, J. L. de Oliveira Arias, I. B. Castro, G. Fillmann and E. G. Primel *Antifouling booster biocides in coastal waters of Panama: First appraisal in one of the busiest shipping zones. Marine Pollution Bulletin* 112(1) (2016). 415-419.

Bester, K. *Triclosan in a sewage treatment process—balances and monitoring data. Water Research* 37(16) (2003). 3891-3896.

Bogialli, S., G. D'Ascenzo, A. Di Corcia, A. Laganà and S. Nicolardi *A simple and rapid assay based on hot water extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry for monitoring quinolone residues in bovine milk. Food chemistry* 108(1) (2008). 354-360.

Caldas, S. S., C. M. Bolzan, E. J. de Menezes, A. L. V. Escarrone, C. d. M. G. Martins, A. Bianchini and E. G. Primel *A vortex-assisted MSPD method for the extraction of pesticide residues from fish liver and crab hepatopancreas with determination by GC–MS. Talanta* 112(2013). 63-68.

Caldas, S. S., C. Rombaldi, M. B. R. Cerqueira, B. M. Soares and E. G. Primel *Avanços recentes da MSPD para extração de resíduos de agrotóxicos, PPCPs, compostos inorgânicos e organometálicos. Sci Chromatogr* 5(2013). 190-213.

Caldas, S. S., C. Rombaldi, J. L. de Oliveira Arias, L. C. Marube and E. G. Primel *Multi-residue method for determination of 58 pesticides, pharmaceuticals and personal care products in water using solvent demulsification dispersive liquid–liquid microextraction combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Talanta* 146(2016). 676-688.

Caldas, S. S., B. M. Soares, F. Abreu, Í. B. Castro, G. Fillmann and E. G. Primel *Antifouling booster biocide extraction from marine sediments: a fast and simple method based on vortex-assisted matrix solid-phase extraction. Environmental Science and Pollution Research* 25(8) (2018). 7553-7565.

Callow, M. E. and G. Willingham *Degradation of antifouling biocides. Biofouling* 10(1-3) (1996). 239-249.

Cancilla, D., J. Baird and R. Rosa *Detection of aircraft deicing additives in groundwater and soil samples from Fairchild Air Force Base, a small to moderate user of deicing fluids. Bulletin of environmental contamination and toxicology* 70(5) (2003). 0868-0875.

Cao, W., S.-S. Hu, L.-H. Ye, J. Cao, X.-Q. Pang and J.-J. Xu *Trace matrix solid phase dispersion using a molecular sieve as the sorbent for the determination of flavonoids in fruit peels by ultra-performance liquid chromatography*. *Food chemistry* 190(2016). 474-480.

Capriotti, A. L., C. Cavaliere, P. Giansanti, R. Gubbiotti, R. Samperi and A. Laganà *Recent developments in matrix solid-phase dispersion extraction*. *Journal of chromatography A* 1217(16) (2010). 2521-2532.

Carbery, K., R. Owen, T. Frickers, E. Otero and J. Readman *Contamination of Caribbean coastal waters by the antifouling herbicide Irgarol 1051*. *Marine Pollution Bulletin* 52(6) (2006). 635-644.

Carrasco, P. B., S. Díez, J. Jiménez, M. a.-P. Marco and J. M. Bayona *Determination of Irgarol 1051 in Western Mediterranean sediments. Development and application of supercritical fluid extraction-immunoaffinity chromatography procedure*. *Water research* 37(15) (2003). 3658-3665.

Casado, J., G. Castro, I. Rodríguez, M. Ramil and R. Cela *Selective extraction of antimycotic drugs from sludge samples using matrix solid-phase dispersion followed by on-line clean-up*. *Analytical and bioanalytical chemistry* 407(3) (2015). 907-917.

Casado, J., D. Santillo and P. Johnston *Multi-residue analysis of pesticides in surface water by liquid chromatography quadrupole-Orbitrap high resolution tandem mass spectrometry*. *Analytica chimica acta* 1024(2018). 1-17.

Cassi, R., I. Tolosa and S. de Mora *A survey of antifoulants in sediments from Ports and Marinas along the French Mediterranean coast*. *Marine Pollution Bulletin* 56(11) (2008). 1943-1948.

Castro, Í. B. d., E. Westphal and G. Fillmann *Tintas anti-incrustantes de terceira geração: novos biocidas no ambiente aquático*. (2011).

Čelić, M., M. Gros, M. Farré, D. Barceló and M. Petrović *Pharmaceuticals as chemical markers of wastewater contamination in the vulnerable area of the Ebro Delta (Spain)*. *Science of The Total Environment*(2018).

Cerqueira, M. B., K. L. Soares, S. S. Caldas and E. G. Primel *Sample as solid support in MSPD: A new possibility for determination of pharmaceuticals, personal care and degradation products in sewage sludge*. *Chemosphere* 211(2018). 875-883.

Chatelain, E. and B. Gabard *Photostabilization of Butyl methoxydibenzoylmethane (Avobenzene) and Ethylhexyl methoxycinnamate by*

Bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine (Tinosorb S), a New UV Broadband Filter¶. *Photochemistry and Photobiology* 74(3) (2001). 401-406.

Chen, L., Y. Xu, W. Wang and P.-Y. Qian *Degradation kinetics of a potent antifouling agent, butenolide, under various environmental conditions*. *Chemosphere* 119(2015). 1075-1083.

COLLINS, C., G. BRAGA and P. BONATO *Fundamentos de Cromatografia*, editora Unicamp. Camoinas, São Paulo, 290p(2006).

Comber, S., M. Gardner and A. Boxall *Survey of four marine antifoulant constituents (copper, zinc, diuron and Irgarol 1051) in two UK estuaries*. *Journal of Environmental Monitoring* 4(3) (2002). 417-425.

Connelly, D. P., J. W. Readman, A. H. Knap and J. Davies *Contamination of the coastal waters of Bermuda by organotins and the triazine herbicide Irgarol 1051*. *Marine Pollution Bulletin* 42(5) (2001). 409-414.

Cordova-Kreylos, A. L. and K. M. Scow *Effects of ciprofloxacin on salt marsh sediment microbial communities*. *The ISME journal* 1(7) (2007). 585.

Cresswell, T., J. P. Richards, G. A. Glegg and J. W. Readman *The impact of legislation on the usage and environmental concentrations of Irgarol 1051 in UK coastal waters*. *Marine pollution bulletin* 52(10) (2006). 1169-1175.

Crommentuijn, T., D. Sijm, J. De Bruijn, K. Van Leeuwen and E. Van de Plassche *Maximum permissible and negligible concentrations for some organic substances and pesticides*. *Journal of Environmental Management* 58(4) (2000). 297-312.

CSIC. *Consejo Superior de Investigaciones Científicas - CSIC*. Retrieved 03 de abril de 2019., Disponível em: <http://http://www.csic.es/>. (2019)

Dafforn, K. A., J. A. Lewis and E. L. Johnston *Antifouling strategies: history and regulation, ecological impacts and mitigation*. *Marine Pollution Bulletin* 62(3) (2011). 453-465.

de Queiroz ANDRADE, G., E. da Silva BISPO and J. I. Druzian *Avaliação da qualidade nutricional em espécies de pescado mais produzidas no Estado da Bahia*. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 29(4) (2009).

Di Landa, G., G. Ansanelli, R. Ciccoli and C. Cremisini *Occurrence of antifouling paint booster biocides in selected harbors and marinas inside the Gulf of Napoli: a preliminary survey*. *Marine pollution bulletin* 52(11) (2006). 1541-1546.

Díaz-Cruz, M. S. and D. Barceló *Determination of antimicrobial residues and metabolites in the aquatic environment by liquid chromatography tandem mass spectrometry*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 386(4) (2006). 973-985.

Díaz-Cruz, M. S., P. Gago-Ferrero, M. Llorca and D. Barceló *Analysis of UV filters in tap water and other clean waters in Spain. Analytical and bioanalytical chemistry* 402(7) (2012). 2325-2333.

Díaz-Cruz, M. S., M. J. García-Galán and D. Barceló *Highly sensitive simultaneous determination of sulfonamide antibiotics and one metabolite in environmental waters by liquid chromatography–quadrupole linear ion trap–mass spectrometry. Journal of Chromatography A* 1193(1-2) (2008). 50-59.

Díaz-Cruz, M. S., D. Molins-Delgado, M. P. Serra-Roig, E. Kalogianni, N. T. Skoulikidis and D. Barceló *Personal care products reconnaissance in EVROTAS river (Greece): Water-sediment partition and bioaccumulation in fish. Science of The Total Environment* 651(2019). 3079-3089.

Diniz, L. G. R., T. C. R. dos Santos Franco and M. S. de Jesus *PRINCIPAIS MÉTODOS PARA ANÁLISE DO ANTI-INCRUSTANTE IRGAROL EM AMBIENTES MARINHOS E AVALIAÇÃO DA ECOTOXICIDADE. Cadernos de Pesquisa*(2012).

Diniz, L. G. R., M. S. Jesus, L. A. E. Dominguez, G. Fillmann, E. M. Vieira and T. C. R. Franco *First appraisal of water contamination by antifouling booster biocide of 3rd generation at Itaqui Harbor (São Luiz-Maranhão-Brazil). Journal of the Brazilian Chemical Society* 25(2) (2014). 380-388.

DINIZ, M. d. S. *DETERMINAÇÃO DOS BIOCIDAS ANTI-INCRUSTANTES IRGAROL E DIURON EM ÁREAS PORTUÁRIAS DA ILHA DE SÃO LUÍS, MARANHÃO.* (2017).

Du, B., P. Perez-Hurtado, B. Brooks and C. Chambliss *Evaluation of an isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry method for pharmaceuticals in fish. Journal of Chromatography A* 1253(2012). 177-183.

Duarte, F. A., B. M. Soares, A. A. Vieira, E. R. Pereira, J. V. Maclel, S. S. Caldas and E. G. Primel *Assessment of modified matrix solid-phase dispersion as sample preparation for the determination of CH₃Hg⁺ and Hg₂⁺ in fish. Analytical Chemistry* 85(10) (2013). 5015-5022.

Economou, A., H. Botitsi, S. Antoniou and D. Tsipi *Determination of multi-class pesticides in wines by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Journal of chromatography A* 1216(31) (2009). 5856-5867.

EPA. *Method 1694: Pharmaceuticals and Personal Care Products in Water, Soil, Sediment, and Biosolids by HPLC/MS/MS.* Disponível. (2007)

Escarrone, A. L. V., S. S. Caldas, B. M. Soares, S. E. Martins, E. G. Primel and L. E. Maia Nery *A vortex-assisted MSPD method for triclosan extraction from fish*

tissues with determination by LC-MS/MS. *Analytical Methods* 6(20) (2014). 8306-8313.

Européia, D. *POSIÇÃO DO PARLAMENTO EUROPEU* Retrieved 30 de abril de 2019., Disponível em: <http://www.europarl.europa.eu/sides/getDoc.do?pubRef=-//EP//NONSGML+TC+P6-TC1-COD-2008-0035+0+DOC+PDF+V0//PT>. (2009)

Fent, K., A. Zenker and M. Rapp *Widespread occurrence of estrogenic UV-filters in aquatic ecosystems in Switzerland. Environmental Pollution* 158(5) (2010). 1817-1824.

Fernández-Alba, A., M. Hernando, L. Piedra and Y. Chisti *Toxicity evaluation of single and mixed antifouling biocides measured with acute toxicity bioassays. Analytica Chimica Acta* 456(2) (2002). 303-312.

Ferrer, I., B. Ballesteros, M. P. Marco and D. Barceló *Pilot survey for determination of the antifouling agent irgarol 1051 in enclosed seawater samples by a direct enzyme-linked immunosorbent assay and solid-phase extraction followed by liquid chromatography– diode array detection. Environmental science & technology* 31(12) (1997). 3530-3535.

Ferrer, I. and D. Barceló *Simultaneous determination of antifouling herbicides in marina water samples by on-line solid-phase extraction followed by liquid chromatography–mass spectrometry. Journal of Chromatography A* 854(1-2) (1999). 197-206.

Ferrer, I. and D. Barceló *Identification of a new degradation product of the antifouling agent Irgarol 1051 in natural samples. Journal of Chromatography a* 926(1) (2001). 221-228.

Ferrer, I., M.-C. Hennion and D. Barceló *Immunsorbents coupled on-line with liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization/mass spectrometry for the part per trillion level determination of pesticides in sediments and natural waters using low preconcentration volumes. Analytical Chemistry* 69(22) (1997). 4508-4514.

Franco-Barrios, A., M. E. Torres-Padrón, Z. Sosa-Ferrera and J. J. Santana-Rodríguez *Development and application of a microwave-assisted extraction and LC/MS/MS methodology to the determination of antifouling booster biocides in sea mullets (Mugil cephalus) organisms. Journal of AOAC International* 97(1) (2014). 197-204.

Fries, E. *Determination of benzothiazole in untreated wastewater using polar-phase stir bar sorptive extraction and gas chromatography–mass spectrometry. Analytica chimica acta* 689(1) (2011). 65-68.

Gago-Ferrero, P., M. S. Díaz-Cruz and D. Barceló *Fast pressurized liquid extraction with in-cell purification and analysis by liquid chromatography tandem mass spectrometry for the determination of UV filters and their degradation products in sediments. Analytical and bioanalytical chemistry* 400(7) (2011). 2195-2204.

Gago-Ferrero, P., M. S. Díaz-Cruz and D. Barceló *Occurrence of multiclass UV filters in treated sewage sludge from wastewater treatment plants. Chemosphere* 84(8) (2011). 1158-1165.

Gago-Ferrero, P., M. S. Díaz-Cruz and D. Barceló *Multi-residue method for trace level determination of UV filters in fish based on pressurized liquid extraction and liquid chromatography–quadrupole-linear ion trap-mass spectrometry. Journal of Chromatography A* 1286(2013). 93-101.

Gago-Ferrero, P., M. S. Díaz-Cruz and D. Barceló *UV filters bioaccumulation in fish from Iberian river basins. Science of the Total Environment* 518(2015). 518-525.

García-Galán, M. J., M. S. Díaz-Cruz and D. Barceló *Determination of 19 sulfonamides in environmental water samples by automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography–tandem mass spectrometry (SPE-LC–MS/MS). Talanta* 81(1-2) (2010). 355-366.

García-Rodríguez, D., R. Cela-Torrijos, R. Lorenzo-Ferreira and A. Carro-Díaz *Analysis of pesticide residues in seaweeds using matrix solid-phase dispersion and gas chromatography–mass spectrometry detection. Food chemistry* 135(1) (2012). 259-267.

Gardinali, P. R., M. Plasencia, S. Mack and C. Poppell *Occurrence of Irgarol 1051 in coastal waters from Biscayne Bay, Florida, USA. Marine pollution bulletin* 44(8) (2002). 781-788.

Gardinali, P. R., M. D. Plasencia and C. Maxey *Occurrence and transport of Irgarol 1051 and its major metabolite in coastal waters from South Florida. Marine Pollution Bulletin* 49(11-12) (2004). 1072-1083.

Gatidou, G., A. Kotrikla, N. S. Thomaidis and T. D. Lekkas *Determination of two antifouling booster biocides and their degradation products in marine sediments by high performance liquid chromatography–diode array detection. Analytica Chimica Acta* 505(1) (2004). 153-159.

Gatidou, G., A. Kotrikla, N. S. Thomaidis and T. D. Lekkas *Determination of the antifouling booster biocides irgarol 1051 and diuron and their metabolites in seawater by high performance liquid chromatography–diode array detector. Analytica Chimica Acta* 528(1) (2005). 89-99.

Gatidou, G., N. S. Thomaidis and J. L. Zhou *Fate of Irgarol 1051, diuron and their main metabolites in two UK marine systems after restrictions in antifouling paints. Environment International* 33(1) (2007). 70-77.

Giacomazzi, S. and N. Cochet *Environmental impact of diuron transformation: a review. Chemosphere* 56(11) (2004). 1021-1032.

Giger, W., C. Schaffner and H.-P. E. Kohler *Benzotriazole and tolyltriazole as aquatic contaminants. 1. Input and occurrence in rivers and lakes. Environmental science & technology* 40(23) (2006). 7186-7192.

Gimeno, R., C. Aguilar, R. Marcé and F. Borrull *Monitoring of antifouling agents in water samples by on-line solid-phase extraction–liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. Journal of Chromatography A* 915(1-2) (2001). 139-147.

Godoi, A. F. L., R. Favoreto and M. Santiago-Silva *Contaminação ambiental por compostos organoestênicos. Química nova* 26(5) (2003). 708-716.

Gómez, M. J., M. Petrović, A. R. Fernández-Alba and D. Barceló *Determination of pharmaceuticals of various therapeutic classes by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis in hospital effluent wastewaters. Journal of Chromatography A* 1114(2) (2006). 224-233.

Hall Jr, L., R. Anderson and M. Ailstock *Chronic toxicity of Irgarol 1051 to submerged aquatic macrophytes. Final Report, University of Maryland, Wye Research and Education Center, Queenstown, MD, USA*(1999).

Hamwijk, C., A. Schouten, E. Foekema, J. Ravensberg, M. Collombon, K. Schmidt and M. Kugler *Monitoring of the booster biocide dichlofluanid in water and marine sediment of Greek marinas. Chemosphere* 60(9) (2005). 1316-1324.

Hanssen, H. W. and N. D. Henderson *A review of the environmental impact and toxic effects of 2-MBT, The Division.*(1991)

Harino, H., S. Midorikawa, T. Arai, M. Ohji, N. D. Cu and N. Miyazaki *Concentrations of booster biocides in sediment and clams from Vietnam. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 86(5) (2006). 1163-1170.

Harino, H., M. Ohji, G. Wattayakorn, T. Arai, S. Rungsupa and N. Miyazaki *Occurrence of antifouling biocides in sediment and green mussels from Thailand. Archives of environmental contamination and toxicology* 51(3) (2006). 400-407.

HARRIS, D. C. *Análise Química Quantitativa, 5ª. Ed., Rio de Janeiro, Editora Livros Técnicos e Científicos*(2001).

Hartig, C., T. Storm and M. Jekel *Detection and identification of sulphonamide drugs in municipal waste water by liquid chromatography coupled with electrospray ionisation tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A* 854(1-2) (1999). 163-173.

Hernando, M. D., L. Piedra, Á. Belmonte, A. Agüera and A. R. Fernández-Alba *Determination of traces of five antifouling agents in water by gas chromatography with positive/negative chemical ionisation and tandem mass spectrometric detection. Journal of Chromatography A* 938(1-2) (2001). 103-111.

Herrero, P., F. Borrull, E. Pocurull and R. M. Marcé *An overview of analytical methods and occurrence of benzotriazoles, benzothiazoles and benzenesulfonamides in the environment. TrAC Trends in Analytical Chemistry* 62(2014). 46-55.

Hertzog, G. I., K. L. Soares, S. S. Caldas and E. G. Primel *Study of vortex-assisted MSPD and LC-MS/MS using alternative solid supports for pharmaceutical extraction from marketed fish. Analytical and bioanalytical chemistry* 407(16) (2015). 4793-4803.

Hirsch, R., T. A. Ternes, K. Haberer, A. Mehlich, F. Ballwanz and K.-L. Kratz *Determination of antibiotics in different water compartments via liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A* 815(2) (1998). 213-223.

Hoff, R. B., L. Meneghini, T. n. M. Pizzolato, M. d. C. R. Peralba, M. S. Díaz-Cruz and D. Barceló *Structural elucidation of sulfaquinoxaline metabolism products and their occurrence in biological samples using high-resolution orbitrap mass spectrometry. Analytical chemistry* 86(11) (2014). 5579-5586.

Huerta, B., A. Jakimska, M. Gros, S. Rodriguez-Mozaz and D. Barcelo *Analysis of multi-class pharmaceuticals in fish tissues by ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A* 1288(2013). 63-72.

IDAEA. *Instituto de Diagnostico Ambiental y Estudios del Agua - IDAEA*. Disponível em: <https://www.idaea.csic.es/>. (2019)

INMETRO. *Orientação sobre validação de métodos analíticos DOQ-CGCRE-008, Revisão em julho de 2018*. Retrieved 30 de abril de 2018., 2019, Disponível em: [file:///C:/Users/soare/Downloads/DOQ-Cgcre-8_07%20\(1\)_INMETRO_2018.pdf](file:///C:/Users/soare/Downloads/DOQ-Cgcre-8_07%20(1)_INMETRO_2018.pdf). (2018)

Jardim, J. J., L. S. Alves and M. Maltz *The history and global market of oral home-care products. Brazilian oral research* 23(2009). 17-22.

Jelić, A., M. Petrović and D. Barceló *Multi-residue method for trace level determination of pharmaceuticals in solid samples using pressurized liquid extraction followed by liquid chromatography/quadrupole-linear ion trap mass spectrometry. Talanta* 80(1) (2009). 363-371.

Jeon, H.-K., Y. Chung and J.-C. Ryu *Simultaneous determination of benzophenone-type UV filters in water and soil by gas chromatography–mass spectrometry. Journal of Chromatography A* 1131(1-2) (2006). 192-202.

Joss, A., S. Zabczynski, A. Göbel, B. Hoffmann, D. Löffler, C. S. McArdell, T. A. Ternes, A. Thomsen and H. Siegrist *Biological degradation of pharmaceuticals in municipal wastewater treatment: proposing a classification scheme. Water research* 40(8) (2006). 1686-1696.

Jover, E., V. Matamoros and J. M. Bayona *Characterization of benzothiazoles, benzotriazoles and benzosulfonamides in aqueous matrixes by solid-phase extraction followed by comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry. Journal of Chromatography A* 1216(18) (2009). 4013-4019.

Kalister, K., D. Dolenc, M. Sarakha, O. Polyakova, A. Lebedev and P. Trebše *A chromatography-mass spectrometry study of aquatic chlorination of UV-filter avobenzene. Journal of analytical chemistry* 71(14) (2016). 1289-1293.

Kaonga, C. C., K. Takeda and H. Sakugawa *Antifouling agents and Fenitrothion contamination in seawater, sediment, plankton, fish and selected marine animals from the Seto Inland Sea, Japan. Geochemical Journal* 49(1) (2015). 23-37.

Kapalavavi, B., R. Marple, C. Gamsky and Y. Yang *Separation of sunscreens in skincare creams using greener high-temperature liquid chromatography and subcritical water chromatography. International journal of cosmetic science* 34(2) (2012). 169-175.

Kazos, E. A., C. G. Nanos, C. D. Stalikas and C. N. Konidari *Simultaneous determination of chlorothalonil and its metabolite 4-hydroxychlorothalonil in greenhouse air: dissipation process of chlorothalonil. Chemosphere* 72(10) (2008). 1413-1419.

Kim, D., S. Kim, S.-A. Kim, M. Choi, K.-J. Kwon, M. Kim, D.-S. Kim, S.-H. Kim and B.-K. Choi *Simultaneous analysis and monitoring of 16 UV filters in cosmetics by high-performance liquid chromatography. Journal of cosmetic science* 63(2) (2012). 103-117.

Kim, N. S., W. J. Shim, U. H. Yim, S. H. Hong, S. Y. Ha, G. M. Han and K.-H. Shin *Assessment of TBT and organic booster biocide contamination in seawater*

from coastal areas of South Korea. *Marine pollution bulletin* 78(1-2) (2014). 201-208.

Kim, U.-J., I.-S. Lee, M. Choi and J.-E. Oh *Assessment of organotin and tin-free antifouling paints contamination in the Korean coastal area. Marine pollution bulletin* 99(1-2) (2015). 157-165.

Kloepfer, A., M. Jekel and T. Reemtsma *Determination of benzothiazoles from complex aqueous samples by liquid chromatography–mass spectrometry following solid-phase extraction. Journal of Chromatography A* 1058(1-2) (2004). 81-88.

Klosterhaus, S. L., R. Grace, M. C. Hamilton and D. Yee *Method validation and reconnaissance of pharmaceuticals, personal care products, and alkylphenols in surface waters, sediments, and mussels in an urban estuary. Environment international* 54(2013). 92-99.

Knutson, S., C. Downs, R. Richmond and G. K. Ostrander *Distribution, effects, and risk of irgarol on hawaiian coral reefs. Report to the Hawaii Coral Reef Initiative Research Program*(2006).

Köck-Schulmeyer, M., C. Postigo, M. Farré, D. Barceló and M. L. de Alda *Medium to highly polar pesticides in seawater: Analysis and fate in coastal areas of Catalonia (NE Spain). Chemosphere* 215(2019). 515-523.

Konstantinou, I. and T. Albanis *Worldwide occurrence and effects of antifouling paint booster biocides in the aquatic environment: a review. Environment International* 30(2) (2004). 235-248.

Kurz, M. H., J. L. d. S. Batista, L. G. de Oliveira, R. Hoff, M. L. Martins and F. F. Gonçalves *Clean-up Procedure Development and Method Validation for Pesticide Residues Analysis in Carrots. Food Analytical Methods* 12(1) (2019). 282-292.

Kwon, J.-W., K. L. Armbrust, D. Vidal-Dorsch, S. M. Bay and K. Xia *Determination of 17-ethynylestradiol, carbamazepine, diazepam, simvastatin, and oxybenzone in fish livers. Journal of AOAC International* 92(1) (2008). 359-370.

Lam, K.-H., Z. Cai, H.-Y. Wai, V. W.-H. Tsang, M. H.-W. Lam, R. Y.-H. Cheung, H. Yu and P. K.-S. Lam *Identification of a new Irgarol-1051 related s-triazine species in coastal waters. Environmental pollution* 136(2) (2005). 221-230.

Lam, K.-H., N.-Y. Lei, V. W.-H. Tsang, Z. Cai, K. M. Leung and M. H.-W. Lam *A mechanistic study on the photodegradation of Irgarol-1051 in natural seawater. Marine pollution bulletin* 58(2) (2009). 272-279.

Lambropoulou, D. A., V. A. Sakkas and T. A. Albanis *Analysis of antifouling biocides Irgarol 1051 and Sea Nine 211 in environmental water samples using solid-phase microextraction and gas chromatography. Journal of Chromatography A* 952(1-2) (2002). 215-227.

Lambropoulou, D. A., V. A. Sakkas and T. A. Albanis *Determination of antifouling compounds in marine sediments by solid-phase microextraction coupled to gas chromatography–mass spectrometry. Journal of chromatography A* 1010(1) (2003). 1-8.

Lamoree, M., C. Swart, A. Van der Horst and B. Van Hattum *Determination of diuron and the antifouling paint biocide Irgarol 1051 in Dutch marinas and coastal waters. Journal of Chromatography A* 970(1-2) (2002). 183-190.

LANÇAS, F. M. *Cromatografia líquida moderna: HPLC/CLAE. Campinas: Editora Átomo*(2009).

Lehotay, S. J., A. R. Lightfield, J. A. Harman-Fetcho and D. J. Donoghue *Analysis of pesticide residues in eggs by direct sample introduction/gas chromatography/tandem mass spectrometry. Journal of agricultural and food chemistry* 49(10) (2001). 4589-4596.

Lehotay, S. J., K. A. Son, H. Kwon, U. Koesukwiwat, W. Fu, K. Mastovska, E. Hoh and N. Leepipatpiboon *Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. Journal of Chromatography A* 1217(16) (2010). 2548-2560.

Liao, C., S. Lee, H.-B. Moon, N. Yamashita and K. Kannan *Parabens in sediment and sewage sludge from the United States, Japan, and Korea: spatial distribution and temporal trends. Environmental science & technology* 47(19) (2013). 10895-10902.

Liu, D., G. Pacepavicius, R. Maguire, Y. Lau, H. Okamura and I. Aoyama *Survey for the occurrence of the new antifouling compound Irgarol 1051 in the aquatic environment. Water Research* 33(12) (1999). 2833-2843.

Liu, H., W. Kong, B. Gong, Q. Miao, Y. Qi and M. Yang *Rapid analysis of multi-pesticides in Morinda officinalis by GC–ECD with accelerated solvent extraction assisted matrix solid phase dispersion and positive confirmation by GC–MS. Journal of Chromatography B* 974(2015). 65-74.

Löffler, D. and T. A. Ternes *Analytical method for the determination of the aminoglycoside gentamicin in hospital wastewater via liquid chromatography–electrospray-tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A* 1000(1-2) (2003). 583-588.

Loos, R., G. Hanke and S. J. Eisenreich *Multi-component analysis of polar water pollutants using sequential solid-phase extraction followed by LC-ESI-MS. Journal of Environmental Monitoring* 5(3) (2003). 384-394.

Maldaner, L. and I. C. Jardim *Determination of some organic contaminants in water samples by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Talanta* 100(2012). 38-44.

Martínez Bueno, M. J., A. Agüera, M. J. Gómez, M. D. Hernando, J. F. García-Reyes and A. R. Fernández-Alba *Application of liquid chromatography/quadrupole-linear ion trap mass spectrometry and time-of-flight mass spectrometry to the determination of pharmaceuticals and related contaminants in wastewater. Analytical Chemistry* 79(24) (2007). 9372-9384.

Martinez, K. and D. Barceló *Determination of antifouling pesticides and their degradation products in marine sediments by means of ultrasonic extraction and HPLC–APCI–MS. Fresenius' journal of analytical chemistry* 370(7) (2001). 940-945.

Martínez, K., I. Ferrer and D. Barceló *Part-per-trillion level determination of antifouling pesticides and their byproducts in seawater samples by off-line solid-phase extraction followed by high-performance liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. Journal of Chromatography A* 879(1) (2000). 27-37.

Martins, M. L., T. M. Rizzetti, M. Kemmerich, N. Saibt, O. D. Prestes, M. B. Adaime and R. Zanella *Dilution standard addition calibration: a practical calibration strategy for multiresidue organic compounds determination. Journal of Chromatography A* 1460(2016). 84-91.

Martins, S. E., G. Fillmann, A. Lillicrap and K. V. Thomas *ecotoxicity of organic and organo-metallic antifouling co-biocides and implications for environmental hazard and risk assessments in aquatic ecosystems. Biofouling* 34(1) (2018). 34-52.

Marube, L. C., S. S. Caldas, K. L. Soares and E. G. Primel *Dispersive liquid-liquid microextraction with solidification of floating organic droplets for simultaneous extraction of pesticides, pharmaceuticals and personal care products. Microchimica Acta* 182(9-10) (2015). 1765-1774.

McNeill, K. and D. Cancilla *Detection of triazole deicing additives in soil samples from airports with low, mid, and large volume aircraft deicing activities. Bulletin of environmental contamination and toxicology* 82(3) (2009). 265-269.

Mestankova, H., B. Escher, K. Schirmer, U. Von Gunten and S. Canonica *Evolution of algal toxicity during (photo) oxidative degradation of diuron. Aquatic toxicology* 101(2) (2011). 466-473.

Mezcua, M., M. Hernando, L. Piedra, A. Agüera and A. Fernández-Alba *Chromatography-mass spectrometry and toxicity evaluation of selected contaminants in seawater. Chromatographia* 56(3-4) (2002). 199-206.

Miao, X.-S., F. Bishay, M. Chen and C. D. Metcalfe *Occurrence of antimicrobials in the final effluents of wastewater treatment plants in Canada. Environmental science & technology* 38(13) (2004). 3533-3541.

Míguez-Framil, M., A. Moreda-Piñeiro, P. Bermejo-Barrera, I. Álvarez-Freire, M. J. Tabernero and A. M. Bermejo *Matrix solid-phase dispersion on column clean-up/pre-concentration as a novel approach for fast isolation of abuse drugs from human hair. Journal of Chromatography A* 1217(41) (2010). 6342-6349.

Mitchelmore, C. L., K. He, M. Gonsior, E. Hain, A. Heyes, C. Clark, R. Younger, P. Schmitt-Kopplin, A. Feerick and A. Conway *Occurrence and distribution of UV-filters and other anthropogenic contaminants in coastal surface water, sediment, and coral tissue from Hawaii. Science of The Total Environment*(2019).

Mizukawa, A., D. Molins-Delgado, J. C. R. de Azevedo, C. V. S. Fernandes, S. Díaz-Cruz and D. Barceló *Sediments as a sink for UV filters and benzotriazoles: the case study of Upper Iguaçu watershed, Curitiba (Brazil). Environmental Science and Pollution Research* 24(22) (2017). 18284-18294.

Molins-Delgado, D., M. del Mar Olmo-Campos, G. Valeta-Juan, V. Pleguezuelos-Hernández, D. Barceló and M. S. Díaz-Cruz *Determination of UV filters in human breast milk using turbulent flow chromatography and babies' daily intake estimation. Environmental research* 161(2018). 532-539.

Molins-Delgado, D., D. García-Sillero, M. S. Díaz-Cruz and D. Barceló *On-line solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry for insect repellent residue analysis in surface waters using atmospheric pressure photoionization. Journal of Chromatography A* 1544(2018). 33-40.

Mturi, G. J. and B. S. Martincigh *Photostability of the sunscreens agent 4-tert-butyl-4'-methoxydibenzoylmethane (avobenzone) in solvents of different polarity and proticity. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 200(2-3) (2008). 410-420.

Naccarato, A., E. Gionfriddo, G. Sindona and A. Tagarelli *Simultaneous determination of benzothiazoles, benzotriazoles and benzosulfonamides by solid phase microextraction-gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry*

in environmental aqueous matrices and human urine. *Journal of Chromatography A* 1338(2014). 164-173.

Okamura, H., I. Aoyama, Y. Ono and T. Nishida *Antifouling herbicides in the coastal waters of western Japan. Marine Pollution Bulletin* 47(1-6) (2003). 59-67.

Okamura, H., I. Aoyama, T. Takami, T. Maruyama, Y. Suzuki, M. Matsumoto, I. Katsuyama, J. Hamada, T. Beppu and O. Tanaka *Phytotoxicity of the new antifouling compound Irgarol 1051 and a major degradation product. Marine Pollution Bulletin* 40(9) (2000). 754-763.

Okamura, H. and Y. Sugiyama *Photosensitized degradation of Irgarol 1051 in water. Chemosphere* 57(7) (2004). 739-743.

Pacheco-Silva, E., J. Souza and E. D. Caldas *Resíduos de medicamentos veterinários em leite e ovos. Química nova* 37(1) (2014). 111-122.

Pavlović, D. M., T. Pinušić, M. Periša and S. Babić *Optimization of matrix solid-phase dispersion for liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of 12 pharmaceuticals in sediments. Journal of Chromatography A* 1258(2012). 1-15.

Peñela, G. A., I. Ferrer and D. Barceló *Identification of new photodegradation byproducts of the antifouling agent Irgarol in seawater samples. International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 78(1) (2000). 25-40.

Peng, X., S. Xiong, W. Ou, Z. Wang, J. Tan, J. Jin, C. Tang, J. Liu and Y. Fan *Persistence, temporal and spatial profiles of ultraviolet absorbents and phenolic personal care products in riverine and estuarine sediment of the Pearl River catchment, China. Journal of hazardous materials* 323(2017). 139-146.

Peñuela, G. A. and D. Barceló *Photodegradation and stability of chlorothalonil in water studied by solid-phase disk extraction, followed by gas chromatographic techniques. Journal of Chromatography A* 823(1-2) (1998). 81-90.

Petrie, B., J. Youdan, R. Barden and B. Kasprzyk-Hordern *Multi-residue analysis of 90 emerging contaminants in liquid and solid environmental matrices by ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A* 1431(2016). 64-78.

Peysson, W. and E. Vulliet *Determination of 136 pharmaceuticals and hormones in sewage sludge using quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction followed by analysis with liquid chromatography–time-of-flight-mass spectrometry. Journal of Chromatography A* 1290(2013). 46-61.

Piedra, L., A. Tejedor, M. Hernando, A. Agüera, D. Barceló and A. Fernández-Alba *Screening of antifouling pesticides in sea water samples at low ppt levels by GC-MS and LC-MS. Chromatographia* 52(9-10) (2000). 631-638.

Pietrogrande, M. C. and G. Basaglia *GC-MS analytical methods for the determination of personal-care products in water matrices. TrAC Trends in Analytical Chemistry* 26(11) (2007). 1086-1094.

Plagellat, C., T. Kupper, R. Furrer, L. F. De Alencastro, D. Grandjean and J. Tarradellas *Concentrations and specific loads of UV filters in sewage sludge originating from a monitoring network in Switzerland. Chemosphere* 62(6) (2006). 915-925.

Pocurull, E., L. Brossa, F. Borrull and R. Marcé *Trace determination of antifouling compounds by on-line solid-phase extraction–gas chromatography–mass spectrometry. Journal of Chromatography A* 885(1-2) (2000). 361-368.

Prat, D., J. Hayler and A. Wells *A survey of solvent selection guides. Green Chemistry* 16(10) (2014). 4546-4551.

Prestes, O., M. Martins, C. Friggi, J. Munaretto, M. Adaime and R. Zanella *O estado da arte na determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal empregando técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massas. Química Nova* 36(5) (2013). 697-710.

Prestes, O. D., C. A. Friggi, M. B. Adaime and R. Zanella *QuEChERS—Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. Química Nova* 32(6) (2009). 1620-1634.

Rallis, G. N., V. A. Sakkas, V. A. Boumba, T. Vougiouklakis and T. A. Albanis *Determination of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in post-mortem human lung by matrix solid-phase dispersion with the aid of response surface methodology and desirability function. Journal of Chromatography A* 1227(2012). 1-9.

Ramirez, A. J., M. A. Mottaleb, B. W. Brooks and C. K. Chambliss *Analysis of pharmaceuticals in fish using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Analytical chemistry* 79(8) (2007). 3155-3163.

Ramos, L. *Critical overview of selected contemporary sample preparation techniques. Journal of Chromatography A* 1221(2012). 84-98.

Rani, M., W. J. Shim, G. M. Han, M. Jang, Y. K. Song and S. H. Hong *Benzotriazole-type ultraviolet stabilizers and antioxidants in plastic marine debris and their new products. Science of The Total Environment* 579(2017). 745-754.

Readman, J. W. *Development, Occurrence and Regulation of Antifouling Paint Biocides: Historical Review and Future Trends*. Antifouling Paint Biocides, Springer. (2006): 1-15.

Readman, J. W., L. L. W. Kwong, D. Grondin, J. Bartocci, J. P. Villeneuve and L. D. Mee *Coastal water contamination from a triazine herbicide used in antifouling paints*. *Environmental science & technology* 27(9) (1993). 1940-1942.

Renz, L., C. Volz, D. Michanowicz, K. Ferrar, C. Christian, D. Lenzner and T. El-Hefnawy *A study of parabens and bisphenol A in surface water and fish brain tissue from the Greater Pittsburgh Area*. *Ecotoxicology* 22(4) (2013). 632-641.

Rombaldi, C., J. L. de Oliveira Arias, G. I. Hertzog, S. S. Caldas, J. P. Vieira and E. G. Primel *New environmentally friendly MSPD solid support based on golden mussel shell: characterization and application for extraction of organic contaminants from mussel tissue*. *Analytical and bioanalytical chemistry* 407(16) (2015). 4805-4814.

Rubert, J., K. J. James, J. Mañes and C. Soler *Study of mycotoxin calibration approaches on the example of trichothecenes analysis from flour*. *Food and chemical toxicology* 50(6) (2012). 2034-2041.

Saito-Shida, S., T. Hamasaka, S. Nemoto and H. Akiyama *Multiresidue determination of pesticides in tea by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry: Comparison between Orbitrap and time-of-flight mass analyzers*. *Food chemistry* 256(2018). 140-148.

Sakkas, V. A., I. K. Konstantinou, D. A. Lambropoulou and T. A. Albanis *Survey for the occurrence of antifouling paint booster biocides in the aquatic environment of Greece*. *Environmental Science and Pollution Research* 9(5) (2002). 327.

Sakkas, V. A., D. A. Lambropoulou and T. A. Albanis *Study of chlorothalonil photodegradation in natural waters and in the presence of humic substances*. *Chemosphere* 48(9) (2002). 939-945.

Saleh, A., S. Molaei, N. S. Fumani and E. Abedi *Antifouling paint booster biocides (Irgarol 1051 and diuron) in marinas and ports of Bushehr, Persian Gulf*. *Marine pollution bulletin* 105(1) (2016). 367-372.

Sánchez-Rodríguez, Á., Z. Sosa-Ferrera, Á. Santana-del Pino and J. J. Santana-Rodríguez *Probabilistic risk assessment of common booster biocides in surface waters of the harbours of Gran Canaria (Spain)*. *Marine pollution bulletin* 62(5) (2011). 985-991.

Sánchez-Rodríguez, Á., Z. Sosa-Ferrera and J. J. Santana-Rodríguez *Applicability of microwave-assisted extraction combined with LC–MS/MS in the*

evaluation of booster biocide levels in harbour sediments. *Chemosphere* 82(1) (2011). 96-102.

Sánchez-Rodríguez, Á., Z. Sosa-Ferrera and J. J. Santana-Rodríguez *Analytical methods for the determination of common booster biocides in marine samples. Central European Journal of Chemistry* 10(3) (2012). 521-533.

SANTE. *Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed.* Retrieved 08 de abril de 2019., Disponible en: https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_2017-11813.pdf. (2017)

Sapozhnikova, Y., P. Pennington, E. Wirth and M. Fulton *Fate and transport of Irgarol 1051 in a modular estuarine mesocosm. Journal of Environmental Monitoring* 11(4) (2009). 808-814.

Sapozhnikova, Y., E. Wirth, K. Schiff and M. Fulton *Antifouling biocides in water and sediments from California marinas. Marine pollution bulletin* 69(1-2) (2013). 189-194.

Sargent, C., J. Bowman and J. Zhou *Levels of antifoulant irgarol 1051 in the Conwy Marina, North Wales. Chemosphere* 41(11) (2000). 1755-1760.

Scarlett, A., M. Donkin, T. Fileman and P. Donkin *Occurrence of the marine antifouling agent Irgarol 1051 within the Plymouth Sound locality: implications for the green macroalga *Enteromorpha intestinalis*. Marine Pollution Bulletin* 34(8) (1997). 645-651.

Scarlett, A., P. Donkin, T. Fileman and R. Morris *Occurrence of the antifouling herbicide, Irgarol 1051, within coastal-water seagrasses from Queensland, Australia. Marine Pollution Bulletin* 38(8) (1999). 687-691.

Schlüsener, M. P., M. Spiteller and K. Bester *Determination of antibiotics from soil by pressurized liquid extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Journal of chromatography A* 1003(1-2) (2003). 21-28.

Sebastià, N., C. Soler, J. M. Soriano and J. Mañes *Occurrence of aflatoxins in tigernuts and their beverages commercialized in Spain. Journal of agricultural and food chemistry* 58(4) (2010). 2609-2612.

Seeland, A., M. Oetken, A. Kiss, E. Fries and J. Oehlmann *Acute and chronic toxicity of benzotriazoles to aquatic organisms. Environmental Science and Pollution Research* 19(5) (2012). 1781-1790.

Serra-Roig, M. P., A. Jurado, M. S. Díaz-Cruz, E. Vázquez-Suñé, E. Pujades and D. Barceló *Occurrence, fate and risk assessment of personal care products in river–groundwater interface. Science of the Total Environment* 568(2016). 829-837.

Skoog, D. A., F. J. Holler and S. R. Crouch *Principles of instrumental analysis*, Cengage learning.(2017)

Soares, K. L., M. B. R. Cerqueira, S. S. Caldas and E. G. Primel *Evaluation of alternative environmentally friendly matrix solid phase dispersion solid supports for the simultaneous extraction of 15 pesticides of different chemical classes from drinking water treatment sludge. Chemosphere* 182(2017). 547-554.

Steen, R., P. Leonards, U. T. Brinkman and W. Cofino *Ultra-trace-level determination of the antifouling agent Irgarol 1051 by gas chromatography with tandem mass spectrometric detection. Journal of Chromatography A* 766(1-2) (1997). 153-158.

Steen, R. J., F. Ariese, B. van Hattum, J. Jacobsen and A. Jacobson *Monitoring and evaluation of the environmental dissipation of the marine antifoulant 4, 5-dichloro-2-n-octyl-4-isothiazolin-3-one (DCOIT) in a Danish Harbor. Chemosphere* 57(6) (2004). 513-521.

Tamtam, F., F. Mercier, B. Le Bot, J. Eurin, Q. T. Dinh, M. Clément and M. Chevreuil *Occurrence and fate of antibiotics in the Seine River in various hydrological conditions. Science of the Total Environment* 393(1) (2008). 84-95.

Tan, D., J. Jin, F. Li, X. Sun, Y. Ni and J. Chen *Phenyltrichlorosilane-functionalized magnesium oxide microspheres: Preparation, characterization and application for the selective extraction of dioxin-like polycyclic aromatic hydrocarbons in soils with matrix solid-phase dispersion. Analytica chimica acta* 956(2017). 14-23.

Tarazona, I., A. Chisvert, Z. León and A. Salvador *Determination of hydroxylated benzophenone UV filters in sea water samples by dispersive liquid–liquid microextraction followed by gas chromatography–mass spectrometry. Journal of Chromatography A* 1217(29) (2010). 4771-4778.

Thomas, K. *The use of broad-spectrum organic biocides in marine antifouling paints. Advances in marine antifouling coatings and technologies*, Elsevier. (2009): 522-553.

Thomas, K. V. *Determination of selected antifouling booster biocides by high-performance liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry. Journal of Chromatography A* 825(1) (1998). 29-35.

Thomas, K. V., S. J. Blake and M. J. Waldock *Antifouling paint booster biocide contamination in UK marine sediments. Marine Pollution Bulletin* 40(9) (2000). 739-745.

Thomas, K. V., T. W. Fileman, J. W. Readman and M. J. Waldock *Antifouling paint booster biocides in the UK coastal environment and potential risks of biological effects. Marine Pollution Bulletin* 42(8) (2001). 677-688.

Thomas, K. V., M. McHugh, M. Hilton and M. Waldock *Increased persistence of antifouling paint biocides when associated with paint particles. Environmental Pollution* 123(1) (2003). 153-161.

Thomas, K. V., M. McHugh and M. Waldock *Antifouling paint booster biocides in UK coastal waters: inputs, occurrence and environmental fate. Science of the Total Environment* 293(1-3) (2002). 117-127.

Togunde, O. P., E. Cudjoe, K. D. Oakes, F. S. Mirnaghi, M. R. Servos and J. Pawliszyn *Determination of selected pharmaceutical residues in wastewater using an automated open bed solid phase microextraction system. Journal of Chromatography A* 1262(2012). 34-42.

Tolosa, I. and J. Readman *Simultaneous analysis of the antifouling agents: tributyltin, triphenyltin and Irgarol 1051 in marina water samples. Analytica chimica acta* 335(3) (1996). 267-274.

Toth, S., K. Becker-van Slooten, L. Spack, L. F. De Alencastro and J. Tarradellas *Irgarol 1051, an antifouling compound in freshwater, sediment, and biota of Lake Geneva. Bulletin of environmental contamination and toxicology* 57(3) (1996). 426-433.

Trebše, P., O. V. Polyakova, M. Baranova, M. B. Kralj, D. Dolenc, M. Sarakha, A. Kutin and A. T. Lebedev *Transformation of avobenzene in conditions of aquatic chlorination and UV-irradiation. Water research* 101(2016). 95-102.

Tsang, V. W.-H., N.-Y. Lei and M. H.-W. Lam *Determination of Irgarol-1051 and its related s-triazine species in coastal sediments and mussel tissues by HPLC–ESI-MS/MS. Marine pollution bulletin* 58(10) (2009). 1462-1471.

Tsui, M. M., H. Leung, B. K. Kwan, K.-Y. Ng, N. Yamashita, S. Taniyasu, P. K. Lam and M. B. Murphy *Occurrence, distribution and ecological risk assessment of multiple classes of UV filters in marine sediments in Hong Kong and Japan. Journal of hazardous materials* 292(2015). 180-187.

Tu, X. and W. Chen *A Review on the Recent Progress in Matrix Solid Phase Dispersion. Molecules* 23(11) (2018). 2767.

Turiel, E., A. Martín-Esteban and J. L. Tadeo *Multiresidue analysis of quinolones and fluoroquinolones in soil by ultrasonic-assisted extraction in small columns and HPLC-UV*. *Analytica Chimica Acta* 562(1) (2006). 30-35.

Tuzimski, T. and J. Sherma *Quantitative analysis and method validation*. High Performance Liquid Chromatography in Pesticide Residue Analysis, CRC Press. (2015): 326-347.

Valencia, T. M. G. and M. P. G. de Llasera *Determination of organophosphorus pesticides in bovine tissue by an on-line coupled matrix solid-phase dispersion–solid phase extraction–high performance liquid chromatography with diode array detection method*. *Journal of Chromatography A* 1218(39) (2011). 6869-6877.

Valle-Sistac, J., D. Molins-Delgado, M. Díaz, L. Ibáñez, D. Barceló and M. S. Díaz-Cruz *Determination of parabens and benzophenone-type UV filters in human placenta. First description of the existence of benzyl paraben and benzophenone-4*. *Environment international* 88(2016). 243-249.

van Wezel, A. P. and P. Van Vlaardingen *Environmental risk limits for antifouling substances*. *Aquatic toxicology* 66(4) (2004). 427-444.

Vazquez-Roig, P., R. Segarra, C. Blasco, V. Andreu and Y. Picó *Determination of pharmaceuticals in soils and sediments by pressurized liquid extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry*. *Journal of Chromatography A* 1217(16) (2010). 2471-2483.

Vieira, A. A., S. S. Caldas, A. L. V. Escarrone, J. L. de Oliveira Arias and E. G. Primel *Environmentally friendly procedure based on VA-MSPD for the determination of booster biocides in fish tissue*. *Food Chemistry* 242(2018). 475-480.

Vieira, A. A., S. S. Caldas, L. Kupski, R. A. Tavella and E. G. Primel *Extraction of chlorothalonil, dichlofluanid, DCOIT, and TCMTB from fish tissues employing the vortex assisted matrix solid-phase dispersion*. *Microchemical Journal* 143(2018). 92-98.

Villa, S., L. Assi, A. Ippolito, P. Bonfanti and A. Finizio *First evidences of the occurrence of polycyclic synthetic musk fragrances in surface water systems in Italy: spatial and temporal trends in the Molgora River (Lombardia Region, Northern Italy)*. *Science of the total Environment* 416(2012). 137-141.

Voulvoulis, N., M. Scrimshaw and J. Lester *Partitioning of selected antifouling biocides in the aquatic environment*. *Marine Environmental Research* 53(1) (2002). 1-16.

Voulvoulis, N., M. D. Scrimshaw and J. N. Lester *Occurrence of four biocides utilized in antifouling paints, as alternatives to organotin compounds, in waters and sediments of a commercial estuary in the UK. Marine Pollution Bulletin* 40(11) (2000). 938-946.

Wang, G. N., L. Zhang, Y. P. Song, J. X. Liu and J. P. Wang *Application of molecularly imprinted polymer based matrix solid phase dispersion for determination of fluoroquinolones, tetracyclines and sulfonamides in meat. Journal of Chromatography B* 1065(2017). 104-111.

Wang, J., W. Chow, D. Leung and J. Chang *Application of ultrahigh-performance liquid chromatography and electrospray ionization quadrupole orbitrap high-resolution mass spectrometry for determination of 166 pesticides in fruits and vegetables. Journal of agricultural and food chemistry* 60(49) (2012). 12088-12104.

Wang, J. and P. R. Gardinali *Analysis of selected pharmaceuticals in fish and the fresh water bodies directly affected by reclaimed water using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Analytical and bioanalytical chemistry* 404(9) (2012). 2711-2720.

Wang, T., J. Tong, M. Sun and L. Chen *Fast and selective extraction of chloramphenicol from soil by matrix solid-phase dispersion using molecularly imprinted polymer as dispersant. Journal of separation science* 34(15) (2011). 1886-1892.

Weiss, S. and T. Reemtsma *Determination of benzotriazole corrosion inhibitors from aqueous environmental samples by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. Analytical Chemistry* 77(22) (2005). 7415-7420.

Wille, K., J. A. Kiebooms, M. Claessens, K. Rappé, J. V. Bussche, H. Noppe, N. Van Praet, E. De Wulf, P. Van Caeter and C. R. Janssen *Development of analytical strategies using U-HPLC-MS/MS and LC-ToF-MS for the quantification of micropollutants in marine organisms. Analytical and bioanalytical chemistry* 400(5) (2011). 1459-1472.

Xu, L., X. Qi, X. Li, Y. Bai and H. Liu *Recent advances in applications of nanomaterials for sample preparation. Talanta* 146(2016). 714-726.

Xu, X.-R. and X.-Y. Li *Sorption and desorption of antibiotic tetracycline on marine sediments. Chemosphere* 78(4) (2010). 430-436.

Xue, J. and K. Kannan *Accumulation profiles of parabens and their metabolites in fish, black bear, and birds, including bald eagles and albatrosses. Environment international* 94(2016). 546-553.

Yebra, D. M., S. Kiil and K. Dam-Johansen *Antifouling technology—past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. Progress in organic Coatings* 50(2) (2004). 75-104.

Yu, Y., Q. Huang, J. Cui, K. Zhang, C. Tang and X. Peng *Determination of pharmaceuticals, steroid hormones, and endocrine-disrupting personal care products in sewage sludge by ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Analytical and Bioanalytical Chemistry* 399(2) (2011). 891-902.

YUN, F. and X. HAO *High performace liquid chromatography–mass spectrometry determination of Irgarol 1051 and its degradation products. 2004(2009).*

Zgoła-Grześkowiak, A. *Application of DLLME to isolation and concentration of non-steroidal anti-inflammatory drugs in environmental water samples. Chromatographia* 72(7-8) (2010). 671-678.

Zhang, A. Q., K. M. Leung, K. W. Kwok, V. W. Bao and M. H. Lam *Toxicities of antifouling biocide Irgarol 1051 and its major degraded product to marine primary producers. Marine Pollution Bulletin* 57(6-12) (2008). 575-586.

Zhang, H., Z. Du, Y. Ji and M. Mei *Simultaneous trace determination of acidic non-steroidal anti-inflammatory drugs in purified water, tap water, juice, soda and energy drink by hollow fiber-based liquid-phase microextraction and ultra-high pressure liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. Talanta* 109(2013). 177-184.

Zhang, Q., C. Ji, L. Yan, M. Lu, C. Lu and M. Zhao *The identification of the metabolites of chlorothalonil in zebrafish (Danio rerio) and their embryo toxicity and endocrine effects at environmentally relevant levels. Environmental pollution* 218(2016). 8-15.

Zhang, Y., J. Xu, Z. Zhong, C. Guo, L. Li, Y. He, W. Fan and Y. Chen *Degradation of sulfonamides antibiotics in lake water and sediment. Environmental Science and Pollution Research* 20(4) (2013). 2372-2380.

Zhang, Z., N. Ren, Y.-F. Li, T. Kunisue, D. Gao and K. Kannan *Determination of benzotriazole and benzophenone UV filters in sediment and sewage sludge. Environmental science & technology* 45(9) (2011). 3909-3916.