Bruno Henrique Fumes

Emprego de materiais baseados em grafeno como sorventes em técnicas modernas de preparo de amostra

Tese apresentada no Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Química Analítica e Inorgânica.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Mauro Lanças

SÃO CARLOS

2018

Dedico esse trabalho aos meus pais Sônia e José por me estimularem durante toda essa jornada. Ao meu irmão Mateus e minha namorada Flávia por me ouvirem, encorajarem, e dar preciosos conselhos nos momentos em que mais precisei. Vocês são uma parte maravilhosa da minha vida. Obrigado!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por guiar meus passos, pela oportunidade concedida em e por colocar em minha vida pessoas especiais.

Aos meu pais José e Sônia por não medirem esforços para que eu e meu irmão tivéssemos uma boa educação e, também, por me incentivarem em todos os desafios, todas as etapas e comemorem todas as minhas conquistas.

À minha namorada e companheira Flávia, por tornar essa etapa mais doce, me aconselhar, me motivar e apoiar minhas decisões. Você tornou os momentos difíceis mais fáceis, as alegrias mais coloridas e minha vida mais feliz.

Meu irmão, Mateus, obrigado pelas conversas, pelos conselhos, por se preocupar e me ajudar sempre que preciso.

Ao professor Dr. Lanças por ter me recebido no grupo e dado condições de trabalho para desenvolvimento do trabalho, por compartilhar seu elevado conhecimento e, também, pelos conselhos dados durante esse período.

Ao professor Dr. Álvaro por sempre ajudar nas dúvidas do dia à dia, principalmente durante a “hora do café”.

A todas as pessoas da minha família e amigos que torceram e ainda torcem por mim.

Aos antigos amigos do Croma “velha geração” que já deixaram o grupo Rodrigo, Maraissa, Adriel, Felipe, Tanare, Dodói, Lucas, Meire, Lucas, Odete, Alcimar, Scarlet e Carlão por me receberem de braços abertos, pelos momentos prazerosos, pelos bons cafés e boas conversas.

Aos amigos do Croma “nova geração” ou “geração remanescente” Ana, Vivane, Dalton, Pininho, Marcião, Guilherme, Arley, João, Elaine, Pipe, Marcela, Letícia, Karen, Lídia, Douglas, Viny e demais que posso não ter citado, vocês colaboraram e tornaram os dias no laboratório mais legais e descontraídos.

À FAPESP (processo 2015/15462-5) pela bolsa de pesquisa concedida que auxiliou no desenvolvimento do trabalho e, também, pelo apoio ao IQSC e projetos do grupo.

A CAPES e CNPq por apoiar os projetos desenvolvidos no grupo e financiar o trabalho de outros colegas.

Aos funcionários do IQSC pela ajuda e cordialidade.

“Be water, my friend.”

Bruce Lee

RESUMO

Técnicas modernas de preparo de amostra têm sido utilizadas na determinação de diferentes classes de compostos em diversos tipos de matrizes. Essas técnicas podem ser divididas em dois grandes grupos, as baseadas em solvente e as baseadas sorvente, foco do trabalho. Dentre os materiais sorventes mais estudados atualmente, os derivados de grafeno têm se destacado devido a suas propriedades físico-químicas favoráveis para realizar sorção com uma grande variedade de compostos de interesse. Por isso, no presente trabalho são apresentadas possibilidades de utilização de materiais baseados em grafeno nas seguintes técnicas de preparo de amostras: microextração por sorvente empacotado (MEPS), extração “*on-line*” e extração sortiva em barra de agitação (SBSE). Para a técnica MEPS, foi realizado a síntese de óxido de grafeno e grafeno suportados por ligação covalente em aminopropil sílica. Esses materiais foram empregados como sorventes para determinação de parabenos em amostras de água. O método desenvolvido apresentou limites de quantificação (LOQ) que variaram de 0,2 a 0,3 µg/L, coeficientes de variação (CV) < 19,2% e exatidão de 82,3 a 119,2%. Os materiais utilizados na técnica MEPS também foram utilizados para empacotar colunas de extração “*on-line*” e realizar uma comparação entre as fases sintetizadas. O método de extração “*on-line*” apresentou LOQ de 0,5 µg/L, exatidão de 88,2 à 107,2 e CV < 16%. A comparação entre as colunas de extração empacotadas com o grafeno e seu óxido suportados na aminopropil sílica mostrou que o grafeno suportado na sílica apresenta maior retenção para os parabenos mais apolares. Com relação ao desenvolvimento de barras de SBSE revestidas com grafeno, o método desenvolvido empregando as barras de SBSE apresentou valores de LOQ que variaram de 2 à 8 µg/L, exatidão de 81,9 à 126,3% e CV < 30%. Além disso, avaliou-se o uso do grafeno e óxido de grafeno ligado a sílica com grupamentos amino variando algumas condições de síntese e testando esses materiais para analitos das classes das triazinas, sulfonamidas e anti-inflamatórios não esteroidais. Também são apresentados testes iniciais realizados para um novo modo de extração proposto, similar a técnica SBSE, avaliando a extração de parabenos e anti-inflamatórios não esteroidais.

ABSTRACT

Modern sample preparation techniques have been applied to the determination of different compounds class in several matrices. These techniques might be divided into two groups, solvent and sorbent based, the last being the goal of this work. Nowadays, among the most studied materials the graphene based ones has been highlighted due to its physical chemical properties favorable to sorption process of a variety of interested compounds. The present work shows possibilities to employ graphene based materials in the follow sample preparation techniques: microextraction by packed sorbent (MEPS), “*on-line*” extraction, and stir bar sorptive extraction (SBSE). For MEPS, the materials graphene oxide and graphene supported on aminopropyl silica through covalent bounds were synthesized. These materials were employed as sorbent to determine parabens in water samples. The developed method showed limits of quantification (LOQ) ranging from 0,2 a 0,3 $\mu\text{g/L}$, coefficients of variation (CV) < 19,2% and accuracy ranging from 82,3 à 119,2%. The synthesized materials used in MEPS were also used and compared to an “*on-line*” method employing an extraction column packed with them. The “*on-line*” method showed LOQ of 0,5 $\mu\text{g/L}$, accuracy ranging from 88,2 to 107,2 and CV < 16%. The comparison between packed column with graphene and graphene oxide supported on aminopropyl silica showed that graphene had a higher retention for parabens with high Log K_{ow} . The method developed with SBSE bars coated with graphene showed LOQ ranging from 2 to 8 $\mu\text{g/L}$, accuracy ranging from 81,9 to 126,3% and CV < 30%. Moreover, the employment of graphene oxide and graphene synthesized by changing some synthesis conditions and testing these materials to extract triazines, sulfonamides, and non-steroidal anti-inflammatory drugs was also evaluated. In addition, are presented the preliminary tests regarding to a new extraction mode, similar to SBSE. These tests were done for parabens and non-steroidal anti-inflammatory drugs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Principais técnicas miniaturizadas de preparo de amostra.	26
Figura 2 – Exemplo ilustrativo das etapas em um processo de extração por MEPS.	29
Figura 3 – Representação esquemática de uma extração por SBSE.	30
Figura 4 – Comparação entre os modos de extração SBSE e BAμE.	31
Figura 5 – Representação esquemática de um sistema “on-line” de extração. (A) Carregamento da amostra e (B) Eluição da amostra.	32
Figura 6 – Número de trabalhos publicados pesquisando pelo termo “graphene sample preparation” na base de dados Scopus.	35
Figura 7 – Trabalhos encontrados pesquisando pelo termo I” na base de dados Scopus, filtrando a pesquisa por técnica de preparo de amostra.	35
Figura 8 – Rota representativa da obtenção de óxido de grafeno (GO), grafeno (G), óxido de grafeno suportado em aminopropil sílica (Si@GO) e grafeno suportado em aminopropil sílica (Si@G).	38
Figura 9 – Estruturas do metil-parabeno (MeP), etil-parabeno (EtP), propil-parabeno (PrP) butil-parabeno (BuP) e benzil-parabeno (BeP).	40
Figura 10 – Representação da seringa utilizada para empacotar os materiais sorventes.	46
Figura 11 - Espectros vibracionais na região infravermelho obtidos para a aminopropil sílica (Si), óxido de grafeno suportado por ligação covalente na aminopropil sílica (Si-GO), e grafeno suportado por ligação covalente na aminopropil sílica (Si-G).	49
Figura 12 - Difratoograma de raios-x.	50
Figura 13 – MEV dos materiais sintetizados. (A) Si ampliado 3300 vezes, (B) Si-GO ampliado 10000 vezes, (C) Si-GO ampliado 10000 vezes, (D) Si-G ampliado 7000 vezes, (E) PSA ampliado 6000 vezes, (F) PSA-GO ampliado 6000 vezes.	51
Figura 14- Fotografia dos materiais sintetizados. (A) Óxido de grafeno suportado em aminopropil sílica (Si-GO); (B) Grafeno suportado em aminopropil sílica (Si-G).	52

Figura 15 – Comparação entre os materiais sorventes avaliados. MeP, metil parabeno; EtP etil parabeno; PrP, propil parabeno; BuP, butil parabeno; BeP benzil parabeno.	53
Figura 16 – Cromatograma ilustrativo, obtido no sistema LC-UV Shimadzu, comparando a extração realizada por MEPS utilizando como material sorvente o grafeno suportado em aminopropil sílica (Si-G) e materiais disponíveis comercialmente Strata TM -X, C18 e amostra fortificada em 200 (µg/L).....	54
Figura 17 – Variáveis avaliadas e otimizadas para o extração de parabenos em água por MEPS. (A) efeito do pH da amostra (4, 7 e 10); (B) solvente de eluição avaliados MeOH:ACN 50:50, MP (ACN:H ₂ O 40:60), MeOH e ACN); (C) força iônica da amostra (0, 10 e 20%). MeP, metil parabeno; EtP, etil parabeno; PrP, propil parabeno; BuP, butil parabeno; BeP, benzil parabeno.	55
Figura 18 - diagrama de pareto do experimento fatorial fracionário 2 ⁶⁻² para o metil, etil, propil, butil e benzil parabeno.	57
Figura 19 – Cromatograma representativo obtido após uma extração por MEPS da amostra utilizada como branco após a fortificação na concentração de 1 µg/L dos parabenos avaliados.	58
Figura 20 – Gráficos de resíduos para cada parabeno. À esquerda são apresentados os gráficos de resíduos para os modelos sem ponderação (w = 1) e à direita os modelos ponderados.....	61
Figura 21 – Curvas de calibração para os modelos ponderados.....	62
Figura 22 – Representação esquemática do sistema “on-line” de extração utilizado.....	70
Figura 23 – A) Efeito do volume de injeção na área do pico de cada composto. B) Efeito do tempo de giro da válvula para cada composto.....	72
Figura 24 – Gráficos de resíduos para cada parabeno investigado utilizando Si-GO como fase extratora. À esquerda são apresentados os gráficos de resíduos para os modelos sem ponderação (w = 1) e à direita os modelos ponderados.....	76
Figura 25 – Curvas de calibração para os modelos utilizados no método “on-line” que emprega Si-GO como fase de extração.	77

Figura 26 – Cromatograma representativo obtido utilizando coluna de extração preenchida com a fase Si-GO. Amostra utilizada como branco fortificada com os compostos de interesse na concentração de 2 µg/L.	79
Figura 27 - Cromatograma representativo obtido utilizando coluna de extração preenchida com a fase Si-G. Amostra utilizada como branco fortificada com os compostos de interesse na concentração de 2 µg/L.	80
Figura 28 – Ilustração do procedimento esquemático de produção das barras de SBSE revestidas com grafeno.	88
Figura 29 – Difrátogramas de raios-x do óxido de grafite, óxido de grafeno (GO) e grafeno (G).	91
Figura 30 – Barras de SBSE revestidas com grafeno que foram produzidas conforme descrito no item 2.3.	92
Figura 31 – Imagens dos MEVs realizados nas barras de SBSE (dispositivos) após o recobrimento com o grafeno. (A) dispositivo ampliado 59 vezes, (B) dispositivo ampliado 1000 vezes, (C) dispositivo parcialmente recoberto com grafeno ampliado 102 vezes, (D) vista lateral do dispositivo ampliada 90 vezes, (E) grafeno sem estar aderido no dispositivo ampliado 5000 vezes.	93
Figura 32 – Diagramas de paretos do experimento fatorial 2 ³ . (A) MeP, (B) EtP, (C) PrP e (D) BuP.	95
Figura 33 – Desejabilidade das variáveis otimizados pelo planejamento 2 ³ com ponto central. (A) velocidade de agitação x tempo de agitação, (B) tempo de dessorção x tempo de agitação, (C) tempo de dessorção x velocidade de agitação.	96
Figura 34 – Otimização univariada avaliando a influencia da força iônica, quantidade de metanol (MeOH) e solvente de dessorção em SBSE/grafeno. (A) influência da força iônica (0%, 10%, 20% e 30% de NaCl); (B) porcentagem de MeOH (0%, 3%, 6% e 9%); (C) solvente de dessorção (ACN:MeOH (50:50), MP = ACN:H ₂ O (40:60), ACN e MeOH).	97
Figura 35 – Cromatogramas representativos mostrando a extração por SBSE. (A) dispositivo não recoberto, (B) amostra fortificada na concentração de 200 µg/L e (C) dispositivo recoberto com grafeno.	98

Figura 36 – Gráficos de resíduos do método que utiliza barras de SBSE revestidas com grafeno. À esquerda modelos não ponderados.....	100
Figura 37 - Curvas de calibração para os modelos ponderados empregados no método que utiliza barras de SBSE revestidas com grafeno.	102
Figura 38 – Cromatograma representativo da extração dos parabenos pela barra de SBSE revestida com grafeno (concentração igual ao P ₂ , Tabela 15).....	105
Figura 39 – Seringas empacotadas com as fases de sílica com grupamento amino com óxido de grafeno acoplado. (veja tabela 21 para identidade das fases	113
Figura 40 – A) fita adesiva dupla face antes e depois do recobrimento com grafeno. B) Dispositivo pronto. C) modo de funcionamento do dispositivo proposto.	113
Figura 41 – Extração de parabenos com as novas fases sintetizadas.....	115
Figura 42 – Comparação de desempenho entre fases GO ligadas em diferentes sílicas (irregular, esférica e PSA) antes e após a redução (G).....	116
Figura 43 – Comparação de desempenho entre a fase 3 e fases comerciais.	116
Figura 44 – Cromatogramas representando a extração das sulfas na concentração de 100 µg/L, amostra sem acidificar.....	117
Figura 45 – Comparação entre as fases sintetizadas e as comerciais para a extração de sulfas na concentração de 100 µg/L. Cromatogramas de amostras acidificadas com 0,1% de AcF e não acidificadas.	118
Figura 46 - Extração de triazinas (200 µg/L) com as novas fases sintetizadas antes da etapa de redução.	119
Figura 47 – Cromatogramas mostrando extrações utilizando fases preparadas antes e depois da etapa de redução.....	119
Figura 48 – Cromatogramas comparando as extrações utilizando fases comerciais e sintetizadas para extração de triazinas.	120
Figura 49 – Cromatogramas mostrando extrações dos anti-inflamatórios não esteroidais. A) λ = 220 nm e B) λ = 254 nm.....	121

Figura 50 – Cromatogramas mostrando extrações dos anti-inflamatórios não esteroidais utilizando fases sintetizadas e comerciais. A) $\lambda = 220$ nm e B) $\lambda = 254$ nm.....	122
Figura 51 – Imagens dos MEVs das fases sintetizadas. (A) Fase 1 Si-GO, (B) Fase 1 Si-G, (C) Fase 3 Si-GO, (D) Fase 3 Si-G, (E) Fase 5 PSA-GO, (F) Fase 5 PSA-G, (G) Fase 6.....	123
Figura 52 – Imagens das fases sintetizadas que antes (esquerda) e depois (direita) da etapa de redução. A) fase 1, B) fase 3, C) fase 5, D) fase 6.	124
Figura 53 – Representação comparativa entre os dispositivos de SBSE, BAμE, e o dispositivo proposto.....	125
Figura 54 – Imagens de MEV de uma (A) fita antes e (B) depois do recobrimento com grafeno.	126
Figura 55 – Cromatogramas de uma extração empregando os dispositivos desenvolvidos. (A) parabenos e (B) fármacos não-esteroidais.....	126

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Transições monitoradas no modo MRM e condições utilizadas durante a avaliação das figuras de mérito.	45
Tabela 2 – Níveis das variáveis otimizadas pelo planejamento experimental fracionário 2^{6-2}	47
Tabela 3 - Teste F para os parabenos avaliados.	59
Tabela 4 - Parâmetros obtidos na avaliação linear utilizando os modelos ponderados sugeridos por Almeida et al. (68) (x^{-2} , x^{-1} , $x^{-0,5}$, y^{-1} , y^{-2} , $y^{-0,5}$) e modelo sem ponderação (1). Destacado em negrito o modelo escolhido.	60
Tabela 5 – Valores obtidos para a exatidão e precisão intra-dia e inter-dia para os três níveis de concentração avaliados (baixo, médio e alto).	63
Tabela 6 – Concentração encontrada dos parabenos em $\mu\text{g/L}$ nas amostras de água avaliadas. MeP, metil parabeno; EtP, etil parabeno; PrP, propil parabeno; BuP, butil parabeno; BeP benzil parabeno.	64
Tabela 7 – Métodos disponíveis na literatura que determinaram parabenos em diferentes matrizes.	65
Tabela 8 – Programação dos eventos de giro de válvula utilizados na avaliação das figuras de mérito do método.	73
Tabela 9 - Teste F para os parabenos avaliados empregando as fases Si-G e Si-GO.	74
Tabela 10 - Parâmetros obtidos na avaliação linear utilizando os modelos ponderados sugeridos por Almeida et al. (2) (x^{-2} , x^{-1} , $x^{-0,5}$, y^{-1} , y^{-2} , $y^{-0,5}$) e modelo sem ponderação (1). Fase de extração Si-GO.	75
Tabela 11 – Resultados de exatidão e precisão intra e inter-dias.	78
Tabela 12 - Comparação entre colunas preenchidas com Si-GO e Si-G. Modelos sem ponderação para ambas as fases.	81
Tabela 13 – Comparação dos resultados obtidos do método “on-line” que utiliza Si-GO com disponíveis na literatura.	83
Tabela 14 – Níveis das variáveis avaliadas no planejamento experimental 2^3 com ponto central.	89

Tabela 15 – Concentrações ($\mu\text{g/L}$) de parabenos utilizadas na avaliação de linearidade.	90
Tabela 16 - Teste F para o método que emprega barras de SBSE revestidas com grafeno.	99
Tabela 17 - Parâmetros obtidos na avaliação linear utilizando os modelos ponderados sugeridos por Almeida et al. (2) (x^{-2} , x^{-1} , $x^{-0.5}$, y^{-1} , y^{-2}) e modelo sem ponderação (1). Método que utiliza uma barra de SBSE revestida com grafeno.	101
Tabela 18 – Valores de exatidão e precisão do método que emprega uma barra de SBSE revestida com grafeno ($n = 3$).	103
Tabela 19 – Resultados obtidos nas amostras avaliadas empregando a técnica SBSE revestida com grafeno.	104
Tabela 20 – Métodos disponíveis na literatura que determinam parabenos e/ou outros compostos por SBSE ou BA μ E.	107
Tabela 21 – Proporção dos reagentes utilizadas na síntese das fases.	111
Tabela 22 – Áreas médias e coeficiente de variação (CV%) obtidos para extração de parabenos e anti-inflamatórios não esteroidais utilizando o método proposto.	127
Tabela 23 – Comparação entre as técnicas modernas de extração utilizadas neste trabalho.	131

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\Sigma\%RE$ - Soma dos resíduos absolutos

AcF – Ácido fórmico

ACN – Acetonitrila

APTES - Aminopropiltietoxisilano

BA μ E - Microextração adsortiva em barra

BeP – Benzil parabeno

BIN - *barrel insert needle*

BuP – Butil parabeno

CA – carbono ativado

CNTs – Nanotubos de carbono

CV – Coeficiente de variação

DAD – Detector de arranjo de diodos

DCC - Diciclohexilcarboimida

DCC – diciclohexilcarboimida

DLLME - Microextração dispersiva líquido-líquido

DMF - Dimetilformamida

DMF – Dimetilformamida

EtP- Etil parabeno

G – Grafeno

GC – Cromatografia Gasosa

GO – Óxido de grafeno

HF-LPME - Microextração em fibra oca por fase líquida

HPAs - Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

HS – *Head Space*

ICH - *International Conference on Harmonization*

ILs - Líquidos iônicos

LC – Cromatografia líquida

LLE - Extração líquido-líquido

LOD – Limite de detecção

LOQ – Limite de quantificação

MD – Método desenvolvido

MeOH – Metanol

MeP – Metil parabeno

MEPS - Microextração por sorvente empacotado

MEV - Microscopia eletrônica de varredura

MIP - Polímeros molecularmente impressos

MRM - *Multiple reaction monitoring*

MS – Espectrômetro de massas

MS/MS - Espectrômetro de massas sequencial

MSPE - Extração em fase sólida magnética

NA – Não aplicável

NR – Não reportado

PDMS - Polidimetilsiloxano

PEG - Polietilenoglicol

PFD - *p*-fenilenodiamina

PrP – Propil parabeno

PSA – Sílica com grupamentos amino primário e secundário

PT-SPE – Extração em fase sólida realizada na ponta de uma pipeta

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

R^2 - Coeficiente de determinação

RAM - Materiais de acesso restrito

RPM – Rotações por minuto

Rt - Tempo de retenção

SBSE - Microextração em barras de agitação

SCP - Sulfaclopiridazina

SDM -Sulfadimetoxina

SDME - Microextração por gota única

SDZ – Sulfadiazina

SFE - Extração por fluído no estado supercrítico

Si – Aminopropil sílica

Si-G – Aminopropil sílica com óxido de grafeno suportado

Si-GO – Aminopropil sílica com óxido de grafeno suportado

SMR - Sulfamerazina,

SMX -Sulfametoxazol

SMZ – Sulfametazol

SOX - *Soxhlet*

SPE - Extração em fase sólida

SPME - Microextração em fase sólida

SQM – Sulfaquinoxalina

STZ – Sulfatiazol

TFC - Cromatografia em fluxo turbulento

UV – Ultravioleta

XRD – Difratoômetro de raios-x

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	24
Introdução Geral	24
1 A importância do preparo da amostra	25
2 Técnicas modernas de preparo de amostras	26
2.1 Técnicas miniaturizadas	26
2.1.1 Técnicas de microextração baseadas em sorvente	27
2.1.1 Microextração por sorvente empacotado (MEPS)	28
2.1.2 Microextração por barra de agitação (SBSE).....	29
2.2 Técnicas “on-line” de preparo de amostra.....	31
3 Emprego de novos materiais sorventes em preparo de amostra	33
3.1 Emprego de grafeno e óxido de grafeno no preparo de amostra	36
4 Parabenos.....	39
CAPÍTULO 2	41
Emprego de grafeno suportado em aminopropil sílica como sorvente em microdispositivos empacotados (MEPS).....	41
1 Objetivo	42
2 Materiais e Métodos.....	42
2.1 Padrões e reagentes utilizados	42
2.2 Síntese do óxido de grafeno	43
2.3 Produção do óxido de grafeno e do grafeno suportados em sílica	43
2.4 Instrumentação e condições analíticas.....	44
2.5 Comparação entre os materiais sintetizados	45
2.6 Otimização das condições de extração por MEPS	46
2.7 Figuras de mérito.....	47
2.8 Amostras	48

3 Resultados e Discussão	49
3.1 Caracterização dos materiais	49
3.2 Comparação entre os materiais sorventes.....	52
3.3 Otimização das variáveis	54
3.4 Figuras de mérito.....	58
3.5 Aplicação do método desenvolvido	63
3.6 Comparação entre os resultados obtidos com valores representativos disponíveis na literatura.....	64
4 Conclusões.....	66
CAPÍTULO 3	67
Emprego de óxido de grafeno e grafeno suportados em aminopropil sílica como material sorvente em métodos de extração “on-line”.....	67
1 Objetivos	68
2 Materiais e métodos	68
2.1 Padrões e reagentes	68
2.2 Síntese do óxido de grafeno e do grafeno e seu óxido suportado em sílica	69
2.3 Empacotamento das colunas de extração	69
2.4 Instrumentação e condições de análise.....	69
2.5 Avaliação do volume de injeção e tempo de giro de válvula	71
2.6 Avaliação das figuras de mérito.....	71
3 Resultados e discussão	72
3.1 Avaliação do volume de injeção e do tempo de giro de válvula.....	72
3.2 Avaliação das figuras de mérito.....	73
3.3 Comparação entre as colunas de extração Si-GO e Si-G	78
3.4 Comparação dos resultados obtidos com dados disponíveis na literatura.....	82
4 Conclusões.....	83
CAPÍTULO 4	85

Emprego de grafeno como material sorvente em microextração por barra de agitação (SBSE)	85
1 Objetivos	86
2 Materiais e métodos	86
2.1 Padrões e reagentes	86
2.2 Síntese do grafeno	87
2.3 Produção das barras de SBSE	87
2.4 Instrumentação e condições analíticas	88
2.5 Otimização das condições de extração por SBSE	88
2.6 Avaliação das figuras de mérito	89
2.7 Amostras analisadas	90
3 Resultados e discussão	91
3.1 Caracterização do grafeno e das barras de SBSE	91
3.2 Otimização das condições de extração por SBSE	94
3.3 Avaliação das figuras de mérito	99
3.4 Aplicação do método em amostras	103
3.5 Dificuldades encontras e perspectivas de melhoria	105
3.6 Comparação dos resultados obtidos com disponíveis na literatura	106
4 Conclusões	107
CAPÍTULO 5	109
Avaliação de materiais baseados em grafeno para extração de outras classes de analitos e uma nova proposta de microtécnica de extração	109
1 Objetivos	110
2 Materiais e Métodos	110
2.1 Padrões e reagentes	110
2.2 Síntese dos materiais	111
2.3 Instrumentação e condições de análise	112
2.4 Condições de extração e comparação entre as fases extratoras	112

2.5 Confeção dos dispositivos de extração similares ao SBSE e BAμE.....	113
2.5.1 Condições de extração utilizadas para avaliar os dispositivos desenvolvidos.....	114
3 Resultados e Discussão	114
3.1 Avaliação das fases sintetizadas	114
3.1.1 Parabenos	114
3.1.2 Sulfonamidas.....	117
3.1.3 Triazinas.....	118
3.1.4 Anti-inflamatórios não esteroidais.	120
3.2 Fases Sintetizadas	122
3.3 Proposta de um novo modo de extração similar a SBSE e BAμE.....	124
4 Conclusões.....	127
CAPÍTULO 6	129
Conclusão geral e perspectivas futuras	129
Conclusão Geral.....	130
Perspectivas Futuras.....	131
REFERÊNCIAS	133

PREFÁCIO

A presente tese aborda o emprego de materiais baseados em grafeno em técnicas modernas de preparo de amostra. O trabalho está dividido em seis capítulos abordando o desenvolvimento e aplicação desses materiais nas seguintes técnicas: Microextração por sorvente empacotados (MEPS), extração “*on-line*”, extração por barra de agitação (SBSE) e, também, desenvolvimento inicial de uma nova proposta de extração derivada de SBSE e extração sortiva em barra de agitação (BA μ E).

No Capítulo 1 é apresentado uma revisão bibliográfica sobre técnicas modernas de preparo de amostra, novos materiais sorventes com foco no emprego de materiais baseados em grafeno no preparo de amostra.

O Capítulo 2 destaca os resultados obtidos empregando grafeno e seu óxido suportado em sílica por ligação covalente e seu emprego como sorvente na técnica MEPS para realizar a extração de parabenos em amostras de água.

No Capítulo 3 utilizamos uma proposta de extração “*on-line*” utilizando os mesmos materiais, previamente sintetizados e descritos no capítulo anterior. Adicionalmente é realizada uma comparação entre colunas de extração empacotadas com os materiais reduzidos e não reduzidos.

O Capítulo 4 aborda a construção de dispositivo de SBSE “*lab-made*” revestido com grafeno e a possibilidade de sua utilização para extração de parabenos em algumas amostras de origem aquosa.

No Capítulo 5 são avaliadas modificações no modo de síntese do óxido de grafeno suportado em sílica com grupamentos amina por ligação covalente. Também é realizado uma pré-avaliação dos materiais sintetizados nessa etapa como sorventes para analitos da classe dos parabenos, sulfonamidas, triazinas e anti-inflamatórios não esteroidais. Além disso, é apresentada uma nova proposta de extração derivada das técnicas SBSE e BA μ E.

Por fim, o Capítulo 6 apresenta uma conclusão geral sobre o trabalho e apresenta perspectivas futuras.

CAPÍTULO 1

Introdução Geral

*“Eu não sei
Se vem de Deus
Do céu ficar azul
Ou virá
Dos olhos teus
Essa cor
Que azuleja o dia”*

Djavan, 1982
Azul

1 A importância do preparo da amostra

O preparo de amostra é uma importante etapa na determinação de resíduos de contaminantes, especialmente quando esses compostos estão presentes em baixos níveis de concentração e em matrizes complexas. Essa etapa, geralmente tediosa e que demanda na maioria dos casos bastante tempo, é essencial na obtenção de bons resultados pois está diretamente relacionada a reprodutibilidade do método. A introdução dessa etapa auxilia principalmente na remoção de interferentes e na concentração dos compostos de interesse. Assim, é possível melhorar a sensibilidade de um método e obter-se limites de quantificação menores do que nos casos onde essa etapa é omitida. (1)

Embora grande parte dos cromatógrafos utilizem como detectores espectrômetros de massas simples (MS) ou sequenciais (MS/MS), em muitos casos a complexidade da matriz não permite a omissão da etapa de preparo da amostra. Como exemplo, pode-se citar matrizes de alimentos (carne, frutas e seus derivados), águas residuais (estação de tratamento de esgoto), ou mesmo água de mananciais/reservatórios. Nessas matrizes, é essencial o controle, por exemplo, de resíduos de pesticidas, drogas veterinárias, fármacos e poluentes orgânicos aromáticos, sendo o preparo de amostra empregado na maioria delas.

Nos últimos 50 anos várias técnicas de extração vêm sendo utilizadas para o preparo de amostra. Destacam-se a extração líquido-líquido (LLE), (2) Soxhlet (SOX), (3) extração por fluído no estado supercrítico (SFE) ou subcrítico, (4) extração em fase sólida (SPE), (5) e a QuEChERS. (6) A grande maioria dessas técnicas, com exceção a extração por fluído supercrítico ou subcrítico consome, geralmente, grandes quantidades de solvente além de necessitarem de maiores quantidades de amostra. Essas técnicas também são, em sua maioria, utilizadas no modo “*off-line*” que está mais suscetível a erros que um preparo de amostra totalmente automatizado. Dessa forma, duas grandes abordagens na área de preparo de amostra têm se destacado: as técnicas de extração denominadas miniaturizadas e as técnicas de extração “*on-line*” (que podem, ou não, ser consideradas miniaturizadas), ambas podendo ser consideradas como técnicas modernas de preparo de amostra.

2 Técnicas modernas de preparo de amostras

2.1 Técnicas miniaturizadas

Dentre as técnicas miniaturizadas de preparo de amostra é possível destacar dois grandes grupos: as baseadas em extração líquido-líquido, e as baseadas na sorção do analito com o material sorvente, Figura 1. No grupo das baseada no processo de extração líquido-líquido se destacam, entre outras técnicas, a microextração por gota única (SDME), a microextração em fibra oca por fase líquida (HF-LPME), e a microextração dispersiva líquido-líquido (DLLME). Já as baseadas no processo de sorção, foco do presente trabalho, as que mais têm se destacado são a microextração em fase sólida (SPME), a microextração em barras de agitação (SBSE) e a microextração por sorvente empacotado (MEPS). Ambas as abordagens têm sido empregadas com sucesso na determinação de resíduos de contaminantes em matrizes de origem ambiental, alimentícia e biológica. (7)

Figura 1 – Principais técnicas miniaturizadas de preparo de amostra.

Autoria própria.

2.1.1 Técnicas de microextração baseadas em sorvente

A primeira técnica de microextração baseada em sorvente a ter sucesso foi desenvolvida em 1990 por Arthur e Pawliszyn, (8) e denominada SPME. Essa técnica pode ser considerada a precursora das técnicas de preparo de amostra miniaturizadas e, por isso, é a que apresenta o maior número de publicações até o presente momento.

A SPME é baseada no equilíbrio de partição dos analitos presentes na amostra com a fase estacionária que reveste a fibra. Essa técnica é facilmente automatizada através do acoplamento a um cromatografo liquido (LC) ou gasoso (GC), e pode ser empregada no modo direto ou em “*headspace*” (HS-SPME). No modo direto, o recobrimento da fibra é inserido na amostra e os analitos são sorvidos na fase extratora. No modo “*headspace*”, os analitos, que nesse caso precisam ser voláteis, são transportados para uma barreira de ar antes de atingirem a fibra. Nesse modo a fibra tende a ter uma vida útil maior e também torna possível mudanças na matriz como, por exemplo, alteração no pH da amostra, sem danificar a fibra. (9)

Pode-se considerar a SPME como técnica inspiradora para o desenvolvimento de inúmeros outros trabalhos na área de preparo de amostra. Graças a SPME existem hoje outras técnicas de microextração baseadas em sorventes, cujas quais serão discutidas e destacadas, por terem sido utilizadas no presente trabalho, a técnica MEPS e a SBSE.

As técnicas de preparo de amostra baseadas em sorventes citadas (SPME, SBSE e MEPS) estão alinhadas com os conceitos da química verde. Elas utilizam menores quantidades de amostra e solvente, quando comparadas as técnicas convencionais. Seus dispositivos são, geralmente, reutilizáveis contribuindo ainda mais com a diminuição da quantidade de resíduos gerados. Contudo, para aprimorar ainda mais essas técnicas, e ajudar a ampliação do escopo de aplicações é necessário o desenvolvimento e investigação de novos materiais que possam ser empregados como alternativas aos já disponíveis comercialmente (tais como, por exemplo, C8, C18, trocadores iônicos, fases poliméricas (StrataTM X, HLB[®]), cianopropil, aminopropil sílica, etc).

2.1.1 Microextração por sorvente empacotado (MEPS)

A técnica MEPS foi desenvolvida por Abdel-Rehim em 2003, (10) e pode ser considerada uma miniaturização da SPE convencional. Nessa técnica, uma pequena quantidade de material sorvente (1-10 mg) é empacotada dentro de uma micro seringa ou BIN (barrel insert needle), utilizada para realizar a extração dos compostos de interesse presentes na amostra. Como vantagens em relação a SPE é possível destacar o uso de menores quantidades de material sorvente (1-10 mg); menores volumes de amostra são necessários para o processo de extração (100 μ L - 2 mL); requer menor volume de solvente para realizar a dessorção dos analitos (50 μ L - 100 μ L), permite a realização de vários ciclos de aspiração, lavagem e de eluição (dessorção) da amostra; seu cartucho de sorção pode ser reutilizado (em alguns casos em até 100 vezes) dependendo na natureza da amostra. O MEPS, assim como a SPME e a SBSE, também pode ser acoplado “*on-line*” à cromatografia líquida e gasosa.

A Figura 2 ilustra as etapas de um processo de extração simplificado utilizando a técnica MEPS. Primeiramente é realizado o condicionamento do material sorvente aspirando um solvente forte seguido por água, que pode ou não ser acidificada. Após essa etapa deve-se aspirar a amostra na qual os analitos estão presentes para que eles entrem em contato com o material sorvente. Então, é realizada a etapa de lavagem, a qual tem a função de remover possíveis interferentes presentes na amostra. Finalmente, é feita a eluição do analitos empregando um solvente adequado para realizar a injeção em um sistema de GC ou LC.

Dentre as técnicas miniaturizadas apresentadas a MEPS é a que apresenta o menor número de publicações, até o presente momento, tanto no escopo de aplicações como no desenvolvimento e avaliação de materiais que possam ser utilizados como sorvente. Por isso, ainda existem inúmeros caminhos a serem explorados utilizando essa técnica no preparo de amostra. Isso foi um dos fatores que motivou a busca por uma maneira de aplicar um material baseado em grafeno nessa técnica de preparo de amostra.

Figura 2 – Exemplo ilustrativo das etapas em um processo de extração por MEPS.

Fonte: Traduzido de MOEIN, M. M.; ABDEL-REHIM, A.; ABDEL-REHIM, M. Microextraction by packed sorbent (MEPS). *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 67, p. 34–44, 2015. (11)

2.1.2 Microextração por barra de agitação (SBSE)

A SBSE foi desenvolvida por Baltusen et al. em 1999, (12,13) e é constituída de uma barra de agitação magnética revestida com material polimérico, sendo o mais empregado o polidimetilsiloxano (PDMS). Seu princípio de funcionamento é semelhante ao da SPME sendo a extração baseada no equilíbrio de partição entre os analitos presentes na amostra e na fase polimérica. Na SBSE os volumes de recobrimento da fase de extração são da ordem de 24-126 μL , enquanto na SPME é de no máximo 0,5 μL ; por isso, a SBSE tem capacidade de extrair uma maior quantidade de analitos em uma mesma amostra, quando comparada com a SPME.(14) Assim como na SPME, a extração por SBSE pode ser realizada tanto no modo direto como em “headspace” (HS-SBSE). Para esse caso, também é possível utilizar um sistema completamente automatizado sendo alguns deles comercializados pela Gerstel. (15)

Na Figura 3 é representada uma extração esquemática de SBSE no modo direto. Na Etapa 1, a amostra é colocada em um frasco que pode ter capacidade entre 10 e 50 mL, no qual é adicionado o dispositivo de extração. Na Etapa 2 o frasco contendo o dispositivo de extração

é colocado em agitação a uma velocidade (rpm) e intervalo de tempo que, preferencialmente, devem ser otimizados. Após esse período a barra de extração é removida do frasco (Etapa 3) e colocada em um frasco (vial ou “*insert*”) contendo um solvente de dessorção, esse frasco é levado em um banho de ultrassom por um período de tempo. Então, finalmente, a barra de extração é removida do frasco que é enviado para ser injetado em um LC ou GC (nesse caso as Etapa 4 e 5 podem ser substituídos por dessorção térmica).

Figura 3 – Representação esquemática de uma extração por SBSE.

Autoria própria.

Dentre as principais vantagens da SBSE a que mais se destaca é a possibilidade de usar agitadores multiposicionais, o que pode representar um ganho de tempo mesmo considerando o tempo de equilíbrio e a maior quantidade de fase extratora quando comparada com a SPME. No quesito desvantagens a principal é a maior dificuldade em se automatizar o processo de extração em comparação a outras técnicas de extração como, por exemplo, a MEPS e a SPME.

Existe na literatura uma abordagem muito similar a SBSE, denominada microextração adsorptiva em barra (BA μ E). Nesse caso, o dispositivo extrator “flutua na amostra” que é agitada por um agitador magnético. No caso da SBSE a agitação da amostra é promovida pelo próprio dispositivo de extração (Figura 4).

Figura 4 – Comparação entre os modos de extração SBSE e BAμE

Autoria própria.

2.2 Técnicas “on-line” de preparo de amostra

Dentre as técnicas de extração “on-line” as mais conhecidas são a “on-line” SPE, *in-tube* SPME, e a cromatografia em fluxo turbulento (TFC). Vale ressaltar que alguns autores, também denominam o uso das técnicas SPME, SBSE e MEPS realizadas no modo automático com auxílio de um robô ou “autosampler” como “on-line” (16,17). Contudo, essa definição difere da proposta de Puig et al. (18) devido a utilização de robôs na etapa de preparo de amostra. Esse trabalho define que o uso de robôs para a etapa de preparo de amostra configura um sistema denominado “at-line”. (18) Por isso, no presente trabalho o uso do termo “on-line” se refere a sistemas que estão fisicamente conectados por uma interface (válvula) que transfere o analito para a coluna de separação.

Os sistemas “on-line” de extração como o SPE, “in-tube” SPME e TFC apresentam funcionamento similar, necessitando basicamente do mesmo aparato experimental. Esses sistemas utilizam uma bomba dedicada para realizar o carregamento da coluna de extração com a amostra e uma válvula de comutação com no mínimo 6 portas, além de toda a aparelhagem de um sistema de LC convencional. Essas formas “on-line” de preparo de amostra, também, podem ser denominadas como sistemas multidimensionais de separação. (19)

Nos sistemas onde a separação ocorre de forma “on-line”, a etapa de preparo de amostra é realizada na coluna de extração, muitas vezes também chamada de pré-coluna. Essa coluna tem a função de reter os analitos de interesse, enquanto possíveis interferentes são enviados

para o descarte. Depois de um tempo, ocorre um giro (mudança de posição) da válvula que direciona os analitos de interesse da coluna de extração para a coluna analítica. (19,20)

A Figura 5 ilustra o funcionamento de um sistema “on-line” que utiliza uma válvula de 6 portas. Em (A) a válvula se encontra na posição de carregamento e a bomba 2 transfere a amostra do injetor até a coluna de extração; nessa mesma etapa, a bomba 1 tem está direcionada para a coluna analítica, e tem a função de realizar seu condicionamento. Após o período de condicionamento a válvula muda de posição (Figura 5B). O solvente utilizado no condicionamento da coluna (bomba 1) é direcionado para a coluna de extração fazendo com que os analitos de interesse sejam direcionados para a coluna analítica onde ocorrerá a separação cromatográfica; e o solvente de carregamento (bomba 2) é direcionado para o descarte.

A configuração ilustrada na Figura 5 é representativa de um sistema em que a eluição é realizada em sentido contrário ao sentido de carregamento sendo denominado de “backflush”. Além dessa configuração, existe a possibilidade de realizar a eluição no mesmo sentido do carregamento, sendo esse modo chamado de “forwardflush”. (21)

Figura 5 – Representação esquemática de um sistema “on-line” de extração. (A) Carregamento da amostra e (B) Eluição da amostra.

Autoria própria.

A grande vantagem do uso de sistemas “on-line” de preparo de amostra é facilitar o desenvolvimento de métodos mais reprodutíveis de extração, possibilidades de acoplamento com sistemas cromatográficos que possuem diferentes detectores, possível diminuição do tempo de preparo da amostra. Contudo, apresenta como desvantagens o custo das válvulas de

comutação, provável aumento de pressão no sistema quando as colunas de extração e analítica estão em série e possível alargamento de banda se a fase utilizada na coluna de extração apresentar granulometria maior que a da coluna analítica.

A principal diferença entre essas nomenclaturas (SPE, “*in-tube*” e TFC) está geralmente relaciona a dimensão da coluna de extração e o perfil do laminar da fase móvel. O modo denominado SPE “*on-line*” utiliza colunas no mesmo formato das colunas analíticas com dimensões menores. (19) O “*in-tube*”, geralmente, é realizado em tubos capilares empacotados, ou então, tubulares abertos; e na posição de carregamento a amostra pode passar pela coluna de extração mais de uma vez (aspirando e dispensando a amostra no tubo capilar). (22) Já o modo TFC utiliza elevadas vazões da fase móvel de modo que essa não apresenta um perfil laminar. (23)

O modo “*on-line*” utilizado no presente trabalho se assemelha mais com o denominado SPE “*on-line*”. Contudo, será apenas chamado de extração “*on-line*” visto que os modos de operação e aparelhagem são semelhantes.

3 Emprego de novos materiais sorventes em preparo de amostra

Entre os materiais que estão em evidência no preparo de amostra, se destacam, os líquidos iônicos (ILs), polímeros molecularmente impressos (MIPs), materiais de acesso restrito (RAM), e o grafeno e seus derivados. (24,25) Esses materiais têm sido utilizados com sucesso como sorventes nas técnicas já mencionadas (SPME, SBSE, MEPS e nas técnicas “*on-line*”), e também, na SPE e suas variações como, por exemplo, a SPE dispersiva e SPE em ponta de pipeta (PT-SPE).

ILs são sais líquidos a temperatura ambiente constituídos por cátions orgânicos, derivados de bases de Lewis, e também, ânions inorgânicos ou orgânicos. Os ILs têm atraído atenção para sua utilização em técnicas de preparo de amostra devido a possibilidade de serem combinados com substituintes de diferentes estruturas, o que possibilita a adaptação da hidrofobicidade ou hidrofiliabilidade do material. Esses materiais necessitam de um suporte para que suas propriedades possam ser exploradas em técnicas de extração baseada em sorção. Geralmente o suporte mais empregado é a sílica sendo o recobrimento realizado de diversas formas, via catálise ácida ou básica). (26)

MIPs são polímeros chamados de molecularmente impressos por utilizem uma molécula molde durante o processo de síntese. Isso confere a esses materiais especificidade para um analito ou uma classe de analitos devido aos sítios de interação específicos formados durante a etapa de síntese. Essa síntese pode ser realizada por três abordagens diferentes que envolvem a formação de ligações covalente, não covalente e semi-covalente, sendo que essa etapa influenciará na posterior remoção da molécula utilizada como molde. (24,27)

RAMs são materiais utilizados durante o preparo de amostra, principalmente, quando a exclusão de macro-moléculas é necessária nessa etapa. O lado externo do material atua como uma barreira que impede a entrada de macro-moléculas, enquanto a superfície interna promove a “retenção” de moléculas com menor massa molecular por interações que podem ser hidrofílicas, hidrofóbicas, eletrostáticas, entre outras. Esses materiais podem ser produzidos, por exemplo, através da combinação de uma proteína como a albumina do soro bovino (BSA) e octadecilsilano. (25,27)

O grafeno, dentre esses materiais mais recentemente desenvolvidos, começou a despertar interesse para ser utilizado como sorvente em preparo de amostra devido as suas características favoráveis. Entre elas se destacam a elevada área superficial ($2630 \text{ m}^2/\text{g}$); estabilidade térmica, química e mecânica e, principalmente, o sistema de elétrons- π deslocalizados que pode realizar fortes interações com estruturas que possuem anéis aromáticos, como é o caso de poluentes, fármacos e biomoléculas. Além disso, é possível realizar-se a funcionalização do grafeno através de seu precursor, o óxido de grafeno. Essas características conferem a essa forma alotrópica do carbono boas propriedades para atuar como material nas técnicas modernas de preparo de amostra mencionadas. (24,28,29)

Na Figura 6 é apresentado o resultado de uma pesquisa realizada na base de dados Scopus com o termo “*graphene sample preparation*”. É possível notar um aumento considerável nos trabalhos publicanos entre os anos de 2010 à 2016. Isso mostra que materiais baseados em grafeno estão chamando a atenção e ganhando destaque na área de preparo de amostra. Contudo, o seu uso como sorvente nas técnicas de preparo de amostra, denominadas modernas, e previamente discutidas (MEPS, SBSE e extração “*on-line*”) ainda é pouco explorado (Figura 7). Esse fator motivou o presente trabalho que tem como foco desenvolvimento e aplicações de métodos que empreguem o grafeno e seus derivados como material sorvente nessas técnicas.

Figura 6 – Número de trabalhos publicados pesquisando pelo termo “*graphene sample preparation*” na base de dados Scopus.

* Considerando artigos, revisões, *short communications* e etc. Pesquisa realizada em 31/10/2017.

Figura 7 – Trabalhos encontrados pesquisando pelo termo I” na base de dados Scopus, filtrando a pesquisa por técnica de preparo de amostra.

* Considerando artigos, revisões, *short communications* e etc. Termos usados para cada técnica SPME, solid phase microextraction; MEPS, microextraction by packed sorbent; SBSE, stir bar sorptive extraction. Pesquisa realizada em 31/10/2017.

3.1 Emprego de grafeno e óxido de grafeno no preparo de amostra

O grafeno e seu óxido, empregados em técnicas de preparo de amostra, podem ser obtidos pela oxidação do grafite à óxido de grafite, sendo o método Hummers (30) o mais usado para esse fim. Após esse processo o óxido de grafite passa por um processo de esfoliação para ser convertido a óxido de grafeno, que pode ou não, ser reduzido a grafeno. Essa forma de obtenção do grafeno se difere da utilizada por Geim e Novoselov, (31) que isolaram o grafeno utilizando uma fita adesiva para separar as folhas de grafeno das lamelas de grafite.

Os materiais baseados em grafeno são denominados de diferentes formas na área de preparo de amostra. Os termos mais comuns encontrados para o grafeno obtido através da redução do óxido de grafeno são: óxido de grafeno reduzido, (32) grafeno quimicamente reduzido, (33) grafeno quimicamente convertido, (28) e grafeno (34), nomenclatura utilizada no presente trabalho. Essas nomenclaturas são utilizadas para os materiais produzidos pelo processo de redução do óxido de grafeno.

O maior número de aplicações que utilizam materiais baseados em grafeno como sorvente em técnicas de preparo de amostra está relacionado com o emprego das seguintes técnicas de extração: SPME, (33,35–37) extração em fase sólida magnética (MSPE), (38–40) e SBSE em menor quantidade que os dois primeiros casos. (41,42) O principal motivo para isso, pode estar relacionado com o modo de operação dessas técnicas. Em todas elas, em nenhum momento durante a etapa de extração é realizado a aplicação de pressão no sistema; dessa forma a elevada área superficial do material não impossibilita a extração, pois não ocorre obstrução dos “*frits*” ou aumento de pressão no sistema de extração.

Para técnicas de extração como o caso da MEPS, por exemplo, durante os ciclos de amostragem, lavagem e eluição é necessária a aplicação de pressão para que as soluções (amostra, solvente de lavagem e solvente de dessorção) entrem em contato com o material sorvente. O uso de materiais com elevada área superficial, como o caso dos baseados em grafeno é um fator limitante, dificultando a extração ou tornando essa etapa impraticável devido ao aumento de pressão no sistema. Talvez por isso não havia relatos na literatura do emprego desses materiais como sorvente na técnica MEPS, o que nos motivou a procurar alternativas para superar esse fator limitante.

Uma maneira de solucionar esse problema é utilizar um suporte para o material como, por exemplo, partículas de tamanho maior que não causem problemas de entupimento. Liu et al., (34) foram os pioneiros a realizar o suporte de grafeno e de seu óxido em partículas de

aminopropil sílica, através de ligação covalente. Esse procedimento consiste em realizar uma ligação covalente entre o grupamento carboxíla (-COOH), presentes no óxido de grafeno, com o grupamento amino (-NH₂) da aminopropil sílica, similar a ligação que ocorre entre dois peptídeos.

O uso desse tipo de abordagem foi explorado por alguns autores utilizando aminopropil sílica em formato irregular (34,43) e esférico. (44) Também é verificado na literatura o uso de sílica que passou pelo processo de silanização com aminopropiltrietoxissilano para fornecer o grupamento (-NH₂), (45) responsável por formar a ligação covalente com o óxido de grafeno. Na Figura 8, (25) é ilustrada a abordagem adotada, que mostra o processo de síntese do óxido de grafeno partindo do grafite, até a obtenção de uma partícula de sílica com grafeno suportado em sua superfície por ligação covalente. Esse grafeno pode conter em sua estrutura, após o processo de redução, resquícios de hidroxilas e carboxilas.

Abordagens semelhantes as demonstradas na Figura 8 já foram utilizadas para a obtenção de materiais sorventes empregados em SPE convencional para realizar a concentração de difenil éteres polibromados, (34) fluoroquinolonas, (32) hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), (43) e íons inorgânicos (Cu²⁺ e Pb²⁺). (44)

Considerando que a técnica MEPS é uma miniaturização da SPE convencional e que, por isso, pode utilizar os mesmos materiais sorventes. Foi verificada a possibilidade de se utilizar essa abordagem (Figura 8) para empregar o grafeno como sorvente na técnica MEPS. Além do suporte do óxido de grafeno nas partículas de aminopropil sílica, também foi avaliada a possibilidade de se utilizar como suporte sílica com grupamentos amino primário e secundário (PSA).

Alguns dos materiais sintetizados baseados na representação da Figura 8, também foram avaliados para serem utilizados como sorvente em uma coluna extração. Essas colunas de extração foram utilizadas no modo “*on-line*”. São encontradas poucas abordagens que utilizam materiais baseados em grafeno na coluna de extração, algumas delas são: óxido de grafeno “enxerdado” em sílica (similar ao descrito na Figura 8) porém nesse caso a sílica foi previamente tratado com aminopropiltrietoxissilano (APTES); (46) material híbrido de politifeno e óxido de grafeno em uma coluna de extração tubular aberta; (47) e acrilamida funcionalizada com grafeno. (48)

Figura 8 – Rota representativa da obtenção de óxido de grafeno (GO), grafeno (G), óxido de grafeno suportado em aminopropil sílica (Si@GO) e grafeno suportado em aminopropil sílica (Si@G).

Fonte: Traduzido de: Nazario, C.E.D.; Fumes, B.H.; Silva, M.R. da; Lanças, F.M. New materials for sample preparation techniques in bioanalysis. **Journal of Chromatography B**, v. 1043, p. 81–95, 2017.

O uso de materiais baseados em grafeno na técnica SBSE geralmente consistem em uma abordagem diferente da apresentada para as técnicas MEPS e o preparo de amostras “on-line”. Isso pode ser atribuído a não necessidade de aplicação de pressão no sistema, como já mencionado, durante o processo de extração. As abordagens encontradas na literatura que utilizam materiais baseados em grafeno na técnica SBSE incluem o uso de materiais híbridos como, por exemplo, MIP e grafeno (49,50) e politetrafluoretileno com óxido de grafeno, (51). Embora existam alguns trabalhos relatando o uso de materiais baseados em grafeno em SBSE, eles ainda são poucos e, por isso, há uma grande gama de possibilidades a serem exploradas.

No presente trabalhos o grafeno foi combinado com uma resina epóxi para confeccionar os dispositivos de SBSE.

Para o estudo do uso de materiais baseados em grafeno nas técnicas MEPS, extração “*on-line*” e SBSE foram escolhidos inicialmente como analitos modelo, compostos da classe dos parabenos. A escolha desses analitos foi baseado em sua estrutura que é composta por um anel aromático, o que poderia facilitar as interações π - π com o grafeno e seu óxido. Posteriormente, foi verificado a possibilidade de realizar extração de outras classes de analitos (triazinas, sulfonamidas e anti-inflamatórios não esteroidais).

4 Parabenos

Parabenos são ésteres derivados do ácido *p*-hidroxibenzoico que apresentam baixo custo e boa estabilidade térmica e química, podendo ser aplicados em uma ampla faixa de pH. Por esses motivos, esses compostos são empregados como conservantes antimicrobianos em uma ampla faixa de produtos como: cosméticos, alimentos (processados e bebidas), produtos de higiene pessoal e em preparações farmacológicas. (52–54) A estrutura dos principais parabenos é ilustrada na Figura 9; (52) a presença do anel benzênico na estrutura desses compostos torna o emprego de materiais baseados em grafeno bons candidatos a sorventes para realizar a extração desses compostos.

Embora os parabenos sejam considerados compostos de baixa toxicidade, é possível que eles causem desregulação endócrina, levando a incidência de câncer de mama e, também, de pele. (55) Outro exemplo de riscos do uso desses compostos foi constatado expondo ratazanas grávidas ao butil-parabeno, o que levou a alterações no órgão reprodutor masculino na prole dessas ratazanas. (56) Esses riscos estão associados com a fácil adsorção dos parabenos em tecidos da pele humana sem que eles sejam degradados pelas enzimas esterase. (52,55,57) Sendo assim, é necessária a realização de mais estudos para determinar qual o nível seguro de exposição a esses compostos. Nesse contexto, o desenvolvimento de métodos analíticos que ajudem a monitorar os níveis desses compostos em diferentes matrizes é um tema relevante a ser abordado.

Figura 9 – Estruturas do metil-parabeno (MeP), etil-parabeno (EtP), propil-parabeno (PrP) butil-parabeno (BuP) e benzil-parabeno (BeP).

Existem relatos na literatura que investigam a presença desses compostos em diversas matrizes incluindo urina, (53) leite materno, (58) cosméticos, (52) alimento de origem marinha, (59) e água. (54,60) As técnicas de preparo de amostra que tem sido empregadas para realizar a etapa de extração são LLE, SPE, SPME, SBSE, DLLME, HF-LPME e MEPS. (52,61,62) Isso fornece uma boa base para comparação e avaliação dos resultados obtidos. Além disso, devido aos parabens serem amplamente utilizados como conservantes em diversos produtos, era esperado encontrar esses compostos em matrizes de águas obtidas de diferentes fontes, como já relatado em diversos estudos disponíveis na literatura. (54,60,62,63)

Dessa forma, durante o desenvolvimento do presente trabalho de doutorado, no qual avaliou-se o emprego de materiais baseados em grafeno como sorvente em técnicas modernas de preparo de amostra, foi realizada a síntese, caracterização e posterior aplicação dos materiais nas técnicas de preparo de amostra MEPS, extração “*on-line*” e SBSE. Dependendo do caso, foi realizado o desenvolvimento do dispositivo, otimização das variáveis de extração, avaliação de figuras de méritos e aplicação do método.

CAPÍTULO 2

Emprego de grafeno suportado em aminopropil sílica como
sorvente em microdispositivos empacotados (MEPS)

*“Eu quero ver
Você mandar na razão
Prá mim não é
Qualquer notícia
Que abala o coração”*

Djavan, 1975
Fato Consumado

1 Objetivo

O objetivo do trabalho descrito nesse capítulo foi investigar a possibilidade de empregar, como sorvente na técnica MEPS, um material baseado em grafeno para determinar compostos da classe dos parabenos. Para atingir esse objetivo global os seguintes objetivos específicos foram traçados:

- ✓ Síntese dos materiais sorventes: óxido de grafeno, óxido de grafeno suportado em aminopropil sílica e em PSA por ligação covalente seguida pela redução do óxido de grafeno ligado nesses materiais;
- ✓ Caracterização dos materiais sintetizados;
- ✓ Comparação dos materiais sintetizado com materiais comercialmente disponíveis;
- ✓ Otimização de variáveis que podem afetar o processo de extração na técnica MEPS;
- ✓ Avaliação das principais figuras de mérito de validação do método desenvolvido;
- ✓ Aplicação em amostras de água provenientes de diferentes fontes e obtidas na cidade de São Carlos-SP;

2 Materiais e Métodos

2.1 Padrões e reagentes utilizados

Os padrões de metil parabeno, etil parabeno, propil parabeno, butil parabeno e benzil parabeno foram adquiridos da Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Esses padrões foram utilizados na preparação de soluções estoque dos parabenos na concentração de 1000 mg/L em metanol. Posteriormente, foram empregados no preparo de uma solução de trabalho com todos os parabenos na concentração de 40 mg/L utilizada para fortificar as amostras. A solução de trabalho era preparada semanalmente e armazenada a -4 °C.

Para a síntese do óxido de grafeno e seu suporte em Si e PSA foram utilizados grafite, NaNO_3 , KMnO_4 , diciclohexilcarboimida (DCC) e dimetilformamida (DMF), todos adquiridos

da Sigma–Aldrich (São Paulo, Brasil); HCl da Qhemis (Jundiaí, Brasil); H₂SO₄ da Tedia (Fairfield, OH, USA); H₂O₂ da Synth (Diadema, Brasil) e hidrazina 64% adquirida da Acros Organics (New Jersey, EUA). Os materiais sorventes aminopropil e PSA, foram adquiridos da Varian (Lake Forest, CA, EUA) e Supelco (Bellefonte, PA, EUA), respectivamente.

Os materiais sorventes utilizados na comparação com os sintetizados foram C18–Chromabond® da Macherey-Nagel (Düren, Germany) e Strata™-X da Phenomenex (Torrance, CA, EUA).

Os solventes metanol (MeOH) e acetonitrila (ACN), ambos grau de análise cromatográfica, foram adquiridos da Tedia (Fairfield, OH, EUA). O ácido fórmico 96% e hidróxido de amônio usados no ajuste de pH das amostras foram adquiridos da Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, EUA), e da Qhemis (Jundiaí, Brasil), respectivamente. O NaCl usado durante a avaliação da força iônica no processo de extração por MEPS foi adquirido da J.T.Baker (Phillipsburg, NJ, EUA).

2.2 Síntese do óxido de grafeno

A síntese do óxido de grafeno foi realizada empregando o método originalmente descrito por Hummers. (30,64,65) Utilizou-se 2g de grafite, 2g de NaNO₃ e 92 mL of H₂SO₄, essa mistura foi agitada em um banho de gelo por uma hora. Então, adicionou-se 12g KMnO₄ e a mistura foi agitada por mais duas horas. Após esse período, foi adicionado lentamente 184 mL de H₂O, e a mistura novamente levada para agitação, dessa vez em um banho de óleo à 98°C por mais 30 minutos. Foram adicionados mais 400 mL de H₂O e 40 mL of H₂O₂, e a mistura foi centrifugada e então lavada com H₂O contendo 10% de HCl (v/v) para remoção de possíveis íons metálicos. O material obtido (óxido de grafite) foi secado por 72 horas à 40°C. Então, o material foi re-disperso em água na concentração de 1 mg/mL, e essa solução foi ultrasonificada por 1 hora, sendo em seguida liofilizada resultando no óxido de grafeno.

2.3 Produção do óxido de grafeno e do grafeno suportados em sílica

Para suportar o óxido de grafeno nas partículas de sílica (Si e PSA) foi utilizado o método originalmente proposto por Liu et al., (34). 40 mg de óxido de grafeno foram adicionados em 100 mL of DMF e essa mistura foi colocada no banho de ultrassom por 1 hora.

Após essa etapa adicionou-se 1g de Si e 40 mg de DCC (agente de ligação). A mistura foi agitada à 50°C por 30 horas em refluxo. O produto obtido foi lavado com metanol para remover eventuais partículas de óxido de grafeno que não se ligaram a sílica e o material obtido, Si-GO, foi então liofilizado. O mesmo procedimento foi realizado para se obter a PSA-GO.

Si-G e PSA-G foram produzidos à partir da redução das partículas de Si-GO e PSA-GO, 0,2 g de material de material (Si ou PSA) foi adicionado em 10 mL H₂O, seguido pela adição cuidadosa de 150 µL de hidrato de hidrazina 64%. A mistura foi agitada por 2 horas em um banho de óleo à 95°C, também em refluxo, e após esse período o material foi lavado com metanol e então liofilizado.

2.4 Instrumentação e condições analíticas

Durante a etapa de avaliação dos materiais sorventes e otimização do método foi utilizado um sistema LC da Shimadzu (Kyoto, Japan) equipado com duas bombas LC- 20AD, um “autosampler” SIL-20AC, um degaseificador DGU-20A5, uma interface CBM-20A e um detector UV-Vis SPD-20A no comprimento de onda (λ) de 254 nm. Na avaliação das figuras de mérito do método foi utilizado um sistema Waters ACQUITY UPLC (Milford, MA, EUA) equipado com um bomba binária e “autosampler”, acoplado a um espectrômetro de massas sequencial XEVO (MS/MS) com ionização por electrospray (ESI). As análises foram realizadas no modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM). As condições do ESI operando no modo negativo foram as seguintes: voltagem do capilar 2.9 kV; voltagem do cone, 21 V; temperatura da fonte, 150 °C; temperatura do gás de dessolvatação, 400 °C; vazão do gás de dessolvatação (N₂), 800 L/h; vazão do gás de colisão (Ar), 0.15 mL/min. Na Tabela 1 são apresentadas as transições utilizadas, a energia de colisão, a voltagem do cone, o “*dwel-time*” e o tempo que cada íon foi monitorado.

As separações cromatograficas foram realizadas empregando uma coluna Poroshell 120 EC-C18 (100 x 2.1 mm, 2.7 µm) da Agilent (Palo Alto, CA, USA) no modo isocrático com vazão de 0,3 mL/min e temperatura da coluna mantida à 40°C. Para o sistema LC da Shimadzu a composição da fase móvel utilizada foi acetonitrila:água (30:70 v/v) para evitar coeluição do butil e benzil parabeno; no sistema Waters ACQUITY UPLC, utilizado após a otimização das variáveis que podem afetar o processo de extração por MEPS, a composição da fase móvel utilizada foi acetonitrila:água (40:60 v/v).

Tabela 1 – Transições monitoradas no modo MRM e condições utilizadas durante a avaliação das figuras de mérito.

Parabeno	Íons precursores (m/z)	Transições MRM (m/z)	Voltagem do cone (V)	Energia de colisão (V)	Dwell time (s)	Tempo monitorado (min)
MeP	151,03	91,95 ¹	28	18	0,2	0,00-1,75
		135,94 ²	28	12		
EtP	165,03	92,08 ¹	30	22	0,2	1,45-2,25
		136,80 ²	30	14		
PrP	178,97	92,00 ¹	34	20	0,3	2,00-3,25
		136,20 ²	34	18		
BuP	193,10	92,01 ¹	34	26	0,3	3,00-7,00
		136,40 ²	34	14		
BeP	227,03	91,94 ¹	30	22	0,3	3,00-7,00
		135,93 ²	30	16		

¹transição usada na quantificação; ² transição usada na confirmação.

Na caracterização dos materiais foi utilizado um espectrôfotometro infravermelho IRAffinity-1 da Shimadzu (Kyoto, Japan). Os espectros de infravermelho foram obtidos de 4000 à 400 cm⁻¹ utilizando discos prensados com KBr adquirido da Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Os difratogramas de raios-x foram obtidos utilizando um difratômetro (XRD) Ultima IV da Rigaku (Tokyo, Japan). A morfologia dos materiais foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) da Zeiss-Leica/440 (Mannheim, Germany) operando a 20 kV.

2.5 Comparação entre os materiais sintetizados

Durante a avaliação dos materiais sorventes, foram utilizadas seringas de insulina de 1 mL, empacotadas com 7mg dos materiais sorventes utilizando “frits” de polipropileno (Figura 10). Essa avaliação foi realizada no sistema LC-UV empregando água destilada fortificada com os parabenos na concentração de 200 µg/L. Durante a etapa de amostragem 600 µL da solução fortificada passaram por 6 ciclos de aspiração, seguidos por 4 ciclos de secagem (sucção de 1 mL de ar), e só então a etapa de dessorção foi realizada empregando 100 µL de acetonitrila em

10 ciclos. O processo de regeneração/condicionamento do sorvente foi realizado através de 4 ciclos de 500 μ L do solvente de dessorção, procedimento que foi repetido duas vezes para evitar efeito de memória, seguido por 4 ciclos de lavagem com 1 mL de água deionizada, também realizado duas vezes.

Figura 10 – Representação da seringa utilizada para empacotar os materiais sorventes.

Fonte: Figura elaborada no grupo.

2.6 Otimização das condições de extração por MEPS

Depois da escolha do melhor material sorvente, foi realizada a avaliação da influência das variáveis pH, solvente de dessorção e força iônica no comportamento da técnica. Os valores de pH avaliados foram 4, 7 e 10; os solventes de dessorção foram metanol, acetonitrila, metanol:acetonitrila (50:50) e acetonitrila:água (40:60); a influência da força iônica foi avaliada nas condições de 0%, 10% e 20% de NaCl.

Após essa etapa, foi empregado um planejamento experimental fracionário 2^{6-2} , com ponto central replicado três vezes para avaliar as variáveis que poderiam afetar o procedimento durante a extração por MEPS. As variáveis avaliadas e seus níveis são mostrados na Tabela 2. Essas avaliações foram realizadas levando-se em consideração as principais variáveis que podem afetar a performance da extração por MEPS. (11,66)

Tabela 2 – Níveis das variáveis otimizadas pelo planejamento experimental fracionário 2⁶⁻².

Variável	nível		
	-1	0	+1
(1) Volume da amostra (μL)	500	750	1000
(2) Volume de dessorção (μL)	50	75	100
(3) Ciclos de amostragem	6	8	10
(4) Ciclos de lavagem	1	3	4
(5) Ciclos de dessorção	6	8	10
(6) NaCl %	20	25	30

2.7 Figuras de mérito

A avaliação das figuras de mérito do método desenvolvido foi realizada seguindo o guia de validação do “*International Conference on Harmonization*” (ICH). (67) Os parâmetros avaliados foram a seletividade, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), exatidão e precisão (intra e inter-dias). Durante essa etapa foi utilizada uma amostra de água de subsolo como matriz representativa (branco).

A seletividade foi analisada através da análise do branco após o procedimento de extração por MEPS. O LOD e LOQ foram definidos como a concentração do analito que produzisse um sinal de 3 e 10 vezes maior, respectivamente, que relação sinal/ruído.

A linearidade foi avaliada fortificando o branco e realizando a extração de acordo com os resultados obtidos na etapa de otimização do procedimento de extração por MEPS. As curvas analíticas foram construídas em seis níveis de concentração (0.2, 0.4, 1.0, 5.0, 10.0 e 20.0 μg/L), cada uma replicada 3 vezes, começando do LOQ de cada parabeno. A única exceção foi o benzil parabeno, pois seu LOQ foi de 0.3 μg/L ao invés de 0.2 μg/L. Foram também avaliados os modelos de calibração ponderada sugeridos por Almeida et al. (68), sendo a escolha do melhor modelo foi baseado na soma dos resíduos absolutos ($\sum \%RE$), no coeficiente de determinação

(R^2) e também avaliando o gráfico de resíduos (%). As equações utilizadas no cálculo dos coeficientes angular (1), linear (2) e de determinação (3) são apresentadas a seguir: (68)

$$b = \frac{\sum w_i \cdot \sum w_i x_i y_i - \sum w_i x_i \cdot \sum w_i y_i}{\sum w_i \cdot \sum w_i x_i^2 - (\sum w_i x_i)^2} \quad (1)$$

$$a = \frac{\sum w_i x_i^2 \cdot \sum w_i y_i - \sum w_i x_i \cdot \sum w_i x_i y_i}{\sum w_i \cdot \sum w_i x_i^2 - (\sum w_i x_i)^2} \quad (2)$$

$$r = \frac{\sum w_i \cdot \sum w_i x_i y_i - \sum w_i x_i \cdot \sum w_i y_i}{\sqrt{\sum w_i \cdot \sum w_i x_i^2 - (\sum w_i x_i)^2} \cdot \sqrt{\sum w_i \cdot \sum w_i y_i^2 - (\sum w_i y_i)^2}} \quad (3)$$

Onde:

w_i = peso (x^{-2} , x^{-1} , $x^{-0,5}$, y^{-2} , y^{-1} , $y^{-0,5}$);

x_i = concentração;

y_i = área obtida;

A exatidão e precisão foram avaliadas fortificando-se o branco da matriz em 3 níveis de concentração (0.3, 2.0, 15.0 $\mu\text{g/L}$). Cada nível foi avaliado em triplicata, e também, em dois dias diferentes para avaliar a precisão através do coeficiente de variação (CV%) das análises intra e inter-dias.

2.8 Amostras

As amostras de água avaliadas por esse método foram coletadas de diferentes fontes incluindo lago, esgotos sanitários, piscina e torneira em São Carlos, SP, Brasil. Elas foram previamente centrifugadas a 10000 rpm por 10 minutos e depois filtradas para evitar que algum resíduo remanescente pudesse obstruir a seringa durante o procedimento de extração por MEPS.

3 Resultados e Discussão

3.1 Caracterização dos materiais

Os espectros vibracionais na região do infravermelho, obtidos para a aminopropil sílica (Si), óxido de grafeno suportado em aminopropil sílica (Si-GO) e grafeno suportado na aminopropil sílica (Si-G), são mostrados na Figura 11. É observada uma banda na região de 800 cm^{-1} e uma mais intensa em 1100 cm^{-1} , as quais correspondem a vibração angular SiO-H e estiramento das ligações Si-O-Si, respectivamente. (34,69) O aumento de banda observado, próximo a 1650 cm^{-1} , pode ser atribuído a ligação C=O do grupamento amida que se forma entre o GO e a Si; esse grupo provavelmente é reduzido durante a redução do Si-GO à Si-G e, por isso, é observada uma redução dessa quando esses dois materiais são comparados. A banda próxima a 3500 cm^{-1} é causada pelas vibrações -OH; é observado um aumento dessa banda no Si-GO quando comparado ao Si, assim como, uma diminuição no Si-G o que indica que a redução do Si-GO com hidrazina ocorreu com sucesso. (34) O mesmo comportamento foi observado para a PSA, PSA-GO e PSA-G.

Figura 11 - Espectros vibracionais na região infravermelho obtidos para a aminopropil sílica (Si), óxido de grafeno suportado por ligação covalente na aminopropil sílica (Si-GO), e grafeno suportado por ligação covalente na aminopropil sílica (Si-G).

Os difratogramas de raios-x, Figura 12, mostram um intenso pico próximo a 26 graus no grafite, o qual não é observado no GO. O estreito pico próximo a 12 graus no GO indica uma estrutura cristalina menor que no grafite e, também, que o processo de oxidação do grafite seguido por uma esfoliação em ultrassom foi realizado com sucesso. (70) Além disso, é observado que o Si-GO e Si-G apresentam estrutura amorfa similar a Si, o que sugere que as nanofolhas de óxido de grafeno (GO) e grafeno (G) estão desarranjadas na estrutura da sílica.(34)

Figura 12 - Difratograma de raios-x.

As imagens de microscopia eletrônica (MEV) de varredura são mostradas na Figura 13 onde é possível observar o GO e G ondulados e, também, que a estrutura de nanofolhas na superfície das sílicas utilizadas foi mantida.

Figura 13 – MEV dos materiais sintetizados. (A) Si ampliado 3300 vezes, (B) Si-GO ampliado 10000 vezes, (C) Si-GO ampliado 10000 vezes, (D) Si-G ampliado 7000 vezes, (E) PSA ampliado 6000 vezes, (F) PSA-GO ampliado 6000 vezes.

A Figura 14 mostra uma fotografia dos materiais Si-GO e Si-G sintetizados; nela é possível observar que o Si-GO apresenta coloração mais próxima ao marrom e que, após a etapa de redução, a Si-G sua coloração muda apresentando um aspecto mais cinza. Esse fato pode ser atribuído ao aumento da hidrofobicidade do material causado pela diminuição no número dos grupos hidroxilas (-OH) e carboxilas (-COOH). (71)

Figura 14- Fotografia dos materiais sintetizados. (A) Óxido de grafeno suportado em aminopropil sílica (Si-GO); (B) Grafeno suportado em aminopropil sílica (Si-G).

3.2 Comparação entre os materiais sorventes

A comparação entre o desempenho dos materiais sorventes na extração dos parabenos foi realizada em triplicata, e é mostrada na Figura 15. É possível observar um aumento na área dos picos para as fases Si-GO e Si-G em comparação a fase Si. Isso pode ser atribuído a possibilidade de interações π entre os anéis aromáticos dos parabenos com as nanofolhas de óxido de grafeno e grafeno suportados na superfície da aminopropil sílica. A fase sorvente Si-GO apresenta mais grupos -OH e -COOH que a fase Si-G; isso pode explicar o porquê dela ter sido o melhor sorvente para o metil parabeno ($\log K_{o/w} = 1.67$, (72)) que a fase Si-G. Para o etil parabeno, propil parabeno, butil parabeno e benzil parabeno, o aumento da cadeia alquílica e a presença de outro grupo aromático, como no caso do benzil parabeno, aumenta o $\log K_{o/w}$ desses compostos que variam de 2,03 à 3,40; (72) e por isso esses compostos podem não ter apresentado grande diferença de área entre as fases Si-GO e Si-G.

Figura 15 – Comparação entre os materiais sorventes avaliados. MeP, metil parabeno; EtP etil parabeno; PrP, propil parabeno; BuP, butil parabeno; BeP benzil parabeno.

Resultados similares em termos de melhora da extração não foram observados para PSA-GO e PSA-G. Esses materiais mostraram resultados inferiores aos obtidos para a StrataTM-X que apresenta mecanismos de interação múltiplos (polar e apolar). (20)

Outro fator que certamente pode influenciar na extração por MEPS, são os parâmetros de extração utilizados (e.g. amostragem, lavagem e ciclos de dessorção), sendo que os resultados apresentados podem apresentar alterações se outros parâmetros forem utilizados. (11,66) Um aumento nos ciclos de amostragem poderia, por exemplo, melhorar os resultados obtidos para o sorvente C18. Contudo, vale destacar que o objetivo da comparação aqui realizada era estimar a performance dos materiais sintetizados em relação aos disponíveis comercialmente (especificamente C18 e StrataTM-X), assim como se ocorreria melhora em relação as fases Si e PSA quando essas não estão ligadas ao grafeno ou seu óxido.

Embora a fase Si-GO tenha apresentado melhores resultados para o metil parabeno, os desvios padrões obtidos entre diferentes extrações foram maiores para os outros parabeno. Por essa razão, a fase Si-G foi escolhida para as próximas etapas do desenvolvimento do método, otimização, avaliação das figuras de mérito e aplicação do método.

A Figura 16 mostra os cromatogramas obtidos após a extração por MEPS com as fases comerciais (C18 e StrataTM-X) e a fase Si-G. É possível observar a melhora na altura do pico quando se utilizou Si-G como sorvente, em relação as fases comerciais. Foi também observada

a presença de alguns picos que podem estar relacionados ao uso de um embolo contendo uma borracha de nitrila. Para superar esse possível problema foram confeccionados êmbolos de teflon que foram empregados durante a etapa de avaliação das figuras de mérito do método. Além disso, essa etapa foi realizada utilizando um espectrômetro de massas sequencial (MS/MS) como detector, cuja seletividade é superior ao LC-UV.

Figura 16 – Cromatograma ilustrativo, obtido no sistema LC-UV Shimadzu, comparando a extração realizada por MEPS utilizando como material sorvente o grafeno suportado em aminopropil sílica (Si-G) e materiais disponíveis comercialmente StrataTM-X, C18 e amostra fortificada em 200 (µg/L).

3.3 Otimização das variáveis

As variáveis avaliadas (pH, solvente de dessorção e força iônica), podem afetar a etapa de extração por MEPS. (66) A variável pH interfere na ionização dos parabenos; esses compostos estão majoritariamente em sua forma neutra em pH de 4 à 7 (73) e, em pH acima de 8, o grupamento álcool da molécula começa a sofrer hidrólise, sendo completamente hidrolisado em pH próximo à 10. (72) Foi observado que em pH 10 a extração dos parabenos foi menos eficiente do que quando a amostra estava em pH 4 ou 7. A Figura 17A mostra o efeito do pH observado durante a extração dos parabenos por MEPS. Assim, antes de cada extração o pH da amostra foi verificado para garantir que as amostras estivessem nessa faixa.

A possibilidade de se usar a composição do solvente de dessorção semelhante a fase móvel, ACN:H₂O (40:60), também foi avaliada. Esse procedimento poderia evitar a necessidade de secar e re-suspender a amostra após a etapa de extração por MEPS. Entre os solventes de dessorção avaliados o que apresentou melhores resultados foi a composição ACN:MeOH (50:50), Figura 17B, composição utilizada no restante do desenvolvimento do método. Alguns métodos encontrados na literatura também usam a composição ACN:MeOH (50:50) como solvente de dessorção, para determinação de parabenos em amostras de água, em outras técnicas de preparo de amostra. (60,74)

Figura 17 – Variáveis avaliadas e otimizadas para o extração de parabenos em água por MEPS. (A) efeito do pH da amostra (4, 7 e 10); (B) solvente de eluição avaliados MeOH:ACN 50:50, MP (ACN:H₂O 40:60), MeOH e ACN); (C) força iônica da amostra (0, 10 e 20%). MeP, metil parabeno; EtP, etil parabeno; PrP, propil parabeno; BuP, butil parabeno; BeP, benzil parabeno.

A variável força iônica também pode influenciar o processo de sorção. (66) O aumento da força iônica pode diminuir a solubilidade de compostos orgânicos e facilitar o processo de sorção com o material sorvente, especialmente para os compostos com polaridade intermediária como, por exemplo, o metil, etil e propil parabeno. Na Figura 17C é observado um aumento na área do pico para esses três parabenos quando a força iônica da amostra está em 20%. Por esse motivo, essa variável também foi incluída no planejamento experimental fracionário 2^{6-2} para avaliar se outro aumento da força iônica da amostra poderia melhorar ainda mais a extração dos parabenos por MEPS.

As variáveis volume da amostra, volume do solvente de dessorção, ciclos de amostragem, ciclos de lavagem, ciclos de dessorção e, novamente, força iônica, foram avaliadas por um planejamento experimental 2^{6-2} , com ponto central replicado três vezes. Na Figura 18 observa-se que as variáveis volume do solvente de dessorção, volume da amostra e força iônica, afetam o processo de extração para o metil parabeno nos níveis avaliados. Os resultados obtidos para todos os outros parabenos foram similares, porém sem apresentar efeito significativo para a variável força iônica.

O aumento do volume do solvente de dessorção de 50 para 100 μL pode causar a diluição do analito contribuindo para a diminuição da área do pico, como observado. Por esse motivo, o volume de 50 μL foi usado para o solvente de dessorção.

A extração por MEPS foi melhorada quando o volume da amostra usado aumentou de 500 para 1000 μL . O uso de um maior volume de amostra faz com que uma maior quantidade de analitos possam interagir com o material sorvente.

A força iônica apresentou efeito significativo apenas para o metil parabeno, melhorando a extração quando seu nível aumentou de 20 para 30%. Para os outros parabenos, essa variável não apresentou efeito significativo e, por isso, foi definida como 30%. Uma possível razão para isso pode estar relacionada ao fato de que o metil parabeno possui o menor valor de $\log K_{ow}$ (1,67) em comparação com os outros parabenos ($\log K_{ow}$ 2,03 – 3,40). (72)

Os ciclos do processo de extração por MEPS (amostragem, lavagem e dessorção) não apresentaram efeitos significativos dentro dos níveis avaliados e, por isso, foram definidos no menor nível sendo utilizados 6 ciclos de amostragem, 2 ciclos de lavagem e 6 ciclos de dessorção. Os ciclos de regeneração/condicionamento e de secagem foram os mesmos descritos no item 2.5.

Figura 18 - diagrama de pareto do experimento fatorial fracionário 2^{6-2} para o metil, etil, propil, butil e benzil parabeno.

3.4 Figuras de mérito

A Figura 19 mostra um cromatograma representativo da matriz utilizada como branco fortificada com 1 µg/L dos parabenos em estudo (metil, etil, propil, butil e benzil) após passar pelo processo MEPS. Foi observado em 1.1 min a presença de um pico que apresentou as mesmas transições do metil parabeno. Para esse pico, a transição m/z 151.03 $\rightarrow$ 135.94, foi mais intensa que a transição m/z 151.03 $\rightarrow$ 91.95, diferentemente do observado para o metil parabeno, o que pode sugerir a presença de um possível isômero conformacional. (75,76) Vale ressaltar que esse pico, possui um tempo de retenção diferente do metil parabeno e, por isso, não interfere na seletividade do método para o presente propósito.

Figura 19 – Cromatograma representativo obtido após uma extração por MEPS da amostra utilizada como branco após a fortificação na concentração de 1 µg/L dos parabenos avaliados.

O método apresentou um LOQ de 0,2 µg/L para quase todos os parabenos avaliados; a única exceção foi o benzil parabeno que apresentou um LOQ de 0,3 µg/L. Foi obtida uma faixa linear de trabalho para o método do LOQ até 20 µg/L. O LOD do método foi de 0,09 µg/L para o benzil parabeno e 0,06 µg/L para os demais.

Durante a avaliação da linearidade, os modelos de calibração ponderada (x^{-2} , x^{-1} , $x^{-0.5}$, y^{-1} , y^{-2} , $y^{-0.5}$) sugerido por Almeida et al. (68) foram avaliados, visto que a variância do primeiro ponto (LOQ) e do último ponto da curva de calibração foram significativamente diferentes. Ou seja, no teste de homocedasticidade os valores do F_{exp} foram maiores que o $F_{\text{tab}}(2;2;0,99) = 19$ para todos os compostos (Tabela 3).

A utilização de modelos ponderados, dependendo do caso, também melhorou a soma dos resíduos absolutos ($\sum \%RE$) e a distribuição dos resíduos, nos seus respectivos gráficos, em comparação com o modelo não ponderado. Na Tabela 4 são apresentados os valores de coeficientes angular e linear obtidos para cada modelo, os coeficientes de determinação (R^2), e a soma dos resíduos absolutos. Nela é possível notar que para quase todos os casos o uso de um modelo ponderado diminui a soma dos resíduos absolutos e, concomitantemente, aumenta o valor de R^2 . Além disso, o modelo ponderado escolhido melhorou a dispersão dos gráficos de resíduos em relação ao modelo não ponderado, conforme pode ser observado na Figura 20. As curvas de calibração obtidas para os modelos ponderados escolhidos são apresentadas na Figura 21.

Tabela 3 - Teste F para os parabenos avaliados.

Composto	F_{exp}	F_{tab}	$F_{\text{exp}}/F_{\text{tab}}$
MeP	51358	66	519
EtP	8757	99	88
PrP	37586	99	380
BuP	2055	99	21
BeP	3836	99	39

Tabela 4 - Parâmetros obtidos na avaliação linear utilizando os modelos ponderados sugeridos por Almeida et al. (68) (x^{-2} , x^{-1} , $x^{-0,5}$, y^{-1} , y^{-2} , $y^{-0,5}$) e modelo sem ponderação (1). Destacado em **negrito** o modelo escolhido.

Composto	Peso (w)	a	b	R ²	Σ%RE
MeP	1	1471,3	125,9	0,9773	233,0
	x^{-2}	1516,	50,7	0,9822	153,1
	x^{-1}	1479,5	75,6	0,9870	161,5
	$x^{-0,5}$	1474,1	97,4	0,9850	191,9
	y^{-1}	1462,8	78,7	0,9876	161,0
	y^{-2}	1478,9	56,9	0,9849	151,9
	$y^{-0,5}$	1452,9	238,5	0,9814	396,2
Composto	Peso (w)	a	b	R ²	Σ%RE
EtP	1	1930,3	-4,1	0,9806	189,0
	x^{-2}	1902,4	54,6	0,9780	167,5
	x^{-1}	1922,9	40,7	0,9837	163,8
	$x^{-0,5}$	1930,3	11,2	0,9845	176,3
	y^{-1}	1892,9	41,5	0,9824	171,2
	y^{-2}	1825,4	69,0	0,9741	184,4
	$y^{-0,5}$	1918,2	3,6	0,9799	185,2
Composto	Peso (w)	a	b	R ²	Σ%RE
PrP	1	2094,3	-825,1	0,9805	1062,1
	x^{-2}	1909,2	-2,9	0,9675	195,6
	x^{-1}	1965,8	-41,3	0,9753	203,3
	$x^{-0,5}$	2021,6	-213,7	0,9821	369,2
	y^{-1}	1928,4	-41,9	0,9786	206,4
	y^{-2}	1810,5	13,2	0,9674	220,1
	$y^{-0,5}$	2037,9	565,2	0,9780	788,1
Composto	Peso (w)	a	b	R ²	Σ%RE
BuP	1	1312,0	475,4	0,9693	924,5
	x^{-2}	1419,3	29,3	0,9560	263,3
	x^{-1}	1380,8	55,4	0,9753	260,3
	$x^{-0,5}$	1354,2	134,2	0,9757	324,9
	y^{-1}	1351,0	48,6	0,9747	278,3
	y^{-2}	1332,3	31,7	0,9500	298,7
	$y^{-0,5}$	1326,8	293,4	0,9698	599,1
Composto	Peso (w)	A	b	R ²	Σ%RE
BeP	1	601,2	-222,4	0,9716	755,1
	x^{-2}	530,6	0,4	0,9587	206,6
	x^{-1}	569,6	-32,1	0,9772	215,7
	$x^{-0,5}$	584,4	-83,1	0,9775	353,6
	y^{-1}	558,2	-33,5	0,9764	225,0
	y^{-2}	501,4	2,8	0,9509	237,9
	$y^{-0,5}$	587,9	-180,3	0,9740	644,1

w, peso utilizado; *a*, coeficiente angular; *b*, coeficiente linear; *R*², coeficiente de determinação; Σ%RE, somatória dos resíduos absolutos.

Figura 20 – Gráficos de resíduos para cada parabenos. À esquerda são apresentados os gráficos de resíduos para os modelos sem ponderação ($w = 1$) e à direita os modelos ponderados.

Figura 21 – Curvas de calibração para os modelos ponderados.

A Tabela 5 mostra os valores de exatidão e precisão intra e inter-dia obtidas. O método desenvolvido apresentou boa exatidão, a qual variou de 82,3 à 119,2%. A precisão, avaliada através do coeficiente de variação, foi satisfatória nos ensaios realizados intra e inter-dias, variando de 1,5 à 17,2% e 6,4 à 19,2%, respectivamente. Os valores obtidos estão de acordo com grande parte dos guias de validação internacionais e nacionais, onde geralmente a exatidão pode variar de 80 à 120% e a precisão deve apresentar $CV \leq 20\%$, dependendo do nível de concentração.

Tabela 5 – Valores obtidos para a exatidão e precisão intra-dia e inter-dia para os três níveis de concentração avaliados (baixo, médio e alto).

Composto	µg/L	Exatidão	Precisão CV% (n=3)		
			Dia 1	Dia 2	Inter Dia
MeP	0,3	103,0	12,3	12,0	12,6
	2	115,8	8,2	5,5	6,4
	15	88,1	15,2	9,2	14,3
EtP	0,3	82,3	17,2	13,5	16,8
	2	106,5	3,9	7,8	8,1
	15	100,9	1,5	11,7	7,7
PrP	0,3	98,2	12,5	12,8	11,8
	2	111,9	15,4	9,3	13,3
	15	85,0	18,2	4,9	16,0
BuP	0,3	91,0	12,9	13,7	19,2
	2	104,0	16,7	7,8	16,9
	15	93,4	5,3	7,4	6,8
BeP	0,3	104,5	17,4	15,9	19,7
	2	90,0	6,0	15,5	17,9
	15	119,2	5,0	4,8	4,8

3.5 Aplicação do método desenvolvido

Após a avaliação das figuras de mérito do método, foram realizadas análises para determinação de parabenos em amostras de água obtidas na região de São Carlos – SP, Brasil. O metil parabeno foi encontrado dentro dos níveis de quantificação na maioria das amostras analisadas. Em métodos encontrados na literatura para a determinação de parabenos em diferentes matrizes, esse composto foi avaliado em todos os casos citados, (52,61) provavelmente porque é, dentre os parabenos, o mais utilizado como conservante. O propil parabeno também foi encontrado, dentro dos níveis de quantificação em duas amostras, sendo o segundo parabeno mais estudado, de acordo com dados consultados na literatura, dentre os compostos avaliados. (52,61) O etil parabeno e o butil parabeno foram encontrados, dentro dos

níveis de quantificação, em apenas uma amostra. Já o benzil parabeno não foi encontrado dentro dos níveis de quantificação e também detecção em nenhuma das amostras avaliadas. Na Tabela 6, são mostradas as concentrações dos parabenos encontradas em cada amostra coletada em diferentes locais na cidade de São Carlos.

Tabela 6 – Concentração encontrada dos parabenos em µg/L nas amostras de água avaliadas. MeP, metil parabeno; EtP, etil parabeno; PrP, propil parabeno; BuP, butil parabeno; BeP benzil parabeno.

Amostra	MeP	EtP	PrP	BuP	BeP
Água de torneiro	-	-	-	-	-
Esgoto Sanitário 1	0,4	-	-	-	-
Fonte do parque ecológico	4,6	0,4	0,3	0,5	-
Água de lago 1	<LOQ	-	-	-	-
Água de lago 2	0,7	-	0,2	-	-
Água de piscina	0,2	-	-	-	-
Esgoto sanitário 2	0,4	-	<LOQ	-	-

3.6 Comparação entre os resultados obtidos com valores representativos disponíveis na literatura

Na Tabela 7 são apresentados alguns métodos disponíveis na literatura que determinam parabenos em diferentes matrizes, utilizando diferentes técnicas de extração, separação e detecção. É possível observar, que de forma geral, os LOQ alcançados para a maioria dos casos estão com valores próximos aos obtidos pelo método desenvolvido.

O método que utilizou a técnica de extração DLLME atingiu LOQ consideravelmente menores ($< 0,01 \mu\text{g/L}$). (77) Esse fato pode ser explicado pelo maior fator de concentração proporcionado por esse método (200 vezes), aliado ao fato de que geralmente os métodos por GC apresentam picos mais estreitos que os por LC, auxiliando na obtenção de menores valores de LOQ. (78) Uma desvantagem desse método foi a necessidade de realizar a derivatização dos parabenos.

Os métodos encontrados na literatura que utilizam como técnica de extração a BAµE, (60,74) embora utilizem detectores com arranjo de diodos (DAD) apresentaram LOQ próximos aos métodos que utilizaram detectores de massa sequencial (MS/MS). Os motivos para isso, podem estar associados a elevada área superficial do material disponível para o processo de

sorção e, também, o elevado fator de concentração (cerca de 150 vezes). Apesar disso, uma extração por essa técnica exige um tempo de equilíbrio (equilíbrio de partição), que pode ser de 30 à 60 minutos, dependendo do método.

O método encontrado que utiliza a técnica MEPS para determinar parabenos em urina, (53) apresentou LOQ com valores próximos ao desenvolvido no presente trabalho; e também valores de %CV similares. Entretanto seus coeficientes de determinação ($R^2 > 0,99$) foram relativamente melhores que o do presente método; o uso de padrão interno e de uma seringa especial para a técnica são fatores que podem ter contribuído para isso.

Com relação aos materiais utilizados como sorvente, é possível notar que o mais utilizado é o octadecilsilano (C18). Durante a nossa avaliação, dentro das condições utilizadas, o material sintetizado apresentou melhor eficiência que o material C18. Contudo, vale ressaltar que esse material produzido por diferentes fabricantes pode apresentar diferentes características (e.g carga de carbono, tamanho da partícula e do poro, formato, etc.). (20) Os exemplos ilustrados na **Tabela 7** utilizam C18 de diferentes empresas (SGE, (53) Sigma-Aldrich, (59) Varian, (79) e Merck). (80)

Tabela 7 – Métodos disponíveis na literatura que determinaram parabenos em diferentes matrizes.

sorvente	Compostos	Método	Matriz	LOQ ($\mu\text{g/L}$)	Ref
C18	MeP, EtP, PrP BuP e BeP	MEPS-UHPLC-MS/MS	urina	0,5	(53)
CA	MeP, EtP, PrP e BuP	BA μ E ^a -HPLC-DAD	água	0,3	(74)
RAM-MIP	MeP, EtP, PrP e BuP	in-tube SPME-UHPLC-MS/MS	leite materno	3,0 - 10,0	(58)
GO	MeP, EtP, PrP e BuP	μ -SPE envelope ^b	água e vinagre	0,1 – 0,5	(81)
sílica gel + C18	MeP, EtP, PrP e BuP	MSPD-GC-MS	alimentos de origem marinha	0,4	(59)
Rolha ^c	MeP, EtP	BA μ E ^a -HPLC-DAD	água	3,0 – 20,0	(60)
NA	MeP, EtP, PrP, BuP e isoBuP	LLME e IL-DLLME-GC-MS	água	< 0,01	(77)
NA	MeP e PrP	LLE-HPLC-UV	cosmético	NR	(61)
C18	MeP, EtP e PrP	SPE-HPLC-ED	shampoo	125 ^d	(79)
C18	MeP, EtP, PrP BuP e BeP	“on-line” SPE-HPLC-MS/MS	soro sanguíneo	0,1 – 0,2 ^e	(80)
Si-G	MeP, EtP, PrP BuP e BeP	MEPS-HPLC-MS/MS	água	0,2 – 0,3	MD

^a Técnica de extração derivada da SBSE; ^b Os autores chamaram de μ -SPE, mas definem no artigo o dispositivo como uma membrana porosa na qual o material é aprisionado (1.5 cm $\times$ 1.0 cm); ^c Rolha de vinho (cortiça); ^d $\mu\text{g/kg}$; ^e LOD; CA – carbono ativado; NA – não aplicável; NR – não reportado; MD – método desenvolvido.

4 Conclusões

O trabalho desenvolvido e relatado neste capítulo descreve, até onde temos conhecimento, o primeiro uso de um material baseado em grafeno na técnica MEPS. Nessa abordagem parabenos foram utilizados como modelo para avaliar os materiais sintetizadas e compara-los com os comerciais (C18 e StrataTM-X). Dentro das condições avaliadas o material sintetizado Si-G foi o que apresentou melhores resultados e, por isso, foi escolhido para otimização das variáveis que podem afetar o processo de MEPS.

Foi realizada uma avaliação das figuras de mérito do método que apresentou linearidade dentro da faixa de concentração de 0,2 à 20 µg/L, R^2 de 0,9753 à 0,9849, exatidão de 82 à 119% e CV < 20%. Durante a avaliação de linearidade o emprego de modelos ponderados também melhorou a dispersão dos gráficos de resíduos. Após essa avaliação o método foi aplicado com sucesso na determinação de parabenos em amostras de água.

O desenvolvimento e investigação de novos materiais sorventes para técnicas de preparo de amostra é uma importante tendência, especialmente quando se pensa em miniaturização. O material sintetizado demonstrou ser uma alternativa que pode ser aplicada para a análise de outros compostos, visto que foi possível realizar o desenvolvimento e aplicação utilizando Si-G como sorvente na técnica MEPS. Contudo, também é necessário continuar investigando a possibilidade de variações no processo de síntese desse material, assim como seu emprego em outras matrizes (biológicas e alimentícias).

CAPÍTULO 3

Emprego de óxido de grafeno e grafeno suportados em aminopropil sílica como material sorvente em métodos de extração “*on-line*”.

*“O luar, estrela do mar
O sol e o dom
Quiçá, um dia, a fúria desse front
Virá lapidar o sonho
Até gerar o som
Como querer Caetanear
O que há de bom”*

Djavan, 1982
Sina

1 Objetivos

O objetivo dessa etapa do trabalho foi avaliar a possibilidade de empregar o material Si-GO e Si-G como sorvente em técnicas de preparo de amostra “*on-line*”. Para isso os seguintes objetivos específicos foram traçados:

- ✓ Empacotar uma coluna de extração com os materiais previamente sintetizados Si-GO e Si-G;
- ✓ Verificar a influência dos parâmetros volume de injeção e tempo de giro de válvula nos resultados;
- ✓ Avaliar as figuras de mérito de um método de extração “*on-line*” empregando parabenos como analitos modelo;
- ✓ Comparar as colunas de extração empacotadas com as fases Si-GO e Si-G;

2 Materiais e métodos

2.1 Padrões e reagentes

Os padrões de metil parabeno (MeP), etil parabeno (EtP), propil parabeno (PrP), butil parabeno (BuP) e benzil parabeno (BeP) foram adquiridos da Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Partindo desses padrões foram preparadas soluções estoque individual desses compostos na concentração de 1000 mg/L em metanol. Essas soluções foram empregadas no preparo das soluções estoque desses parabenos e utilizados para fortificar as amostras.

Os solventes metanol (MeOH) e acetonitrila (ACN), ambos grau de análise cromatográfica, foram adquiridos da Tedia (Fairfield, OH, USA).

As fases óxido de grafeno e grafeno ligados covalentemente a aminopropil sílica (Si-GO e Si-G) são as mesmas preparadas e descritas no capítulo anterior; por isso, não serão listados, novamente, os reagentes utilizados nessas duas sínteses.

2.2 Síntese do óxido de grafeno e do grafeno e seu óxido suportado em sílica

A síntese do óxido de grafeno (GO) e grafeno (G) suportado em aminopropil sílica já foi descrita com detalhes no Capítulo 2 sendo representada à seguir.

O procedimento de síntese parte do grafite, que é utilizado para produção do óxido de grafite pelo método descrito por Hummers. (30,64,65) Posteriormente, esse óxido de grafite é convertido a óxido de grafeno por uma etapa denominada de sonificação (ultrassom). O óxido de grafeno é então ligado covalentemente a aminopropil sílica (Si-GO) seguindo o método proposto por Liu et al. (34) Esse material passa por uma etapa de redução resultando em grafeno ligado covalentemente à aminopropil sílica (Si-G).

2.3 Empacotamento das colunas de extração

As fases Si-GO e Si-G foram empacotadas em um tubo de aço inox com 2 mm de diâmetro interno ($\emptyset$) e 40 mm de comprimento. Para isso, as fases previamente secas foram adicionadas aos tubos até o seu total preenchimento. Após essa etapa, com auxílio de uma bomba Shimadzu LC prominence (LC-20A), as colunas foram condicionadas com acetonitrila e água, até estabilizar a pressão. Então, elas eram novamente abertas para verificar se estavam completamente preenchidas; em caso negativo, elas eram novamente preenchidas com a fase seca e esse procedimento repetido até se constatar o total preenchimento da coluna.

2.4 Instrumentação e condições de análise

O método “*on-line*” foi desenvolvido em um sistema Waters ACQUIT UPLC (Milford, MA, EUA) acoplado a um espectrômetro de massas XEVO (MS/MS) com ionização por nebulização eletrônica electrospray (ESI). O ESI operou no modo negativo nas seguintes condições: voltagem do capilar 2.9 kV, voltagem do cone 21V, temperatura da fonte 150 °C, temperatura de dessolvatação 400 °C, vazão de N₂ 800 L/h, vazão de Ar 0,15 mL/min. Essas condições foram as mesmas apresentadas e as transições monitoradas foram as mesmas já apresentadas na Tabela 1 (Capítulo 2). A diferença nesse caso foi o tempo de monitoramento das transições, nesse caso, todas as transições foram monitoradas no tempo de 0 à 18 minutos.

2.5 Avaliação do volume de injeção e tempo de giro de válvula

Os parâmetros volume de injeção e tempo de giro de válvula foram investigados a fim de garantir uma melhor resposta no sinal analítico obtido. Para isso, foi fortificada uma amostra de água na concentração de 2 µg/L com os parabenos (MeP, EtP, PrP, BuP e BeP). Os volumes de injeção testados foram 30, 37 e 50 µL; os tempos de giro de válvula de 1, 2, 3 e 4 também foram avaliados sendo todos esses ensaios executados em triplicata. A coluna de extração empacotada com a fase Si-GO foi a empregada nessa etapa devido a maior quantidade de fase disponível para realizar os testes iniciais.

2.6 Avaliação das figuras de mérito

A avaliação das figuras de mérito desse método foi realizada baseada no guia de validação do ICH. (67) Os parâmetros avaliados nesse caso foram a seletividade, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), linearidade, exatidão e precisão inter-dias. Água de subsolo foi utilizada como matriz representativa (branco).

A linearidade foi avaliada nas concentrações de 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0 e 10.0 µg/L, com exceção ao BeP onde a concentração de 0.5 µg/L não foi utilizada na construção da curva. Para esse método também foram avaliados os modelos de calibração ponderada sugeridos por Almeida et al. (68)

A exatidão e precisão do método foram avaliadas em três níveis de concentração (0.5, 4.0 e 10 µg/L), com exceção ao BeP onde o primeiro nível não foi avaliado. Cada nível de concentração foi avaliado em triplicata e a precisão determinada pelo coeficiente de variação (CV%).

Essas figuras de mérito foram avaliadas utilizando a coluna de extração com a fase Si-GO. Após essa etapa, uma coluna previamente preenchida com a fase Si-G, também foi usada na avaliação de linearidade com o objetivo de realizar uma comparação entre as colunas empacotadas com as fases Si-GO e Si-G.

3 Resultados e discussão

3.1 Avaliação do volume de injeção e do tempo de giro de válvula

O volume de injeção foi investigado por ser uma variável que pode estar diretamente relacionada com o aumento da intensidade de sinal. Um aumento no volume de injeção, faz com que mais compostos de interesse possam interagir com a fase de extração colaborando para a diminuição do limite de quantificação do método. Na Figura 23A é possível observar que um aumento no volume de injeção da amostra melhora a resposta obtida para todos os compostos (MeP, EtP, PrP, BuP e BeP). Esse aumento na área do pico foi ainda mais acentuado para os compostos BuP e BeP (mais apolares). Por isso, o volume de injeção escolhido para o restante do desenvolvimento foi o de 50 μ L.

O tempo de giro de válvula é uma variável que pode afetar a completa extração dos compostos de interesse, pois interfere no tempo que ele ficará em contato com a fase de extração. Na Figura 23B é possível observar que para quase todos os compostos o tempo de giro de válvula não afetou a extração; a única exceção foi o MeP, onde um tempo de 4 minutos diminuiu a resposta obtida.

Figura 23 – A) Efeito do volume de injeção na área do pico de cada composto. B) Efeito do tempo de giro da válvula para cada composto.

Uma possibilidade para explicar esse fato pode estar relacionada a menor polaridade do MeP em relação aos outros analitos. Dessa forma, em um tempo próximo a 4 minutos parte das moléculas de MeP já passaram pela coluna de extração e foram direcionados para o resíduo. Considerando esse fator, e também, o desvio padrão entre as extrações, o tempo de giro de válvula de 3 minutos foi o escolhido para o restante do desenvolvimento. O resumo das condições utilizadas na avaliação das figuras de mérito está descrito na Tabela 8.

Tabela 8 – Programação dos eventos de giro de válvula utilizados na avaliação das figuras de mérito do método.

Evento	Tempo (min)	vazão (mL/min)	Solvente	Posição da válvula
Extração	0 – 3	0.2	H ₂ O (100%)	Carregamento
Dessorção	3 – 10	0.2	ACN: H ₂ O (40:60, v/v)	Injeção
Limpeza	10 – 15	0.2	ACN (100%)	Injeção
Condicionamento	15 – 18	0.2	H ₂ O (100%)	Carregamento

3.2 Avaliação das figuras de mérito

O LOQ obtido no método foi de 0,5 µg/L para o MeP, EtP, PrP e BuP, com exceção ao BeP que apresentou LOQ de 1 µg/L. Para todos os compostos a faixa linear avaliada foi do LOQ até 10 µg/L.

No estudo da linearidade foi verificado se a variância entre o primeiro e o último ponto da curva eram significativamente diferentes, ou seja, apresentavam heterocedasticidade. Na Tabela 9 são apresentados os valores de F_{exp} para as fases S-G e Si-GO. É possível verificar que para a coluna empacotada com a fase Si-G apenas os compostos EtP e PrP apresentaram variância significativa (heterocedasticidade) entre o primeiro e o último ponto da curva de calibração, ou seja $F_{exp} > F_{tab}$. No caso da fase Si-GO os analitos EtP e BuP tiveram o valor de $F_{exp} > F_{tab}$. Contudo, com intuito de verificar se ocorreria melhora significativa na soma dos resíduos os modelos de calibração ponderada (x^{-2} , x^{-1} , $x^{-0.5}$, y^{-1} , y^{-2} , $y^{-0.5}$), sugerido por Almeida

et al. (68), foram avaliados para todos os compostos. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 10 e na Figura 24.

Tabela 9 - Teste F para os parabenos avaliados empregando as fases Si-G e Si-GO.

	Si-G (F_{exp})	Si-G ($F_{\text{exp}}/F_{\text{tab}}$)	Si-GO (F_{exp})	Si-GO ($F_{\text{exp}}/F_{\text{tab}}$)
MeP	2,5	0,0	0,3	0,0
EtP	289,3	2,9	499,6	5,0
PrP	407,8	4,1	16,9	0,2
BuP	0,7	0,0	14459,9	146,1
BeP	17,6	0,2	61,2	0,6

* $F_{\text{tab}}(2;2;0,99) = 99$

É possível notar na Tabela 10 que o uso de modelos ponderados diminui a soma de resíduos absolutos ($\sum\%RE$), principalmente para o BuP, analito que apresentou variância diferente entre o primeiro e o último ponto da curva. Esse comportamento também foi observado, porém de forma menos acentuada, para o PrP e BeP que apresentaram valores de $F_{\text{exp}} = 16,9$ e $61,2$, respectivamente. O MeP e EtP não apresentaram melhora na somatória de resíduos e, por isso, não foram utilizados os valores obtidos com a calibração ponderada para esses compostos. Esse fato também pode ser observado na Figura 24, onde os gráficos de resíduos dos melhores modelos ponderados são comparados com o modelo não ponderado ($w = 1$). As curvas de calibração levando em consideração o melhor modelo escolhido para cada composto são apresentadas na Figura 25.

Tabela 10 - Parâmetros obtidos na avaliação linear utilizando os modelos ponderados sugeridos por Almeida et al. (2) (x^{-2} , x^{-1} , $x^{-0,5}$, y^{-1} , y^{-2} , $y^{-0,5}$) e modelo sem ponderação (1). Fase de extração Si-GO.

Composto	Peso (w)	a	b	R ²	Σ%RE
MeP	1	792.6	138.1	0.9855	164.6
	x^{-2}	795.6	126.7	0.9786	160.7
	x^{-1}	795.5	127.0	0.9860	160.7
	$x^{-0,5}$	794.7	128.9	0.9867	161.2
	y^{-1}	789.8	123.3	0.9859	157.2
	y^{-2}	778.3	129.5	0.9800	160.3
	$y^{-0,5}$	736.0	438.3	0.9771	463.7
Composto	Peso (w)	a	b	R ²	Σ%RE
EtP	1	564.7	-33.7	0.9830	132.8
	x^{-2}	560.3	-19.9	0.9858	138.3
	x^{-1}	561.7	-22.0	0.9889	137.6
	$x^{-0,5}$	563.3	-27.1	0.9873	135.5
	y^{-1}	557.6	-22.0	0.9885	137.1
	y^{-2}	553.1	-21.2	0.9859	137.0
	$y^{-0,5}$	575.1	-102.2	0.9733	201.8
Composto	Peso (w)	a	b	R ²	Σ%RE
PrP	1	649.1	-122.9	0.9973	89.8
	x^{-2}	633.0	-74.2	0.9934	77.9
	x^{-1}	638.9	-83.1	0.9975	76.5
	$x^{-0,5}$	643.3	-96.4	0.9976	77.8
	y^{-1}	638.4	-85.4	0.9974	75.8
	y^{-2}	634.5	-83.6	0.9918	75.8
	$y^{-0,5}$	702.2	-413.5	1.0072	444.3
Composto	Peso (w)	a	b	R ²	Σ%RE
BuP	1	442.4	-114.7	0.9931	154.0
	x^{-2}	426.7	-63.4	0.9928	80.9
	x^{-1}	430.9	-69.6	0.9944	81.5
	$x^{-0,5}$	435.7	-84.0	0.9941	103.3
	y^{-1}	429.1	-68.7	0.9946	80.2
	y^{-2}	423.8	-63.7	0.9931	77.1
	$y^{-0,5}$	488.4	-368.0	1.0085	576.1
Composto	Peso (w)	a	b	R ²	Σ%RE
BeP	1	167.7	-84.0	0.9829	130.8
	x^{-2}	156.4	-42.6	0.9830	102.4
	x^{-1}	161.5	-55.3	0.9860	107.7
	$x^{-0,5}$	164.4	-66.9	0.9851	112.4
	y^{-1}	160.0	-53.8	0.9860	107.1
	y^{-2}	154.7	-44.7	0.9797	105.0
	$y^{-0,5}$	167.9	-89.2	0.9865	138.9

*Destacado em negrito o modelo escolhido. **a**, coeficiente angular; **b**, coeficiente linear; **R²**, coeficiente de determinação; Σ%RE, somatória dos resíduos absolutos.*

Figura 25 – Curvas de calibração para os modelos utilizados no método “on-line” que emprega Si-GO como fase de extração.

Na Tabela 11 são apresentados os valores de exatidão e precisão obtidos empregando a coluna preenchida com a fase Si-GO. A exatidão do método variou de 88,2 à 111,3%. A precisão, avaliada através do coeficiente de variação (%CV) para os ensaios intra e inter-dias variou de 0,9 à 16,9 e 3,9 à 13,6%, respectivamente. Esses resultados além de estarem de acordo com grande parte dos guias de validação nacionais e internacionais, também apresentam menores variações que o método inicialmente desenvolvido empregando o material sorvente Si-G na técnica MEPS. (82) Esse fato pode ser atribuído ao método de extração ser realizado de forma automatizada, esses métodos geralmente apresentam menor variabilidade que as técnicas de extração “off-line”. (19,20,83)

Tabela 11 – Resultados de exatidão e precisão intra e inter-dias.

Composto	µg/L	Exatidão (%)	CV% (n=3) ¹	CV% (n=3) ²	CV% Inter-dia
MeP	0,5	96,9	12,7	11,6	11,3
	4,0	95,9	13,2	16,9	13,6
	10,0	98,8	0,3	2,3	1,5
EtP	0,5	101,8	9,4	11,2	9,3
	4,0	97,5	8,7	11,6	9,8
	10,0	99,7	10,8	8,9	8,9
PrP	0,5	106,2	8,0	9,5	7,9
	4,0	88,2	8,5	11,4	9,6
	10,0	89,0	10,7	8,8	8,9
BuP	0,5	99,0	0,9	14,0	9,6
	4,0	97,0	1,2	4,3	3,9
	10,0	105,6	4,9	4,9	4,4
BeP	4,0	96,3	4,7	9,7	6,9
	10,0	107,2	7,6	3,6	5,6

¹ Dia 1; ² Dia 2.

3.3 Comparação entre as colunas de extração Si-GO e Si-G

Com o intuito de se obter uma melhor comparação entre as fases Si-GO e Si-G, foi realizado o estudo de linearidade do método empregando uma coluna de extração preenchida com a fase Si-G. Foram utilizadas as mesmas condições de volume de injeção (50 µL) e tempo de giro de válvula (3 minutos) da coluna de extração com a fase Si-GO.

As Figura 26 e Figura 27 mostram cromatogramas representativos da extração “*on-line*” de parabenos na concentração de 2 µg/L, utilizando colunas de extração empacotadas com as fases Si-GO e Si-G, respectivamente. É possível observar que para ambas as fases, o MeP, composto que apresenta o menor valor de Log K_{ow}, o tempo de retenção foi idêntico para as duas colunas de extração. Contudo, para os outros parabenos é possível perceber um aumento no tempo de retenção conforme aumenta o valor de Log K_{ow} desses compostos.

Figura 26 – Cromatograma representativo obtido utilizando coluna de extração preenchida com a fase Si-GO. Amostra utilizada como branco fortificada com os compostos de interesse na concentração de 2 µg/L.

Figura 27 - Cromatograma representativo obtido utilizando coluna de extração preenchida com a fase Si-G. Amostra utilizada como branco fortificada com os compostos de interesse na concentração de 2 µg/L.

Para o PrP o tempo de retenção (R_t) foi de 7,26 e 7,35 para as fases Si-GO e Si-G, repetitivamente, variação de 0,09 minutos. Para o BeP essa variação foi de 0,22 minutos, R_t de 9,34 e 9,56 para as fases Si-GO e Si-G, respectivamente. Essa diferença pode ser atribuída a menor quantidades de grupos hidroxilas (-OH) e carboxilas (-COOH) presentes na fase Si-G que é oriunda da redução da fase Si-GO.

Na Tabela 12 são apresentados os valores de coeficiente angular (a), coeficiente linear (b), coeficiente de determinação (R^2) e tempo de retenção (R_t) obtidos para as duas fases avaliadas (ambas sem utilizar ponderação). É observado que para quase todos os casos, com exceção ao EtP, o coeficiente angular (a) foi maior para a fase Si-G, sugerindo que essa fase apresenta extração ligeiramente superior a fase Si-GO no modo de extração “on-line”. Contudo, essa ligeira melhora não limita ou impossibilita o uso da fase Si-GO, o qual apresenta como vantagem a necessidade de uma etapa a menos em sua síntese o que, consequentemente, reduz os custos para produção em larga escala.

Tabela 12 - Comparação entre colunas preenchidas com Si-GO e Si-G. Modelos sem ponderação para ambas as fases.

Composto		Si-GO	Si-G
MeP	a	792.6	1160.7
	b	138.1	-159.3
	R^2	0.9855	0.9954
	R_t	5.71	5.71
EtP	a	564.7	447.3
	b	-33.7	20.7
	R^2	0.9830	0.9684
	R_t	6.24	6.28
PrP	a	649.1	725.5
	b	-122.9	-184.6
	R^2	0.9973	0.9829
	R_t	7.26	7.35
BuP	a	442.4	464.3
	b	-114.7	-116.8
	R^2	0.9931	0.9902
	R_t	9.07	9.25
BeP	a	167.7	276.8
	b	-84.0	-191.4
	R^2	0.9829	0.9808
	R_t	9.34	9.56

a, coeficiente angular; b, coeficiente linear; R^2 coeficiente de determinação; R_t , tempo de retenção.

3.4 Comparação dos resultados obtidos com dados disponíveis na literatura

Na Tabela 13 são apresentados alguns resultados disponíveis na literatura que utilizam métodos de extração “*on-line*”. É possível perceber que de forma geral os valores obtidos de LOQ do método proposto estão condizentes com os encontrados na literatura, especialmente no caso de análise de parabenos. Com relação ao comprimento da coluna de extração, no método proposto, utilizou uma coluna de 40 mm de comprimento, valor um pouco maior que os encontrados na literatura (10 – 25 mm).

Outro aspecto relevante é referente ao tamanho das partículas da coluna de extração. Os métodos apresentados na Tabela 13 utilizam partículas de 12 - 25 μm , enquanto no presente método o grafeno foi suportado em partículas de 47 μm . O uso de partículas com tamanho maiores influencia o termo A (difusão longitudinal) da equação de Van Deemter; (84) esta pode ser uma razão pela qual alguns picos observados nas Figura 26 e Figura 27 apresentam alargamento de banda. Esse comportamento é observado para o MeP, EtP e PrP, compostos que eluem primeiro e que, por isso, também “percorrem” um caminho maior na coluna de extração.

No que tange os materiais sorventes utilizados, podemos perceber o largo uso de colunas com fase comercial C18, além das baseadas em grafeno e seu óxido. Vale destacar a aplicação descrita por Shamsayei et al. (47) que construíram uma coluna de extração tubular aberta revestida com óxido de grafeno por um processo denominado “eletro polimerização” e que, por isso, utilizam o termo “*in-tube*” ao invés de “*on-line*” SPE.

Tabela 13 – Comparação dos resultados obtidos do método “*on-line*” que utiliza Si-GO com disponíveis na literatura.

Sorvente (coluna de extração)	Compostos	Método	Matriz	LOQ (µg/L)	Ref
C18 (25 × 4 mm, 25 µm)	MeP, EtP, PrP, BuP e BeP ⁽¹⁾	“ <i>on-line</i> ” SPE-LC-MS/MS	Leite materno	5 – 10 ⁽²⁾	(85)
C18 (20 × 2.1 mm, 12 µm)	MeP, EtP, e PrP e BeP ⁽¹⁾	“ <i>on-line</i> ” SPE-LC-MS/MS	Água	0,1 – 0,7	(86)
Politiofeno-GO (10 × 0,75 mm)	Dexepina e ametriplina	“ <i>In-tube on-line</i> ” SPE-LC-UV	Água, urina e plasma	0,3 – 1,7	(47)
Líquido iônico polimérico (10 × 4.6 mm)	Ácidos fenólicos	“ <i>on-line</i> ” SPE-LC-DAD	“ <i>Pollen Typha angustifolia</i> ” extrado	0,01 – 0,04	(87)
PEEK-GO (1/16 in. o.d., 250 µm i.d.)	alcalóides	“ <i>on-line</i> ” SPE-LC-MS/MS	“ <i>Cortex Phellodendri</i> ” e plasma de rato	0,0003	(88)
Si-GO (40 × 2 mm, 47 µm)	MeP, EtP, PrP, BuP e BeP	“ <i>on-line</i> ” SPE-LC-MS/MS	Água	0,5 - 1	MD ⁽³⁾

⁽¹⁾ Outros compostos também foram analisados; ⁽²⁾ LOD; ⁽³⁾ MD – método desenvolvido.

4 Conclusões

Essa etapa do trabalho relata o uso de colunas de extração “*on-line*” que empregam grafeno e óxido de grafeno como material sorvente. Nesse trabalho foram avaliados os parâmetros volume de injeção e tempo de giro de válvula com intuito de encontrar a melhor condição de extração. As melhores condições encontradas foram 50 µL de volume de injeção e tempo de giro de válvula em 3 minutos.

Na avaliação das figuras de mérito do método empregando Si-GO como sorvente, o método apresentou linearidade dentro da faixa de concentração de 0,5 à 10 µg/L, R^2 de 0,9830 à 0,9974, exatidão de 88,2 à 107,2 e CV < 16%. Foi realizada o uso de calibração ponderada apenas para os compostos PrP, BuP e BeP o que melhorou a soma de resíduos nesses casos.

A comparação entre uma coluna de extração empacotada com Si-G e uma outra de Si-GO mostrou que os parabenos, principalmente os mais apolares, ficam mais retidos na coluna

de Si-G. Pelos resultados obtidos é possível inferir que ambas as fases poderiam ser utilizadas para determinação desses analitos em matrizes aquosas.

CAPÍTULO 4

Emprego de grafeno como material sorvente em
microextração por barra de agitação (SBSE)

*“Será talvez
Que minha ilusão
Foi dar meu coração
Com toda força
Pra essa moça
Me fazer feliz
E o destino não quis
Me ver como raiz
De uma flor de lis”*

Djavan, 1976
Flor de Lis

1 Objetivos

O objetivo dessa etapa foi realizar o desenvolvimento e produção de dispositivos de SBSE revestidos com grafeno através de um método simples, de baixo custo e que possibilitasse a produção de uma elevada quantidade de barras para sua utilização em agitador multiposicional. Para isso, foram traçados os seguintes objetivos específicos:

- ✓ Preparar barras de SBSE revestidas com grafeno;
- ✓ Verificar a influência dos parâmetros tempo de extração e dessorção, velocidade de agitação (RPM), força iônica, porcentagem de metanol e solvente de dessorção;
- ✓ Avaliar as figuras de mérito de um método de extração por SBSE, utilizando parabenos como analitos modelo;
- ✓ Aplicar o método em amostras de diferentes matrizes;

2 Materiais e métodos

2.1 Padrões e reagentes

Os padrões de metil parabenho (MeP), etil parabenho (EtP), propil parabenho (PrP), butil parabenho (BuP) foram adquiridos da Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Partindo desses padrões foram preparadas soluções estoque individual desses compostos na concentração de 1000 mg/L em metanol. Essas soluções foram empregadas para fortificar as amostras usadas na etapa de otimização e validação. Os padrões utilizados foram os mesmos descritos no item 2.1 do Capítulo 2.

Os solventes metanol (MeOH) e acetonitrila (ACN), grau de análise cromatográfica, foram adquiridos da Tedia (Fairfield, OH, EUA). O NaCl usado para avaliar o efeito da força iônica no processo de extração pelas barras de extração de SBSE foi adquirido da J.T.Baker (Phillipsburg, NJ, EUA). A p-fenilenodiamina (PFD) e a dimetilformamida (DMF) utilizados na redução do óxido de grafeno a grafeno foram ambas adquiridas da Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Para suportar o grafeno foi utilizado uma resina de secagem rápida do tipo epóxi da marca Araldite® Hobby (Joinville, Brasil).

2.2 Síntese do grafeno

A síntese do grafeno foi iniciada seguindo o procedimento de Hummers, (30,64) como já descrito anteriormente, partindo do grafite para obtenção do óxido de grafeno. Contudo, nessa etapa ao invés de se ligar o óxido de grafeno covalentemente a aminopropil sílica foi realizada sua redução para se obter o grafeno.

Na redução de óxido de grafeno a grafeno, foi utilizado 1,2 g de p-fenilenodiamina (PFD) dissolvidos em 100 mL de dimetilformamida (DMF). Após essa dissolução foi adicionado 100 mL de uma solução de óxido de grafeno em H₂O (1 mg/mL); essa solução foi previamente preparada, ficando em banho de ultrassom por 1 hora antes de ser adicionada a solução de PFD e DMF. A mistura das soluções de óxido de grafeno em água e PFD em DMF foi aquecida em um banho de óleo em uma temperatura de ~ 98 °C e em refluxo por 36 horas. Após esse período essa solução é lavada com acetona para remoção da PFD. Posteriormente a essa etapa, foi realizada a lavagem do material com H₂O ultrapura e o material, é então, finalmente seco em um liofilizador. (89)

2.3 Produção das barras de SBSE

O método utilizado para produção dos dispositivos de SBSE utilizando grafeno como sorvente é apresentado na Figura 28. Em suma, hastes de polipropileno com diâmetro interno de aproximadamente 2 mm foram cortadas com 9 mm de comprimento e lavadas com metanol. Após estarem secas, essas barras foram inseridas, 3 de cada vez, em uma haste de metal e deslizadas em uma placa de vidro onde previamente foi adicionada e misturada a resina epóxi (0,05 g de epóxi + 0,05 g de resina endurecedora). Depois disso, a haste de metal que continha as hastes cortadas de polipropileno foi inserida em um tubo tipo eppendorf com grafeno, fornecendo o dispositivo de SBSE revestido com grafeno. Esses dispositivos foram secos em temperatura ambiente por 24 horas, depois foram lavados em ultrassom com solvente (metanol e acetonitrila) e, finalmente, levados a estufa para serem secos por um período de aproximadamente 20 minutos. Antes da utilização do dispositivo é necessário a inserção de uma haste de metal que será responsável pela rotação do dispositivo na placa de agitação, essa haste foi cortada nas dimensões do dispositivo e previamente lavada com solvente.

Figura 28 – Ilustração do procedimento esquemático de produção das barras de SBSE revestidas com grafeno.

Autoria própria.

2.4 Instrumentação e condições analíticas

Para otimizar as condições de extração por SBSE foi empregado um LC da Shimadzu (Kyoto, Japan) equipado com duas bombas LC- 20AD, um autosampler SIL-20AC, um degaseificador DGU-20A5, uma interface CBM-20A e um detector UV-Vis SPD-20A que operou no comprimento de onda (λ) de 254 nm. A coluna empregada nessa etapa foi uma Poroshell 120 EC-C18 (100 x 3.0 mm, 2.7 μ m) da Agilent (Palo Alto, CA, USA) acoplada a um filtro pré-coluna; a separação foi realizada em modo isocrático com composição acetonitrila:água (40:60 v/v), vazão de 0,3 mL/min e temperatura da coluna mantida à 40°C.

A avaliação das figuras de mérito do método que emprega os dispositivos de SBSE revestida com grafeno foi realizada em um cromatografo da Waters ACQUITY UPLC (Milford, MA, EUA). Esse sistema possui uma bomba binária e “autosampler” que são acoplados a um espectrômetro de massas sequencial XEVO (MS/MS). A ionização dos analitos de interesse foi realizada por electrospray (ESI) operando no modo negativo. As condições do ESI e as reações múltiplas monitoradas para cada analito foram as mesmas já descritas no Capítulo 2 e apresentadas na Tabela 1. Nesse equipamento foi usada uma coluna Poroshell 120 EC-C18 (100 x 2.1 mm, 2.7 μ m) da Agilent (Palo Alto, CA, USA) no modo isocrático, com a composição acetonitrila:água (40:60 v/v), vazão de 0,3 mL/min e temperatura da coluna à 45°C.

2.5 Otimização das condições de extração por SBSE

Para avaliar o efeito das variáveis tempo de agitação, velocidade de agitação e tempo de dessorção foi empregado um planejamento experimental 2^3 com ponto central em triplicata. A Tabela 14 mostra as variáveis e os níveis que foram testados para cada uma.

Tabela 14 – Níveis das variáveis avaliadas no planejamento experimental 2^3 com ponto central.

Variável		Nível		
		-1	0	+1
(1)	Tempo de agitação (min)	60	90	12
(2)	Velocidade de agitação (rpm)	300	500	700
(3)	Tempo de dessorção (min)	10	20	30

Após a otimização pelo planejamento 2^3 foram avaliadas de forma univariada a influência força iônica da amostra, porcentagem de metanol na amostra e solvente de dessorção. O efeito da força iônica na extração por SBSE foi avaliada na presença de 0%, 10%, 20% e 30% de NaCl; as porcentagens de metanol adicionadas na amostras foram 0%, 3%, 6% e 9%; os solventes de dessorção avaliados foram acetonitrila (ACN), metanol (MeOH), MeOH:ACN (50:50) e ACN:H₂O (40:60).

As etapas de otimização (planejamento fatorial e otimização univariada) foram realizadas utilizando como amostra água destilada fortificada com os quatro compostos em estudo (MeP, EtP, PrP e BuP) na concentração de 200 µg/L. As amostras fortificadas foram colocadas em frascos de 10 mL nos quais foram inseridos os dispositivos de SBSE. Após o tempo de agitação estipulado esses dispositivos foram, um a um, removidos com auxílio de um bastão magnético e gentilmente “secos” em um lenço de papel (encostando no lenço apenas uma de suas extremidades para que o excesso de água fosse removido). Depois de “secos” os dispositivos foram inseridos em “*inserts*” de 300 µL onde se adicionou 200 µL de acetonitrila (solvente de dessorção), com exceção da etapa de otimização do solvente de dessorção onde foi adicionada a mesma alíquota do respectivo solvente.

2.6 Avaliação das figuras de mérito

A avaliação das figuras de mérito do método empregando os dispositivos de SBSE revestida com grafeno foi realizada baseado no guia de validação do ICH. (67) Os parâmetros avaliados foram limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), linearidade, exatidão e precisão. Água destilada fortificada com os quatro compostos de interesse (MeP, EtP, PrP e BuP) foi utilizada para avaliar as figuras de mérito do método.

A linearidade do método foi avaliada nas concentrações de cada composto de interesse exemplificadas na Tabela 15. Cada nível de concentração usado na avaliação da linearidade foi avaliado em triplicada, e também utilizado para extrair os valores de exatidão e precisão do método, sendo a precisão determinada através do coeficiente de variação (%CV).

Tabela 15 – Concentrações ($\mu\text{g/L}$) de parabenos utilizadas na avaliação de linearidade.

Composto	P ₁ ($\mu\text{g/L}$)	P ₂ ($\mu\text{g/L}$)	P ₃ ($\mu\text{g/L}$)	P ₄ ($\mu\text{g/L}$)	P ₅ ($\mu\text{g/L}$)
MeP	8	20	40	60	80
EtP	4	10	20	30	40
PrP	2	5	10	15	20
BuP	2	5	10	15	20

2.7 Amostras analisadas

O método proposto empregando barras de SBSE revestidas com grafeno foi aplicado para investigar a presença desses parabenos (MeP, EtP, PrP e BuP) em amostras de diferentes matrizes (alimentos ou água), listadas a seguir: 1- energético; 2 – suco de pêssago; 3 – suco de maçã; 4 – água com gás; 5 – refrigerante sabor “cola”; 6 – refrigerante sabor laranja; 7 – cerveja preta; 8 – cerveja pilsen ; 9 – refrigerante sabor guaraná; 10 – água de coco; 11 – água coletada da fonte de um parque; 12 – água sabor limão; 13 – água coletada em um lago; 14- água coletada de um córrego*; 15 – água coletada de um córrego** (diferente da amostra número 14). Essas amostras foram doadas e adquiridas por colegas do laboratório, ou então, coletadas na cidade de São Carlos-SP. Todas as amostras foram centrifugas a 5000 RPM por 10 minutos, e então analisadas utilizando o método de extração proposto.

3 Resultados e discussão

3.1 Caracterização do grafeno e das barras de SBSE

Foram realizadas análises por difração de raios-x (XRD) nos materiais obtidos durante as etapas de síntese do grafeno (Figura 29). Nela é possível perceber um pico próximo a 10° para o óxido de grafite que diminui de intensidade no óxido de grafeno (GO). Esse fato, pode ser explicado pelo processo de esfoliação em ultrassom do material. Após a redução do óxido de grafeno à grafeno o pico próximo a 10° não aparece mais no difratograma, dando lugar a uma banda larga que inicia em aproximadamente 15° e vai até 35° . Essa banda é característica de materiais amorfos, como é o caso do grafeno.

Figura 29 – Difratogramas de raios-x do óxido de grafite, óxido de grafeno (GO) e grafeno (G).

Na Figura 30 são ilustradas as barras de SBSE revestidas e utilizadas na abordagem desenvolvida. Essas barras foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), como pode ser visto na Figura 31. É possível observar nesta figura (Figura 31) que o revestimento das barras foi realizado com sucesso. Nas imagens (A) e (B), são mostradas uma barra completamente revestida (A), e a ampliação dessa barra 1000x (B), onde é possível perceber a morfologia de nanofolhas do grafeno aderido nas barras de SBSE. Claramente as nanofolhas da imagem (B) se parecem com a imagem (E), que corresponde ao grafeno sem estar aderido nas barras. A imagem (C) mostra uma barra parcialmente recoberta com grafeno (uma parte foi removida, para ilustrar a barra sem e com o revestimento). Além disso, na imagem D é facilmente percebido a formação de um filme que não é totalmente regular devido a presença das nanofolhas de grafeno.

Figura 30 – Barras de SBSE revestidas com grafeno que foram produzidas conforme descrito no item 2.3.

Autoria própria.

3.2 Otimização das condições de extração por SBSE

A extração por SBSE pode sofrer influência das variáveis como tempo de agitação, velocidade de agitação, tempo de dessorção. (14) Por esse motivo, essas variáveis foram avaliadas por um planejamento fatorial 2^3 que também permitem avaliar possíveis interações entre essas variáveis.

Pelos diagramas de pareto apresentados da Figura 32 é possível notar que o tempo de agitação no nível alto (120 minutos) melhora significativamente a extração para o PrP e BuP. Para o MeP e EtP, embora também ocorra melhora, ela não é significativa. Uma hipótese para explicar esse fato, pode ser atribuída ao fato de que os compostos PrP e BuP possuem coeficientes de partição (K_{ow}) mais elevados que o MeP e EtP, e que talvez por isso, um maior tempo de extração favorece a sorção desses dois compostos (PrP e BuP) no grafeno. Aqui vale lembrar que o grafeno é mais hidrofóbico que o óxido de grafeno devido a redução dos grupos hidroxilas (-OH) e carboxilas (-COOH).

Outra observação importante na Figura 32 é que as variáveis velocidade de agitação e tempo de dessorção não apresentaram efeitos significativos na extração individualmente. Entretanto, a interação entre elas influencia significativamente na extração dentro dos níveis testados. A interação que ocorre entre as variáveis velocidade de agitação e tempo de dessorção proporciona melhores extrações quando ambas estão, concomitantemente, em seu nível baixo ou alto. Isso significa que elas devem ser utilizadas em umas das seguintes combinações: velocidade de agitação em 300 RPM e tempo de dessorção 10 minutos ou velocidade de agitação em 700 RPM e tempo de dessorção 30 minutos. Como uma das duas situações tinha que ser escolhida plotamos o gráfico de desejabilidade (Figura 33), para auxiliar na tomada de decisão. Na Figura 33 é possível notar que a condição onde a maior parte da região é favorável a extração é observado quando as duas variáveis estão no nível baixo.

Dessa forma, as condições escolhidas após a otimização por planejamento 2^3 com ponto central das variáveis tempo de agitação, velocidade de agitação e tempo de dessorção foi 120 minutos, 300 RPM e 10 minutos, respectivamente.

Figura 32 – Diagramas de paretos do experimento fatorial 2^3 . (A) MeP, (B) EtP, (C) PrP e (D) BuP.

Figura 33 – Desejabilidade das variáveis otimizadas pelo planejamento 2^3 com ponto central. (A) velocidade de agitação x tempo de agitação, (B) tempo de dessorção x tempo de agitação, (C) tempo de dessorção x velocidade de agitação.

As variáveis força iônica (0%, 10%, 20% e 30% de NaCl), porcentagem de metanol (0%, 3%, 6% e 9%) e solvente de dessorção (ACN:MeOH (50:50), MP = ACN:H₂O (40:60), ACN e MeOH) foram testadas de forma univariada, e os resultados obtidos são mostrados na Figura 34.

A força iônica, pode influenciar na solubilidade dos analitos presentes na amostra (efeito “*salting in*” e “*salting out*”). Embora em alguns trabalhos que avaliam parabenos o aumento da força iônica da amostra favoreça a extração desses compostos (60,74), isso não foi observado no presente caso. Uma possível explicação a esse fato pode ser atribuído aos íons de NaCl também serem adsorvidos na superfície do dispositivo de SBSE, o que pode dificultar a adsorção dos parabenos avaliados devido a formação de uma camada de água no dispositivo.

Figura 34 – Otimização univariada avaliando a influência da força iônica, quantidade de metanol (MeOH) e solvente de dessorção em SBSE/grafeno. (A) influência da força iônica (0%, 10%, 20% e 30% de NaCl); (B) porcentagem de MeOH (0%, 3%, 6% e 9%); (C) solvente de dessorção (ACN:MeOH (50:50), MP = ACN:H₂O (40:60), ACN e MeOH).

A variável porcentagem de metanol (MeOH) na amostra pode, teoricamente, melhorar a extração de analitos apolares devido ao “wall-effect”. (62) Esse efeito recebe essa denominação devido a possível sorção de analitos apolares na parede do frasco de extração. (90) Dessa forma, caso ocorresse alguma melhora seria de se esperar que o composto BuP apresentasse as maiores mudanças devido ao maior valor de log de K_{ow} desse compostos. Contudo como dentro dos valores avaliados, para todos os compostos, os melhores resultados ocorreram quando MeOH (0%) não foi adicionado na amostra.

Finalmente, o solvente usado no processo de extração foi avaliado. Observando a Figura 34C é possível perceber que ACN e uma mistura ACN:MeOH (50:50) foram os que apresentaram melhores resultados de extração, sendo o primeiro (ACN), o escolhido como solvente de dessorção por apresentar os melhores resultados.

Na Figura 35, são mostrados cromatogramas representativos da injeção de uma amostra na concentração de 200 µg/L, uma amostra após a extração e a extração utilizando uma barra de SBSE que não foi revestida com grafeno. É possível observar que extração foi mais eficiente para os dois compostos mais apolares (PrP e BuP), provavelmente devido ao caráter mais hidrofóbico do grafeno. Além disso, o “dispositivo” que não foi recoberto com nenhum material não apresentou sorção dos compostos, sugerindo que de fato essa extração ocorre devido a presença do grafeno na barra de SBSE.

Figura 35 – Cromatogramas representativos mostrando a extração por SBSE. (A) dispositivo não recoberto, (B) amostra fortificada na concentração de 200 µg/L e (C) dispositivo recoberto com grafeno.

3.3 Avaliação das figuras de mérito

O LOQ do método que emprega barras de SBSE revestida com grafeno variou de 2 à 8 $\mu\text{g/L}$ dependendo do compostos avaliado. Os compostos PrP e BuP apresentaram menores LOQs devido a sua melhor extração quando comparados com o MeP e EtP. Provavelmente, isso é um indicativo de que analitos mais apolares possuem maior afinidade pelo grafeno que apresenta menos grupos hidroxilas (-OH) e carboxilas (-COOH) que seu óxido. Isso também pode ser um indicativo de que as interações hidrofóbicas são importantes para a extração que também ocorre por interações π . (91)

Durante o estudo de linearidade do método, na avaliação da homocedasticidade, foi constatado que a variância entre o primeiro e o último ponto da curva não eram significativamente diferentes, Tabela 16. Contudo, ao plotar o gráfico de resíduos (Figura 36), em alguns casos, os valores obtidos para o primeiro ponto da curva (LOQ) foram elevados, e por isso também, foi verificado como esses resíduos ficariam utilizando os modelos ponderados (x^{-2} , x^{-1} , $x^{-0,5}$, y^{-1} e y^{-2}) sugeridos por Almeida et al. (68). Na Tabela 17 são apresentados os valores dos coeficientes linear (b) e angular (a), os valores de coeficiente de determinação (R^2), e também, as somas de resíduos para cada modelo ($\sum\%RE$). A escolha do melhor modelo levou em consideração os valores de $\sum\%RE$ e R^2 .

Tabela 16 - Teste F para o método que emprega barras de SBSE revestidas com grafeno.

	F_{exp}	F_{tab}	$F_{\text{exp}}/F_{\text{tab}}$
MeP	46,0	99,0	0,5
EtP	105,6	99,0	1,1
PrP	10,2	99,0	0,1
BuP	21,9	99,0	0,2

A Figura 37 ilustra as curvas de calibração dos modelos ponderados escolhidos no método. Nela é possível perceber que os compostos que foram melhor extraídos pelas barras de SBSE revestidas com grafeno também apresentaram melhores valores de coeficiente de determinação.

Figura 36 – Gráficos de resíduos do método que utiliza barras de SBSE revestidas com grafeno. À esquerda modelos não ponderados.

Tabela 17 - Parâmetros obtidos na avaliação linear utilizando os modelos ponderados sugeridos por Almeida et al. (2) (x^{-2} , x^{-1} , $x^{-0,5}$, y^{-1} , y^{-2}) e modelo sem ponderação (1). Método que utiliza uma barra de SBSE revestida com grafeno.

Composto	w	a	b	R ²	Σ%RE
MeP	1	66.8	-457.2	0.9248	328.9
	x^{-2}	55.0	-66.2	0.9301	222.3
	x^{-1}	60.0	-176.2	0.9375	243.4
	$x^{-0,5}$	63.0	-284.1	0.9336	277.2
	y^{-1}	57.6	-160.9	0.9317	245.1
	y^{-2}	49.8	-38.1	0.9189	251.1
Composto	w	a	b	R ²	Σ%RE
EtP	1	77.7	-276.5	0.9434	330.0
	x^{-2}	63.9	-51.6	0.9250	220.6
	x^{-1}	70.2	-120.7	0.9449	248.5
	$x^{-0,5}$	73.7	-182.7	0.9464	281.6
	y^{-1}	67.8	-121.3	0.9324	261.4
	y^{-2}	55.8	-29.3	0.8792	316.0
Composto	w	a	b	R ²	Σ%RE
PrP	1	154.3	-169.2	0.9500	279.8
	x^{-2}	129.2	32.5	0.9217	245.3
	x^{-1}	141.3	-33.2	0.9521	223.5
	$x^{-0,5}$	147.4	-88.5	0.9538	245.7
	y^{-1}	139.2	-47.7	0.9486	238.2
	y^{-2}	123.3	18.6	0.9260	254.4
Composto	w	a	b	R ²	Σ%RE
BuP	1	222.9	-137.6	0.9482	255.0
	x^{-2}	193.2	99.2	0.9229	228.4
	x^{-1}	207.8	19.3	0.9535	217.7
	$x^{-0,5}$	215.0	-45.5	0.9542	220.8
	y^{-1}	205.9	-9.8	0.9508	217.5
	y^{-2}	186.6	66.5	0.9261	247.0

*Destacado em negrito o modelo escolhido. **a**, coeficiente angular; **b**, coeficiente linear; **R²**, coeficiente de determinação; **Σ%RE**, somatória dos resíduos absolutos.*

Figura 37 - Curvas de calibração para os modelos ponderados empregados no método que utiliza barras de SBSE revestidas com grafeno.

A avaliação da exatidão e precisão do método é apresentada na Tabela 18. A exatidão para quase todos os casos ficou dentro dos valores aceitos pela maioria dos guias de validação (70 à 120%), as exceções foram: MeP 126,3% (80 µg/L), EtP 121,9% (4 µg/L) e PrP 121,5% (2 µg/L). Os valores de %CV variaram de 2,7% à 29,2%. Os valores de CV maiores que 20% talvez ocorreram devido a técnica de extração ser baseada no equilíbrio de partição entre os analitos na amostra (H₂O) e fase extratora. (9,92,93) Talvez um método que utilize um maior tempo de equilíbrio forneça resultados mais precisos, com a desvantagem de prejudicar a produtividade do método o tornando tedioso e pouco produtivo.

Tabela 18 – Valores de exatidão e precisão do método que emprega uma barra de SBSE revestida com grafeno (n = 3).

Composto	($\mu\text{g/L}$)	Exatidão (%)	CV (%)
MeP	8	105.5	13.4
	20	87.6	23.1
	40	91.4	16.7
	60	89.2	4.9
	80	126.3	7.6
EtP	4	121.9	6.0
	10	85.0	29.2
	20	88.2	19.2
	30	90.0	4.2
	40	115.0	6.5
PrP	2	121.5	22.6
	5	81.9	2.4
	10	93.3	20.6
	15	90.4	5.1
	20	112.9	7.7
BuP	2	118.1	24.8
	5	83.8	10.8
	10	95.2	23.6
	15	93.4	2.7
	20	109.6	12.5

3.4 Aplicação do método em amostras

O método, após desenvolvimento, otimização e validação, foi aplicado na extração de 15 amostras de diferentes matrizes. Os resultados obtidos nas amostras avaliadas empregando o dispositivo de SBSE revestido com grafeno são apresentados na Tabela 19. Para nenhuma amostra foram encontrados os compostos de interesse dentro dos valores de LOQ. Para a amostra 2 (suco de pêssago) foi detectado o PrP, abaixo do LOQ do método não sendo possível quantificar esse composto. Em alguns casos foi verificada a presença de um pico próximo ao tempo de retenção 1,29 min, que difere do tempo obtido para o MeP (1,49 min). Esses picos talvez sejam oriundos de um possível isômero posicional do MeP, visto que a transição 151.03 $\rightarrow$ 135.94 foi mais intensa que a transição 151.03 $\rightarrow$ 91.95 no tempo de retenção 1,29 min. Na Figura 38 é apresentado um cromatograma representativo, após extração por SBSE, para efeito de comparação.

Tabela 19 – Resultados obtidos nas amostras avaliadas empregando a técnica SBSE revestida com grafeno.

Amostra	MeP	EtP	PrP	BuP
1 – Energético	*	-	-	-
2 – suco de pêssago	*	-	< LOQ	-
3 – suco de maça	-	-	-	-
4 – água com gás	-	-	-	-
5 – refrigerante “cola”	-	-	-	-
6 – refrigerante laranja	-	-	-	-
7 – cerveja preta	-	-	-	-
8 – cerveja pilsen	-	-	-	-
9 – refrigerante de guaraná	*	-	-	-
10 – água de coco	*	-	-	-
11 – água coletada fonte do parque ecológico	*	-	-	-
12 – água sabor limão	-	-	-	-
13 – água de água	*	-	-	-
14 – água coletada do córrego 1	-	-	-	-
15 – água coletada do córrego 2	-	-	-	-

* Nesses casos foram detectados picos próximo ao tempo de retenção de 1,29 min.

Embora o método desenvolvido tenha apresentados resultados satisfatórios, para essa etapa de desenvolvimento inicial, é importante efetuar seu aprimoramento para tornar possível a detecção e quantificação desses compostos em níveis mais baixos de concentração. Outro aspecto que também deve ser levado em consideração, é a avaliação da curva de calibração, preferencialmente, construída em cada matriz a ser analisada. Como o intuito inicial era realizar a avaliação da possibilidade de emprego de dispositivos de SBSE revestidos com grafeno, isso não feito. Contudo, com uma possível melhora nos valores de LOQ do método será importante realizar esse tipo de avaliação.

Figura 38 – Cromatograma representativo da extração dos parabenos pela barra de SBSE revestida com grafeno (concentração igual ao P₂, Tabela 15).

3.5 Dificuldades encontras e perspectivas de melhoria

O procedimento de revestimento das barras de SBSE com grafeno é artesanal e isso, certamente, influi nos resultados. Durante o uso das barras de SBSE notou-se que depois de certo tempo de uso (aproximadamente 5 extrações para algumas barras) o filme com grafeno começou a soltar do dispositivo. Quando isso ocorria o filme era recolocado no dispositivo ainda “úmido” e levado a estufa a 50 °C para secagem. Após a secagem era possível reutilizar

o dispositivo novamente. Uma alternativa para contornar esse problema, e melhorar o processo de produção das barras, seria o uso de outro tipo de “resina”, mais adequada ao polipropileno. Essa alternativa poderá, também, a durabilidade do dispositivo e fornecer resultados mais precisos.

3.6 Comparação dos resultados obtidos com disponíveis na literatura

Na Tabela 20 são apresentados alguns métodos encontrados na literatura que utilizam a técnica SBSE e BAμE. De forma geral, os valores de LOQs estão em valores próximos aos obtidos para a maioria dos casos. (49,50,60,74) Contudo, existem métodos que proporcionam menores LOQs que os obtidos. (51,94,95)

O método proposto por Amlashi e Reza (94) utiliza polietileno glicol para suportar CNTs na superfície da barra de SBSE. Os CNTs, assim como o grafeno, podem realizar interações π com os analitos de interesse; entretanto apresentam um impedimento estérico maior que o grafeno devido a sua morfologia. O tempo de extração desse método foi de 70 minutos (valor relativamente baixo lembrando que pode-se efetuar várias análises simultâneas) utilizando um volume de amostra de 50 mL (5 vezes maior que no método proposto), o que pode ser uma limitação em caso de baixa disponibilidade de amostra. Outro fator que certamente colabora para os baixos valores de LOQ foi o comprimento de 15 mm das barras de SBSE utilizadas nesse caso. Para pequenos volumes de amostra o comprimento da barra recomendado é de aproximadamente 10 mm. (90)

Fan et al. (13) realizaram a polimerização de um MIP com grafeno em um dispositivo de politetrafluoretileno de 20 mm. O tempo total de polimerização de uma barra desse método foi de 24 horas. As extrações utilizaram um volume de amostra de 10 mL com tempo de 40 minutos. O valor de LOQ ficou próximo aos valores obtidos no método aqui desenvolvido. Um aspecto interessante desse trabalho é a polaridade do analito (propranolol $\log K_{ow} = -0,45$) e o uso do óxido de grafeno na barra. O óxido de grafeno apresenta grupamentos hidroxila (-OH) e carboxila (-COOH) e, por isso, tem mais afinidade por compostos mais polares como o caso do propranolol quando comparado ao grafeno. No caso do método desenvolvido no presente trabalho os analitos mais apolares foram melhor extraídos, provavelmente devido ao uso de grafeno, o qual tem característica mais apolares que seu óxido.

Com relação aos materiais empregados nos métodos apresentados na Tabela 20, é de se destacar que o uso do grafeno e seu óxido, datam de 2016. Nesses métodos o grafeno ou seu óxido são polimerizado juntos com outro material para formar o revestimento da barra de SBSE, diferentemente do que ocorre no método proposto, onde o grafeno é “suportado” na barra com o auxílio de uma resina epóxi.

Tabela 20 – Métodos disponíveis na literatura que determinam parabenos e/ou outros compostos por SBSE ou BAμE.

Sorvente	Compostos	Método	Matriz	LOQ (μg/L)	Ref
GO-polidopamina	HPAs	SBSE-LC-FLD	água, solo e “poeira”	0,05- 0,15 ²	(51)
Cortiça	EtP, PrP, Benzofenona, triclocarban	BAμE-LC-DAD	água	3 - 20	(60)
PEG-CNTs	HPAs	SBSE-LC-UV	água	0,05- 0,2	(94)
NA	MeP, PrP e benzoato	Eletroforese-DAD	água	1600 - 4000	(96)
Poli-luminol-G	hormônios	SBSE-LC-DAD	leite	1 - 4	(50)
GO-MIP	propranolol	SBSE-LC-UV	urina	1	(49)
PEG	MeP, EtP e PrP ¹	SBSE-LC-MS/MS	água	0,01 – 0,02	(95)
CA	MeP, EtP, PrP e BuP	SBSE-LC-DAD	água	0,3	(74)
G	MeP, EtP, PrP e BuP	SBSE-LC-MS/MS	água	2 - 8	MD

¹ foram estudados outros analitos além desses; ² LOQ (μg/kg); NA - Não se aplica; PEG - polietilenoglicol; CA – carbono ativado; MD – método desenvolvimento.

4 Conclusões

O método proposto descreve o uso de uma abordagem simples, rápida e de baixo custo para produção de dispositivos de SBSE revestidos com grafeno. Esse método, além de possibilitar o emprego das barras de SBSE para extração de parabenos, pode ser uma alternativa viável para avaliação de outros materiais sorventes, assim como ser usado para analisar outras classes de compostos.

Foi realizada, com sucesso, a otimização das variáveis que podem afetar a extração dos compostos avaliados para a barra de SBSE revestida com grafeno. As condições tempo de agitação e a combinação das variáveis tempo e velocidade de agitação mostraram influenciar o processo de extração, utilizando as barras de SBSE confeccionadas. Com relação as variáveis avaliadas univariadamente (porcentagem de NaCl, porcentagem de MeOH e solvente de dessorção) as condições utilizadas foram: 0% de NaCl, 0% de MeOH e ACN como solvente de dessorção.

O método desenvolvido apresentou valores de LOQ que variaram de 2 à 8 $\mu\text{g/L}$, R^2 de 0,9301 à 0,9535, exatidão de 81,9 à 126,3 e $\text{CV} < 30\%$. Dentro dos níveis de concentração avaliados a variância entre o primeiro e último ponto da curva de cada composto não foi diferente; avaliando somente esse cenário, o uso de calibração ponderada não seria necessário. Contudo, a aplicação de ponderação ajudou a diminuir os resíduos no primeiro ponto da curva e, por isso, optou-se por sua utilização.

A aplicação do método a diversos tipos de matrizes mostra que as amostras selecionadas não apresentaram resíduos de parabenos dentro dos níveis de concentração possíveis de quantificar pelo mesmo. Por isso, é necessário realizar melhorias no dispositivo e no método com intuito de atingir menores valores de LOQ. Um fator que talvez colaborasse com isso, seria o uso de outro tipo de resina para melhor aderir o grafeno no dispositivo de SBSE.

O uso de grafeno como sorvente em barras de SBSE demonstra ser uma alternativa viável. Os resultados, até aqui obtidos, demonstram que essa abordagem pode funcionar melhor para compostos mais apolares visto que a extração foi melhor para o PrP e BuP (mais apolares) em relação ao MeP e EtP.

CAPÍTULO 5

Avaliação de materiais baseados em grafeno para extração de outras classes de analitos e uma nova proposta de microtécnica de extração

*“Eu quero ver o pôr do sol
Lindo como ele só
E gente pra ver, e viajar
No seu mar de raio”*

*Djavan, 1984
Lilás*

1 Objetivos

Os objetivos dessa etapa do trabalho consistiram em realizar uma avaliação preliminar da possibilidade de empregar materiais baseados em grafeno como sorventes para extração de outras classes de analitos. Além disso, foi avaliada uma nova técnica de preparo de amostra derivada da SBSE e BAμE. Essas propostas visavam colaborar com as ideias apresentadas nos capítulos anteriores, assim como novas possibilidades de emprego de materiais baseados em grafeno para estudá-las futuramente. Para ambas as tarefas os seguintes objetivos específicos foram traçados:

- ✓ Variar as proporções dos reagentes de síntese do acoplamento entre o GO e as sílica com grupamentos amina (irregular, esférica e PSA);
- ✓ Testar a extração dos materiais sintetizados para as seguintes classes de compostos: parabenos, triazinas, sulfonamidas e anti-inflamatórios não esteroidais;
- ✓ Comparar os materiais sintetizados com fases de extração comercialmente disponíveis;
- ✓ Propor um dispositivo de extração com princípios similares a SBSE e BAμE;
- ✓ Avaliar o método de extração desenvolvido utilizando analitos da classe dos parabenos e anti-inflamatórios não esteroidais.

2 Materiais e Métodos

2.1 Padrões e reagentes

Os padrões de MeP, EtP, PrP e BuP foram adquiridos da Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, EUA), e já mencionado anteriormente (Capítulo 2). Os padrões de triazinas (simazina, atrazina e ametrina) e sulfonamidas (sulfadiazina, sulfatiazol, sulfamerazina, sulfametazol, sulfaclorpiridazina, sulfametoxazol, sulfadimetoxina, sulfaquinoxalina) utilizados no preparo de soluções estoque em acetonitrila e metanol, respectivamente, na concentração de 100 mg/L foram adquiridos da Sigma–Aldrich (Steinheim, Alemanha). Os padrões de anti-inflamatórios não esteroidais naproxeno, ibuprofeno e diclofenaco foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St.

Louis, MO, EUA), o paracetamol foi adquirido da Henrifarma (São Paulo, Brasil), todos foram utilizados para preparar na concentração de 1000 mg/L em metanol.

As partículas de sílica utilizadas para suportar o óxido de grafeno foram: aminopropil sílica irregular da Varian (Lake Forest, CA, EUA), aminopropil sílica esférica da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) e PSA da Supelco (Bellefonte, PA, EUA). Os materiais comerciais utilizados na comparação com os sintetizados foram C18–Chromabond® da Macherey-Nagel (Düren, Germany), HLB Oasis® da Waters (Milford, MA, EUA) e Strata™-X da Phenomenex (Torrance, CA, EUA).

2.2 Síntese dos materiais

A síntese dos materiais foi realizada utilizando partículas de aminopropil sílica irregular e esférica e, também, sílica com grupamentos amino primário e secundário (PSA). Na Tabela 21 são apresentadas as proporções de reagentes utilizadas; o procedimento experimental para ligar o GO na sílica e o de redução foi o mesmo descrito no Capítulo 2. (34)

Tabela 21 – Proporção dos reagentes utilizadas na síntese das fases

Nº	Fase	GO (mg)	DCC (mg)	Ultrassom (min)
1	Si-GO irregular 4%	40	47	160
2	Si-GO irregular 8%	80	83	180
3	Si-GO irregular 12%	120	140	180
4	PSA-GO 8%	80	80	180
5	PSA -GO	40	57	90
6	Si-GO esférica	50	67	180
7	Si-GO esférica*	60	68	180
8	Si-GO irregular*	62	68	180
9	Si-GO esférica*	50	50	180

*Volume de DMF = 100mL; massa de sílica = 1g; *foi adicionado DCC e sílica e mantido em ultrassom por mais 30 minutos antes da etapa de refluxo.*

2.3 Instrumentação e condições de análise

Nessa etapa de avaliação foi utilizado um sistema LC da Shimadzu (Kyoto, Japan) equipado com duas bombas LC- 20AD, um “autosampler” SIL-20AC, um desgaseificador DGU-20A5, uma interface CBM-20A e um detector UV-Vis SPD-20^a. O comprimento de onda (λ) selecionado para a análise foi de 254 nm para os analitos da classe das triazinas, parabenos; 280 nm para as sulfonamidas; e 254 ou 220 nm para os anti-inflamatórios não esteroidais.

As separações cromatográficas foram realizadas empregando uma coluna Poroshell 120 EC-C18 (100 x 2.1 mm, 2.7 μ m) da Agilent (Palo Alto, CA, EUA). Foi utilizada uma vazão de 0,25 mL/min e a temperatura da coluna mantida à 40°C. Para os parabenos, triazinas e anti-inflamatório não esteroidais foram usadas como fase móvel ACN:H₂O com composição de 40, 55 e 55% (0,1% de ácido fórmico), respectivamente, operando no modo isocrático. A separação das sulfonamidas foi realizada utilizando ACN e H₂O com 0,1% de ácido fórmico; iniciando com 8% de ACN condição mantida por 8 minutos, a partir de então essa proporção era aumentada, linearmente, para se chegar a 30% em 20 minutos, onde se retornava a condição inicial (8% de ACN) no tempo de 22 minutos. A composição era então mantida por mais 5 minutos, totalizando uma corrida de 28 minutos.

2.4 Condições de extração e comparação entre as fases extratoras

A comparação preliminar dos diferentes materiais foi realizada utilizando-se amostras de água destilada fortificada com os padrões de interesse nas seguintes concentrações: parabenos, 200 μ g/L; sulfonamidas 100 μ g/L; triazinas 200 μ g/L e anti-inflamatório não esteroidais 200 μ g/L. As extrações foram realizadas utilizando na etapa de amostragem 600 μ L da solução padrão fortificada (para cada classe de compostos). Esta solução passava por 6 ciclos de aspiração (etapa de amostragem), seguidos por 4 ciclos de secagem (sucção de 1 mL de ar) e, só então, a etapa de dessorção era realizada empregando 100 μ L de solvente de dessorção (ACN) em 8 ciclos. A Figura 39 mostra as seringas empacotadas com as fases sintetizadas, todas antes da etapa de redução.

Figura 39 – Seringas empacotadas com as fases de sílica com grupamento amino com óxido de grafeno acoplado. (veja tabela 21 para identidade das fases)

2.5 Confeção dos dispositivos de extração similares ao SBSE e BAμE

A confecção dos dispositivos de extração propostos utiliza uma fita adesiva de dupla face Adelbras 9 mm de largura por 1mm de espessura. Essa fita foi recoberta com grafeno em ambos os lados (Figura 40A) e depois cortado com 4 mm de diâmetro; então, uma pequena parte (cerca de 2 mm) e inserida dentro de um tubo de polipropileno (Figura 40B). Os dispositivos foram colocados em ultrassom com MeOH e ACN, respectivamente, por uma hora para o seu condicionamento, e depois disso, foram levados a estufa a 50° C por 30 minutos.

A presente proposta de extração é semelhante a BAμE; a fase extratora não recobre o tubo de polipropileno, mas fica presa por esse tubo, também “flutuando” (Figura 40C) na amostra assim como na BAμE.

Figura 40 – A) fita adesiva dupla face antes e depois do recobrimento com grafeno. B) Dispositivo pronto. C) modo de funcionamento do dispositivo proposto.

2.5.1 Condições de extração utilizadas para avaliar os dispositivos desenvolvidos

As condições de extração utilizadas nos testes iniciais desse dispositivo foram: 10 mL de amostra de água destilada fortificada com parabenos ou anti-inflamatórios não esteroidais na concentração de 200 µg/L; velocidade de agitação do agitador 1100 rpm; tempo de extração 2h; volume do solvente de extração 200 µL de ACN e tempo de dessorção em ultrassom 15 minutos.

3 Resultados e Discussão

3.1 Avaliação das fases sintetizadas

Na avaliação preliminar das novas fases sintetizadas foi realizada uma extração simples empregando apenas as fases baseadas em sílica (irregular e esférica) acopladas ao GO. As condições de extração utilizadas são descritas no item 2.4 deste Capítulo, para cada classe de composto (parabenos, sulfonamidas, triazinas e anti-inflamatórios não esteroidais) e a identificação das fases na Tabela 21.

Após essa etapa, as fases 1 e 3 (aminopropil sílica irregulares com diferentes proporções de GO), fase 5 (PSA) e fase 6 (aminopropil sílica esférica) foram escolhidas para a etapa de redução. Então, foi realizado uma comparação individual para cada uma das fases (1, 3, 5 e 6), antes e depois, da etapa de redução. Para facilitar o entendimento os resultados são apresentados separados de acordo com a classe de cada analito.

3.1.1 Parabenos

As fases sintetizadas que apresentaram os melhores resultados para os parabenos foram as de aminopropil sílica irregular (Fases 1, 2 e 3). Na Figura 41 são apresentados cromatogramas contendo os resultados de extração das fases 1, 2 e 9 antes da etapa de redução. Observa-se que as fases 1 e 2 apresentaram uma extração relativamente melhor que a fase 9 (aminopropil sílica esférica).

Figura 41 – Extração de parabenos com as novas fases sintetizadas.

Na Figura 42 são apresentadas a comparação de uma extração utilizando as fases reduzidas e não reduzidas de cada tipo de sílica, com exceção as fases 1 e 3. Os resultados obtidos para a fase 1, antes e após a etapa de redução do GO, são similares. Para a fase 3 o material obtido após a etapa de redução (Si-G) apresentou melhor extração que o (Si-GO). Por esses motivos, são comparados os materiais reduzidos para as fases 1 e 3.

Pode-se observar (Figura 42), que para a sílica esférica e a PSA, após a etapa de redução do material (Si-G e PSA-G) a extração foi relativamente melhor que a respectiva fase não reduzida (Si-GO e PSA-GO). Para as fases 1 e 3 (sílica irregular utilizando diferentes proporções de GO na síntese) a fase 3 (Si-G), foi relativamente melhor que a fase 1 (Si-G) e, também, as demais fases.

Na Figura 43 mostra-se uma comparação entre a fases 3 e alguns materiais disponíveis comercialmente. Pode-se perceber que, nesse caso, a fase 3 apresentou no mínimo, comportamento ligeiramente melhor que as fases comerciais para os analitos com menor polaridade (MeP e EtP). Para os analitos mais apolares (PrP e BuP) os resultados foram ainda melhores.

Figura 42 – Comparação de desempenho entre fases GO ligadas em diferentes sílicas (irregular, esférica e PSA) antes e após a redução (G).

Figura 43 – Comparação de desempenho entre a fase 3 e fases comerciais.

3.1.2 Sulfonamidas

A avaliação das fases sintetizadas visando o emprego na extração sulfonamidas, sugere que em um primeiro momento, nenhuma delas se destacasse para ser utilizada como sorvente. Para fins de comparação utilizamos as mesmas fases, reduzidas e não reduzidas, utilizadas para os parabenos (Fases 1, 3, 5 e 6). Na Figura 44, são apresentados os resultados de extração para as fases 3, 5 e 6. Nessa etapa as amostras de água destilada fortificada com as sulfas na concentração de 100 µg/L não estavam sendo acidificadas. Sabe-se que as sulfas em pH~7 encontram-se em sua forma ionizadas, o que, pode afetar a extração dependendo do tipo de material sorvente utilizado. (97,98)

Para comparar melhor a extração obtida com o uso das fases sintetizadas com as comerciais optou-se por realizar a acidificação da amostra. Foi verificado que acidificando a amostra com 0,1% de ácido fórmico (AcF), os resultados eram melhorados. Nessa concentração de ácido o pH da amostra ficaria próximo a 3,5 ~ 4,0 e as sulfas se encontram em sua forma neutra. (99)

Figura 44 – Cromatogramas representando a extração das sulfas na concentração de 100 µg/L, amostra sem acidificar.

Na **Erro! Autoreferência de indicador não válida.** são mostrados os cromatogramas obtidos das fases sintetizadas e as comerciais em amostras acidificadas (0,1% AcF) e não acidificadas. É possível perceber que para as fases sintetizadas a adição de ácido na amostra melhora a extração das sulfas, principalmente para as sulfas mais retidas. O mesmo

comportamento foi observado para a fase Strata X (melhores resultados). Para a fase HLB a extração foi praticamente a mesma acidificando ou não a amostra, por isso, é mostrado apenas o resultado da extração com amostra sem acidificação.

De forma geral, os resultados obtidos para as fases Strata X (amostra acidificada) e HLB (ambas) foram melhoradas que os resultados obtidos para as fases sintetizadas. Mesmo mudando o pH da amostra para que a maior parte das sulfas esteja em sua forma neutra, uma porcentagem delas ainda permanece ionizada (cerca de 20%). (99) Talvez por isso, as fases comerciais que tem grupamentos carregados na forma positivo e negativa em sua estrutura consigam extrair melhor esses compostos e são empregadas como sorventes em diversos métodos. (100,101)

Figura 45 – Comparação entre as fases sintetizadas e as comerciais para a extração de sulfas na concentração de 100 µg/L. Cromatogramas de amostras acidificadas com 0,1% de AcF e não acidificadas.

3.1.3 Triazinas

A extração de amostras fortificadas com triazinas foi melhor para as fases que empregaram sílica irregular. A Figura 46 ilustra a extração das fases 1 e 3 antes da etapa de redução.

Na Figura 47, são mostrados cromatogramas comparando as extrações de alguns materiais reduzidos e não reduzidos. Para a fase 5 o material reduzido apresentou melhor extração em relação ao não reduzido. A fase 3, também apresenta o mesmo comportamento.

Para efeito de comparação, o mesmo cromatogramas da fase 3 é comparado com a fase 1 onde é possível notar que eles apresentam comportamentos bem similares. Para a fase 6 os cromatogramas não foram mostrados pois não foi obtido uma boa extração.

Figura 46 - Extração de triazinas (200 µg/L) com as novas fases sintetizadas antes da etapa de redução.

Figura 47 – Cromatogramas mostrando extrações utilizando fases preparadas antes e depois da etapa de redução.

A comparação da fase 1 sintetizada, com fases comercialmente disponíveis, é mostrada na Figura 48. É possível perceber que para as condições testadas a extração foi melhor sucedida para as fases HLB e C18. Além disso, assim como o observado na

Figura 47, a extração para a fase 1 reduzida foi relativamente melhor que a para fase não reduzida. Isso pode ser atribuído a característica mais apolar da fase reduzida. (25,102)

Figura 48 – Cromatogramas comparando as extrações utilizando fases comerciais e sintetizadas para extração de triazinas.

3.1.4 Anti-inflamatórios não esteroidais.

Na avaliação do uso das fases sintetizadas para anti-inflamatórios não esteroidais, as fases sintetizadas mostradas na Figura 49 apresentaram comportamento bem similar. A avaliação do paracetamol ($\log K_{ow} = 0,99$) (99) é prejudicada devido a sua baixa retenção. Para uma melhor avaliação desse analito, seria necessário um melhor desenvolvimento analítico do método. Contudo, o foco principal era realizar uma avaliação preliminar da extração das fases sintetizadas para a presente classe de compostos. Na Figura 49 nota-se que houve um aumento de sinal para os compostos naproxeno, diclofenaco e ibuprofeno. Como as fases sintetizadas mostradas (Figura 49) apresentam comportamento similar, na comparação com fases comerciais foi avaliado apenas a fase não reduzida (Si-GO).

Figura 49 – Cromatogramas mostrando extrações dos anti-inflamatórios não esteroidais. A) $\lambda = 220$ nm e B) $\lambda = 254$ nm.

**Si-G e Si-GO provenientes da fase 3.*

Na Figura 50 é possível notar que o naproxeno e ibuprofeno foram melhor extraídos pela fase Strata-X, já o diclofenaco foi melhor extraído pela fase 3 (Si-GO). Nas amostras desses analitos a acidificação da amostra com 0,1% de AcF melhorou a extração para as fases sintetizadas e Strata X. Isso pode ocorrer devido ao aumento de polaridade dos analitos quando se abaixa o valor de pH. Essa variação de polaridade pode ser observada consultando os gráficos teóricos de Log D para esses analitos (polaridade em função do pH). (99)

Por esses resultados é possível perceber que o uso da aminopropil sílica ligada covalentemente com o óxido de grafeno, apresentou resultados bem similares a fases comerciais, e em alguns casos (diclofenaco) apresentou, inclusive, uma melhor extração. Por isso, esses materiais poderiam ser utilizados como sorventes para a extração desta classe de compostos.

Figura 50 – Cromatogramas mostrando extrações dos anti-inflamatórios não esteroidais utilizando fases sintetizadas e comerciais. A) $\lambda = 220$ nm e B) $\lambda = 254$ nm.

**Si-G e Si-GO provenientes da fase 3.*

3.2 Fases Sintetizadas

A Figura 51 mostra imagens dos MEV realizadas nas fases sintetizadas (apenas para as fases que passaram pela etapa de redução), cujos cromatogramas provenientes das extrações são mostrados nas figuras anteriores neste capítulo. Pode-se perceber folhas de óxido de grafeno e grafeno na superfície da sílica.

Figura 51 – Imagens dos MEVs das fases sintetizadas. (A) Fase 1 Si-GO, (B) Fase 1 Si-G, (C) Fase 3 Si-GO, (D) Fase 3 Si-G, (E) Fase 5 PSA-GO, (F) Fase 5 PSA-G, (G) Fase 6

Na Figura 52 são apresentadas as fotos de algumas das fases sintetizadas, antes e depois da etapa de redução. É possível perceber o escurecimento da fase depois da etapa de redução devido a diminuição dos grupamentos -OH e -COOH. (71,82) Esse efeito é mais pronunciado na Figura 52A, provavelmente devido ao uso de uma menor quantidade de GO na síntese.

Figura 52 – Imagens das fases sintetizadas que antes (esquerda) e depois (direita) da etapa de redução. A) fase 1, B) fase 3, C) fase 5 e D) fase 6.

3.3 Proposta de um novo modo de extração similar a SBSE e BAμE

A ideia de tentar realizar a extração por esse novo modo, surgiu da tentativa de melhorar as barras de SBSE produzidas e discutidas no Capítulo 4. Tentando encontrar outras formas de melhorar a reprodutibilidade de extração, avaliou-se uma proposta, sugerida por alguns autores, de utilizar uma fita dupla face para aderir o material no tubo de polipropileno. (60,62,103) Nesse ponto, encontrou-se um tipo de fita dupla face, de maior espessura, e utilizada em construção civil para fixação. Então, surgiu a ideia de acoplar a fita com o tubo de polipropileno ao invés de colar a mesma no tubo e posteriormente aplicar o material na fita. Alguns aspectos desse dispositivo ainda precisam ser melhor avaliados e aprimorados, podendo gerar o interesse por trabalhos futuros. Há um grande espaço para exploração dessa ideia, principalmente, por possibilitar multi extrações, ser um dispositivo de baixo custo e de fácil construção.

A Figura 53 representa de forma esquemática os modos de extração por SBSE, BA μ E e do dispositivo proposto.

Figura 53 – Representação comparativa entre os dispositivos de SBSE, BA μ E, e o dispositivo proposto.

Autoria própria.

Na Figura 54, são apresentadas imagens de MEV da fita dupla face antes (Figura 54A) e depois (Figura 54B) do recobrimento. Nela é possível ver claramente as folhas de grafeno aderidas na superfície da fita.

Os dispositivos produzidos, foram empregados na extração de parabenos e anti-inflamatórios não esteroidais. Cromatogramas representativos para ambas as classes são apresentados na Figura 55. É possível observar que para os parabenos, o recobrimento com grafeno melhorou significativamente a extração. Já para os anti-inflamatórios não esteroidais essa melhora não foi tão pronunciada. Na Figura 55A é observado a eluição de um pico após o BuP, provavelmente, um derivado do bisfenol que não foi removido na etapa de lavagem do material. Esse pico não foi observado Figura 55B, provavelmente porque mais etapas de lavagem foram realizadas antes da extração desses compostos.

Figura 54 – Imagens de MEV de uma (A) fita antes e (B) depois do recobrimento com grafeno. **Figura 55** – Cromatogramas de uma extração empregando os dispositivos desenvolvidos. (A) parabenos e (B) fármacos não-esteroidais.

As extrações realizadas para essas duas classes mostraram ser reprodutíveis devido ao $CV\% < 15,4\%$ (Tabela 22). Além disso, na Tabela 22, é possível observar, analisando cada classe de analito separadamente, que os valores de $CV\%$ diminuem e os valores da área média aumentam, respectivamente, com o aumento da hidrofobicidade do composto. Isso sugere que as interações hidrofóbicas entre o analito e o material sintetizado e utilizado no dispositivo, também influenciam o processo de extração assim como as interações π . (28)

Os resultados obtidos para essa técnica de extração indicam que ela pode ser considerada uma alternativa viável para realizar extração, principalmente, de compostos mais apolares ($\log P > 2$). A produção desses dispositivos é mais simples que as barras de SBSE sugeridas no Capítulo 4 e também permite sua aplicação em agitadores multi posicionais, tornando possível a realização de extrações simultâneas.

Tabela 22 – Áreas médias e coeficiente de variação (CV%) obtidos para extração de parabenos e anti-inflamatórios não esteroidais utilizando o método proposto.

Compostos	Log Kow¹	Área média (n=6)	CV% (n=6)
<i>Parabenos</i>			
MeP	1,67	10928,5	15,0
EtP	2,03	17664,8	10,2
PrP	2,55	34948,3	6,1
BuP	3,00	70310,3	3,4
<i>Anti-inflamatórios não esteroidais</i>			
Paracetamol	0,91	20704,7	15,4
Naproxeno	2,99	53099,8	14,0
Diclofenaco	4,26	75377,3	3,8

¹ valores de Log Kow obtidos em (4)

Alguns fatores ainda precisam ser avaliados futuramente como, por exemplo, o emprego de outros materiais sorventes que melhorem a extração de compostos com Log P < 2; possibilidade de utilização de outros tipos de fita dupla face; e avaliação e otimização das variáveis que afetam a extração (similares a SBSE e BAμE).

4 Conclusões

Na avaliação das novas fases sintetizadas nesse capítulo, pode-se concluir que de modo geral a fase aminopropil sílica irregular apresentou melhores resultados nas extrações quando comparada com aminopropil sílica esférica e a fase PSA.

A avaliação do emprego dessas fases para diferentes analitos mostrou mais eficiência e para compostos da classe dos parabenos e anti-inflamatórios não esteroidais, tendo as fases caso comportamento no mínimo similar ou então melhor. Para as triazinas, dentro das condições avaliadas, as fases comerciais C18 e HLB apresentaram melhor desempenho que a sintetizada utilizada na comparação. Entretanto, seu uso pode ser uma alternativa, não sendo necessariamente, descartada. Para as sulfas, classe de analitos mais polares utilizados na avaliação, as fases comerciais Strata X (quando a amostra é acidificada) e HLB (acidificada ou

não) apresentaram desempenho superior as fases sintetizadas. Assim pode-se sugerir a emprego de fases similares as sintetizadas para extrair parabenos e anti-inflamatórios não esteroidais em amostras do tipo ambiental, alimentício ou mesmo biológicas.

Em relação aos dispositivos de extração desenvolvidos como alternativa as técnicas SBSE e BAμE, eles apresentaram, inicialmente, resultados promissores para serem empregados como dispositivo de extração. Alguns aspectos ainda precisam ser investigados como, por exemplo, as variáveis que afetam o processo de extração, o uso de outros sorventes no lugar do grefeno ou mesmo o uso de outro material no lugar da fita dupla face (e.g. PDMS). Apesar disso, os resultados iniciais mostraram que a técnica tem potencial para ser mais explorada e já mostrou, dentro das condições testadas, ter potencial para extrair parabenos e anti-inflamatórios não esteroidais, principalmente os mais apolares.

CAPÍTULO 6

Conclusão geral e perspectivas futuras

*“Luz das estrelas
Laço do infinito
Gosto tanto dela assim
Rosa amarela
Voz de todo grito
Gosto tanto dela assim”*

Djavan e Caetano Veloso, 1993
Linha do Equador

Conclusão Geral

No presente trabalho, foi possível desenvolver e aplicar métodos de análise que empregam materiais baseados em grafenos em técnicas modernas de preparo de amostra. Foram utilizados, com sucesso, grafeno e óxido de grafeno suportados em aminopropil sílica na técnica MEPS e em uma coluna de extração “*on-line*”. Além disso, foram desenvolvidas barras SBSE revestidas com grafeno e testes de aplicação de materiais baseados em grafeno e seu óxido suportados em sílica para extração de outras classes de compostos (triazinas, sulfonamidas e anti-inflamatórios não esteroidais). Ao final do trabalho, é proposto um novo dispositivo de extração derivado das técnicas SBSE e BAμE. Esse dispositivo apresentou ser uma alternativa viável, pois sua avaliação inicial foi bem-sucedida na extração de parabenos e anti-inflamatórios não esteroidais.

Com relação as técnicas e métodos desenvolvidos, a MEPS e a extração “*on-line*”, mostraram ser alternativas viáveis para a extração de parabenos em amostras de águas. O dispositivo de SBSE proposto apresentou bom potencial para ser aplicado, principalmente para os analitos mais apolares avaliados (PrP e BuP). Contudo, pequenas melhorias que possibilitem extrações mais precisas seriam um ponto a ser melhorado e considerado para trabalhos futuros. Uma alternativa que pode ser a solução para isso, pode ser o dispositivo proposto (Capítulo 5) derivado da SBSE e BAμE. Esse dispositivo, que também foi revestido com grafeno, realizou boas extrações (ainda não otimizadas) para parabenos e anti-inflamatórios não esteroidais, apresentando melhor resultados para os compostos mais apolares dentre as classes avaliadas.

Com intuito de mostrar uma comparação entre as técnicas modernas de extração utilizadas nesse trabalho na Tabela 23 são apresentados pontos observados durante a utilização de cada uma delas. Com isso, é possível ter um parâmetro comparativo sobre os pontos fortes e fracos de cada uma dessas técnicas.

Tabela 23 – Comparação entre as técnicas modernas de extração utilizadas neste trabalho.

	MEPS	"on-line"	SBSE	Método proposto
Tempo de extração	B	A	E	E
Consumo de amostra	B	A	E	E
Consumo de solvente	B	B	B	B
Múltiplas extrações	C	E	A	A
Custo do dispositivo	A	C	A	A
Facilidade de utilização	A	B	A	A
Possibilidade de automatização	B	A ²	D	D

**Classificação comparativa utilizando uma escala de A (melhor condição) à E (condição menos favorável); ¹ requer o desenvolvimento de um dispositivo para realizar extrações simultâneas; ² já automatizado.*

Perspectivas Futuras

Para todos os materiais desenvolvidos nesse trabalho é possível investigar sua utilização como sorventes para outras classes de analitos. Alguns exemplos sugeridos são flavonoides, poluentes orgânicos e outras classes de fármacos. Esses compostos podem ser avaliados em diferentes tipos de matrizes como, por exemplo, ambiental, alimentícia e biológica.

O método de extração proposto derivado da SBSE e BAμE mostrado no Capítulo 5 apresenta boas possibilidades de ser empregado, principalmente para analitos mais apolares. Pode-se investigar as variáveis que afetam a extração por esse método de forma a otimiza-lo, assim como avaliar o uso de outros materiais como, por exemplo, PDMS para ser utilizado no lugar da fita dupla face. Além disso, pode-se estudar o recobrimento da fita com outros materiais como líquidos iônicos, polímeros molecularmente impresso e outros materiais.

PUBLICAÇÕES NO PERÍODO

Artigos

1. Franco, M.S.; Padovan, R.N.; Fumes, B.H.; Lanças, F.M. An overview of multidimensional liquid phase separations in food analysis. **ELECTROPHORESIS**, v. 37, n. 13, p. 1768–1783, 2016.
2. Fumes, B.H.; Andrade, M.A.; Franco, M.S.; Lanças, F.M. “*on-line*” approaches for the determination of residues and contaminants in complex samples. **Journal of Separation Science**, v. 40, n. 1, p. 183–202, 2017.
3. Nazario, C.E.D.; Fumes, B.H.; Silva, M.R. da; Lanças, F.M. New materials for sample preparation techniques in bioanalysis. **Journal of Chromatography B**, v. 1043, p. 81–95, 2017.
4. 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.
5. Lúcia de Toffoli, A.; Vasconcelos Soares Maciel, E.; Henrique Fumes, B.; Mauro Lanças, F. The role of graphene-based sorbents in modern sample preparation techniques. **Journal of Separation Science**, 2017.

Capítulos de Livro

1. Silva, M.R. da, Fumes, B.H., Nazario, C.E.D., Lancas, F.M. New Materials for Green Sample Preparation. In: 2017, p. 575–599.

REFERÊNCIAS

- 1 WEN, Y.; CHEN, L.; LI, J.; LIU, D.; CHEN, L. Recent advances in solid-phase sorbents for sample preparation prior to chromatographic analysis. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 59, p. 26–41, 2014.
 - 2 GUAJARDO, N.; CARLESI, C.; SCHREBLER, R.; MORALES, J. Applications of Liquid/Liquid Biphasic Oxidations by Hydrogen Peroxide with Ionic Liquids or Deep Eutectic Solvents. **ChemPlusChem**, v. 82, n. 2, p. 165–176, 2017.
 - 3 ZHANG, C.-W.; WANG, C.-Z.; TAO, R. Analysis on the Physicochemical Properties of Ginkgo biloba Leaves after Enzymolysis Based Ultrasound Extraction and Soxhlet Extraction. **Molecules**, v. 21, n. 1, p. 97, 2016.
 - 4 SILVA, M.R.; ANDRADE, F.N.; FUMES, B.H.; LANÇAS, F.M. Unified chromatography: Fundamentals, instrumentation and applications†. **Journal of Separation Science**, v. 38, n. 17, p. 3071–3083, 2015.
 - 5 ALBERTI, G.; AMENDOLA, V.; PESAVENTO, M.; BIESUZ, R. Beyond the synthesis of novel solid phases: Review on modelling of sorption phenomena. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 256, n. 1–2, p. 28–45, 2012.
 - 6 NEZ, O.; GALLART-AYALA, H.; MARTINS, C.P.B.; LUCCI, P. New trends in fast liquid chromatography for food and environmental analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1228, p. 298–323, 2012.
 - 7 PŁOTKA-WASYŁKA, J.; SZCZEPAŃSKA, N.; LA GUARDIA, M. DE; NAMIEŚNIK, J. Miniaturized solid-phase extraction techniques. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 73, p. 19–38, 2015.
 - 8 ARTHUR, C.L.; PAWLISZYN, J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. **Analytical Chemistry**, v. 62, n. 19, p. 2145–2148, 1990.
 - 9 RISTICEVIC, S.; LORD, H.; GÓRECKI, T.; ARTHUR, C.L.; PAWLISZYN, J. Protocol for solid-phase microextraction method development. **Nature protocols**, v. 5, n. 1, p. 122–139, 2010.
- Abdel-Rehim, M. (2003). Method and apparatus for sample preparation using solid phase microextraction. 77.
- 11 MOEIN, M.M.; ABDEL-REHIM, A.; ABDEL-REHIM, M. Microextraction by packed sorbent (MEPS). **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 67, p. 34–44, 2015.
 - 12 BALTUSSEN, E.; SANDRA, P.; DAVID, F.; CRAMERS, C. Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: Theory and principles. **Journal of Microcolumn Separations**, v. 11, n. 10, p. 737–747, 1999.
 - 13 BALTUSSEN, H.A. **New concepts in sorption based sample preparation for chromatography**. Netherlands: 2000.
 - 14 SÁNCHEZ-ROJAS, F.; BOSCH-OJEDA, C.; CANO-PAVÓN, J.M. A Review of Stir Bar Sorptive Extraction. **Chromatographia**, v. 69, p. 79–94, 2009.

- 15 Twister / Stir Bar Sorptive Extraction SBSE. <http://www.gerstel.com/en/twister-stir-bar-sorptive-extraction.htm>. (acessado em 20/06/2017)
- 16 KIM, D.; HAN, J.; CHOI, Y. “on-line” solid-phase microextraction of triclosan, bisphenol A, chlorophenols, and selected pharmaceuticals in environmental water samples by high-performance liquid chromatography-ultraviolet detection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, n. 1, p. 377–387, 2013.
- 17 ŠRÁMKOVÁ, I.; CHOCHOLOUŠ, P.; SKLENÁŘOVÁ, H.; ŠATÍNSKÝ, D. “on-line” coupling of Micro-Extraction by Packed Sorbent with Sequential Injection Chromatography system for direct extraction and determination of betaxolol in human urine. **Talanta**, v. 143, p. 132–137, 2015.
- 18 PUIG, P.; BORRULL, F.; CALULL, M.; AGUILAR, C. Recent advances in coupling solid-phase extraction and capillary electrophoresis (SPE–CE). **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 7, p. 664–678, 2007.
- 19 FUMES, B.H.; ANDRADE, M.A.; FRANCO, M.S.; LANÇAS, F.M. “on-line” approaches for the determination of residues and contaminants in complex samples. **Journal of Separation Science**, v. 40, n. 1, p. 183–202, 2017.
- 20 FRANCO, M.S.; PADOVAN, R.N.; FUMES, B.H.; LANÇAS, F.M. An overview of multidimensional liquid phase separations in food analysis. **ELECTROPHORESIS**, v. 37, n. 13, p. 1768–1783, 2016.
- 21 PADOVAN, R.N. (2015). Degradação de hormônios em águas de abastecimento público por fotocatalise heterogênea solar.
- 22 FERNÁNDEZ-AMADO, M.; PRIETO-BLANCO, M.C.; LÓPEZ-MAHÍA, P.; MUNIATEGUI-LORENZO, S.; PRADA-RODRÍGUEZ, D. Strengths and weaknesses of in-tube solid-phase microextraction: A scoping review. **Analytica Chimica Acta**, v. 906, p. 41–57, 2016.
- 23 COUCHMAN, L. Turbulent flow chromatography in bioanalysis: a review. **Biomedical Chromatography**, n. 26, p. 892–905, 2012.
- 24 FUMES, B.H.; SILVA, M.R.; ANDRADE, F.N.; NAZARIO, C.E.D.; LANÇAS, F.M. Recent advances and future trends in new materials for sample preparation. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 9–25, 2015.
- 25 NAZARIO, C.E.D.; FUMES, B.H.; SILVA, M.R. DA; LANÇAS, F.M. New materials for sample preparation techniques in bioanalysis. **Journal of Chromatography B**, v. 1043, p. 81–95, 2017.
- 26 FONTANALS, N.; BORRULL, F.; MARCÉ, R.M. Ionic liquids in solid-phase extraction. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 41, p. 15–26, 2012.
- 27 BEDWELL, T.S.; WHITCOMBE, M.J. Analytical applications of MIPs in diagnostic assays: future perspectives. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 408, n. 7, p. 1735–1751, 2016.
- 28 LIU, Q.; SHI, J.; JIANG, G. Application of graphene in analytical sample preparation. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 37, p. 1–11, 2012.
- 29 WUEST, J.D.; ROCHEFORT, A. Strong adsorption of aminotriazines on graphene. **Chemical Communications**, v. , n. 17, p. 2923, 2010.

- 30 HUMMERS, W.S.; OFFEMAN, R.E. Preparation of Graphitic Oxide. **Journal of the American Chemical Society**, v. 80, n. 6, p. 1339–1339, 1958.
- 31 NOVOSELOV, K.S. Electric Field Effect in Atomically Thin Carbon Films. **Science**, v. 306, n. 5696, p. 666–669, 2004.
- 32 SPELTINI, A.; STURINI, M.; MARASCHI, F.; CONSOLI, L.; ZEFFIRO, A.; PROFUMO, A. Graphene-derivatized silica as an efficient solid-phase extraction sorbent for pre-concentration of fluoroquinolones from water followed by liquid-chromatography fluorescence detection. **Journal of chromatography. A**, v. 1379, p. 9–15, 2015.
- 33 LIU, Q.; CHENG, M.; LONG, Y.; YU, M.; WANG, T.; JIANG, G. Graphenized pencil lead fiber: Facile preparation and application in solid-phase microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1325, p. 1–7, 2014.
- 34 LIU, Q.; SHI, J.; SUN, J.; WANG, T.; ZENG, L.; JIANG, G. Graphene and Graphene Oxide Sheets Supported on Silica as Versatile and High-Performance Adsorbents for Solid-Phase Extraction. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 50, n. 26, p. 5913–5917, 2011.
- 35 WANG, Y.; WANG, X.; GUO, Z.; CHEN, Y. Ultrafast coating procedure for graphene on solid-phase microextraction fibers. **Talanta**, v. 119, p. 517–523, 2014.
- 36 LI, Y.; XU, H. Development of a novel graphene/polyaniline electrodeposited coating for “on-line” in-tube solid phase microextraction of aldehydes in human exhaled breath condensate. **Journal of chromatography. A**, v. 1395, p. 23–31, 2015.
- 37 WANG, X.; WANG, Y.; QIN, Y.; DING, L.; CHEN, Y.; XIE, F. Sensitive and selective determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in mainstream cigarette smoke using a graphene-coated solid-phase microextraction fiber prior to GC/MS. **Talanta**, v. 140, p. 102–108, 2015.
- 38 CAI, M.-Q.; SU, J.; HU, J.-Q.; WANG, Q.; DONG, C.-Y.; PAN, S.-D.; JIN, M.-C. Planar graphene oxide-based magnetic ionic liquid nanomaterial for extraction of chlorophenols from environmental water samples coupled with liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1459, p. 38–46, 2016.
- 39 XU, K.; WANG, Y.; DING, X.; HUANG, Y.; LI, N.; WEN, Q. Magnetic solid-phase extraction of protein with deep eutectic solvent immobilized magnetic graphene oxide nanoparticles. **Talanta**, v. 148, p. 153–162, 2016.
- 40 WU, Q.; ZHAO, G.; FENG, C.; WANG, C.; WANG, Z. Preparation of a graphene-based magnetic nanocomposite for the extraction of carbamate pesticides from environmental water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 44, p. 7936–7942, 2011.
- 41 LUO, Y.-B.; CHENG, J.-S.; MA, Q.; FENG, Y.-Q.; LI, J.-H. Graphene-polymer composite: extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from water samples by stir rod sorptive extraction. **Anal. Methods**, v. 3, n. 1, p. 92–98, 2011.
- 42 ZHANG, W.; ZHANG, Z.; ZHANG, J.; MENG, J.; BAO, T.; CHEN, Z. Covalent immobilization of graphene onto stainless steel wire for jacket-free stir bar sorptive extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1351, p. 12–20, 2014.
- 43 SHI, R.; YAN, L.; XU, T.; LIU, D.; ZHU, Y.; ZHOU, J. Graphene oxide bound silica for solid-phase extraction of 14 polycyclic aromatic hydrocarbons in mainstream cigarette smoke. **Journal of chromatography. A**, v. 1375, p. 1–7, 2015.

- 44 SITKO, R.; ZAWISZA, B.; TALIK, E.; JANIK, P.; OSOBA, G.; FEIST, B.; MALICKA, E. Spherical silica particles decorated with graphene oxide nanosheets as a new sorbent in inorganic trace analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 834, n. 1, p. 22–29, 2014.
- 45 WANG, X.; LIU, B.; LU, Q.; QU, Q. Graphene-based materials: Fabrication and application for adsorption in analytical chemistry. **Journal of Chromatography A**, v. 1362, p. 1–15, 2014.
- 46 MO, J.; ZHOU, L.; LI, X.; LI, Q.; WANG, L.; WANG, Z. “on-line” separation and pre-concentration on a mesoporous silica-grafted graphene oxide adsorbent coupled with solution cathode glow discharge-atomic emission spectrometry for the determination of lead. **Microchemical Journal**, v. 130, p. 353–359, 2017.
- 47 SHAMSAYEI, M.; YAMINI, Y.; ASIABI, H. Polythiophene/graphene oxide nanostructured electrodeposited coating for “on-line” electrochemically controlled in-tube solid-phase microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1475, p. 8–17, 2016.
- 48 YANG, X.; HU, Y.; LI, G.; ZHANG, Z. Acrylamide-functionalized graphene micro-solid-phase extraction coupled to high-performance liquid chromatography for the online analysis of trace monoamine acidic metabolites in biological samples. **Journal of Separation Science**, v. 38, n. 8, p. 1380–1387, 2015.
- 49 FAN, W.; HE, M.; YOU, L.; ZHU, X.; CHEN, B.; HU, B. Water-compatible graphene oxide/molecularly imprinted polymer coated stir bar sorptive extraction of propranolol from urine samples followed by high performance liquid chromatography-ultraviolet detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1443, p. 1–9, 2016.
- 50 LIU, H.; QIAO, L.; GAN, N.; LIN, S.; CAO, Y.; HU, F.; WANG, J.; CHEN, Y. Electrodeposited poly-luminol molecularly imprinted polymer coating on carboxyl graphene for stir bar sorptive extraction of estrogens in milk. **Journal of Chromatography B**, v. 1027, p. 50–56, 2016.
- 51 ZHANG, Z.; MWADINI, M.A.; CHEN, Z. Polytetrafluoroethylene-jacketed stirrer modified with graphene oxide and polydopamine for the efficient extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Journal of Separation Science**, v. 39, n. 20, p. 4011–4018, 2016.
- 52 OCAÑA-GONZÁLEZ, J.A.; VILLAR-NAVARRO, M.; RAMOS-PAYÁN, M.; FERNÁNDEZ-TORRES, R.; BELLO-LÓPEZ, M.A. New developments in the extraction and determination of parabens in cosmetics and environmental samples. A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 858, p. 1–15, 2014.
- 53 CRISTINA JARDIM, V.; PAULA MELO, L. DE; SOARES DOMINGUES, D.; COSTA QUEIROZ, M.E. 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.
- 54 GALINARO, C.A.; PEREIRA, F.M.; VIEIRA, E.M. Determination of Parabens in Surface Water from Mogi Guaçu River (São Paulo, Brazil) Using Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Based on Low Density Solvent and LC-DAD. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 0, n. 0, p. 1–9, 2015.
- 55 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.

- 56 KANG, K.-S.; CHE, J.-H.; RYU, D.-Y.; KIM, T.-W.; LI, G.-X.; LEE, Y.-S. 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.
- 57 ROUTLEDGE, E.J.; PARKER, J.; ODUM, J.; ASHBY, J.; SUMPTER, J.P. Some Alkyl Hydroxy Benzoate Preservatives (Parabens) Are Estrogenic. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 153, n. 1, p. 12–19, 1998.
- 58 SOUZA, I.D.; MELO, L.P.; JARDIM, I.C.S.F.; MONTEIRO, J.C.S.; NAKANO, A.M.S.; QUEIROZ, M.E.C. Selective molecularly imprinted polymer combined with restricted access material for in-tube SPME/UHPLC-MS/MS of parabens in breast milk samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 932, p. 49–59, 2016.
- 59 DJATMIKA, R.; HSIEH, C.-C.; CHEN, J.-M.; DING, W.-H. Determination of paraben preservatives in seafood using matrix solid-phase dispersion and “on-line” acetylation gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 1036, p. 93–99, 2016.
- 60 DIAS, A.N.; SILVA, A.C. DA; SIMÃO, V.; MERIB, J.; CARASEK, E. 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.
- 61 CABALEIRO, N.; LA CALLE, I. DE; BENDICHO, C.; LAVILLA, I. An overview of sample preparation for the determination of parabens in cosmetics. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 57, p. 34–46, 2014.
- 62 NOGUEIRA, J.M.F. Stir-bar sorptive extraction: 15 years making sample preparation more environment-friendly. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 214–223, 2015.
- 63 HAMAN, C.; DAUCHY, X.; ROSIN, C.; MUNOZ, J.-F. Occurrence, fate and behavior of parabens in aquatic environments: A review. **Water Research**, v. 68, p. 1–11, 2015.
- 64 POH, H.L.; ŠANĚK, F.; AMBROSI, A.; ZHAO, G.; SOFER, Z.; PUMERA, M. Graphenes prepared by Staudenmaier, Hofmann and Hummers methods with consequent thermal exfoliation exhibit very different electrochemical properties. **Nanoscale**, v. 4, n. 11, p. 3515–3522, 2012.
- 65 GENGLER, R.Y.N.; SPYROU, K.; RUDOLF, P. A roadmap to high quality chemically prepared graphene. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 43, n. 37, p. 374015, 2010.
- 66 ABDEL-REHIM, M. Microextraction by packed sorbent (MEPS): A tutorial. **Analytica Chimica Acta**, v. 701, n. 2, p. 119–128, 2011.
- 67 International Conference on Harmonisation (ICH) of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. Harmonised tripartite guideline. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). 2005.
- 68 ALMEIDA, A.M.; CASTEL-BRANCO, M.M.; FALCÃO, A.C. Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods. **Journal of Chromatography B**, v. 774, n. 2, p. 215–222, 2002.

- 69 YANG, S.; FENG, X.; IVANOVICI, S.; MÜLLEN, K. Fabrication of Graphene-Encapsulated Oxide Nanoparticles: Towards High-Performance Anode Materials for Lithium Storage. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 49, n. 45, p. 8408–8411, 2010.
- 70 LUO, Y.-B.; YUAN, B.-F.; YU, Q.-W.; FENG, Y.-Q. Substrateless graphene fiber: A sorbent for solid-phase microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1268, p. 9–15, 2012.
- 71 DREYER, D.R.; PARK, S.; BIELAWSKI, C.W.; RUOFF, R.S. The chemistry of graphene oxide. **Chem. Soc. Rev.**, v. 39, n. 1, p. 228–240, 2010.
- 72 <http://www.chemicalize.org/>(accessed 04.04.16).
- 73 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. **Anal. Methods**, v. 6, n. 2, p. 419–425, 2014.
- 74 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.
- 75 WU, Y.; GUO, C.; ZHANG, N.; BIAN, G.; JIANG, K. Rapid differentiation of ortho -, meta -, and para -isomers of halogenated phenylmethyldene hydrazinecarbodithioates by metal complexation and electrospray ionization mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 28, n. 19, p. 2111–2120, 2014.
- 76 MORAES, L.A.B.; SABINO, A.A.; MEURER, E.C.; EBERLIN, M.N. Absolute configuration assignment of ortho, meta, or para isomers by mass spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 16, n. 4, p. 431–436, 2005.
- 77 CACHO, J.I.; CAMPILLO, N.; VIÑAS, P.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. Improved sensitivity gas chromatography-mass spectrometry determination of parabens in waters using ionic liquids. **Talanta**, v. 146, p. 568–574, 2016.
- 78 LANÇAS, F.M. **Cromatografia em fase gasosa**. São Carlos: Acta Eventos, 1993.
- 79 MARTINS, I.; CARREIRA, F.C.; CANAES, L.S.; SOUZA CAMPOS JUNIOR, F.A. DE; SILVA CRUZ, L.M. DA; RATH, S. Determination of parabens in shampoo using high performance liquid chromatography with amperometric detection on a boron-doped diamond electrode. **Talanta**, v. 85, n. 1, p. 1–7, 2011.
- 80 YE, X.; TAO, L.J.; NEEDHAM, L.L.; CALAFAT, A.M. Automated “on-line” column-switching HPLC–MS/MS method for measuring environmental phenols and parabens in serum. **Talanta**, v. 76, n. 4, p. 865–871, 2008.
- 81 WANG, L.; ZANG, X.; WANG, C.; WANG, Z. Graphene oxide as a micro-solid-phase extraction sorbent for the enrichment of parabens from water and vinegar samples. **Journal of Separation Science**, v. 37, n. 13, p. 1656–1662, 2014.
- 82 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.

- 83 NAZARIO, C.E.D.; SILVA, M.R.; FRANCO, M.S.; LANÇAS, F.M. Evolution in miniaturized column liquid chromatography instrumentation and applications: An overview. **Journal of Chromatography A**, v. 1421, p. 18–37, 2015.
- 84 J.J.; DEEMTER, VAN; F.J.; ZUIDERWEG; KLINKENBERG, A. Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of non ideality in chromatography. **Chemical Engineering Science**, v. 5, p. 271–289, 1956.
- 85 YE, X.; BISHOP, A.M.; NEEDHAM, L.L.; CALAFAT, A.M. Automated “on-line” column-switching HPLC-MS/MS method with peak focusing for measuring parabens, triclosan, and other environmental phenols in human milk. **Analytica Chimica Acta**, v. 622, n. 1–2, p. 150–156, 2008.
- 86 GORGA, M.; PETROVIC, M.; BARCELÓ, D. Multi-residue analytical method for the determination of endocrine disruptors and related compounds in river and waste water using dual column liquid chromatography switching system coupled to mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1295, p. 57–66, 2013.
- 87 DAI, X.; WANG, D.; LI, H.; CHEN, Y.; GONG, Z.; XIANG, H.; SHI, S.; CHEN, X. Hollow porous ionic liquids composite polymers based solid phase extraction coupled online with high performance liquid chromatography for selective analysis of hydrophilic hydroxybenzoic acids from complex samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1484, p. 7–13, 2017.
- 88 WANG, C.; ZHOU, W.; LIAO, X.; ZHANG, W.; CHEN, Z. An etched polyether ether ketone tube covered with immobilized graphene oxide for online solid phase microextraction of quaternary alkaloids prior to their quantitation by HPLC-MS/MS. **Microchimica Acta**, 2017.
- 89 CHEN, Y.; ZHANG, X.; YU, P.; MA, Y. Stable dispersions of graphene and highly conducting graphene films : a new approach to creating colloids of graphene monolayers w. p. 4527–4529, 2009.
- 90 DAVID, F.; SANDRA, P. Stir bar sorptive extraction for trace analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1152, n. 1–2, p. 54–69, 2007.
- 91 IBRAHIM, W.A.W.; NODEH, H.R.; SANAGI, M.M. Graphene-Based Materials as Solid Phase Extraction Sorbent for Trace Metal Ions, Organic Compounds, and Biological Sample Preparation. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 46, n. 4, p. 267–283, 2016.
- 92 KAWAGUCHI, M.; TAKATSU, A.; ITO, R.; NAKAZAWA, H. Applications of stir-bar sorptive extraction to food analysis. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 45, p. 280–293, 2013.
- 93 CAMINO-SÁNCHEZ, F.J.; RODRÍGUEZ-GÓMEZ, R.; ZAFRA-GÓMEZ, A.; SANTOS-FANDILA, A.; VÍLCHEZ, J.L. Stir bar sorptive extraction: Recent applications, limitations and future trends. **Talanta**, v. 130, p. 388–399, 2014.
- 94 AMLASHI, N.E.; REZA, M. Sol – gel coating of poly (ethylene glycol) -grafted multi-walled carbon nanotubes for stir bar sorptive extraction and its application to the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in water. **Journal of Separation Science**, v. 39, n. 17, p. 3445–3456, 2016.

- 95 APARICIO, I.; MARTÍN, J.; SANTOS, J.L.; MALVAR, J.L.; ALONSO, E. Stir bar sorptive extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry determination of polar and non-polar emerging and priority pollutants in environmental waters. **Journal of Chromatography A**, v. 1500, p. 43–52, 2017.
- 96 SILVEIRA PETRUCI, J.F. DA; CARDOSO, A.A.; PEREIRA, E.A. Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação de benzoato, sorbato, metil e propilparabenos em produtos alimentícios utilizando a eletroforese capilar. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1177–1181, 2011.
- 97 FU, X.; LIANG, H.; XIA, B.; HUANG, C.; JI, B.; ZHOU, Y. Determination of Sulfonamides in Chicken Muscle by Pulsed Direct Current Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 37, p. 8256–8263, 2017.
- 98 ČIZMIĆ, M.; BABIĆ, S.; KAŠTELAN-MACAN, M. Multi-class determination of pharmaceuticals in wastewaters by solid-phase extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry with matrix effect study. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 25, p. 20521–20539, 2017.
- 99 <http://www.chemicalize.org/>(accessed 01.09.17).
- 100 DMITRIENKO, S.G.; KOCHUK, E. V.; APYARI, V. V.; TOLMACHEVA, V. V.; ZOLOTOV, Y.A. Recent advances in sample preparation techniques and methods of sulfonamides detection – A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 850, p. 6–25, 2014.
- 101 PEIXOTO, P.S.; TÓTH, I. V.; SEGUNDO, M.A.; LIMA, J.L.F.C. Fluoroquinolones and sulfonamides: features of their determination in water. A review. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 96, n. 2, p. 185–202, 2016.
- 102 LÚCIA DE TOFFOLI, A.; VASCONCELOS SOARES MACIEL, E.; HENRIQUE FUMES, B.; MAURO LANÇAS, F. The role of graphene-based sorbents in modern sample preparation techniques. **Journal of Separation Science**, 2017.
- 103 ANDRADE, F.N.; IDE, A.H.; NENG, N. DA R.; LANÇAS, F.M.; NOGUEIRA, J.M.F. Determination of trace levels of triazines in corn matrices by bar adsorptive microextraction with a molecularly imprinted polymer. **Journal of Separation Science**, v. 39, n. 4, p. 756–761, 2016.