UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Desenvolvimento de um método para a determinação
simultânea de parabenos, bisfenóis e benzofenonas em urina
por MEPS-LC-MS/MS**

Romena Sanglard Silveira

**Ribeirão Preto
2018**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Desenvolvimento de um método para a determinação simultânea de
parabenos, bisfenóis e benzofenonas em urina
por MEPS-LC-MS/MS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Toxicologia da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP
para obtenção do Título de Mestre em
Ciências

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientada: Romena Sanglard Silveira

Orientador(a): Prof. Dr Fernando Barbosa
Júnior

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia em 01/03/2018. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2018

RESUMO

SILVEIRA, R. S. **Desenvolvimento de um método para a determinação simultânea de parabenos, bisfenóis e benzofenonas em urina por MEPS-LC-MS/MS.** 2018. 66f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Bisfenóis, filtros UV de benzofenona, parabenos e antimicrobianos como triclocarban são amplamente utilizados em produtos alimentares, farmacêuticos, cosméticos e de cuidados pessoais e também são encontrados como contaminantes. A maioria destes compostos apresentam possíveis efeitos adversos à saúde, principalmente devido ao fato de sua potencial atividade desreguladora endócrina. Neste sentido, é crescente o interesse pelo desenvolvimento de métodos analíticos que sejam mais simples e que possam ter a capacidade de detecção do maior número de analitos possíveis simultaneamente para uso em estudos de biomonitoramento humano. O objetivo deste projeto foi desenvolver um novo método de preparo de amostras em microextração em sorvente empacotado (MEPS, do inglês “microextraction by packed sorbent”) para a extração simultânea de substâncias potencialmente desreguladoras endócrinas (parabenos, bisfenóis, benzofenonas e triclocarban). Em 250 µL de urina sintética (pH 5,3) foram adicionados os analitos a uma concentração de 20 ng/mL e diluídos com 250 µL de água. Após este procedimento, os compostos foram extraídos manualmente da amostra de urina usando MEPS C18 com 5 ciclos de aspirar-dispensar de 100 µL. A eluição dos analitos foi realizada utilizando 100 µL (metanol/água 80:20), seguido de análise em LC-MS/MS. O cartucho MEPS, após a limpeza, foi reutilizado para extrações múltiplas sem a presença de efeito de memória. As separações cromatográficas foram conduzidas em uma coluna C18 a 40 °C. A fase móvel foi composta por um gradiente de metanol e água a uma vazão de 500 µL/min. Os dados foram adquiridos no modo MRM com íons negativos como precursores. O método MEPS-LC-MS/MS proposto apresentou curva de calibração linear para todos os analitos com coeficiente de correlação (r) maior que 0,99 no intervalo do limite inferior de quantificação (LIQ) a 20,0 ng/mL. Os LODs variaram de 0,005-0,1 ng/mL e os LIQ variaram de 0,5-2,5 ng/mL. Além disso, a precisão foi expressa como o coeficiente de variação, onde os valores obtidos foram menores que 20% (n=3) nos LIQ e menores que 15% (n=3) nas concentrações de 10,0 e 20,0 ng/mL. A exatidão foi expressa na forma de erro padrão relativo, onde os valores obtidos não foram superiores a ±20% (n=3) para os LIQ e ±15% (n=3) nas concentrações 10,0 e 20,0 ng/mL. O procedimento MEPS proposto apresentou vantagens que incluem a possibilidade de extração e determinação simultânea de 16 analitos em urina, com redução dos volumes de amostra e solvente utilizados, além de vantagens como tempo reduzido de preparo de amostra, *clean up* da matriz e dispensa etapa prévia ao preparo de amostra.

Palavras-chave: Parabenos, Bisfenol, Benzofenona, MEPS, LC-MS/MS

1 introdução

Atualmente animais e humanos estão expostos a milhares de substâncias que são lançadas no meio-ambiente. Dentre estas inúmeras substâncias, uma classe em especial vem chamando atenção da comunidade científica e reguladora, a dos desreguladores endócrinos. Compostos pertencentes a essa classe tais como os parabenos, os bisfenóis e as benzofenonas, são capazes de interagir com o sistema endócrino, causando alterações na homeostase e provocando diversos efeitos adversos a saúde.

Parabenos, bisfenóis e benzofenonas são extensamente utilizados como aditivos em cosméticos, alimentos e produtos farmacêuticos. Devido a isso, estudos de biomonitoramento humano vêm monitorando a presença destes compostos na urina de diferentes populações em várias regiões do planeta (YE et al., 2006b; XUE et al., 2015; CALAFAT et al., 2008; CALAFAT et al., 2010; FREDERIKSEN et al., 2013; KANG et al., 2013; MA et al., 2013; MEEKER et al., 2010; LARSSON et al., 2014).

Como estes compostos e seus metabólitos são excretados na urina, as concentrações urinárias podem ser utilizadas como biomarcadores de exposição (dose interna) a estas substâncias. Além disso, a urina é considerada uma matriz de escolha devido à sua fácil obtenção, fornecendo quantidades suficientes de amostra com coleta não invasiva.

Um adequado método de preparo de amostra para uma ampla gama de compostos pode ser um desafio devido às diferenças nas propriedades físico-químicas dos compostos. No entanto, é de suma importância nos estudos de avaliação de exposição em populações, simplificar e reduzir o tempo total de análise e consumo de reagentes tóxicos, tais como solventes orgânicos. Portanto, o presente estudo aborda o desenvolvimento de um método de extração e determinação simultânea de 16 desreguladores endócrinos em urina empregando MEPS-LC-MS/MS. Até onde vai nosso conhecimento, esta abordagem (MEPS-LC-MS/MS) nunca foi proposta anteriormente para estes mesmos analitos de forma simultânea em amostras biológicas.

2 Revisão da Literatura

2.1 Contaminantes emergentes

A partir da década de 50 o desenvolvimento tecnológico foi acelerado devido à necessidade da sociedade por produtos industrializados. Gêneros alimentícios e produtos farmacêuticos começaram a ser produzidos em larga escala e distribuídos sem qualquer tipo de cuidado com o que estava sendo lançado no ambiente. A preocupação com os possíveis efeitos da presença dessas novas substâncias e informações toxicológicas eram em sua maioria escassas. Esse fato passou a mudar após o uso indiscriminado do inseticida DDT que provocou efeitos reprodutivos sobre a população de aves, como foi relatado no livro da bióloga Rachel Carson “Primavera Silenciosa”. O livro de Carson foi um marco para as novas gerações, levando a maiores preocupações e intensos debates na sociedade sobre os potenciais efeitos tóxicos que estas substâncias poderiam promover ao ambiente e ao homem (SODRÉ, 2012).

Acompanhado do desenvolvimento tecnológico a partir dos anos 70, o poder de detecção dos equipamentos de análise química melhorou consideravelmente. A partir disso, diversos estudos começaram a monitorar a presença de diferentes contaminantes nas mais diversas matrizes ambientais e humanas. Portanto, o interesse da comunidade científica e das agências regulatórias cresceu em relação aos componentes antropogênicos que estavam sendo lançadas no ambiente. A grande maioria desses contaminantes emergentes faz parte de compostos utilizados rotineiramente, no entanto, muitos compostos ainda encontrados residuais no ambiente já tinham seu uso e produção cessados há anos (descritos como contaminantes persistentes). Segundo a United States Environmental Protection Agency (USEPA), contaminantes emergentes são “poluentes que, atualmente, não são incluídos em programas de monitoramento e que podem se tornar candidatos para legislações futuras dependendo de pesquisas sobre a toxicidade, efeitos sobre a saúde, percepção pelo público e dados sobre sua ocorrência em vários ambientes”. Mesmo encontrados em concentrações-traços é muito provável que o ambiente já venha sofrendo há tempos os efeitos da presença destes contaminantes (SODRÉ, 2012).

Dentre as diferentes classes que compõe os contaminantes emergentes, há uma classe de substâncias químicas que vem despertando o interesse científico nos últimos anos e são conhecidos como desreguladores endócrinos (DE). Estas substâncias são encontradas no meio ambiente em concentrações-traço, na ordem de ng/L a µg/L.

2.2 Desreguladores Endócrinos

De acordo com a USEPA, um desregulador endócrino (DE) é definido como um “agente exógeno que interfere com síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação de hormônio natural no corpo que são responsáveis pela manutenção, reprodução, desenvolvimento e/ou comportamento dos organismos” (EPA U.S., 1997).

As substâncias classificadas como DE podem ser agrupadas em duas classes: 1) Substâncias sintéticas (alquilfenóis, pesticidas, ftalatos, bifenilas policloradas, bisfenóis, produtos farmacêuticos, entre outras) e 2) Substâncias naturais (estrogênios naturais e fitoestrogênios).

A exposição aos desreguladores endócrinos pode ocorrer sob diferentes formas, tanto pelo contato direto ou quando pelo contato indireto através da ingestão de água, ar ou alimentos contaminados. Dentre os potenciais efeitos biológicos observados estão as alterações nos níveis hormonais da tireóide, efeitos no sistema reprodutivo feminino (diferenciação sexual, função dos ovários, aumento no risco de câncer de mama e de vagina, ovários policísticos e endometriose) e no sistema reprodutivo masculino (redução na produção de esperma, aumento do risco de câncer testicular e de próstata, infertilidade) (EPA U.S., 1997; DASTON et al., 1997; HARRISON, HOLMES e HUMFREY, 1997; WEBER et al., 2002).

2.3 Bisfenóis, parabenos, benzofenonas e triclocarban

Bisfenóis, filtros UV tipo benzofenona, ésteres de ácido p-hidroxibezóico (parabenos) e agentes antimicrobianos como triclocarban são amplamente utilizados em alimentos, produtos farmacêuticos, cosméticos e produtos de cuidado pessoal ou estão presentes como contaminantes.

Todos esses compostos são suspeitos de exibirem atividade desreguladora endócrina, interagindo como o sistema endócrino e causando alterações na homeostase que potencialmente podem levar a efeitos adversos na saúde (DARBE et al., 2008; KRAUSE et al., 2012).

Embora estudos mostrem que estes compostos apresentem atividade estrogênica fraca, a exposição contínua mesmo que em baixas concentrações pode induzir alterações reprodutivas, comportamentais e/ou no desenvolvimento (HOWDESHELL et al., 1999).

Numerosos estudos detectaram a presença destes compostos na urina mostrando que a população está amplamente exposta (YE et al., 2006a; CALAFAT et al., 2008; CALAFAT et al., 2010; LIAO e KANNAN, 2012; MA et al., 2013; KANG et al., 2013; FREDERIKSEN et al., 2013, MOOS et al., 2014; DEWALQUE et al., 2014; LARSSON et al., 2014; JARDIM et al., 2015).

Bisfenol A (BPA) é utilizado na produção de plástico policarbonato e resinas epóxi (BILES et al., 1997; FÜRHACKER, SCHARF e WEBER, 2000) e sendo encontrado em uma série de produtos no qual estamos em contato no dia a dia por exemplo adesivos, papéis para fax, tubulações, painéis de carros e produtos eletrônicos. Também estão presentes em revestimentos de latas de conservas, frascos de alimentos para bebês, recipientes de armazenamento de alimentos e resinas dentárias.

Estudos demonstram que o BPA contido nas embalagens pode migrar para os alimentos, fazendo com que a exposição humana a este composto seja considerável (BILES et al., 1997; KUO e DING, 2004). Após a absorção no corpo humano, o BPA é eliminado na urina como um conjugado de ácido glicurônico por isso a urina é uma matriz adequada para a exposição humana ao BPA (ROCHA et al., 2016; CUNHA e FERNANDES, 2010; XUE et al., 2015).

Dentre a classe dos bisfenóis, BPA é o mais representativo deles e o que tem maior produção industrial (YU et al., 2015; VANDENBERG et al., 2012). O uso BPA em alguns produtos, principalmente aqueles destinados a crianças, está sendo regulamentado como ocorreu no Brasil, onde a Agência Nacional de Vigilância Sanitária em 2011 proibiu a fabricação e importação de mamadeiras para a alimentação de lactentes que contenham a substância BPA em sua composição (BRASIL, 2011).

Os demais análogos do bisfenol como bisfenol S (BPS) e bisfenol F (BPF) possuem propriedades físicas químicas semelhantes ao BPA (Fig. 1), que os torna candidatos à substituição industrial do BPA (LEE et al., 2015; CHEN e FUJITA, 2002). No entanto, os demais análogos também possuem perfil toxicológico semelhante, apresentando interferência endócrina assim como o BPA (KITAMURA et al., 2005; ROSENMAI et al., 2014).

Figura 1: Estrutura química do Bisfenol A e seus análogos.

(a) Bisfenol A, (b) Bisfenol S, (c) Bisfenol AF, (d) Bisfenol AP.
Fonte: A autora.

Os parabenos pertencem à família de ésteres do ácido p-hidroxibenzóico. Dentre os mais utilizados podemos citar metilparabeno (MeP), etilparabeno (EtP), propilparabeno (PrP), butilparabeno (BuP) e benzilparabeno (BzP) (Fig. 2).

Devido a fatores como inércia, aceitação regulatória mundial, baixo custo e seu poder antimicrobiano, os parabenos são extensamente utilizados como preservativos em cosméticos, alimentos e produtos farmacêuticos. Segundo a legislação brasileira, é aceitável em produtos de cuidado pessoal a utilização de parabenos como conservante em até 0,4% para apenas um parabeno ou 0,8% para mistura de dois parabenos (BRASIL, 2012).

Os humanos são expostos constantemente aos parabenos através da absorção cutânea e através do trato gastrointestinal após a ingestão oral. Os parabenos são metabolizados rapidamente a compostos conjugados com ácido glicurônico ou sulfúrico sem toxicidade aparente e eliminados na urina (FREDERIKSEN, JORGENSEN e ANDERSSON, 2011). Como os parabenos e seus metabolitos podem ser medidos na urina, níveis urinários de parabenos podem ser usados como biomarcadores de exposição humana recente (YE et al., 2006a; CALAFAT et al., 2010; MEEKER et al., 2011).

Figura 2: Estrutura química dos parabenos.

(a) metilparabeno, (b) etilparabeno, (c) propilparabeno, (d) butilparabeno, (e) benzilparabeno e os metabólitos (f) ácido metil-protocatéquico e (g) ácido etil-protocatéquico.

Fonte: A autora.

Recentes discussões têm sido levantadas a respeito da segurança do uso dos parabenos. Estudos demonstram que os parabenos têm a capacidade de exercer fraca atividade estrogênica como relatado pelo estudo feito por KANG e colaboradores (2002) em ratas grávidas e também sua associação com o câncer de mama (DARBRE et al., 2004).

Dentre os filtros solares químicos comumente utilizados, destaca-se a família das benzofenonas (SALGADO, GALANTE e LEONARDI, 2004) (Fig. 3). As benzofenonas sofrem ressonância mais facilmente requerendo menor energia quântica para a transição eletrônica (RIBEIRO et al., 2004). Devido a este fato, os filtros de benzofenona possuem amplo espectro e excelente estabilidade química (OLIVEIRA et al., 2004; SANAD et al., 2010). São utilizados em uma série de produtos de cuidado pessoal, incluindo protetores solares para proteção da pele e dos cabelos, cosméticos e também no revestimento de embalagens de alimentos como UV estabilizante (SUZUKI et al., 2005; CALAFAT et al., 2008).

De acordo com a legislação brasileira que regulamenta a lista de filtros ultravioletas permitidos para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes, os filtros de benzofenonas podem ser utilizados em até 10% (benzofenona 3 (BP3) e

benzofenona 4 (BP4)), 5% (Benzofenona 5 (BP5)) e 3% (benzofenona 8 (BP8)), sendo que para concentrações superiores à 0,5% o fabricante deve informar a presença de BP3 na embalagem (BRASIL, 2016).

Figura 3: Estrutura química das benzofenonas.

(a) benzofenona 1, (b) benzofenona 2, (c) benzofenona 8 e o metabólito (d) 4-hidróxibenzofenona.
 Fonte: A autora.

Em preparações cosméticas de proteção solar é importante que o ativo permaneça nas camadas superiores da pele e não tenha absorção para a circulação sistêmica. Embora considerados seguros para a aplicação tópica, estudos mostram que os filtros de benzofenona após a aplicação são absorvidos pela pele, metabolizados e então eliminados (CHISVERT et al., 2012). Após absorção cutânea esses compostos podem apresentar efeitos adversos como reações alérgicas e ação desreguladora do sistema endócrino, agindo como hormônios estrogênicos (MA et al., 2003; SCHREURS et al., 2004; DARVAY et al., 2001; HENEWEER et al., 2005).

Triclocarban (TCC) (Fig. 4), assim como triclosan, é um conhecido antimicrobiano amplamente utilizado em produtos de cuidado pessoal como sabonetes, creme dental, desodorantes, detergentes e soluções de desinfecção (YUSA, YE e CALAFAT, 2012).

Em 2016 o TCC foi considerado pelo FDA nem seguro nem efetivo como antimicrobiano para produtos de limpeza (FDA, 2016). Embora a legislação brasileira estabeleça limites para a sua utilização, constantes são os debates que envolvem sua utilização. No Brasil é permitido a utilização do triclocarban em até 0,2% da formulação (BRASIL, 2012) e até 1,5% para produtos destinados a serem enxaguados (BRASIL, 2012b).

Figura 4: Estrutura química do triclocarban.

Fonte: A autora.

2.4 Avanços nas técnicas de preparo de amostras

A etapa de preparo de amostra é uma das etapas mais importante em uma análise química. Esta etapa visa eliminar a matriz, reduzindo possíveis interferências durante a análise. Portanto, a preparação da amostra é reconhecida como uma etapa chave para o sucesso da análise, principalmente se tratando da análise de analitos presentes em baixas concentrações (KATAOKA et al., 2009; ANDRUCH et al., 2012). Quando se utiliza a ionização por eletrospray (ESI) em espectrometria de massas, a presença de componentes da matriz biológica, pode causar interferências na determinação do analito devido a supressão ou incremento do sinal analítico.

Existem diversas maneiras de se preparar a amostra laboratorialmente para uma análise. Protocolos de extração com ácidos e bases são comumente realizados, mas se constituem de procedimentos demorados e difíceis, de baixo rendimento, alto consumo de solventes e passíveis para perda do analito durante o preparo (GIBICAR et al., 2007; QVARNSTRÖM e FRECH, 2002).

Dentre os métodos mais amplamente utilizados estão a precipitação de proteínas (PPT), extração líquido-líquido (LLE) e extração em fase sólida (SPE). A precipitação de proteínas pode não ser suficiente para eliminar interferentes que podem vir a alterar o sinal do analito dependendo do sistema de detecção. A LLE faz o uso de grandes quantidades de solventes ou misturas de solventes que podem gerar emulsões que prejudicam a recuperação do analito. Além do mais, técnicas baseadas no princípio LLE apresentam a desvantagem de ser menos seletivas comparados a técnicas de SPE. SPE é a mais interessante para a recuperação de analitos devido a capacidade desta de reter os analitos e depois liberá-los em solvente enquanto os interferentes da matriz são removidos. No entanto, SPE é uma

técnica que utiliza grandes quantidades de solventes e amostra (ABDEL-REHIM, 2011).

Atualmente essas técnicas tradicionais como SPE e LLE vem sendo modificadas de forma a simplificar e miniaturizar seus procedimentos (Fig. 5). Entre as vantagens destes procedimentos miniaturizados, se destacam a redução do volume de amostra, redução no tempo de preparo da amostra, redução no volume de solventes e resíduos gerados no laboratório (WARDENCKI et al., 2007). Dentre as técnicas de extração miniaturizadas baseadas em extração em fase sólida, a microextração em fase sólida (SPME) e a microextração em sorvente empacotado (MEPS) são as mais comumente empregadas em diversas matrizes, tanto ambientais quanto biológicas (SILVA et al., 2014).

Figura 5: Classificação das técnicas de microextração.

SPME: microextração em fase sólida; SBSE: microextração em barra sortiva; TFME: microextração em filme delgado; SPDE: extração dinâmica em fase sólida; FNME: microextração em fibra empacotada; MEPS: microextração em sorvente empacotado.

Fonte: Adaptado de SILVA et al., 2014.

A Microextração em Sorvente Empacotado (MEPS) parece ser uma alternativa interessante para análise em matrizes biológicas visto que possui a capacidade de reter o analito seletivamente e depois eluí-los em solventes orgânicos. Possui maior eficácia e seletividade quando comparado aos demais métodos de extração baseados no princípio de LLE (SILVA et al., 2014; ABDEL-REHIN, 2011).

2.5 Microextração em sorvente empacotado (MEPS)

MEPS é uma miniaturização da extração em fase sólida (SPE) desenvolvida pela AstraZeneca, Södertälje, Suécia (ABDEL-REHIN, 2004). Esta técnica é ideal para utilização de baixos volumes de amostra e solventes. Também vem apresentando excelentes resultados para análise de compostos em urina, plasma e sangue. MEPS apresenta comercialmente microcolunas de materiais sorventes como fases reversas (adequadas para extração de analitos hidrofóbicos ou analitos orgânicos polares a partir de matrizes aquosas), fases normais (adequadas para extração de analitos polares a partir de solventes orgânicos não polares) e modos mistos e troca iônica (adequados para extração de analitos de amostras orgânicas aquosas ou não-polares) (ABDEL-REHIN, 2011).

A microcoluna possui aproximadamente 1-2 mg de material sólido empacotado e é conectada à agulha de uma seringa (100 – 250 μ L), através de um *plug* com filtros de polietileno em ambos os lados (Fig. 6). Essa integração da microcoluna com a seringa possibilita a manipulação de baixos volumes de líquido e, além disso, possibilita a completa eluição dos analitos do sorvente para recuperação. Além disso, esta técnica pode ser utilizada juntamente com a cromatografia gasosa, a cromatografia líquida e a eletroforese capilar e até mesmo acoplada on-line com os sistemas de separação e detecção, oferecendo a vantagem do analito mais concentrado e menor interferência da matriz biológica (*clean up*) (ABDEL-REHIN, 2011).

Figura 6: Seringa acoplada à microcoluna com material sorvente empacotado.

Antes do uso da MEPS, a microcoluna deve ser condicionada. O uso de solução ligante também pode ser realizado de forma a aumentar a seletividade e a capacidade de retenção do analito no sorvente. Após a percolação da amostra, passa-se pela coluna um solvente (solução de limpeza) que irá remover da amostra os interferentes fracamente sorvidos e só depois o analito é eluído com um determinado solvente (solução de eluição) tanto para as características do analito como para a técnica instrumental que este será analisado (Fig. 7). Deve-se proceder com a lavagem na coluna após a eluição do analito com solvente apropriado para evitar que ocorra efeito de memória entre as amostras passadas pela microcoluna (QUEIROZ, 2011; ADBEL-REHIN, 2011; SILVA, 2014).

Figura 7: Etapas realizadas em MEPS.

Pré-concentração do analito (1), eliminação dos interferentes (2), eluição dos analitos (3) para introdução no sistema analítico (4).
Fonte: QUEIROZ, 2011.

Diversas são as condições relacionadas à MEPS que necessitam ser avaliadas para se obter maior eficiência da extração. Essas condições devem ser selecionadas para cada tipo de analito e amostra em estudo. Em relação ao tipo de amostra analisada, alguns cuidados devem ser tomados como diluição da amostra no caso de matrizes biológicas (sangue, plasma e urina) para a redução da viscosidade; desproteinação; retirada de macromoléculas e ajuste de pH, de forma a aumentar a vida útil do sistema. Dentre os fatores relacionados à MEPS, a escolha

do material sorvente adequado é de extrema importância e deve ser selecionado de acordo com as características do analito. As soluções de limpeza e de eluição devem estar em concentração adequada e possuir pH compatível com o analito de forma a remover os interferentes fracamente sorvidos e eluir completamente os analitos com pouco volume de solvente. Outra variável de extrema importância é o número de ciclos aspirar-dispensar da amostra pela microcoluna que fará com que o analito se concentre cada vez mais (QUEIROZ, 2011; ADBEL-REHIN, 2011; SILVA, 2014).

No que se diz respeito aos contaminantes emergentes, ainda são raros os estudos que fazem o uso da MEPS como uma alternativa de extração destes compostos. JARDIM et al. (2015) realizaram a extração de parabenos em urina em MEPS para posterior análise em LC-MS/MS. GONZALEZ-MARINO et al. (2011), por sua vez, realizaram a extração de parabenos e triclosan em água em MEPS para posterior análise em GC-MS. A extração simultânea de diferentes classes de compostos tem sido feita através de outras técnicas como SPE e microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) (YE, et al., 2006a; ASIMAKOPOULOS, et al., 2014; FREDERIKSEN, et al., 2013; DEWALQUE, et al., 2014; LARSSON, et al., 2014; ROCHA et al., 2016). Até o presente momento, MEPS ainda não foi utilizada com a finalidade de extração multi-classes em urina com posterior detecção por LC-MS/MS.

2.6 Métodos analíticos

Dada à dificuldade de detecção de baixas concentrações (níveis de traços) destes contaminantes, muitos métodos analíticos vêm sendo desenvolvidos para determinação destes compostos em matrizes ambientais e biológicas.

Como parabenos, bisfenóis, benzofenonas e seus metabólitos são excretados através da urina, os níveis urinários podem ser utilizados como biomarcadores humanos da exposição a estas substâncias (YE et al., 2006a; CUNHA e FERNANDES, 2010). Embora estes compostos tenham, sido detectados em diversas matrizes biológicas como soro, sêmen e leite humano (TARAZONA, CHISVERT e SALVADOR, 2013; FREDERIKSEN, JØRGENSEN e ANDERSSON, 2011; SCHLUMPF et al., 2010), a urina é considerada a matriz de escolha para esse

tipo de análise, visto que é de fácil obtenção e fornece quantidades suficientes volumes de amostra.

As análises de baixas concentrações em matrizes biológicas geralmente são realizadas através de cromatografia líquida ou cromatografia gasosa acopladas ao detector de espectrometria de massas ou espectrometria de massas sequencial (RICHARDSON, 2008). Como parabenos, bisfenóis, benzofenonas e triclocarban apresentam baixa volatilidade, é necessário uma etapa prévia de derivatização para uso da cromatografia gasosa, o que acrescenta mais uma etapa laboriosa ao preparo da amostra (KONDO et al., 2010). Portanto, a grande maioria dos estudos vem utilizando a cromatografia líquida (LC) para realizar essa separação (ASIMAKOPOULOS et al., 2014; YE et al., 2006a; KANG et al., 2013; DEWALQUE et al., 2014; LARSSON et al., 2014).

O acoplamento entre a cromatografia e a espectrometria de massas (MS, do inglês, *mass spectrometry*) associa a alta seletividade e eficiência da separação cromatográfica com as informações da MS, como massa molar e aumento da seletividade. Após os analitos serem separados na coluna cromatográfica, estes são então encaminhados para o espectrômetro de massas.

Para que um composto seja analisado através da MS primeiro é necessário que os analitos estejam ionizados. A fonte de ionização mais comumente utilizada para o acoplamento LC-MS é a ionização por eletrospray (ESI) onde os analitos em solução na coluna cromatográfica são diretamente encaminhados à fonte de ionização. Neste caso uma voltagem determinada é aplicada (negativa ou positiva) e os analitos são ionizados sem que ocorra a fragmentação. Ao fim do capilar são geradas pequenas gotas que contém além da fase móvel, íons carregados em excesso. Nessa região do espectrômetro de massas é aplicado um fluxo de gás conhecido como gás de dessolvatação (geralmente N_2) que elimina as moléculas de solvente, diminuindo as gotas até o limite onde a repulsão entre as cargas supere a força de coesão dessa gota formando o que é conhecido como explosão coulômbica. Os íons são então encaminhados para o analisador de massas. O analisador de massas mais comum é o quadrupolo, formado por quatro barras paralelas, onde as barras opostas são conectadas ao mesmo potencial elétrico. O analisador de massas é a parte de um espectrômetro responsável por selecionar os íons de acordo com sua razão massa/carga (m/z) (CROTTI et al., 2006; THEODORIDIS et al., 2012).

Quando se deseja aumentar a seletividade de métodos quantitativos, a fragmentação passa a ser desejada. Neste caso pode ser utilizado o espectrômetro de massas sequencial (*in tandem*), que é composto por um triplo quadrupolo. O primeiro Quadrupolo seleciona somente o íon de interesse conhecido como íon precursor, que será posteriormente fragmentado nos íons produto. Essa fragmentação se dá por meio de colisões do analito de interesse, com um gás neutro (em geral, Ar ou N₂) na câmara de colisão ou dentro do próprio analisador. Esses fragmentos gerados (íons produtos) são então separados de acordo com a sua m/z no próximo quadrupolo. O feixe de íons é então convertido em sinal elétrico pelo detector (fotomultiplicadora) e posteriormente processado pelo sistema de aquisição de dados do computador (CHIARADIA et al., 2008).

Como esses compostos estão presentes em baixas concentrações tanto em matrizes biológicas como ambientais, os métodos analíticos para a determinação geralmente envolvem uma etapa prévia de extração para subsequente separação e detecção como já foi mencionado anteriormente. Métodos clássicos para estes compostos incluem LLE (ASIMAKOPOULOS et al., 2014; ROCHA et al., 2016) ou SPE (YE et al., 2006a; KANG et al., 2013; DEWALQUE et al., 2014; LARSSON et al., 2014). No entanto, até o presente momento, ainda não existe disponível um método de determinação simultânea, empregando MEPS para o preparo de amostra de urina e determinação dos analitos por LC-MS/MS.

6 Conclusão

As condições da extração otimizadas em MEPS como volume da amostra, pH da urina, sorvente da microcoluna, número de ciclos aspira-dispensa e solvente de dessorção, favoreceram a eficiência da extração.

Segundo as figuras analíticas de mérito como linearidade, precisão, exatidão e LOD obtidas, o método desenvolvido pode ser utilizado para análise de desreguladores endócrinos na urina além de proporcionar a determinação de vários compostos em uma só análise.

A utilização de MEPS como técnica de microextração trás uma série de vantagens comparadas a técnicas convencionais descritas na literatura para esse tipo de análise como SPE e DLLME. Menores volumes de amostra e solventes foram utilizados bem como a possibilidade de reutilização da fibra adsorvente diversas vezes após limpeza. Além disso, MEPS possibilitou o *clean up* da matriz, importante nesses casos onde há a utilização de matrizes biológicas e complexas como a urina.

Finalmente, o procedimento proposto pode ser considerado uma excelente alternativa para estudos de biomonitoramento humano com a possibilidade de determinação simultânea de 16 potenciais desreguladores endócrinos em urina (**parabenos, bisfenóis , benzofenonas e triclocarban**).

REFERÊNCIAS

ABDEL-REHIM, M. Microextraction by packed sorbent (MEPS): a tutorial. *Analytica chimica acta*, v. 701, n. 2, p. 119-128, 2011.

ABDEL-REHIM, M. New trend in sample preparation: on-line microextraction in packed syringe for liquid and gas chromatography applications: I. Determination of local anaesthetics in human plasma samples using gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, v. 801, n. 2, p. 317-321, 2004.

ABDEL-REHIM, M. Recent advances in microextraction by packed sorbent for bioanalysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2569-2580, 2010.

ALMEIDA, C.; NOGUEIRA, J. M. F. Determination of trace levels of parabens in real matrices by bar adsorptive microextraction using selective sorbent phases. **Journal of Chromatography A**, v. 1348, p. 17-26, 2014.

ANDRUCH, V. et al. Automated on-line dispersive liquid–liquid microextraction based on a sequential injection system. **Microchemical Journal**, v. 100, p. 77-82, 2012.

ASIMAKOPOULOS, A. G. et al. A multi-class bioanalytical methodology for the determination of bisphenol A diglycidyl ethers, p-hydroxybenzoic acid esters, benzophenone-type ultraviolet filters, triclosan, and triclocarban in human urine by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of chromatography A**, v. 1324, p. 141-148, 2014.

BILES, J. E. et al. Determination of bisphenol-A in reusable polycarbonate food-contact plastics and migration to food-simulating liquids. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 45, n. 9, p. 3541-3544, 1997.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, **AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA)**. RESOLUÇÃO – RDC Nº 41, DE 16 DE SETEMBRO DE 2011.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, **AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA)**. RESOLUÇÃO – RDC Nº 29, DE 01 DE JUNHO DE 2012.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, **AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA)**. RESOLUÇÃO – RDC Nº 03, DE 18 DE JANEIRO DE 2012.

b

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, **AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA)**. RESOLUÇÃO – RDC nº 27, DE 17 DE MAIO DE 2012.c

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, **AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA)**. RESOLUÇÃO – RDC Nº 69, DE 23 DE MARÇO DE 2016.

CALAFAT, A. M. et al. Concentrations of the sunscreen agent benzophenone-3 in residents of the United States: National Health and Nutrition Examination Survey 2003–2004. **Environmental health perspectives**, v. 116, n. 7, p. 893, 2008.

CALAFAT, A. M. et al. Urinary concentrations of four parabens in the US population: NHANES 2005–2006. **Environmental health perspectives**, v. 118, n. 5, p. 679, 2010.

CHEN, M. et al. Simultaneous determination of multiple phthalate metabolites and bisphenol-A in human urine by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 904, p. 73-80, 2012.

CHEN, M.; IKE, M.; FUJITA, M. Acute toxicity, mutagenicity, and estrogenicity of bisphenol-A and other bisphenols. **Environmental toxicology**, v. 17, n. 1, p. 80-86, 2002.

CHIARADIA, M. et al. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química nova**, 2008.

CHISVERT, A. et al. An overview of the analytical methods for the determination of organic ultraviolet filters in biological fluids and tissues. **Analytica chimica acta**, v. 752, p. 11-29, 2012.

CROTTI, A. E. M. et al. Espectrometria de massas com ionização por “electrospray”: Processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Química nova**, v. 29, n. 2, p. 287-292, 2006.

CUNHA, S. C.; FERNANDES, J. O. Quantification of free and total bisphenol A and bisphenol B in human urine by dispersive liquid–liquid microextraction (DLLME) and heart-cutting multidimensional gas chromatography–mass spectrometry (MD–GC/MS). **Talanta**, v. 83, n. 1, p. 117-125, 2010.

DARBRE, P. D. et al. Concentrations of parabens in human breast tumours. **Journal of applied toxicology**, v. 24, n. 1, p. 5-13, 2004.

DARBRE, P. D.; HARVEY, P. W. Paraben esters: review of recent studies of endocrine toxicity, absorption, esterase and human exposure, and discussion of potential human health risks. **Journal of applied toxicology**, v. 28, n. 5, p. 561-578, 2008.

DARVAY, A. et al. Photoallergic contact dermatitis is uncommon. **British Journal of Dermatology**, v. 145, n. 4, p. 597-601, 2001.

DASTON, G. P. et al. Environmental estrogens and reproductive health: a discussion of the human and environmental data. **Reproductive Toxicology**, v. 11, n. 4, p. 465-481, 1997.

DEWALQUE, L. et al. Simultaneous determination of some phthalate metabolites, parabens and benzophenone-3 in urine by ultra high pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 949, p. 37-47, 2014.

DIAS, A. N. et al. A novel approach to bar adsorptive microextraction: Cork as extractor phase for determination of benzophenone, triclocarban and parabens in aqueous samples. **Analytica chimica acta**, v. 888, p. 59-66, 2015.

EPA, U. S. United States Environmental Protection Agency. **Special report on Environmental endocrine disruption: An effects assessment and analysis office of research and development**. REPA/630/R-96/012. In: Washington DC, 1997.

FDA, FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Safety and Effectiveness of Consumer Antiseptics; Topical Antimicrobial Drug Products for Over-the-Counter Human Use, 2016. Disponível em: <https://www.federalregister.gov/documents/2016/09/06/2016-21337/safety-and-effectiveness-of-consumer-antiseptics-topical-antimicrobial-drug-products-for>. Acesso em dezembro 2017.

FREDERIKSEN, H. et al. Bisphenol A and other phenols in urine from Danish children and adolescents analyzed by isotope diluted TurboFlow-LC-MS/MS. **International journal of hygiene and environmental health**, v. 216, n. 6, p. 710-720, 2013.

FREDERIKSEN, H. et al. Urinary excretion of phthalate metabolites, phenols and parabens in rural and urban Danish mother–child pairs. **International journal of hygiene and environmental health**, v. 216, n. 6, p. 772-783, 2013.

FREDERIKSEN, H.; JØRGENSEN, N.; ANDERSSON, A. Parabens in urine, serum and seminal plasma from healthy Danish men determined by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). **Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology**, v. 21, n. 3, p. 262, 2011.

FUMES, B. H.; LANÇAS, F. M. Use of graphene supported on aminopropyl silica for microextraction of parabens from water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1487, p. 64-71, 2017.

FÜRHACKER, M.; SCHARF, S.; WEBER, H. Bisphenol A: emissions from point sources. **Chemosphere**, v. 41, n. 5, p. 751-756, 2000.

GIBIČAR, D. et al. Simultaneous determination of trace levels of ethylmercury and methylmercury in biological samples and vaccines using sodium tetra (n-propyl) borate as derivatizing agent. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 388, n. 2, p. 329-340, 2007.

GONZÁLEZ-MARIÑO, I. et al. Fully automated determination of parabens, triclosan and methyl triclosan in wastewater by microextraction by packed sorbents and gas chromatography–mass spectrometry. **Analytica chimica acta**, v. 684, n. 1, p. 59-66, 2011.

HARRISON, P. T. C.; HOLMES, P.; HUMFREY, C. D. N. Reproductive health in humans and wildlife: are adverse trends associated with environmental chemical exposure?. **Science of the Total Environment**, v. 205, n. 2-3, p. 97-106, 1997.

HENEWEER, M. et al. Additive estrogenic effects of mixtures of frequently used UV filters on pS2-gene transcription in MCF-7 cells. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 208, n. 2, p. 170-177, 2005.

HOWDESHELL, K. L. et al. Environmental toxins: exposure to bisphenol A advances puberty. **Nature**, v. 401, n. 6755, p. 763-764, 1999.

JARDIM, V. C. et al. Determination of parabens in urine samples by microextraction using packed sorbent and ultra-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 974, p. 35-41, 2015.

KANG, K. et al. Decreased sperm number and motile activity on the F1 offspring maternally exposed to butyl p-hydroxybenzoic acid (butyl paraben). **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 64, n. 3, p. 227-235, 2002.

KANG, S. et al. Urinary paraben concentrations among pregnant women and their matching newborn infants of Korea, and the association with oxidative stress biomarkers. **Science of the Total Environment**, v. 461, p. 214-221, 2013.

KATAOKA, H. et al. Developments and applications of capillary microextraction techniques: a review. **Analytica chimica acta**, v. 655, n. 1, p. 8-29, 2009.

KITAMURA, S. et al. Comparative study of the endocrine-disrupting activity of bisphenol A and 19 related compounds. **Toxicological Sciences**, v. 84, n. 2, p. 249-259, 2005.

KONDO, F. et al. Determination of five phthalate monoesters in human urine using gas chromatography-mass spectrometry. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 85, n. 1, p. 92-96, 2010.

KRAUSE, M. et al. Sunscreens: are they beneficial for health? An overview of endocrine disrupting properties of UV-filters. **International journal of andrology**, v. 35, n. 3, p. 424-436, 2012.

KUO, H.; DING, W. Trace determination of bisphenol A and phytoestrogens in infant formula powders by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1027, n. 1, p. 67-74, 2004.

LARSSON, K. et al. Exposure determinants of phthalates, parabens, bisphenol A and triclosan in Swedish mothers and their children. **Environment international**, v. 73, p. 323-333, 2014.

LEE, S. et al. Emission of bisphenol analogues including bisphenol A and bisphenol F from wastewater treatment plants in Korea. **Chemosphere**, v. 119, p. 1000-1006, 2015.

LIAO, C.; KANNAN, K. Determination of free and conjugated forms of bisphenol A in human urine and serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Environmental science & technology**, v. 46, n. 9, p. 5003-5009, 2012.

MA, R. et al. UV filters with antagonistic action at androgen receptors in the MDA-kb2 cell transcriptional-activation assay. **Toxicological Sciences**, v. 74, n. 1, p. 43-50, 2003.

MA, W. et al. Urinary concentrations of parabens in Chinese young adults: implications for human exposure. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 65, n. 3, p. 611-618, 2013.

MEEKER, J. D. et al. Urinary concentrations of parabens and serum hormone levels, semen quality parameters, and sperm DNA damage. **Environmental health perspectives**, v. 119, n. 2, p. 252, 2011.

MOEDER, M. et al. At-line microextraction by packed sorbent-gas chromatography–mass spectrometry for the determination of UV filter and polycyclic musk compounds in water samples. *Journal of chromatography A*, v. 1217, n. 17, p. 2925-2932, 2010.

MOOS, R. K. et al. Rapid determination of nine parabens and seven other environmental phenols in urine samples of German children and adults. **International journal of hygiene and environmental health**, v. 217, n. 8, p. 845-853, 2014.

NOORASHIKIN, M. S.; MOHAMAD, S.; ABAS, M. R. Extraction and determination of parabens in water samples using an aqueous two-phase system of ionic liquid and salts with beta-cyclodextrin as the modifier coupled with high performance liquid chromatography. **Analytical Methods**, v. 6, n. 2, p. 419-425, 2014.

OLIVEIRA, D. A. G. C. et al. Protetores solares, radiações e pele. **Cosmet. Toiletries**, v. 16, n. 2, p. 68-72, 2004.

QUEIROZ, M. E. C. Microextração em sorvente empacotado (MEPS) para a determinação de fármacos em fluidos biológicos. *Scientia Chromatographica*, v. 3, n. 3, p. 223-229, 2011.

QVARNSTRÖM, J.; FRECH, W. Mercury species transformations during sample pre-treatment of biological tissues studied by HPLC-ICP-MS. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 17, n. 11, p. 1486-1491, 2002.

RIBEIRO, R. P. et al. Avaliação do fator de proteção solar (FPS) in vitro de produtos comerciais e em fase de desenvolvimento. **Pharm Bras**, v. 16, p. 86-88, 2004.

RICHARDSON, S. D. Environmental mass spectrometry: emerging contaminants and current issues. **Analytical chemistry**, v. 80, n. 12, p. 4373-4402, 2008.

ROCHA, B. A. et al. A fast method for bisphenol A and six analogues (S, F, Z, P, AF, AP) determination in urine samples based on dispersive liquid-liquid microextraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 154, p. 511-519, 2016.

ROCHA, B. Alves., DE OLIVEIRA, A. R. M., BARBOSA, F. A fast and simple air-assisted liquid-liquid microextraction procedure for the simultaneous determination of bisphenols, parabens, benzophenones, triclosan, and triclocarban in human urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Talanta**, 2018.

ROSENMAI, A. K. et al. Are structural analogues to bisphenol a safe alternatives?. **Toxicological Sciences**, v. 139, n. 1, p. 35-47, 2014.

SALGADO, C.; GALANTE, M. C.; LEONARDI, G. R. Filtros solares: Mecanismos de ação e metodologias em preparações magistrais. **Int. J. Pharm. Compound, Edição Brasileira**, v. 6, n. 4, p. 224-236, 2004.

SANAD, R. A. et al. Formulation of a novel oxybenzone-loaded nanostructured lipid carriers (NLCs). **Aaps Pharmscitech**, v. 11, n. 4, p. 1684-1694, 2010.

SCHLUMPF, M. et al. Exposure patterns of UV filters, fragrances, parabens, phthalates, organochlor pesticides, PBDEs, and PCBs in human milk: correlation of UV filters with use of cosmetics. **Chemosphere**, v. 81, n. 10, p. 1171-1183, 2010.

SCHREURS, R. H. M. M et al. Interaction of polycyclic musks and UV filters with the estrogen receptor (ER), androgen receptor (AR), and progesterone receptor (PR) in reporter gene bioassays. **Toxicological Sciences**, v. 83, n. 2, p. 264-272, 2004.

SHEN, X. et al. Application of dispersive liquid-liquid microextraction for the preconcentration of eight parabens in real samples and their determination by high-performance liquid chromatography. **Journal of separation science**, v. 40, n. 22, p. 4385-4393, 2017.

SILVA, C. et al. Microextraction by packed sorbent (meps) and solid-phase microextraction (spme) as sample preparation procedures for the metabolomic profiling of urine. **Metabolites**, v. 4, n. 1, p. 71-97, 2014.

SODRÉ, F. F. Interferentes Endócrinos como Contaminantes Emergentes: Uma questão de saúde pública. **Artigos Temáticos do AQQUA**, v. 1, n. 1, 2012.

SUZUKI, T. et al. Estrogenic and antiandrogenic activities of 17 benzophenone derivatives used as UV stabilizers and sunscreens. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 203, n. 1, p. 9-17, 2005.

TARAZONA, I.; CHISVERT, A.; SALVADOR, A. Determination of benzophenone-3 and its main metabolites in human serum by dispersive liquid–liquid microextraction followed by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 116, p. 388-395, 2013.

THEODORIDIS, G. A. et al. Liquid chromatography–mass spectrometry based global metabolite profiling: a review. **Analytica chimica acta**, v. 711, p. 7-16, 2012.

VANDENBERG, L. N. et al. Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A. **Ciencia & saude coletiva**, v. 17, n. 2, p. 407-434, 2012.

VELA-SORIA, F. et al. UHPLC–MS/MS method for the determination of bisphenol A and its chlorinated derivatives, bisphenol S, parabens, and benzophenones in human urine samples. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 406, n. 15, p. 3773-3785, 2014.

WARDENCKI, W.; CURYŁO, J.; NAMIEŚNIK, J. Trends in solventless sample preparation techniques for environmental analysis. **Journal of biochemical and biophysical methods**, v. 70, n. 2, p. 275-288, 2007.

WEBER, R. F. A. et al. Environmental influences on male reproduction. **BJU international**, v. 89, n. 2, p. 143-148, 2002.

XUE, J. et al. Urinary levels of endocrine-disrupting chemicals, including bisphenols, bisphenol A diglycidyl ethers, benzophenones, parabens, and triclosan in obese and non-obese Indian children. **Environmental research**, v. 137, p. 120-128, 2015.

YE, X. et al. Quantification of the urinary concentrations of parabens in humans by on-line solid phase extraction-high performance liquid chromatography–isotope dilution tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 844, n. 1, p. 53-59, 2006a.

YE, X. et al. Parabens as urinary biomarkers of exposure in humans. **Environmental health perspectives**, v. 114, n. 12, p. 1843, 2006b.

YU, X. Occurrence and estrogenic potency of eight bisphenol analogs in sewage sludge from the US EPA targeted national sewage sludge survey. **Journal of hazardous materials**, v. 299, p. 733-739, 2015.

YUSA, V.; YE, X.; CALAFAT, A. M. Methods for the determination of biomarkers of exposure to emerging pollutants in human specimens. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 38, p. 129-142, 2012.