UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Desenvolvimento de um método para determinação de disruptores endócrinos em saliva por microextração líquido-líquido dispersiva e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para a obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Toxicologia

Orientada: Mariana Lepri de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Fernando Barbosa Júnior

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Toxicologia em 11/05/2018. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2018

OLIVEIRA, M.L.	Desenvolvimento de um método para determinação de disruptores endócrinos em saliva por microextração líquido-líquido dispersiva e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas		MESTRADO FCFRP USP 2018
-------------------	--	--	-------------------------------

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

Oliveira, Mariana Lepri

Desenvolvimento de um método para determinação de disruptores endócrinos em saliva por microextração líquido-líquido dispersiva e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas. Ribeirão Preto, 2018.
49p.: il.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.

Orientador: Barbosa Júnior, Fernando.

1. DLLME 2. Disruptores endócrinos 3. Bisfenóis 5. Parabenos 6. Benzofenonas 7. Triclocarban

RESUMO

OLIVEIRA, M.L. **Desenvolvimento de um método para determinação de disruptores endócrinos em saliva por microextração líquido-líquido dispersiva e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas.** 2018. 64f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

A crescente demanda por novos compostos químicos sintéticos para atender as necessidades médicas, agrícolas e industriais da população resultou no surgimento de novos contaminantes, denominados emergentes. Com a intensa utilização destes compostos em diversos produtos e o consequente aumento da concentração destes no meio ambiente, a população passou a estar exposta e sujeita aos seus possíveis efeitos deletérios. Os disruptores endócrinos fazem parte do grupo de contaminantes emergentes que tem a capacidade de interferir na ação natural dos hormônios por diferentes mecanismos, podendo agravar o quadro de doenças pré-existentes e causar diversos outros danos à saúde humana. Apesar de serem largamente utilizados na vida cotidiana, a regulamentação do uso desses compostos ainda é quase inexistente, aumentando a preocupação quanto à sua segurança. Comumente, os estudos de biomonitoramento humano para avaliar a exposição da população em geral são realizados utilizando amostras de sangue e urina. Neste sentido, o presente estudo teve como objetivo desenvolver um método alternativo para determinação simultânea de 17 compostos classificados como disruptores endócrinos: bisfenóis, parabenos, benzofenonas e triclocarban em saliva, empregando a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) no preparo da amostra e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS) para a determinação. Os seguintes parâmetros foram avaliados na otimização da DLLME: volume e tipo de solvente extrator e dispersor, força iônica, pH e agitação. Após a otimização, o processo de extração foi realizado adicionando-se 500 μL de água deionizada à 500 μL da amostra de saliva. Os solventes extrator e dispersor selecionados foram triclorometano e acetona, respectivamente (volume de 2 mL da mistura na proporção 1:3). Foi adicionada a etapa de agitação manual por dez segundos. As curvas de calibração de todos os analitos apresentaram linearidade, com coeficiente de correlação superiores a 0,99 no intervalo de concentração de 1-20 ng mL^{-1} . O coeficiente de variação (CV) intra e interdias foram inferiores a 20% para o primeiro ponto da faixa linear e inferiores a 15% para as demais concentrações. O erro padrão relativo intra e interdias foram inferiores a 20% para o primeiro ponto da faixa linear e inferiores a 15% nas demais concentrações. Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) encontrados variaram de 0,01 - 0,15 ng mL^{-1} e 0,05 - 0,40 ng mL^{-1} , respectivamente. Para avaliar a aplicabilidade do método, dez amostras de saliva foram analisadas e apresentaram concentrações detectáveis de bisfenol S (BPS), bisfenol AF (BPAF) e propilparabeno (PrP) (<LOQ). O bisfenol A (BPA) e a benzofenona-3 (BP3) foram encontrados em concentrações que variaram entre 1,01-3,14 e 1,00-2,50 ng mL^{-1} , respectivamente. O metilparabeno (MeP) foi detectado em todas as amostras, atingindo, nos níveis quantificáveis, a concentração de 17,8 ng mL^{-1} . Portanto, o método aqui proposto é uma alternativa simples e rápida para estudos de biomonitoramento humano, capaz de determinar 17 analitos multi-classes simultaneamente com uso de baixo volume de solventes.

Palavras-chave: DLLME, disruptores endócrinos, contaminantes emergentes, bisfenóis, parabenos, benzofenonas, triclocarban.

ABSTRACT

OLIVEIRA, M.L. **Method development for determination of endocrine disrupting in saliva by dispersive liquid-liquid microextraction and high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry.** 2018. 64f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

The growing demand of new synthetic chemical compounds to attend the medical, agricultural and industrial needs of the population has resulted in the emergence of new contaminants, known as emerging contaminants. The presence of these contaminants in several products, and its consequent concentration increase in the environment, exposed the population and subject them to possible deleterious effects. Endocrine disruptors are a group of these contaminants that have the ability to interfere at the natural action of hormones by different mechanisms, which can worsen preexistent diseases and cause other damages to human health. Despite the widely utilization of these compounds in everyday life, regulation of its use is almost non-existent, raising concerns about their safety. Mostly human biomonitoring studies to assess the exposure of the population are performed in urine and blood samples. In this sense, the present study aimed to develop an alternative method for simultaneous determination of 17 endocrine disrupting compounds: bisphenols, parabens, benzophenones and triclocarban in saliva, using dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) at sample preparation and high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS/MS) for determination. The evaluated parameters in the optimization of DLLME were: volume and type of extraction and disperser solvents, ionic strength, pH and agitation. After the optimization, the extraction procedure was performed by adding 500 μL of deionized water to 500 μL of saliva sample. The extraction and disperser solvents selected were trichloromethane and acetone, respectively (2 mL of the mixture in 1:3 ratio). The manual agitation for ten seconds. The matrix-matched calibration curves of all analytes were linear, with correlation coefficients higher than 0.99 in the range level of 1 - 20 ng mL^{-1} . The intra and interday coefficient of variation (CV) was less than 20% for the first point of the linear range and less than 15% for the other concentrations. The intra and interday relative standard deviation (RSD) was less than 20% for the first point of the linear range and less than 15% for the other concentrations. The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) ranged from 0,01 - 0,15 ng mL^{-1} and 0,05 - 0,4 ng mL^{-1} , respectively. To evaluate the applicability of the method, ten saliva samples were analyzed, showing detectable concentrations ($<\text{LOQ}$) of bisphenol S (BPS), bisphenol AF (BPAF) and propylparaben (PrP). Bisphenol A (BPA) and benzophenone-3 (BP3) were found in ranging concentrations from 1,01 - 3,14 and 1,00 - 2,50 ng mL^{-1} , respectively. Methylparaben (MeP) was detected in all samples, reaching, at the quantifiable levels, the concentration of 17,8 ng mL^{-1} . Thus, the proposed method is a simple and fast alternative for human biomonitoring studies, capable of determining 17 multi-class analytes simultaneously using low volume of solvent.

Key words: DLLME, endocrine disrupting, emerging contaminants, bisphenols, parabens, benzophenones, triclocarban.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$^{13}\text{C}_6\text{-BuP}$	butil 4-anel-hidróxibenzoato- $^{13}\text{C}_6$
$^{13}\text{C}_6\text{-EtP}$	etil 4-anel-hidróxibenzoato- $^{13}\text{C}_6$
$^{13}\text{C}_6\text{-MeP}$	metil 4-anel-hidróxibenzoato- $^{13}\text{C}_6$
$^{13}\text{C}_6\text{-PrP}$	propil 4-anel-hidróxibenzoato- $^{13}\text{C}_6$
4OH-BP	4-hidroxi-benzofenona
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BP1	benzofenona 1
BP2	benzofenona 2
BP3	benzofenona 3
BP8	benzofenona 8
BPA	bisfenol A
BPAF	bisfenol AF
BPAP	bisfenol AP
BPF	bisfenol F
BPP	bisfenol P
BPS	bisfenol S
BPZ	bisfenol Z
BuP	butilparabeno
BzP	benzilparabeno
CE	energia de colisão
CV	coeficiente de variação
DLLME	microextração líquido-líquido dispersiva
EPR	erro padrão relativo
EtP	etilparabeno
FMN	fator de matriz normalizado
GC-MS	cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas
LC-MS/MS	cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas <i>in tandem</i>

LLE	extração líquido-líquido
LOD	limite de detecção
LOQ	limite de quantificação
MeP	metilparabeno
MSM	monitoramento de reações múltiplas
PrP	propilparabeno
Q1	íon precursor
Q3	íon produto
RDC	resolução da diretoria colegiada
SD	desvio padrão
SPE	extração em fase sólida
TCC	triclocarban
UPLC	cromatografia líquida de ultra eficiência
USEPA	<i>United States Environmental Protection Agency</i>
USGS	<i>United States Geological Survey</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
°C	graus Celsius
<	menor que
±	mais ou menos
µg	microgramas
µL	microlitros
CaCl₂.2H₂O	cloreto de cálcio dihidratado
g	gramas
KCl	cloreto de potássio
KH₂PO₄	fosfato de potássio monobásico
KSCN	tiocianato de potássio
L	litros
mL	mililitros
mTorr	miliTorr
Na₂HPO₄	fosfato de sódio dibásico
NaCl	cloreto de sódio
NaHCO₃	bicarbonato de sódio
ng	nanogramas
pH	potencial hidrogeniônico
rpm	rotações por minuto
V	volts

1. INTRODUÇÃO

1.1 Contaminantes emergentes

Na sociedade moderna, os produtos químicos são amplamente utilizados para as mais diversas aplicações, demandando uma produção em larga escala. No entanto, seu uso e produção em grandes proporções originam resíduos que podem impactar negativamente o meio ambiente e trazer prejuízos à saúde da população (SILVA e COLLINS, 2011).

Os contaminantes emergentes são compostos considerados “novos” poluentes ambientais, cuja maioria não possui regulamentação pela legislação vigente. Entre essas substâncias estão inclusos produtos farmacêuticos, produtos de cuidado pessoal, surfactantes, aditivos industriais e plastificantes. Por se tratarem de produtos largamente utilizados na vida cotidiana, não precisam necessariamente ser persistentes no meio ambiente, pois são de introdução contínua no mesmo (PETROVIC; GONZALEZ; BARCELÓ, 2003).

Nesse contexto, há uma crescente preocupação das agências ambientais regulatórias de vários países em estabelecer procedimentos para caracterizar e controlar essas substâncias (HUTZINGER, 2006). Segundo a agência norte-americana *United States Geological Survey (USGS)*, um contaminante emergente pode ser definido como “uma substância química de ocorrência natural ou antrópica, ou qualquer microorganismo que não é normalmente monitorado no ambiente, mas que tem potencial para entrar nele e causar efeitos ecológicos adversos e/ou sobre a saúde humana, sendo esses efeitos conhecidos ou suspeitos”. Já a *United States Environmental Protection Agency (USEPA)* define como contaminantes emergentes “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”, atentando mais para a necessidade de normatização da presença dessas substâncias. Também segundo a *USEPA*, essas substâncias podem ser classificadas como persistentes, bioacumulativas e tóxicas; produtos de higiene pessoal e produtos farmacêuticos; nanopartículas; e perturbadores endócrinos.

1.1.1 Disruptores endócrinos

Os disruptores endócrinos, também conhecidos como perturbadores ou desreguladores endócrinos, têm despertado maior atenção da comunidade científica e agências reguladoras devido ao seu potencial efeito estrogênico (ANNAMALAI e NAMASIVAYAM et al., 2015; FUHMAN; TAL; ARNON, 2015; KABIR; RAHMAN; RAHMAN, 2015). Também conhecidos como perturbadores endócrinos, esses compostos são definidos como “agentes exógenos que tem a capacidade de interferir na síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação de hormônios naturais que são responsáveis pela manutenção da homeostase, reprodução, desenvolvimento e/ou comportamento” (USEPA), alterando o funcionamento do sistema endócrino e consequentemente, prejudicando a saúde humana (ROCHESTER, 2013).

Essa classe de substâncias é dividida em dois grupos: o dos compostos sintéticos, como agroquímicos, plastificantes, cosméticos, produtos farmacêuticos, solventes, entre outros; e dos compostos naturais, como extratos de plantas e fungos (KABIR; RAHMAN; RAHMAN, 2015).

No ambiente, esses compostos podem ser encontrados em concentrações muito baixas. No entanto, mesmo essas baixas concentrações são capazes de provocar efeitos adversos à saúde, tais como comprometimento do desenvolvimento, danos no sistema reprodutor e câncer (GIULIVO et al., 2016; ABACI et al., 2009; NOHYNEK et al., 2013), além de agravar quadros de doenças metabólicas, tais como obesidade, endometriose e diabetes (DIAMANTI-KANDARAKIS et al., 2009; MUNCKE, 2011; GIULIVO et al., 2016; LEGLER et al., 2015).

1.1.1.1 Bisfenol A e análogos

O bisfenol A (BPA) é um composto químico industrial utilizado na produção de plásticos de polycarbonatos e resinas epóxi, e revestimentos de embalagens metálicas de bebidas e alimentos. Também é comumente encontrado em produtos como mamadeiras, equipamentos esportivos, dispositivos dentários e médicos, eletrodomésticos e lentes oculares. Não é biodegradável e é altamente resistente à degradação química. Sua produção é realizada em larga escala mundialmente, com uma estimativa de 6 milhões de toneladas por ano (LIANG et al., 2015; GARCIA-PIETRO et al., 2008; BERONIUS et al., 2010; DAAS e HANDAOUI, 2010).

Atualmente, a comunidade científica busca avaliar e os possíveis efeitos tóxicos do BPA, principalmente sua ação hormonal mimética, que leva à alteração do funcionamento celular. Este composto é conhecido como um disruptor endócrino de ação estrogênica, devido ao seu potencial de ligação aos receptores hormonais, principalmente não nucleares, desencadeando suas funções (VINAS; JENG; WATSON, 2012).

Dentro da classe dos bisfenóis temos outros representantes como o bisfenol F (BPF) e o bisfenol S (BPS), que apresentam propriedades físico-químicas similares às do BPA (Figura 1), possibilitando sua substituição na produção industrial (LEE et al., 2015). Entretanto, esses análogos também possuem ação desreguladora endócrina semelhante ao BPA (ROSENMAI et al.; 2014)

Figura 1 – Estrutura química do bisfenol A e análogos.

Fonte: A autora.

Os seres humanos estão expostos a esses contaminantes através da inalação de poeira doméstica, pela via dérmica, e principalmente pela dieta, por meio da ingestão água contaminada, e de alimentos e bebidas armazenados em latas revestidas e recipientes plásticos (VANDENBERG et al., 2012; LIANG et al., 2015), visto que estudos mostraram a migração dessas substâncias das embalagens para os alimentos pode ocorrer (BILES et al., 1997; KUO e DING, 2004).

Nos últimos anos tem ocorrido uma mobilização para a proibição da fabricação e importação de produtos que contenham BPA, principalmente quando estes são destinados ao público infantil, uma vez que essa população pode estar sujeita a maiores danos decorrentes da ação desreguladora hormonal. No Brasil, em 2011, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) proibiu a importação e a fabricação de mamadeiras contendo este composto em sua composição (BRASIL, 2011).

1.1.1.2 Parabenos

Os parabenos compõem um grupo de substâncias químicas formadas por para-hidroxi-ésteres do ácido benzóico com substituintes alquílicos que variam de metil a butil ou grupo benzil (HARVEY e EVERETT, 2012). São utilizados industrialmente como antimicrobianos e conservantes de alimentos, produtos farmacêuticos e, principalmente, cosméticos (JONKERS et al., 2010). Os mais comumente encontrados são o metilparabeno (MeP), etilparabeno (EtP), propilparabeno (PrP), butilparabeno (BuP) e benzilparabeno (BzP) (Figura 2). Seus grupos substituintes caracterizam a solubilidade desses compostos e suas atividades antimicrobianas de diferentes espectros (CASHMAN e WARSHAW, 2005).

Figura 2 – Estrutura química dos principais parabenos.

Fonte: A autora.

Sua ampla utilização é justificada pelo seu baixo custo, alta aceitação regulatória e seu poder antimicrobiano. A legislação brasileira permite o uso em

produtos de higiene pessoal em níveis de até 0,4% quando se é utilizado apenas um parabeno, e de 0,8% quando há uma mistura (BRASIL, 2012).

A exposição a essas substâncias pode ocorrer por meio da ingestão de alimentos e produtos farmacêuticos, bem como através da via dérmica por meio da aplicação de cosméticos e formulações medicamentosas (SONI; CARABIN; BURDOCK, 2005).

Estudos apontam que os parabenos podem exercer desde uma fraca atividade estrogênica (KANG, 2013) até uma possível correlação com o câncer de mama (DARBRE et al., 2004).

1.1.1.3 Benzofenonas

Os derivados da benzofenona (Figura 3), são comumente utilizados como filtros de raio ultravioleta numa variedade de produtos cosméticos, como maquiagens e loções, e em embalagens de alimentos (KUNISUE et al., 2010). A propriedade de filtrar raios solares ocorre devido à menor quantidade de energia quântica que requerem para a transição eletrônica, sofrendo ressonância mais facilmente (RIBEIRO et al., 2004).

Figura 3 - Estrutura química das benzofenonas.

Fonte: A autora.

A exposição a essas substâncias pode ocorrer pelas vias oral e dérmica (BLÜTHGEN; ZUCCHI; FENT, 2012). No organismo, as benzofenonas podem causar reações alérgicas e apresentar ação estrogênica (SCHREURS et al., 2004; HENEWEER et al., 2005).

A legislação brasileira que trata sobre filtros ultravioletas em produtos de higiene pessoal, perfumes e cosméticos preconiza os limites de concentração de até 10% das benzofenonas 3 (BP3) e benzofenona 4 (BP4), até 5% de benzofenona 5 (BP5) e 3% da benzofenona 8 (BP8). Além disso, o fabricante deve informar a presença de BP3 na embalagem do produto quando sua concentração for superior a 0,5%.

1.1.1.4 Triclocarban

O triclocarban (TCC) (Figura 4) é um composto largamente utilizado como antimicrobiano, principalmente em produtos de higiene pessoal, como cremes dentais, antissépticos bucais, sabonetes profiláticos, desodorantes e produtos de desinfecção (YUSA; YE; CALAFAT, 2012; SILVA E COLLINS, 2011).

Figura 4 - Estrutura química do triclocarban.

Fonte: A autora.

Além de seu efeito disruptor endócrino (AHN et al., 2008), outros efeitos vêm sendo investigados, como por exemplo uma possível ação carcinogênica no desenvolvimento do câncer de mama (SOOD; CHOUDHARY; WANG, 2013).

A efetividade do TCC como antimicrobiano em produtos de limpeza e desinfecção tem sido questionada. Em 2016 o FDA considerou o composto não seguro e não efetivo nesses produtos. A legislação brasileira preconiza os limites de até 0,2% da formulação (BRASIL, 2012) e até 1,5% em produtos que são enxaguados após o uso (BRASIL, 2012b).

1.2 Métodos analíticos empregados para a determinação de contaminantes emergentes

Os contaminantes emergentes estão presentes em baixas concentrações nas diversas matrizes, exigindo que os métodos utilizados para determinação desses compostos em amostras biológicas e ambientais apresentem alta sensibilidade. Os principais métodos analíticos empregados para essa tarefa são a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (LC-MS) e cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (GC-MS). A escolha do método está relacionada às características físico-químicas dos compostos de interesse como polaridade, volatilidade e termoestabilidade (YUSA, et al., 2012).

GC-MS geralmente é selecionado para determinação de analitos mais voláteis (HUTTER et al., 2010). Vela-Soria e colaboradores (2014) empregaram GC-MS/MS na determinação simultânea de vários disruptores endócrinos em urina após derivatização, obtendo limites de quantificação variando entre 0,2 e 0,5 ng mL⁻¹. Apesar de conseguir bons limites de quantificação, a derivatização requer o uso de solventes tóxicos e reagentes de alto custo, além da demanda de um maior tempo no preparo da amostra.

LC-MS/MS tem sido essencial na determinação de compostos polares, apresentando alta sensibilidade, boa seletividade e um amplo escopo (CRUZ-VERA et al., 2010; REEMTSMA et al., 2011). A aplicação da técnica de cromatografia líquida acoplada a detector de massas *in tandem* tem avançado rapidamente neste campo de pesquisas, diminuindo os tempos das análises, com uma melhora na sensibilidade, e seletividade das análises (CUNLIFFE et al., 2007; PEDROUZO et al., 2009; VELA-SORIA et al., 2014).

1.3 Preparo de amostras

O passo mais importante e talvez mais laborioso do desenvolvimento e execução de um método analítico para determinação de compostos em matrizes ambientais e biológicas é o preparo de amostras. As principais etapas deste processo incluem: extração, separação, purificação e concentração (JIMENEZ-DIAZ et al.,

2015; ALBERO et al., 2015; PLOTKA-WASYLKA et al., 2016; MOREIRA et al., 2014; SCOGNAMIGLIO et al., 2016).

De acordo com Jimenez-Diaz e colaboradores (2015), o preparo de amostras para análise e determinação de disruptores endócrinos em matrizes biológicas envolve, principalmente, duas técnicas de extração: a extração líquido-líquido (LLE) e a extração por fase sólida (SPE), sendo esta segunda a mais amplamente utilizada. Entre as vantagens da SPE está a possibilidade de ser utilizada em análises *online* e *off-line* multi-resíduo para determinação de compostos com diferentes propriedades físico-químicas. A facilidade no acoplamento do sistema de SPE ao LC-MS/MS também faz com que a técnica seja altamente reprodutível. Por outro lado, a LLE tradicional, apesar de ser uma técnica simples, requer geralmente grandes volumes de solventes orgânicos, demanda tempo e é de difícil automação (JIMENEZ-DIAZ et al., 2015).

Com a crescente demanda de análises associada a necessidade de redução do tempo de preparo de amostras e diminuição do consumo de reagentes durante o processo analítico, várias iniciativas surgiram vislumbrando uma maior simplicidade de operação e redução nos tempos de análise em rotina.

Dessa forma, foram propostas as microtécnicas de extração, incluindo a microextração em fase sólida (FELIX et al., 1998), microextração em fase líquida com fibras ocas (PSILLAKIS e KALOGERAKIS, 2003), extração com uso de polímeros de impressão molecular (SANTOS et al., 2012), e a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) (REZAAEE et al., 2006).

1.3.1 Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME)

Com a substituição das técnicas clássicas de preparo de amostra pelas técnicas miniaturizadas na determinação de compostos orgânicos em amostras biológicas e ambientais nos últimos anos, a DLLME surgiu como uma alternativa viável, possuindo diversas vantagens como rapidez, baixo custo, alta eficiência de extração e pré-concentração dos analitos. A microtécnica é baseada na partição dos analitos alvos utilizando volumes pequenos de uma mistura de solventes (MARTINS et al., 2012; MOREIRA et al., 2014; PLOTKA-WASYLKA et al., 2016).

A DLLME foi proposta por Rezaee e colaboradores (2006). Nessa técnica são utilizados um solvente chamado de dispersor, que deve ser miscível no solvente

extrator (fase orgânica) e na amostra (fase aquosa), e um solvente extrator, que deve ser insolúvel na fase aquosa. Essa mistura de solventes é então injetada rapidamente na amostra com auxílio de uma seringa causando uma rápida turbidez, conhecida como formação do ponto nuvem. Nesse estado são formadas microgotas dos solventes dispersas por toda solução aquosa, aumentando a superfície de contato entre o solvente extrator e a amostra e, conseqüentemente, favorecendo a partição do analito para a fase orgânica (CALDAS et al., 2011). Após a injeção rápida da mistura de solventes, a amostra é centrifugada, para que as microgotas possam ser depositadas, e é realizada a remoção e transferência da fase sedimentada (Figura 5).

Figura 5 - Etapas da DLLME e formação do ponto nuvem.

Fonte: Adaptado de Caldas et al, 2011.

A formação do ponto nuvem dispensa a agitação prolongada e as sucessivas extrações realizadas nos procedimentos da LLE. Como na DLLME a partição ocorre rapidamente e possui alta eficiência, não é necessário que haja novas extrações, fazendo com que a técnica possa ser considerada de equilíbrio ou até mesmo exaustiva quando a recuperação é próxima de 100% (REZAEI; YAMINI; FARAJI, 2010; MARTINS et al., 2012).

Durante o desenvolvimento da técnica de extração por DLLME alguns parâmetros devem ser avaliados para que se atinja uma condição ideal que proporcione uma boa eficiência de extração. Os parâmetros mais importantes são o tipo e o volume dos solventes extrator e dispersor. Além das características de miscibilidade de ambos os solventes já citadas, o volume do solvente extrator deve ser o menor possível que seja capaz de extrair o analito, aumentando o fator de enriquecimento, que é dependente do volume da fase doadora, da recuperação e do volume da fase orgânica. Com relação ao solvente dispersor, seu volume afeta diretamente a formação do ponto nuvem, e, conseqüentemente, a eficiência da extração, além de também modificar o volume da fase sedimentada (REZAEI; YAMINI; FARAJI, 2010).

A influência da força iônica na extração deve ser considerada. A adição de sais pode provocar o efeito conhecido como *salting out*, onde a força iônica do sistema é aumentada devido aos íons formados pela dissociação do sal em meio aquoso, que interagem com as moléculas de água, uma vez que estas reagem preferencialmente com moléculas menores, diminuindo a solubilidade dos analitos polares na fase aquosa e também do solvente, aumentando o volume da fase sedimentada (MARTINS et al., 2012).

O pH da fase doadora é outro parâmetro a ser avaliado considerando as características de acidez ou basicidade do analito, sendo que, quando ionizado, sua solubilidade na fase aquosa aumenta. Portanto, o controle do pH deve ser realizado para que o analito permaneça em sua forma não-ionizada, favorecendo sua solubilização na fase extratora (ZGOLA-GRZÉSKOWIAK; GRZÉSKOWIAK, 2011).

Recentes modificações na técnica de DLLME tem sido testadas com a finalidade de melhorar o processo de extração, sendo as novas técnicas conhecidas como DLLME assistidas. Nestas novas versões, a agitação é realizada de diversas formas. O uso do ultrassom, por exemplo, na técnica chamada de microextração líquido-líquido dispersiva assistida por ultrassom (USADLLME), tem a finalidade de promover a dispersão do solvente extrator, dispensando ou diminuindo o uso do solvente dispersor. No entanto, a sua utilização pode degradar os analitos e formar emulsões instáveis, aumentando o tempo de centrifugação. Para contornar estes problemas, foi proposto o uso de vórtex, resultando na microextração líquido-líquido dispersiva assistida por vórtex (VADLLME) (ANDRUCH et al., 2013). Além disso, a aplicação de uma simples agitação manual por alguns segundos também pode

favorecer a extração, aumentando a eficiência da extração e sua precisão (VELA-SORIA et al.; 2014).

Baseado em todas estas características, a DLLME tornou-se uma ferramenta muito útil na análise de matrizes aquosas, tornando sua aplicação na extração de analitos da saliva uma opção altamente promissora.

1.4 Amostras biológicas utilizadas para análise de contaminantes emergentes

O biomonitoramento humano é uma ferramenta muito importante para elucidar o comportamento de determinado composto e avaliar seu potencial de risco. A partir das informações obtidas, os órgãos regulamentadores responsáveis podem estabelecer limites de segurança e regras que podem diminuir e evitar o risco de exposição à substâncias tóxicas (CALAFAT e NEEDHAM, 2009; KOCH e CALAFAT, 2009). Esses estudos são baseados na análise de contaminantes ambientais e seus biomarcadores de exposição ou de efeito em tecidos ou fluidos biológicos (ANGERER et al., 2006; PAUSTENBACH e GALBRAITH, 2006).

As amostras biológicas mais utilizadas para tal finalidade requerem um método invasivo de coleta, como é o caso do sangue. O sangue é uma das matrizes mais comumente utilizadas, podendo as análises serem realizadas em sangue total, soro, plasma ou tipos celulares específicos dependendo das características do analito. Apesar de cientificamente o sangue ser a matriz preferencial para análise de muitos compostos devido a sua ligação com todos os tecidos e órgãos do organismo, esforços estão sendo realizados na substituição dos métodos invasivos de coleta para métodos não invasivos (ALVES et al., 2014).

Os métodos que utilizam coleta não-invasiva, como de urina, cabelo, unhas, saliva, possuem a vantagem de serem indolores e a possibilidade de armazenamento por maior tempo sem perda das propriedades (SMOLDERS et al., 2009). A urina é a matriz biológica não-invasiva mais utilizada na determinação de biomarcadores de exposição aos contaminantes emergentes, e pode refletir a exposição por várias vias de exposição. Apesar das vantagens da utilização de matrizes não-invasivas, as baixas concentrações dos analitos encontradas tornam a determinação mais desafiadora. (YUSA et al., 2012; ALVES et al., 2014).

A saliva é uma secreção produzida por três tipos de glândulas especializadas: parótida, submandibular e sublinguais, com as funções de proteger e iniciar a digestão na boca. Sua composição é de cerca de 99% de água, sendo os outros componentes eletrólitos, proteínas, enzimas, polipeptídeos, entre outros (SHENKEL et al., 1995; SILVA et al., 2005). O processo de coleta é fácil de ser realizado e podem ser utilizados dispositivos que estimulam ou não a produção salivar (ESTEBAN e CASTAÑO, 2009).

Essa secreção está frequentemente em contato com contaminantes, seja diretamente por fontes externas, como pela alimentação, ou pelo contato próximo com o sangue na mucosa bucal, que faz com que compostos e seus metabólitos, principalmente os não ligados a proteínas plasmáticas, passem para o fluido por diferentes mecanismos (SILVA et al., 2005).

Devido ao contato direto com determinados materiais, estudos de liberação utilizando a saliva são de grande importância, principalmente em produtos destinados à crianças, que são mais susceptíveis a efeitos deletérios. Estudos apontaram uma alta taxa de migração de compostos utilizados como plastificantes em brinquedos para a saliva (BOUMA e SCHAKEL, 2002), criando um alerta sobre o risco do qual essa população está exposta.

Rotineiramente, a saliva é utilizada no biomonitoramento de medicamentos, para determinação de narcóticos, hormônios e algumas análises clínicas (APS e MARTENS, 2005). Os estudos existentes a cerca desses contaminantes nesse fluido biológico estão restritos ao grupo dos bisfenóis na avaliação de resinas e outros materiais odontológicos (LEE et al., 2017; BERGE et al., 2017) e aos parabenos em análises após utilização de cremes dentais e enxaguantes bucais (ZOTOU, SAKLA, TZANAVARAS, 2010; STEINBERG et al., 1999). No entanto, para o biomonitoramento de contaminantes emergentes ela não é uma matriz usualmente escolhida, havendo poucos estudos que abordam o tema (ESTEBAN e CASTAÑO, 2009; SILVA et al., 2005).

Até onde vai o nosso conhecimento, não há na literatura métodos para a determinação desses compostos simultaneamente em saliva. Além disso, muito pouco se sabe sobre o comportamento cinético dessas substâncias no que diz respeito à sua presença ou não na saliva humana, seja por contato direto com alimentos, bebidas ou outros produtos que podem atingir a cavidade oral, ou por distribuição fisiológica. Portanto, o presente estudo apresenta o desenvolvimento de

um método capaz de determinar simultaneamente 17 compostos de ação disruptora endócrina em saliva, empregando DLLME como método de preparo de amostra e LC-MS/MS.

2. CONCLUSÃO

Foi descrito neste trabalho o desenvolvimento, otimização e validação de um método empregando DLLME e LC-MS/MS para a determinação simultânea de 17 potenciais disruptores endócrinos (BPA, BPS, BPAF, BPAP, BPP, BPZ, MeP, EtP, PrP, BuP, BzP, BP3, BP1, BP2, BP8, 4OH-BP e TCC) pela primeira vez em amostras de saliva.

A técnica avaliada no preparo de amostra de saliva (DLLME) mostrou uma elevada eficiência de extração nas condições otimizadas. Além disso, a rapidez, simplicidade, baixo custo e o pequeno volume de solventes orgânicos necessário, tornam a proposta aqui apresentada altamente atraente para aplicações em rotina quando comparada às técnicas clássicas (LLE e SPE) comumente empregadas nos métodos já descritos na literatura.

Nas análises de amostras de voluntários foram detectados BPS, BPAF e PrP, em concentrações inferiores ao limite de quantificação (<LOQ). O BPA e a BP3 foram quantificados em todas as amostras, em intervalos de concentração de 1 - 3 e 1 - 2,5 ng mL⁻¹, respectivamente. As concentrações mais altas encontradas foram referentes ao MeP, atingindo o valor de 18 ng mL⁻¹.

A carência de estudos conclusivos sobre a segurança desses compostos gera uma preocupação maior sobre a quais níveis e por quais meios a população está exposta. Desse modo, o método proposto no presente trabalho pode ser uma importante ferramenta para complementar os estudos de biomonitoramento humano, com uso de uma matriz não invasiva, e também uma alternativa muito viável para estudos de liberação dos compostos em questão em saliva.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABACI, A.; DEMIR, K.; BOBER, E. BUYUKGEBIZ, A. Endocrine disrupters with special emphasis on sexual development. **Pediatric Endocrinology Reviews**, v. 6, p. 464-475, 2009.

AHN, K. C.; ZHAO, B.; CHEN, J.; CHEREDNICHENKO, G.; SANMARTI, E.; DENISON, M. S.; LASLEY, B.; PESSAH, I. N.; KULTZ, D.; CHANG, D. P. Y.; GEE, S. J.; HAMMOCK, B. D. In vitro biologic activities of the antimicrobials triclocarban, its analogs, and triclosan in bioassay screens: Receptor-based bioassay screens **Environmental Health Perspectives**, v. 116, p. 1203-1210, 2008.

ALBERO, B.; SÁNCHEZ-BRUNETE, C.; GARCIA-VARCÁRCEL, A.I.; PÉREZ, R.A.; TADEO, J.L. Ultrasound-assisted extraction of emerging contaminants from environmental samples. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 110-118, 2015.

ALVES, A.; KUCHARSKA, A.; ERRATICO, C.; XU, F.; HOND, E.D.; KOPPEN, G.; VANERMEN, G.; COVACI, A.; VOORSPOELS, S. Human biomonitoring of emerging pollutants through non-invasive matrices: state of the art and future potential. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, p. 4063-4088, 2014.

ANDRUCH, V.; BURDEL, M.; KOCUROVA, L.; SANDREJOVA, J.; BALOGH, I. S. Application of ultrasonic irradiation and vortex agitation in solvent microextraction. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 49, p. 1-19, 2013.

ANGERES, J.; BIRD, M.G.; BURKE, T.A.; DOERRER, N.G.; NEEDHAM, L.; ROBISON, S.H.; SHELDON, L.; ZENICK, H. Strategic biomonitoring initiatives: moving de Science forward. **Toxicological Sciences**, v. 93, p. 3-10, 2006.

ANNAMALAI, J.; NAMASIVAYAM, V. Endocrine disrupting chemicals in the atmosphere. Their effects on humans and wildlife. **Environment International**, v. 76, p. 78-97, 2015.

APS, J.K.; MARTENS, L.C. Review: the physiology of saliva and transfer of drugs into saliva. **Forensic Science International**, v. 150, p. 119-131, 2005.

ASIMAKAPOULOS, A. G.; WANG, L.; THOMAIDIS, N. S.; KANNAN, K. A multi-class bionalytical methodology for the determination of bisphenol A diglycidyl ether, *p*-hydroxybenzoic acid esters, benzophenone-type ultraviolet filters, troclosan and triclocarban in human urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1324, p. 141-148, 2014.

BERGE, T. L. L.; LYGRE, G. B.; JONSSON, B. A. G.; LINDH, C. H.; BJORKMAN, L. Bisphenol A concentration in human saliva related to dental polymer-based fillings. **Clinical Oral Investigations**, v. 21(8), p. 2561-2568, 2017.

BERONIUS, A.; RUDEN, C.; HAKANSSON, H.; HANBERG, A. Risk to all or none? A comparative analysis of controversies in the health risk assessment of bisphenol A. **Reproductive Toxicology**, v. 29, p. 132-146, 2010.

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(9), p. 3541-3544, 1997.

BLÜTHGEN, N.; ZUCCHI, S.; FENT, K. Effects of the UV filter benzophenone-3 (oxybenzone) at low concentrations in zebrafish (*Danio rerio*). **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 263(2), p. 184-194, 2012.

BOUMA, K.; SCHAKEL, D. J. Migration of phthalates from PVC toys into saliva simulant by dynamic extraction. **Food Additives and Contaminants**, v. 19(6), p. 602-610, 2002.

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

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, **AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA** (ANVISA). RESOLUÇÃO – RDC Nº 166, DE 24 DE JULHO DE 2017.

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

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

CALAFAT, A.M.; NEEDHAM, L.L. What additional factors beyond state-of-the-art analytical methods are needed for optimal generation and interpretation of biomonitoring data? **Environmental Health Perspect**, v. 117, p. 1481-1485, 2009.

CALDAS, S. S.; GOLÇALVES, F. F.; PRIMEL, E. G. Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com determinação por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 94(9), o. 1604-1617, 2011.

CASHMAN, A.L.; WARSHAW, E.M. Parabens: a review of epidemiology, structure, allergenicity, and hormonal properties. **Dermatitis**, v. 16(2), p. 57-66, 2005.

CRUZ-VERA, M.; LUCENA, R.; CÁRDENAS, S.; VALCÁRCEL, M. Highly selective and non-conventional sorbents for the determination of biomarkers in urine by liquid chromatography. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 397(3), p. 1029-1038, 2010.

CUNLIFFE, J.M.; ADAMS-HALL, S.B.; MALONEY, T.D. Evaluation and comparison of very high pressure liquid chromatography systems for the separation and validation of pharmaceutical compounds. **Journal of Separation Science**, v. 30(8), p. 1214-1223, 2007.

DAAS, A.; HANDAOUI, O. Extraction of bisphenol A from aqueous solutions by emulsion liquid membrane. **Journal Membrane Science**, v. 348, p. 360-368, 2010.

DARBRE, P. D.; ALJARRAH, A.; MILLER, W. R.; COLDHAM, N. G.; SAUER, M. J.; POPE, G. S. Concentrations of parabens in human breast tumors. **Journal of Applied Toxicology**, v. 24, p. 5-13, 2004.

DIAMANTI-KANDARAKIS, E.; BOURGUIGNON, J. P.; GIUDICE, L. C.; HAUSE, R.; PRINS, G. S.; SOTO, A. M.; ZOELLER, R. T.; GORE, A. C. Endocrine-disrupting chemicals: na endocrine society scientific statement. **Endocrine Reviews**, v. 30, p. 293-342, 2009.

DOWNS, J. M. Z.; SHUMAN, D.; STULL, S. C.; RATZLAFF, R. E. Bisphenol A blood and saliva levels prior to and after dental sealant placement in adults. **Journal of Dental Hygiene**, v. 84(3), p. 145-150, 2010.

DUFFO, G. S.; CASTILLO, E. Q. Development of an artificial saliva solution for studying the corrosion behavior of dental alloys. **Corrosion**, v. 60(6), p. 594-602, 2004.

ESTEBAN, M.; CASTAÑO, A. Non-invasive matrices in human biomonitoring: a review. **Environment International**, p. 35(2), p. 439-449, 2009.

FELIX, T.; HALL, B.J.; BRODBELT, J.S. Determination of benzophenone-3 and metabolites in water and human urine by solid-phase microextraction and quadrupole ion trap GC-MS. **Analytica Chimica Acta**, v. 371, p. 195-203, 1998.

FUHMANN, V. F.; TAL, A.; ARNON, S. Why endocrine disrupting chemicals (EDCs) challenge traditional risk assessment and how to respond. **Journal of Hazardous Materials**, v. 286, p. 589-611, 2015.

GARCIA-PIETRO, A.; LUNAR, M.L.; RUBIO, S.; PEREZ-BENDITO, D. Determination of urinary bisphenol A by conservative microextraction and liquid chromatography-fluorescence detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 630, p. 19-27, 2008.

GIULIVO, M.; ALDA, M. L.; CAPRI, E.; BARCELO, D. Human exposure to disrupting compounds: Their role in reproductive sustems, metabolic syndrome and breast câncer. A review. **Environmental Research**, v. 151, p. 251-264, 2016.

HARVEY, P.W. EVERETT, D.J. Parabens detection in diferente zones of the human breast: consideration of source and implications of findings. **Journal of Applied Toxicology**, v. 32(5), p. 305-309, 2012.

HENEWEER, M.; MUUSSE, M.; BERG, M.; SANDERSON, J. T. Additive estrogenic effects of mixtures of frequently used UV filters on ps2-gene transcription in MCF-7 cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 208(2), p. 170-177, 2005.

HUO, X.; LI, Q.; LIN, X.; CHEN, X. BI, K. Application of dispersive liquid-liquid microextraction for the analysis of six fungicides in fruit samples by GC-ECD. **Chromatographia**, v. 73(3-4), p. 313-319., 2011.

HUTTER, H.P.; WALLNER, P.; HARTL, W.; UHL, M.; LORBEER, G.; GMINSKI, R.; MERSCH-SUNDERMANN, V.; KUNDI, M. Higher blood concentrations of synthetic musks in women above fifty years than in youger women. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 213(2), p. 124-130, 2010.

HUTZINGER, O. The Handbook of Environmental Chemistry. 1. ed. Berlim: Springer, 2006.

JIMENEZ-DIAZ, I.; VELA-SORIA, F.; RODRIGUEZ-GOMEZ, R.; ZAFRA-GOMEZ, A.; BALLESTEROS, O.; NAVALON, A. Analytical methods for the assessment of endocrine disrupting chemical exposure during human fetal and lactation stages: A review. **Analytica Chumica Acta**, v. 892, p. 27-48, 2015.

JONKERS, N.; SOUSA, A.; GALANTE-OLIVEIRA, S.; BARROSO, C.M.; KOHLER, H.E.; GIGER, WALTER. Occurrence and sources of selected phenolic endocrine disruptors in Ria de Aveiro, Portugal. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 17(4), p. 834-843, 2010.

KABIR, E. R.; RAHMAN, M. S.; RAHMAN, I. A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 40, p. 241-258, 2015.

KANG, S.; KIM, S.; PARK, J.; KIM, H. J.; LEE, J.; CHOI, G.; CHOI, S.; KIM, S.; KIM, S. Y.; MOON, H. B.; KIM, S.; KHO, Y. L.; CHOI, K. Urinary paraben concentrations among pregnant women and their matching newborn infants of Korea, and the association with oxidative stress biomarkers. **The Science of the Total Environment**, v. 461, p. 214-221, 2013.

KOCH, H.M.; CALAFAT, A.M. Human body burdens of chemicals used in plastic manufacture. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London, series B, Biological Sciences**, v. 364, p. 2063-2078, 2009.

KRYLOV, V. A.; KRYLOV, A. V.; MOSYAGIN, P. V.; MATKIVSKAYA, Y. O. Liquid-Phase Microextraction Preconcentration of Impurities. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 66(4), p. 331-350, 2011.

KUNISUE, T.; WU, Q.; SHINSUKE, T.; ALDOUS, K.M.; KANNAN, K. Analysis of five penzophenone-type UV filters in human urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical Methods**, v. 2, p. 707-713, 2010.

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(1), p. 67-74, 2004.

LEE, J. H.; YI, S. K.; KIM, S. Y.; KIM, J. S.; SON, S. A.; JEONG, S. H.; KIM, J. B. Salivary bisphenol A levels and their association with composite resin restoration. **Chemosphere**, v. 172, p. 46-51, 2017.

LEE, S.; LIAO, C.; SONG, G.; RA, K; KANNAN, K.; MOON, H. Emission of bisphenol analogues including bisphenol A and bisphenol F from wastewater treatment plants in Korea. **Chemosphere**, v. 119, p. 1000-1006, 2015.

LEGLER, J.; FLETCHER, T.; GOVARTS, E.; PORTA, M.; BLUMBERG, B.; HEINDEL, J. J.; TRASANDE, L. Obesity, diabetes and associated costs of exposure to endocrine-disrupting chemicals in the European Union. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 100, p. 1278-1288, 2015.

LIANG, L. et al. Occurrence of BPA in waters and its physicochemical removal technologies. **Frontiers of Environmental Science and Engineering**, v. 9, p. 16-38, 2015.

MARTINS, M.L.; PRIMEL, E.G.; CALDAS, S.S.; PRESTES, O.D.; ADAIME, M.B.; ZANELLA, R. Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME): fundamentos e aplicações. **Scientia Chromatographica**, v. 4, p. 35-51, 2012.

MOREIRA, B.J.; YOKOYA, J.M.C.; GAITANI, C.M. Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME): fundamentos, inovações e aplicações biológicas. **Scientia Chromatographica**, v. 6, p. 186-204, 2014.

MUNCKE, J. Endocrine disrupting chemicals and other substances of concern in food contact materials: Na updated review of exposure, effect and risk assesment. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 127, p. 118-127, 2011.

NOHYNEK, G. J.; BORGERT, C. J.; DIETRICH, D.; ROZMAN, K. K. Endocrine disruption: fact or urban legend? **Toxicology Letters**, v. 223, p. 295-305, 2013.

PAUSTENBACH, D.; GALBRAITH, D. Biomonitoring: is body burden relevant to public health? **Regulatory Toxicology and Pharmacology: RTP**, v. 44(3), p. 249-61, 2006.

PEDROUZO, M.; BORRULL, F.; MARCÉ, R.M.; POCURULL, E. Ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for determining the presence of eleven personal care products in surfasse and wastewaters. **Journal of Chromatography A**, v. 1216(42), p. 6994-7000, 2009.

PETROVIC, M.; GONZALEZ, S.; BARCELÓ, D. Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, p. 685-696, 2003.

PLOTKA-WASYLKA, J.; OWCZAREK, K.; NAMIESNIK, J. Modern solutions in the field of microextravtion using liquid as a medium of extraction. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 85, p. 46-64, 2016.

PSILLAKIS, E.; KALOGERAKIS, N. Developments in liquid-phase microextraction. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, p. 565-574, 2003.

REEMTSMA, T.; LINGOTT, J.; ROEGLER, S. Determination of 14 monoalkyl phosphates, dialkyl phosphates and dialkyl yiophosphates by LC-MS/MS in human urinary samples. **The Science of the Total Environment**, v. 409(11), p. 1990-1993, 2011.

REZAEI, M.; ASSADI, Y.; HOSSEIN, M.M.; AGHAEI, E.; AHMADIA, F.; BERIJANI, S. Determination of organic compounds in water using dispersing liquid-liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1116, p. 1-9, 2006.

REZAEI, M.; YAMINI, Y.; FARAJI, M. Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method, **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 2342-2357, 2010.

RIBEIRO, R. P.; SANTOS, V. M.; MEDEIROS, E. C.; SILVA, V. A.; VOLPATO, N. M.; GARCIA, S. Avaliação do fator de proteção solar (FPS) in vitro de produtos comerciais e em fase de desenvolvimento. **Infarma**, v. 16, p. 86-88, 2004.

ROCHA, B. A.; ASIMAKOPOULOS, A. G.; BARBOSA, F. Jr.; KANNAN, K. Urinary concentrations of 25 phthalate metabolites in Brazilian children and their association with oxidative DNA damage. **Science of the Total Environment**, v. 586, p. 152-162, 2017.

ROCHA, B. A.; COSTA, B. R. B.; ALBUQUERQUE, N. C. P.; OLIVEIRA, A. R. M.; SOUZA, J. M. O.; AL-TAMEEMI, M.; CAMPIGLIA, A. D.; BARBOSA, F. Jr. 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. 161-195, 2016.

ROCHA, B. A.; OLIVEIRA, A. R. M.; BARBOSA, F. Jr. 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**, *in press*, 2018.

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

ROSENMAI, A. K.; DYBDAHL, M.; VUGF-LUSSENBURG, B. M. A.; WEDEBYE, E. B.; TAXVIG, C.; VINGGAARD, A. M. Are structural analogues to bisphenol A safe alternatives? **Toxicological Sciences**, v. 139(1), p. 35-47, 2014.

SANDBORGH-ENGLUND, G.; ADOLFSSON-ERICI, M.; ODHAM, G.; EKSTRAND, J. Pharmacokinetics of triclosan following oral ingestion in humans. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 69(20), p. 1861-1873, 2006.

SANTOS, M.G.; ABRÃO, L.C.C.; FREITAS, L.A.S.; MORAES, G.O.S.; LIMA, M.M.; FIGUEIREDO, E.C. Emprego de polímeros de impressão molecular em preparo de amostras para análise de compostos orgânicos: aplicações e tendências. **Scientia Chromatographica**, v. 4, p. 161-195, 2012.

SARAJI, M.; BOROUJENI, M. Recent developments in dispersive liquid-liquid microextraction. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406(8), p. 2027-2066, 2014.

SCHENKELS, L.C.; VEERMAN, E.C.; NIEUW, A.A.V. Biochemical composition of human saliva in relation to other mucosal fluids. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v. 6(2), p. 161-175, 1995.

SCHREURS, R. H. M. M.; SONNEVELD, E.; JANSEN, J. H. J.; SEINEN, W.; BURG, B. 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(2), p. 264-272, 2004.

SCOGNAMIGLIO, V.; ANTONACCI, A.; PATROLECCO, L.; LAMBREVA, M.D.; LITESCU, S.C.; GHUGE, S.A.; REA, G. Analytical tools monitoring endocrine disrupting chemicals. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 80, p. 555-567, 2016.

SILVA, C. G. A.; COLLINS, C. H. Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes. **Química Nova**, v. 34(4), p. 665-676, 2011.

SILVA, M.J.; REIDY, J.A.; SAMANDAR, E.; HERBERT, A.R.; NEEDHAM, L.L.; CALAFAT, A.M. Detection of phthalate metabolites in human saliva. **Archives of Toxicology**, v. 79(11), p. 647-652, 2005.

SMOLDERS, R.; SCHRAMM, K.; NICKMILDER, M.; SCHOETERS, G. Applicability of non-invasively collected matrices for human biomonitoring. **Environmental Health**, v. 8, p. 1-10

SONI, M.G.; CARABIN, I.G.; BURDOCK, G.A. Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens). **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 985-1015, 2005.

SOOD, S.; CHOUDHARY, S.; WANG, H. C. R. Induction of human breast cell, carcinogenesis by triclocarban and intervention by curcumin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 438, p. 600-606, 2013.

STEINBERG, D.; HIRSCHFELD, Z.; TAYEB, I.; BEM-YOSEF, S.; DAVID, A.; FRIEDMAN, M. The effect of parabens in a mouthwash and incorporated into a sustained release varnish on salivary bacteria. **Journal of Dentistry**, v. 27(2), p. 101-106, 1999.

USEPA. United States Environmental Protection Agency. Disponível em: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-08/documents/white_paper_aquatic_life_criteria_for_contaminants_of_emerging_concern_part_i_general_challenges_and_recommendations_1.pdf>. Acesso: Agosto, 2017.

USGS. United States Geological Survey. Disponível em: <<http://toxics.usgs.gov/regional/emc/index.html>>. Acesso: Agosto, 2017.

VALDERRAMA, P.; BRAGA, J. W. B.; POPPI, R. J. Estado da arte de figuras de mérito em calibração multivariada. **Química Nova**, v. 32(5), p. 1278-1287, 2009.

VANDENBERG, L.N.; COLBORN, T.; HAYES, T.B.; HEINDEL, J.J.; JACOBS, D.R.Jr.; LEE, D.H.; SHIODA, T.; SOTO, A.M.; Von SAAL, F.S.; WELSHONS, W.V.; ZOELLER, R.T.; MYERS, J.P. Hormones and Endocrine-Disrupting Chemicals: Low-Dose Effects and Nonmonotonic Dose Responses. **Endocrine Reviews**, v. 33(3), p. 378-455, 2012.

VELA-SORIA, F.; BALLESTEROS, O.; ZAFRA-GÓMEZ, A.; BALLESTEROS, L.; NAVALÓN A. A multi-class method for the analysis of endocrine disrupting chemicals in human urine samples. Sample treatment by dispersive liquid-liquid microextraction. **Talanta**, v. 129, p. 209-218, 2014.

VELA-SORIA, F.; BALLESTEROS, O.; ZAFRA-GÓMEZ, A.; BALLESTEROS, L.; NAVALÓN, A. 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, p. 3773-3785, 2014.

VINAS, R.; JENG, Y.J.; WATSON, C.S. Non-genomic effects of xenoestrogen mixtures. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 9, p. 2694–714, 2012.

YE, X.; ZHOU, X.; FURR, J.; AHN K.C.; HAMMOCK, B.D.; GRAY, E.L.; CALAFAT, A.M. Biomarkers of exposure to triclocarban in urine and serum. **Toxicology**, v. 286, p. 69-74, 2011.

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

ZGOLA-GRZÉSKOWIAK, A.; GRZÉSKOWIAK, T. Dispersive liquid-liquid microextraction. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 30(9), p. 1382-1399, 2011.

ZOTOU, A.; SAKLA, I.; TZANAVARAS, P. D. LC-determination of five paraben preservatives in saliva and toothpaste samples using UV detection and a short monolithic column. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 53(3), p. 785-789, 2010.