INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

Filtros UV em água do mar: desenvolvimento e validação de método utilizando as técnicas SD-DLLME e LC-MS/MS e avaliação de amostras do litoral paulista

JOYCE RODRIGUES MARQUES

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Doutor em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Materiais

Orientadora:
Profa. Dra. Marycel Elena Barboza Cotrim

São Paulo
2021

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

Filtros UV em água do mar: desenvolvimento e validação de método utilizando as técnicas SD-DLLME e LC-MS/MS e avaliação de amostras do litoral paulista

Versão Corrigida

Versão Original disponível no IPEN

JOYCE RODRIGUES MARQUES

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Doutor em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Materiais

Orientadora:
Profa. Dra. Marycel Elena Barboza Cotrim

São Paulo

2021

Fonte de Financiamento: CNPq Processo 141831/2017-0

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Como citar:

MARQUES, . J. R. . ***Filtros UV em água do mar***: desenvolvimento e validação de método utilizando as técnicas SD-DLLME e LC-MS/MS e avaliação de amostras do litoral paulista. 2021. 264 f. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN, São Paulo. Disponível em: ‹http://repositorio.ipen.br/› (data de consulta no formato: dd/mm/aaaa)

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de geração automática da Biblioteca IPEN, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Marques, Joyce Rodrigues
Filtros UV em água do mar: desenvolvimento e validação de método utilizando as técnicas SD-DLLME e LC-MS/MS e avaliação de amostras do litoral paulista / Joyce Rodrigues Marques; orientadora Dra. Marycel Elena Barboza Cotrim. -- São Paulo, 2021.
264 f.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear (Materiais) -- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2021.

1. Química Ambiental. 2. Química Analítica. 3. Espectrometria de Massas. 4. Cromatografia Líquida. I. Barboza Cotrim, Dra. Marycel Elena, orient. II. Título.

À Deus e à toda minha família

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pelo dom do pensar.

À Profª Drª Marycel Elena Barboza Cotrim pela oportunidade, confiança e incentivo, ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/CNEN), principalmente ao Centro de Química e Meio Ambiente (CEQMA), pela infraestrutura de trabalho e ao CNPq pelo apoio financeiro concedido (Processo de Bolsa n° 141831/2017-0).

À equipe do CEQMA, Elias, Martinha e Joãozinho pelo auxílio e todo suporte que me deram neste período.

Às pessoas que me deram não só apoio técnico-científico, mas também estiveram ao meu lado, minhas amigas Lucilena Rebelo Monteiro, Tatiane B. S. C. Silva, Mainara G. Faustino, Thamiris B Stellato, Débora Pirani e Camila Tanzillo. Elas sempre que me acompanharam, me apoiaram, e me oferecem o que foi preciso para que eu chegasse aonde eu desejava.

Agradeço às pessoas maravilhosas que contribuíram com a realização de cada etapa deste trabalho, Daniel Lebre, Daniela Daniel, Fernando Lopes, e em especial à Shimadzu do Brasil e toda equipe de aplicação, pela estrutura fornecida e apoio para a realização deste trabalho.

À equipe do Laboratório de Sistemas Planctônicos (LAPS) do Instituto Oceanográfico da USP, principalmente à Luciana Rocha Frazão, pelo auxílio na realização das coletas em Ubatuba-SP.

Um agradecimento incomensurável ao meus pais, Rodes e Placidio, por estarem sempre comigo fazendo tudo por mim e para mim e à minha família por ser tão unida e amável.

E ao meu amor e parceiro.

Quem não tem jardins por dentro, não planta jardins por fora [...]

Rubem Alves

RESUMO

MARQUES, Joyce R. ***Filtros UV em água do mar: desenvolvimento e validação de método utilizando as técnicas SD-DLLME e LC-MS/MS e avaliação de amostras do litoral paulista***. 2021, 264p. **Tese** (Doutorado em Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP. São Paulo

Os filtros UV são compostos ativos presentes em formulações cosméticas, que têm como finalidade proteger dos raios ultravioletas UVA e UVB. Nos últimos anos estes compostos vêm sendo estudados em avaliações ambientais, devido aos potenciais efeitos ambientais negativos que podem causar, portanto já foram quantificados em água do mar de países como Espanha, Japão, Estados Unidos, China, Itália e Grécia. Desta forma este trabalho teve como objetivo desenvolver, validar a aplicar uma metodologia analítica para quantificação dos filtros UV benzofenona-3, octinoxato, avobenzona e octocrileno e aplicá-la para análise de amostras coletadas nas praias de Santos, São Vicente e Ubatuba, municípios turísticos do litoral de São Paulo. A metodologia desenvolvida utiliza a técnica Micro extração líquido-líquido dispersiva com solvente demulsificante para o preparo de amostras, e foi otimizada por estudo estatístico multifatorial, e as quantificações foram realizadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à espectrometria de massas em 5 minutos. A metodologia desenvolvida contempla a faixa de trabalho de 0,1 a 5,0 ng mL^{-1} para todos os analitos, precisão com DPR% abaixo de 30% e recuperação entre 73 e 139 %. Foram analisadas amostras coletadas Santos e São Vicente em 2018 e em Ubatuba em 2019 e 2020 e foi identificada a presença dos filtros UV OMC (0,11 a 0,15 ng mL^{-1}), BMDM (0,16 ng mL^{-1}) e OCT (0,14 a 0,32 ng mL^{-1}) nas praias da Baixada Santista e BP3 (0,10 a 0,99 ng mL^{-1}), OMC (0,12 a 0,26 ng mL^{-1}), BMDM (0,13 ng mL^{-1}) e OCT (0,10 a 0,32 ng mL^{-1}) em Ubatuba. Também foi realizada uma análise exploratória complementar, utilizando espectrometria de massas de alta resolução, com analisadores Quadrupolo – Tempo de Voo, e foi identificada a presença de fármacos sintéticos como 17-estradiol, 17a-etinilestradiol, ofloxacina bisoprolol e atenolol em pontos de coleta de Santos e Ubatuba, evidenciando a influência do lançamento de esgoto sanitário na qualidade das águas do litoral paulista.

Palavras-chave: Filtros ultravioleta; Micro extração líquido-líquido dispersiva com solvente demulsificante; CLAE-EM/EM; Fármacos e Produtos de Higiene pessoal; poluentes emergentes

ABSTRACT

MARQUES, Joyce R. **UV Filters in seawater: method development and validation using SD-DLLME and LC-MS/MS techniques and São Paulo coast evaluation**. 2021, 264p. **Tese** (Doutorado em Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP. São Paulo

UV filters are active ingredients present in cosmetic formulations, which are intended to protect against UVA and UVB ultraviolet rays. In recent years these compounds are being studied in environmental assessments, due to the negative environmental effects they can cause, as a result they have already been quantified in sea water from countries such as Spain, Japan, United States, China, Italy, and Greece. Thus, this work aimed to develop, validate, and apply an analytical methodology for quantification of the UV filters, benzophenone-3, octinoxate, avobenzone and octocrylene and apply this methodology in the analysis of samples collected on the beaches of Santos, São Vicente and Ubatuba, from tourist cities on the coast of São Paulo. The developed methodology uses the solvent demulsification dispersive liquid-liquid micro extraction technique for sample preparation, optimized by multifactorial statistical study, and the quantitation were carried out by High Performance Liquid Chromatography coupled with Mass Spectrometry in 5 minutes. The developed methodology includes a working range of 0.1 to 5.0 ng mL^{-1} for all analytes, precision with RSD below 30% and recovery between 73 and 139%. Samples collected at Santos and São Vicente beaches in 2018 and at Ubatuba in 2019 and 2020 were analyzed and the presence of OMC (0.11 to 0.15 ng mL^{-1}), BMDM (0.16 ng mL^{-1}) and OCT (0.14 to 0.32 ng mL^{-1}) were identified on the beaches of Baixada Santista and BP3 (0.10 to 0.99 ng mL^{-1}), OMC (0.12 to 0.26 ng ml^{-1}), BMDM (0.13 ng ml^{-1}) and OCT (0.10 to 0.32 ng ml^{-1}) on Ubatuba beaches. A complementary exploratory analysis was also carried out using high resolution accurate mass technique, using Quadrupole – Time of Flight analyzers, and the presence of synthetic drugs, such as 17-estradiol, 17a-ethinylestradiol, ofloxacin bisoprolol and atenolol in samples from Santos and Ubatuba, evidence the influence of sanitary wastewater release on the water quality of the São Paulo coast.

Key words: UV filters; SD-DLLME; Seawater; ST-DLLME; PPCP; Pharmaceuticals and Personal Care Products; emerging pollutant; water quality

LISTA DE TABELAS

Páginas

Tabela 1 – Estrutura molecular, Transições e outras informações dos analitos ...62
Tabela 2 – Fatores e variações estudadas 64
Tabela 3 – Combinação de ensaios para a avaliação da robustez de acordo com o Teste de Youden 65
Tabela 4 – Referências dos pontos de coleta em Santos e São Vicente 73
Tabela 5 – Referências dos pontos de coleta em Ubatuba 74
Tabela 6 – Parâmetros de aquisição do método DIA 77
Tabela 7 – Compostos pesquisados na análise utilizando HRAM QTOF – Parte 1 78
Tabela 8 – Compostos pesquisados na análise utilizando HRAM QTOF – Parte 2 79
Tabela 9 – Compostos pesquisados na análise utilizando HRAM QTOF – Parte 3 80
Tabela 10 – Compostos pesquisados na análise utilizando HRAM QTOF – Parte 4 81
Tabela 11 – Compostos pesquisados na análise utilizando HRAM QTOF – Parte 5 82
Tabela 12 – Compostos pesquisados na análise utilizando HRAM QTOF – Parte 6 83
Tabela 13 – Transições e energias otimizadas 87
Tabela 14 – Condições cromatográficas 88
Tabela 15 – Parâmetros de interface otimizados 90
Tabela 16 – Desvio padrão relativo (DPR) obtido para cinco replicatas de cada ponto da curva analítica 95
Tabela 17 – Teste T para comparação entre as inclinações das retas 97
Tabela 18 – Valor máximo de Z calculado para 35 observações 97
Tabela 19 – Resultados da Análise de Variância (ANOVA) 101
Tabela 20 – Resultados de Limite de Detecção do Método, n = 3 102
Tabela 21 – Resultados de Repetibilidade 103
Tabela 22 – Resultados de Precisão Intermediária 104
Tabela 23 – Resultados de Recuperação 104

Tabela 24 – Resultados do teste de Estabilidade após 24 horas.....105
Tabela 25 – Resultados das amostras coletadas em Santos - 2018.....109
Tabela 26 – Resultados das amostras coletadas em Ubatuba - 2019 114
Tabela 27 – Classificação de balneabilidade praias de Ubatuba em 2019 115
Tabela 28 – Resultados das amostras coletadas em Ubatuba - 2020 118
Tabela 29 – Dados mensais do índice pluviométrico para Ubatuba em 2020.....120

LISTA DE FIGURAS

Páginas
Figura 1 – Faixa de radiação UV no espectro eletromagnético 26
Figura 2 – Ressonância na molécula de benzofenona-3.....31
Figura 3 – Estrutura Básica dos cinamatos 32
Figura 4 – Ressonância na molécula de avobenzona 33
Figura 5 – Estrutura do composto octocrileno 33
Figura 6 – Fontes diretas e indiretas de filtros UV no meio ambiente 35
Figura 7 – Publicações com a palavra-chave "*UV Filter*" na Área Ambiental 36
Figura 8 – Relação de citações com palavra-chave "*UV Filter*" na Área Ambiental 36
Figura 9 – Resumo de como os filtros UV podem afetar diferentes espécies marinhas 38
Figura 10 – Esquema gráfico da extração SD-DLLME 42
Figura 11 – Resultados obtidos com LC-MS 45
Figura 12 – Sistema de LC-MS.....46
Figura 13 – Aplicação para diferentes fontes de ionização 48
Figura 14 – Fonte de ionização ESI.....49
Figura 15 – Quadrupolo 50
Figura 16 – Comportamento dos íons de acordo com equação de Mathieu 51
Figura 17 – Analisador tipo tempo de voo 54
Figura 18 – População flutuante dos municípios do litoral de São Paulo.....71
Figura 19 – Pontos de coleta em Santos, São Vicente 72
Figura 20 – Pontos de coleta em Ubatuba 75
Figura 21 – Cromatogramas e espectro de varredura dos íons precursores 84
Figura 22 – Atribuição dos fragmentos selecionados 86
Figura 23 – Testes dos parâmetros de interface 89
Figura 24 – Cromatograma dos analitos em concentração de 100,00 ng mL^{-1} em solução.....90
Figura 25 – Ordenação de Fatores e Gráfico Rankit para otimização da SD-DLLME 91
Figura 26 - Esquema do Procedimento de extração 94

Figura 27 – Comparação entre curvas analíticas preparadas sem matriz (água salinizada) e com matriz 96
Figura 28 – Gráfico dos Resíduos Absolutos 98
Figura 29 – Curvas Analíticas com equação da reta e r^2.....99
Figura 30 – Gráficos de Resíduos Normalizados 100
Figura 31 – Cromatogramas obtidos no LD - concentração de 0,02 ng mL^{-1} 103
Figura 32 – Cromatogramas dos testes de Robustez do Método Analítico.....106
Figura 33 – Média de chuvas por municípios, de acordo com a época do ano...109
Figura 34 – Classificação das praias em janeiro de 2018 111
Figura 35 – Resultados de OCT para a coleta realizada em Santos - 2018 112
Figura 36 – Resultados de OMC para a coleta realizada em Santos - 2018.....112
Figura 37 – Mapa de deriva litorânea da Baía de Santos.....113
Figura 38 – Porcentagem semanal de praias Impróprias em 2019 e chuva diária – Litoral Norte 116
Figura 39 – Resultados de BP3 para a coleta realizada em Ubatuba - 2019.....117
Figura 40 – Resultados de OCT para a coleta realizada em Ubatuba - 2019.....117
Figura 41 – Classificação de balneabilidade para as praias do litoral norte em 2020 119
Figura 42 – Resultados de OCT para a coleta realizada em Ubatuba - 2020.....120
Figura 43 – Resultados de OMC para a coleta realizada em Ubatuba - 2020 121
Figura 44 – Resultados de BP3 para a coleta realizada em Ubatuba - 2020.....121
Figura 45 – Evolução da porcentagem de praias Próprias em 100% de 2010 a 2019 em comparação com crescimento populacional – A) Baixada Santista; B) Litoral Norte 122
Figura 46 – Cromatograma, espectro de massas e predição de fórmula molecular de 17-estradiol – Praia da Divisa – Santos 2018.....125
Figura 47 – Cromatograma, espectro de massas e predição de fórmula molecular de 17a-etinilestradiol – Praia da Divisa – Santos 2018 126
Figura 48 – Cromatograma, espectro de massas e predição de fórmula molecular de ofloxacina– Praia da Divisa – Santos 2018 127
Figura 49 – Cromatograma, espectro de massas e predição de fórmula molecular de bisoprolol – Praia da Divisa – Santos 2018 128
Figura 50 – Cromatograma, espectro de massas e predição de fórmula molecular de atenolol – Praia da Divisa – Santos 2018.....129

LISTA ABREVIATURAS

4-MBC	enzacamene
<LQ	Menor que o limite de quantificação
ACN	acetonitrila
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APCI	Ionização Química sob Pressão Atmosférica, do inglês *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*
API	Ionização em pressão atmosférica, do inglês *Atmospheric Pressure Ionization*
APPI	Fotoionização à Pressão Atmosférica, do inglês *Atmospheric Pressure Photoionization*
BMDM	avobezona
BP3	benzofenona-3
BP4	benzofenona-4
BPC	Cromatograma de Pico base, do inglês *Base Peak Chromatogram*
CDS	Sistema de Entrega de Calibrante, do inglês *Calibrant Delivery System*
CE	Energia de colisão, do inglês *Colision Energy*
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CGCRE	Coordenação Geral de Acreditação
CIIAGRO	Centro integrado de informações agrometeorológicas
CID	Dissociação induzida por colisão, do inglês *Colision Induced Dissociation*
COLIPA	Associação de Cosméticos e Perfumaria, do inglês *Cosmetic and Perfumary Association*
DDA	Aquisição de Dados Dependente, do inglês *Data Dependent Acquisition*
DIA	Aquisição de Dados Independente, do inglês *Data Independent Acquisition*
DL	Linha de dessolvatação, do inglês *desolvation line*

DLLME	Micro Extração Líquido-líquido Dispersiva, do inglês *Dispersive liquid-liquid micro extraction*
DME	Dose mínima eritematosa
DMEnp	Dose mínima eritematosa de pele desprotegida por protetor solar
DMEp	Dose mínima eritematosa de pele protegida por protetor solar
DMPnp	Dose mínima pigmentária de pele desprotegida por protetor solar
DMPp	Dose mínima pigmentária de pele protegida por protetor solar
DOQ	Documento Orientativo de Qualidade
DPR	Desvio Padrão Relativo ou covariância
EHT	etilhexil triazona
EM	Multiplicadora de Elétrons
EPC	Estação de pré-condicionamento
ESI	ElectroSpray
FDA	Agência de Administração de Alimentos e Medicamentos, do inglês *Food and Drug Administration*
FPS	Fator de Proteção Solar
FPUVA	Fator de proteção de raios ultravioleta do tipo A
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada à Espectrometria de Massas, do inglês *Gas Chromatography Mass Spectrometry*
H_2O_{vapor}	Água em vapor
HCl	ácido clorídrico
HPLC	Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência, do inglês *High Precision Liquid Chromatography*
HRAM	Alta Resolução e Massa Exata, do inglês *High Resolution Accurate Mass*
ICH	Conselho Internacional para Harmonização de Requisitos Técnicos para Medicamentos de Uso Humano, do inglês *International Council for Harmonisation*
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
IPCS	Programa Internacional de Segurança Química, do inglês *International Programme on Chemical Safety*
ISO	Organização Internacional para Padronização, do inglês *International Organization for Standardization*

IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*
K_{OW}	Partição octanol/água
LAPS	Laboratório de Sistemas Planctônicos
LC	Cromatografia Líquida
LC-MS	Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas, do inglês *Liquid Chromatography Mass Spectrometry*
LC-MS/MS	Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas sequencial, do inglês *Liquid Chromatography Mass Spectrometry in tandem*
LD	Limite de Detecção
LD	dessorção líquida, do inglês *liquid dessorption*
LOAEL	Nível do Menor Efeito Observado, do inglês *Lowest Observed Adversed Effect Level*
$[M+H]^+$	Íon protonado
$[M+NH_4]^+$	Íon aduto de amônio
M	Molar
m/z	Razão massa/carga
MALDI	Ionização e dessorção a laser assistida por matriz
MBBT	bisoctrizole
MCP	Prato multicanal
ME	Margem de Erro
MeOH	Metanol
MES	Margem de Erro Simultânea
$MgSO_4$	Sulfato de Magnésio
MM	Massa molar
MPa	Megapascal
MRM	Monitoramento de Reações Múltiplas, do inglês *Multiple Reaction Monitoring*
MS	Espectrômetro de Massas
MS/MS	Analisadores de massas em sequência
N_2	nitrogênio

NOAEL	Nível de Efeito Adverso Não Observado, do inglês *No Observed Adversed Effect Level*
OCT	octocrileno
OMC	octinoxato
PPCP	Fármacos e Produtos de Higiene Pessoal, do inglês *Pharmaceutical and Personal Care Products*
Q1	Primeiro quadrupolo
Q2	Cela de colisão
Q3	Terceiro quadrupolo
QTOF	Quadrupolo tempo de voo em sequência, do inglês *Quadrupole Time of Flight in tandem*
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RT	Tempo de retenção, do inglês *Retention time*
SBSE	Extração sortiva em barra de agitação, do inglês *Stir-bar sorptive extraction*
SPE	Extração em fase sólida, do inglês *solid phase extraction*
S/R	Razão sinal ruído
Scan	Varredura
SD-DLLME	Micro Extração Líquido-líquido Dispersiva com Solvente Demulsificante, do *inglês Solvent Demulsification Dispersive liquid-liquid micro extraction*
SIM	Monitoramento de Íon Selecionado, do inglês *Single Ion Monitoring*
SRM	Monitoramento de Reação Selecionada, do inglês *Single Reaction Monitoring*
ST-DLLME	Micro Extração Líquido-líquido Dispersiva terminada com Solvente, do inglês *Solvent Terminated Dispersive liquid-liquid micro extraction*
TD	Dessorção térmica, do inglês *thermal desorption*
TIC	Cromatograma de íons totais, do inglês *Total Ion Chromatogram*
TOF	Tempo de voo, do inglês *Time of Flight*
TQ	Triploquadrupolo
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultravioleta

UVA	Ultravioleta do tipo A
UVA I	Ultravioleta do tipo A - de 340 a 400 nm
UVA II	Ultravioleta do tipo A - de 320 a 340 nm
UVB	Ultravioleta do tipo B
UVC	Ultravioleta do tipo C
v/v	Volume por volume
VIM	Vocabulário Internacional de Metrologia
VMP	Valores Máximos Permitidos
XIC	Cromatograma de íon extraído, do inglês *Extracted Ion Chromatogram*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 19
2 OBJETIVO 22
3 ASPECTOS DE ORIGINALIDADE 23
4 REVISÃO DA LITERATURA 26
4.1 Filtro Ultravioleta (UV) 26
4.2 Radiação Ultravioleta (UV) e Fator de Proteção Solar (FPS) 27
4.3 Tipos de Filtros UV 29
4.3.1 Filtros UV inorgânicos 30
4.3.2 Filtros UV orgânicos 30
4.3.2.1 Benzofenona-3 (BP3) 31
4.3.2.2 Octinoxato (OMC) 31
4.3.2.3 Avobenzona (BMDM) 32
4.3.2.4 Octocrileno (OCT) 33
4.4 Filtros Solares no Meio Ambiente e seus Efeitos Adversos 34
4.5 Métodos Analíticos para determinação de filtros UV em água do mar 39
5 TÉCNICAS APLICADAS E DESENVOLVIMENTO ANALÍTICO 41
5.1 Micro Extração Líquido-líquido Dispersiva com Solvente Demulsificante (*SD-DLLME*) 41
5.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada à Espectrometria de Massas (LC-MS) 42
5.2.1 Alguns Conceitos Básicos 43
5.2.2 LC-MS - Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência acoplado ao espectrômetro de massas 46
5.2.2.1 Fonte de Íons 48
5.2.2.2 Analisadores de Massas: Quadrupolos 49
5.2.2.3 Analisadores de Massas: Tempo de Voo 54
5.2.2.4 Detectores 56
5.2.2.5 Sistema de vácuo 57
5.3 Validação de Métodos Analíticos 57
5.3.1 Seletividade 58
5.3.2 Faixa de Trabalho e Linearidade 58

5.3.3 Limite de Detecção 59
5.3.4 Limite de Quantificação 59
5.3.5 Precisão 59
5.3.6 Recuperação 60
5.3.7 Robustez 60
6 MATERIAIS & MÉTODOS 61
6.1 Instrumentação 61
6.2 Reagentes, Solventes e Materiais 62
6.3 Desenvolvimento Analítico do método de quantificação 62
6.3.1 Método MRM 62
6.3.2 Método Cromatográfico 63
6.3.3 Otimização da extração por SD-DLLME 63
6.4 Validação de métodos analíticos 67
6.4.1 Faixa de Trabalho 67
6.4.2 Seletividade 67
6.4.3 Premissas 68
6.4.4 Linearidade 68
6.4.5 LD e LQ 68
6.4.6 Precisão 69
6.4.7 Recuperação 69
6.4.8 Estabilidade 24h 69
6.4.9 Robustez 69
6.5 Coleta de Amostra 70
6.6 Áreas de Estudo 70
6.6.1 Baía de Santos e São Vicente 70
6.6.2 Ubatuba 73
6.7 Análise Complementar 76
6.7.1 Análises HRAM QTOF 76
7 RESULTADOS E DISCUSSÃO 84
7.1 Desenvolvimento de Método LC-MS/MS 84
7.2 Otimização da Extração SD-DLLME 90
7.3 Validação de Método 94
1.1.1. Faixa de Trabalho 95
1.1.2. Seletividade 95

1.1.3. Premissas.....97
1.1.4. Linearidade.....98
1.1.5. Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ) do Método 101
1.1.6. Precisão 103
1.1.7. Recuperação.....104
1.1.8. Estabilidade em 24 horas.....105
1.1.9. Robustez 105
7.4 Análise de Amostras.....108
7.4.1 Coleta de Santos - 2018.....108
7.4.2 Coletas de Ubatuba – 2019 e 2020.....113
7.5 Comparação dos Resultados.....122
7.6 Análise Exploratória por HRAM.....123
8 CONCLUSÃO 130
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 133
APÊNDICE A – LOCALIZAÇÃO DOS PONTOS DE COLETA.....144
APÊNDICE B – FOTOS DOS PONTOS DE COLETA.....145
APÊNDICE C – DADOS DA VALIDAÇÃO DE MÉTODO.....179
ANEXO 1 – DADOS DOS PADRÕES ANALÍTICOS.....252

1 INTRODUÇÃO

Os protetores solares são formulações cosméticas que têm como principais ativos os filtros de raios ultravioleta – filtros UV, que são compostos orgânicos ou inorgânicos utilizados para a proteção contra a radiação solar, e agem absorvendo, refletindo ou espalhando os raios UV. Os filtros UV orgânicos geralmente agem absorvendo a radiação, elevando o nível energético da molécula, e consequentemente evitando que estes atinjam a pele, ou a região a ser protegida [1, 2].

O Brasil é o terceiro maior mercado de protetores solares do mundo [3]. Por conta da alta incidência de uso destes produtos, os filtros UV chegam ao meio ambiente direta ou indiretamente, via atividades de recreação, lançamento de efluentes e/ou lixiviação.

Estudos ainda vem sendo realizados, porém há evidências na literatura que estes compostos são persistentes, disruptores endócrinos, podem chegar ao sistema circulatório, sistema nervoso central e outros tecidos, além de causarem outros impactos ambientais negativos, pois quando estão no meio ambiente ficam em contato com a biota e o bioma local [4, 5]. Estes compostos podem causar efeitos adversos que afetam também a dinâmica das populações expostas. Além de serem classificados como poluentes emergentes, ou seja, são compostos com potencial tóxico, mas que não são comumente monitorados nos compartimentos ambientais [6].

Estes compostos foram estudados e encontrados em água do mar na Grécia [7], Espanha [8], Japão [9] [10] e China [11]. Além de outros trabalhos citados por Ramos *et al.* (2015), onde filtros UV foram determinados em outras matrizes ambientais, como água de piscina, água de torneira, sedimento e água

superficial na Espanha, Japão, Estados Unidos, China, Ártico, Itália, Oceano Pacífico e Grécia [12].

Porém não foram encontradas referências de pesquisas que determinem a concentração de filtros UV em águas do mar no Brasil. O que é de extrema importância para o conhecimento das concentrações de filtros UV para o direcionamento de estudos ecotoxicológicos com espécies marinhas locais, para entender o impacto ambiental local. Além de auxiliar na determinação de políticas públicas e implementação de ferramentas de controle ambiental, que podem ser embasadas nestes estudos.

A realização de estudos nas praias do Brasil também pode favorecer a tomada de decisões importantes nas determinações de controle, levando em consideração resultados reais obtidos nas praias paulistas, e não somente a extrapolação de resultados obtidos em outros países.

Os estudos da concentração, destino e maiores fontes dos filtros UV no meio ambiente devem ser realizados para o gerenciamento do lançamento destes contaminantes emergentes, gerenciamento do uso da água e para a conservação dos recursos naturais e regiões de conservação ambiental.

No Brasil, a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 47/ 2006 (da Agência Nacional de Vigilância Sanitária) determina quais os filtros UV permitidos, bem como sua concentração máxima permitida nos produtos comercializados, e a Diretiva Europeia 1223/ 2009 é utilizada como referência mundial para esta área [13, 14]. No entanto, essas não levam em consideração o potencial ecotoxicológico e não há monitoramento e acompanhamento da concentração destes contaminantes no meio ambiente.

Neste trabalho foi avaliada a presença dos compostos octinoxato (OMC), benzofenona-3 (BP3), avobenzona (BMDM) e octocrileno (OCT) em água do mar.

Para o preparo de amostra foi utilizada a técnica desenvolvida por Chen *et al.* (2010) e consiste na injeção de uma mistura de solventes (extrator e dispersor)

em um volume de amostra aquosa [15]. O solvente dispersor auxilia na formação de uma nuvem de gotículas do solvente extrator, que devido à maior área superficial promove a extração dos analitos com maior eficiência. O solvente demulsificante age na quebra da emulsão permitindo a coleta do extrato na parte superior ou inferior da amostra, dependendo da densidade do extrator utilizado [16]. Esta técnica de preparo é uma alterativa rápida e econômica para realizar o enriquecimento dos analitos e *clean up* da amostra.

Para a realização das análises foi desenvolvida uma metodologia *Multiple Reaction Monitoring (MRM*) utilizando a técnica Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas sequencial (do inglês *LC-MS/MS – Liquid Chromatography Mass Spectrometry in Tandem*), devido às baixas concentrações dos analitos e à complexidade da matriz, esta técnica apresenta características que possibilitam a obtenção de resultados com sensibilidade, seletividade e precisão adequados.

Para a otimização do preparo de amostra foi utilizado planejamento de experimento multifatorial e para verificação dos resultados obtidos foi realizada a validação do método, onde foram estudados os parâmetros seletividade, linearidade, faixa de trabalho, limite de detecção e quantificação, precisão, exatidão e robustez.

As áreas de estudos foram os municípios de Santos, São Vicente e Ubatuba. A Baía de Santos e São Vicente, fica situadas no litoral sul do Estado de São Paulo, possui o maior porto da América Latina e é reconhecida como polo turístico do estado. Ubatuba é uma estância balneária situada no litoral norte do estado de São Paulo, e para a realização das coletas e estudos complementares, foi firmada uma parceria com o Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo (USP).

2 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é realizar a quantificação de filtros UV orgânicos octinoxato (OMC), benzofenona-3 (BP3), avobenzona (BMDM) e octocrileno (OCT) em amostras de água do mar do litoral paulista.

Para alcançar o objetivo principal do trabalho foram determinadas metas parciais para o desenvolvimento do estudo, conforme citado abaixo:

- Desenvolvimento Analítico
    - Estudo das características físico-químicas dos compostos OMC, BP3, BMDM e OCT para o desenvolvimento de uma metodologia de preparo e análise destes compostos em água do mar por LC-MS/MS;
    - Otimização dos parâmetros para melhorar a eficiência da extração dos analitos pela metodologia de preparo de amostra e para avaliar a performance do método, validação do método analítico;
    - Definição de um plano de Validação;
    - Análises e avaliação dos dados de validação do método analítico.
- Amostragem
    - Definição dos pontos de coleta de amostras;
    - Realização das coletas de amostras nos municípios de Santos, São Vicente e Ubatuba.
- Análises Químicas
    - Analisar as amostras coletadas na área de estudo, utilizando as metodologias de preparo e análise desenvolvidas;
    - Avaliação e discussão dos resultados com base em outras referências sobre a região e outros estudos de filtros UV.

3 ASPECTOS DE ORIGINALIDADE

Os poluentes emergentes são microrganismos ou compostos químicos (sintéticos ou naturais) que não são comumente monitorados ou regulados no meio ambiente, mas que possuem potencial ou suspeita de efeitos adversos ao meio ambiente ou à saúde humana. Estes contaminantes incluem fármacos e produtos de higiene pessoal (*PPCP* – do inglês *Pharmaceutical and Personal Care Products*) e outras classes de compostos, que em sua maioria são oriundos de produtos que são utilizados continuamente e lançados no meio ambiente mesmo em pequenas quantidades, mas que podem causar efeitos adversos crônicos [6].

Desta forma, a obtenção de ferramentas analíticas que permitem a determinação destes compostos em diferentes matrizes ambientais, com sensibilidade adequada são importantes para que estes compostos sejam quantificados, e seu comportamento e distribuição sejam determinados, complementando assim os estudos de toxicidade e ecotoxicidade destes poluentes e contribuindo para a determinação de padrões de qualidade e valores máximos permitidos (VMP)

Para a implementação de VMPs o Programa Internacional de Segurança Química (*International Programme on Chemical Safety* - IPCS), iniciado em 1980 pela Organização Mundial da Saúde e Organização Internacional do Trabalho, tem como objetivo divulgar e realizar a avaliação dos efeitos de elementos e compostos químicos para a saúde humana e na qualidade do meio ambiente, para que o desenvolvimento dos VMPs ocorra com base em estudos científicos [17].

De acordo com Umbuzeiro, G. para a determinação dos VMP's é realizada uma série de estudos que levam em consideração a toxicidade dos contaminantes para o meio ambiente, para os animais e seres humanos, dependendo do fim ao que a água se destina [18].

São determinados critérios de qualidade de água para compostos capazes de causar efeitos adversos aos organismos expostos e a probabilidade de ocorrência por conta das fontes de poluição e utilização no país, e os valores são determinados com base nas formas de exposição e outras questões técnicas, viabilidade técnica e política, fatores de incerteza [19].

Na determinação de critérios de qualidade com o objetivo de proteção da vida aquática é considerada a ocorrência de efeito crônico, levando em consideração o Nível de Efeito Adverso Não Observado (NOAEL – *No observed adverse effect level)* ou Nível do Menor Efeito Observado (LOAEL – *Lowest observed adverse effect level)*). Também são considerados fatores de incerteza, como a qualidade dos dados toxicológicos disponíveis e variabilidade da resposta interespécie [19].

Os critérios de qualidade para proteção da vida aquática levam em consideração o valor em concentração que previne efeito adverso na biota aquática, baseado em dados de pelo menos 3 espécies (peixe, microcrustáceo e alga) representativas do país. Análises físico-químicas, estudos epidemiológicos e biomarcadores de efeito e exposição também são dados complementares considerados nesta determinação [19].

Assim, a necessidade de desenvolvimento de métodos analíticos adequados e confiáveis para a quantificação de contaminantes é a etapa inicial para a implementação de padrões de contaminantes na água, uma vez que estes desenvolvimentos podem servir como referência e embasamento para quantificações em diferentes áreas de estudo, viabilizando a realização de estudos ecotoxicológicos que levam em consideração a concentração real de contaminantes encontrada em cada região.

Como resultado destes trabalhos desenvolvidos tem-se a atualização das normas e outras ferramentas de controle ambiental e implementação de políticas públicas para o controle destes contaminantes.

Os filtros UV orgânicos são poluentes emergentes que vêm sendo estudados nos últimos anos em diversas regiões do mundo, além dos diferentes estudos ecotoxicológicos realizados com diferentes espécies aquáticas, marinhas e de água doce. Porém, ainda não foram realizados estudos de quantificação destes contaminantes nas praias do Brasil.

Segundo pesquisa realizada pela Euromonitor, o Brasil é o país que ocupa a terceira posição no ranking de países que mais consomem produtos de foto proteção, superado apenas por Estados Unidos e China, e onde há 10 anos o mercado cresce cerca de 10% ao ano, dados que evidenciam ainda mais a necessidade da realização de estudos locais monitorando a presença destes contaminantes [3].

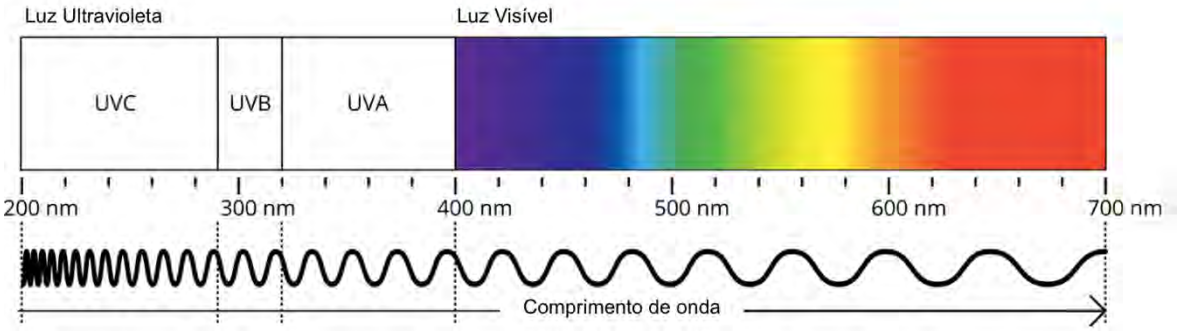
4 REVISÃO DA LITERATURA

4.1 Filtro Ultravioleta (UV)

Os Filtros Ultravioletas, ou filtros UV, são substâncias presentes nas formulações de protetores solares, que têm a finalidade de filtrar os raios ultravioletas (raios UVA, UVB e UVC), visando proteger a pele de certos efeitos danosos [20].

Estes produtos agem protegendo contra radiação ultravioleta emitida pelo sol entre os comprimentos de ondas de 200 a 400 nanômetros (nm), dividida em três faixas, radiação UV-C de 200 a 290 nm, UV-B de 290 a 320 nm e UV-A subdividida em UV-A I de 340 a 400 nm e UV-A II de 320 a 340 nm [20]. A Figura 1 mostra a faixa de radiação UV no espectro eletromagnético.

Figura 1 – Faixa de radiação UV no espectro eletromagnético



Fonte: Adaptado de National Parks Association of NSW [21]

Os protetores solares, são qualquer preparação cosmética destinada a entrar em contato com a pele e lábios, com a finalidade exclusiva ou principal de protegê-la contra a radiação UVB e UVA, absorvendo, dispersando ou refletindo a radiação. Os raios UV do tipo A e B são os que possuem maior capacidade de penetração na pele [20].

No Brasil, a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 30, de 1º de junho de 2012, que aprova o Regulamento Técnico Mercosul sobre Protetores Solares em Cosméticos e dá outras providências, tem como objetivo estabelecer definições, requisitos e critérios para rotulagem e métodos de avaliação de eficácia de protetores solares. Esta Resolução da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) também se aplica a produtos multifuncionais, onde a proteção solar não é a finalidade principal do produto, mas um benefício adicional [20].

A aprovação desta resolução, em substituição à RDC n° 237 (2002), foi um marco importante no mercado de protetores solares no Brasil, pois adicionou cuidado com a faixa de radiação ultravioleta UVA e atualizou a faixa do UVB, assim a determinação do fator de proteção solar dos produtos ficou mais ampla, além de abranger outras características como resistência à água e apresentar requisitos de rotulagem. Com esta resolução ficou determinado que todo protetor solar deve oferecer proteção contra raios UVA e UVB.

Além da RDC n° 30, outra Resolução da ANVISA importante para a regulação dos filtros UV utilizados é a RDC n° 69, de 23 de março de 2016, que contém a lista de filtros UV permitidos no Brasil, e tem a finalidade de assegurar a correta utilização das matérias primas na fabricação de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. Estes filtros ultravioletas podem ser adicionados às formulações de produtos dentro dos limites e condições discriminados nesta resolução. É importante ressaltar que filtros UV utilizados com a finalidade de evitar a degradação da formulação não estão contemplados nesta lista [22].

4.2 Radiação Ultravioleta (UV) e Fator de Proteção Solar (FPS)

A Radiação ultravioleta é uma radiação do espectro eletromagnético, classificada como não ionizante, e pode ser dividida de acordo com o seu comprimento de onda (λ) ([23])

Ao passar pelas camadas de gases da atmosfera, ocorre a atenuação das radiações que atingem a superfície terrestre, o que se deve à absorção,

dispersão e reflexão destas radiações, pela presença destas camadas de gases, como a camada de ozônio, formação de nuvens e outros eventos climáticos [24].

Devido à esta filtração seletiva que alguns gases fazem na atmosfera (O_3, O_2 e H_2O vapor), cerca de 95% da radiação UV que atinge a terra é de radiação UVA. Muito embora pouca radiação UVB atinja a terra, esta possui mais energia que a radiação UVA (comprimento de onda é inversamente proporcional à energia), de acordo com algumas estimativas, a radiação UVB possui 1000 vezes mais energia que a radiação UVA, porém o comprimento de onda é proporcional a capacidade de penetrar a pele, ou seja, a radiação UVA penetra nas camadas mais profundas da pele, portanto, nenhuma destas radiações deve ser negligenciada e o Fator de Proteção Solar (FPS) do protetor solar deve ser levado em consideração [24].

Para entender o conceito de fator de proteção solar (FPS) e a metodologia utilizada para a sua determinação, deve-se saber a definição de Dose mínima Eritematosa (DME) que é a dose mínima de radiação ultravioleta necessária para produzir a primeira reação eritematosa (rubor da pele) perceptível, com bordas claramente definidas, observadas entre 16 e 24 horas após a exposição à radiação ultravioleta, de acordo com a metodologia adotada, definida da mesma maneira pela agência Americana *Food and Drug Administration* (FDA) e pela agência Europeia *Cosmetic and Perfumary Association* (COLIPA) [20].

Como a radiação UVB é a responsável pela reação de vermelhidão da pele (eritema), uma vez que atinge a camada mais superficial, o FPS corresponde ao índice de proteção contra radiação UVB [20].

Conforme Resolução 30 da ANVISA, FPS é o valor obtido entre a dose mínima eritematosa de uma pele protegida por um protetor solar (DMEp) e a dose mínima eritematosa na mesma pele quando desprotegida (DMEnp), conforme indicado na Equação (1) [20].

$$FPS = \frac{DME_p}{DME_{np}} \quad (1)$$

Também deve ser levado em consideração o fator de proteção UVA (FPUVA) do produto, que leva em consideração a dose mínima pigmentária (dose mínima de radiação UVA requerida para produzir um escurecimento pigmentário persistente da pele, com bordas claramente definidas, observando entre 2 e 4 horas após a exposição à radiação UVA). O FPUVA é o valor obtido entre a dose mínima pigmentária de uma pele protegida por um protetor solar (DMPp) e a dose mínima pigmentária na mesma pele quando desprotegida (DMPnp), conforme indicado na Equação (2) [20].

$$FPUVA = \frac{DMP_p}{DMP_{np}} \quad (2)$$

Atualmente o FPS mínimo aceitável para um protetor solar é de 6, e o FPUVA deve corresponder a, no mínimo 1/3 (um terço) do valor de FPS declarado na rotulagem, portanto o FPUVA mínimo deve ser 2 [20].

Para o atendimento das Resolução da ANVISA em relação à concentração dos compostos permitidos e alcançar maiores resultados de FPS é necessário realizar uma mistura dos filtros UV na composição do protetor solar, o que geralmente resulta na presença de filtros UV de diferentes tipos na formulação final do produto, de modo que ele atenda aos requisitos de proteção solar e outros requisitos dos clientes, como aparência, textura, odor, efeito na pele e durabilidade.

4.3 Tipos de Filtros UV

Basicamente existem dois tipos de filtros UV, os físicos ou minerais e os orgânicos. Os filtros UV físicos agem espalhando ou refletindo a radiação e são compostos inorgânicos, como o óxido de zinco ou dióxido de titânio. Já os filtros UV orgânicos são substâncias químicas que interagem com a radiação de modo que esta não cause danos à região protegida.

4.3.1 Filtros UV inorgânicos

O óxido de zinco (ZnO) e dióxido de titânio (TiO_2) são os compostos considerados filtros UV minerais ou físicos. Por assim dizer, eles compõem uma barreira física para a radiação UV, evitando que a região seja atingida. Estes óxidos são utilizados em forma de nano partículas e ao passo que a tecnologia aplicada às formulações cosméticas avança, a aparência esbranquiçada destes óxidos impacta cada vez menos nas formulações.

O tamanho das partículas destes compostos influencia também no fator de proteção obtido, quanto menor o tamanho da partícula, maior o fator de proteção e melhor a transparência [25].

É permitido conter até 25% de óxido de zinco e 25% de dióxido de titânio nos produtos brasileiros [20].

4.3.2 Filtros UV orgânicos

Normalmente, os filtros UV orgânicos são compostos que possuem anéis aromáticos conjugados a grupos carboxílicos, carbonilas ou grupos funcionais que agem doando ou recebendo elétrons, sendo assim, capazes de absorver energia dos raios UV e transformá-la em outras formas de energia, a molécula passa do estado fundamental para o estado excitado, e ao retornar ao estado inicial emite calor ou fótons de energia que não agridem a pele ou outros tecidos [26]. Nos itens abaixo estão apresentadas algumas características e o mecanismo de ação dos compostos estudados neste trabalho.

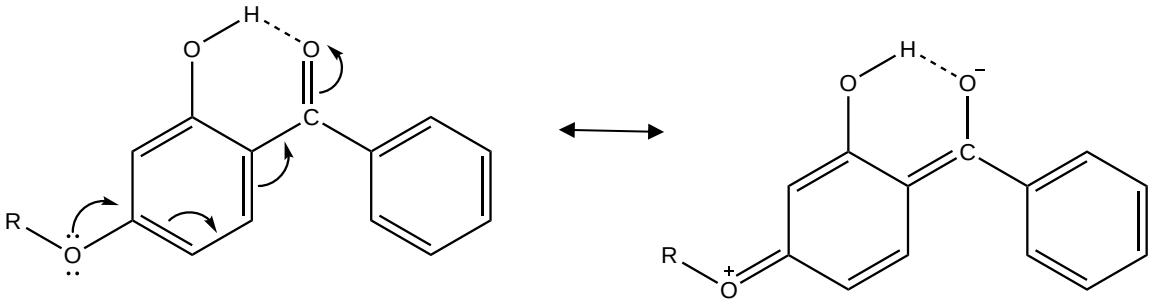
Os filtros UV de forma geral não são compostos voláteis, eles possuem temperatura de ebulição acima de 300 °C. A maioria dos filtros UV também apresenta alta solubilidade em água, muito embora alguns apresentem comportamento diferente, como EHT e o MBBT. Juntamente com a solubilidade a partição octanol/água (K_{OW}) pode ser considerado um indicativo do destino destes filtros UV, compostos que apresentam K_{OW} próximo de 4 já são considerados hidrofóbicos, quanto maior o K_{OW} maior a hidrofobicidade, ou seja, menos solúveis

em água. A ordem de hidrofobicidade dos compostos estudados neste trabalho é BP3 < BMDM < OMC < OCT, quanto mais hidrofóbico menor a probabilidade deste ser encontrado em água [12], porém a sua capacidade de bioacumulação e biomagnificação nos tecidos animais é maior [27].

4.3.2.1 Benzofenona-3 (BP3)

Possui nomenclatura IUPAC (2-hydroxy-4-methoxyphenyl)-phenylmethanone, e é o composto da classe das benzofenonas mais comumente utilizado em filtros solares, as benzofenonas possuem uma cetona ligada a 2 grupos fenils, e é a única classe de filtros solares que pertence à categoria das cetonas, o que permite a ocorrência de ressonância na molécula. Além de possuir grupos doadores de elétrons nas posições orto e para do anel aromático (Figura 2), a carbonila atua como receptor de elétrons [28].

Figura 2 – Ressonância na molécula de benzofenona-3



Fonte: Adaptado de Lopes, F. M. *et al.* [28].

A BP3 absorve raios UVA e UVB, portanto, é um filtro solar de amplo espectro [29] [30]. Este filtro UV pode causar dermatites de contato ou outras reações alérgicas, logo é menos presente em produtos infantis. É permitido conter até 10% de BP3 em produtos cosméticos ou filtros solares [22].

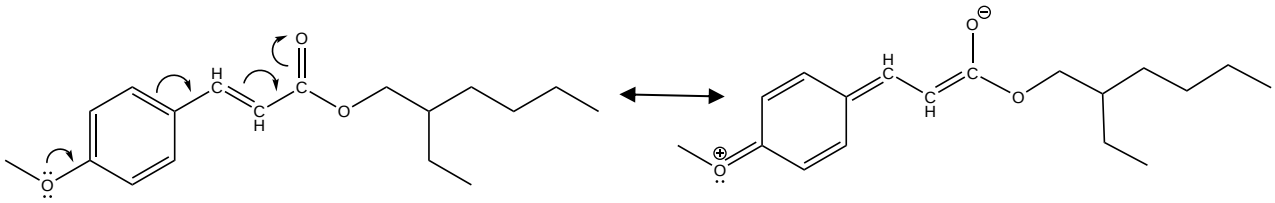
4.3.2.2 Octinoxato (OMC)

Possui nomenclatura IUPAC 2-ethylhexyl (E)-3-(4-methoxyphenyl)prop-2-enoate, e é da classe dos cinamatos, cuja estrutura básica está representada na Figura 3, os compostos desta classe têm um grupo doador (OCH3) e um receptor

de elétrons (éster conjugado com uma dupla ligação), o que confere maior deslocamento eletrônico à molécula.

Os cinamatos são os mais populares absorventes de raios UVB. Geralmente, para atingir níveis mais altos de proteção solar, são combinados com outros absorventes de radiação UVB e/ou nano partículas [31] [30]. Possui absorção máxima em 311 nm, é o filtro solar mais amplamente utilizado em todo o mundo [28].

Figura 3 – Estrutura Básica dos cinamatos



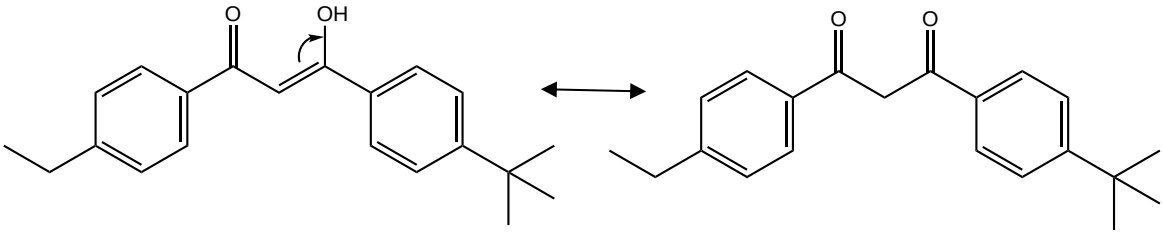
Fonte: Adaptado de Lopes, F. M. *et al.* [28].

O p-metoxicinamato de octila transforma-se em isômero CIS, que tem absorção máxima em 265 nm o que diminui sua eficácia, então este geralmente é combinado com filtros de espectro mais amplo [32]. É permitido conter até 10% de OMC em produtos cosméticos ou filtros solares [22].

4.3.2.3 Avobenzona (BMDM)

Possui nomenclatura IUPAC 1-(4-tert-butylphenyl)-3-(4-methoxyphenyl)propane-1,3-dione, é um derivado do dibenzoil metano (dicetonas substituídas) e suas propriedades são resultantes de tautomerismo ceto-enólico, ou seja, o equilíbrio entre as formas cetônica e enólica, e é um filtro UV de amplo espectro, geralmente fotoestabilizadores são adicionados à formulação para aumentar sua estabilidade [29] [30]. Pode ter seu pico de absorção alterado dependendo da forma, quando cetônico o pico ocorre em 260 nm, quando enólicos pico em 345 nm (Vide Figura 4) [28].

Figura 4 – Ressonância na molécula de avobenzona



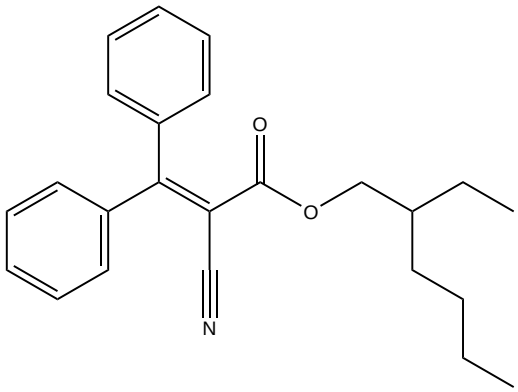
Fonte: Adaptado de Lopes, F. M. *et al.* [28].

É permitido conter até 5% de BMDM em produtos cosméticos ou filtros solares [22].

4.3.2.4 Octocrileno (OCT)

Com nomenclatura IUPAC 2-ethylhexyl 2-cyano-3,3-diphenylprop-2-enoate, é um éster da família dos cinamatos, estrutura apresentada na Figura 5, com absorção de raios UVB e UVA com aparência oleosa, e devido à sua foto estabilidade, também é utilizado para aumentar a estabilidade das formulações cosméticas [29]. É permitido conter até 10% de OCT em produtos cosméticos ou filtros solares [22].

Figura 5 – Estrutura do composto octocrileno



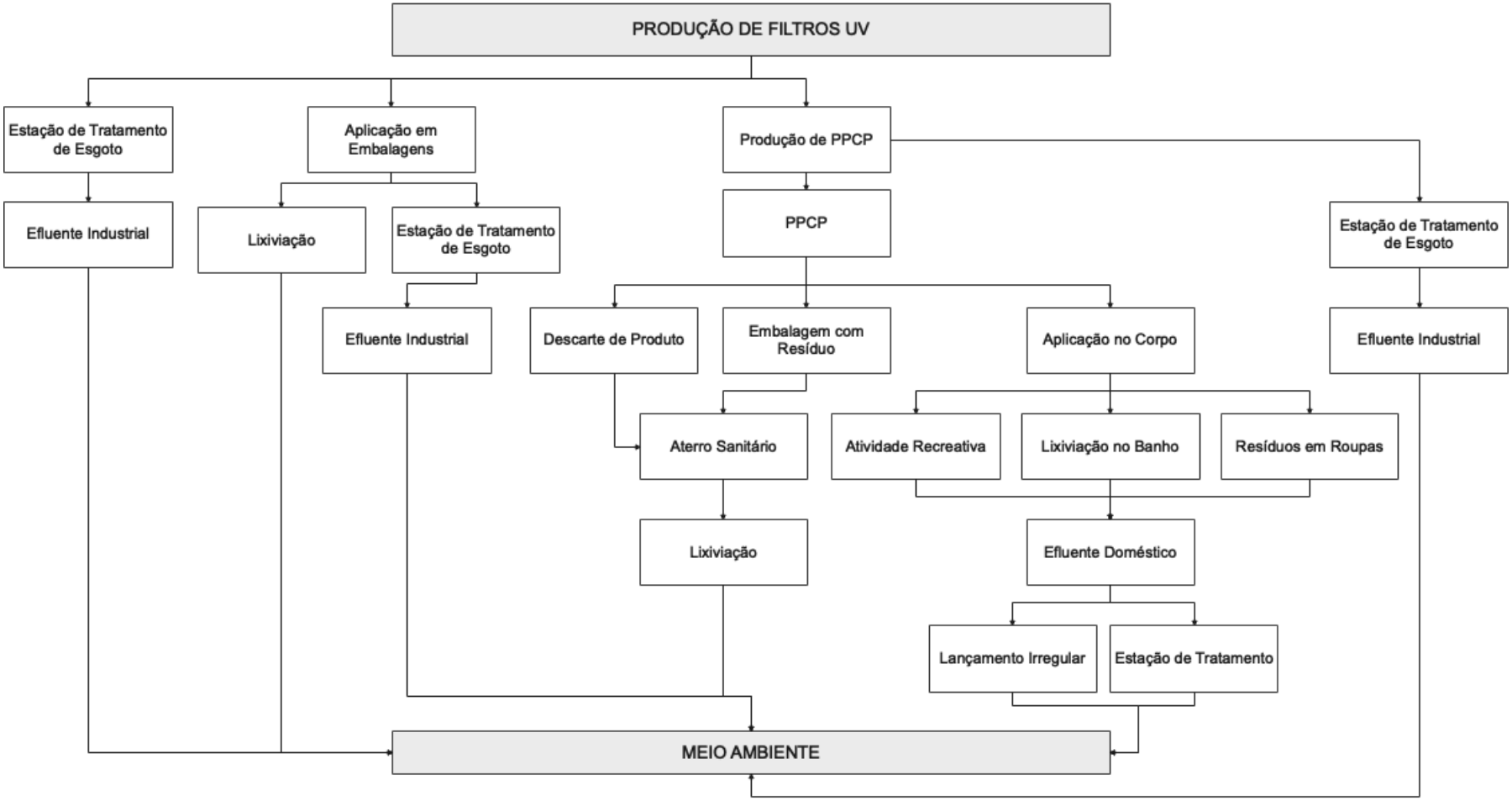
Fonte: Autor da tese

4.4 Filtros Solares no Meio Ambiente e seus Efeitos Adversos

Atualmente 39 compostos, entre filtros UV orgânicos e inorgânicos são liberados para utilização em protetores solares e produtos multifuncionais no Brasil [22]. Como apresentado na Figura 6, a presença de filtros UV no meio ambiente pode ter fontes diretas, como as atividades de recreação, despejo de efluentes industriais ou domésticos ou lixiviação de embalagens ou resíduos que contém filtros UV, ou as fontes indiretas, que podem ser processos produtivos, como a produção dos próprios ativos, produção de embalagens, fármacos e produtos de higiene pessoal (do inglês *Pharmaceutical and Personal Care Products - PPCP*) [33, 34].

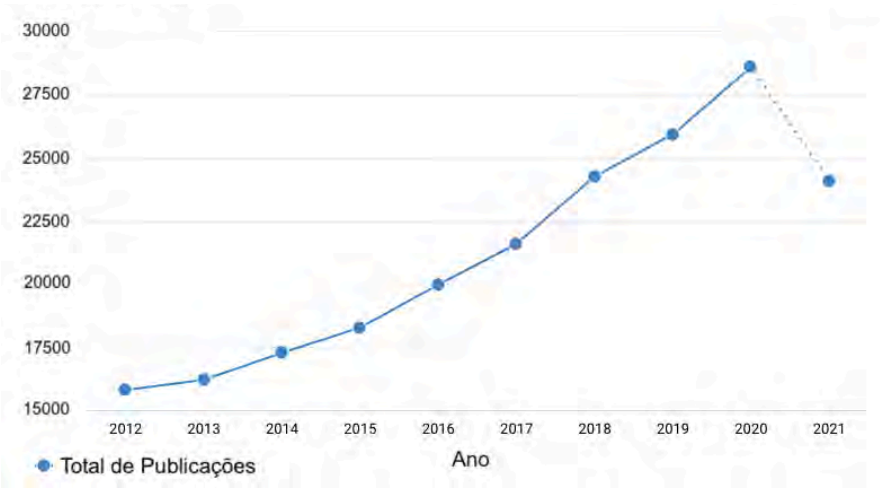
Estes compostos são contaminantes emergentes cada vez mais estudados e segundo busca realizada na plataforma online *dimensions.ai,* utilizando a palavra-chave "*UV filter*" com resultados apenas para a área ambiental foram encontrados aproximadamente 27 mil resultados. O gráfico apresentado na Figura 7 mostra uma tendência crescente para as publicações na área, evidenciando assim o crescente interesse da comunidade científica em avaliar a presença destes contaminantes no meio ambiente e seus efeitos adversos.

Figura 6 – Fontes diretas e indiretas de filtros UV no meio ambiente



Fonte: Adaptado de Giokas, D. L. [35]

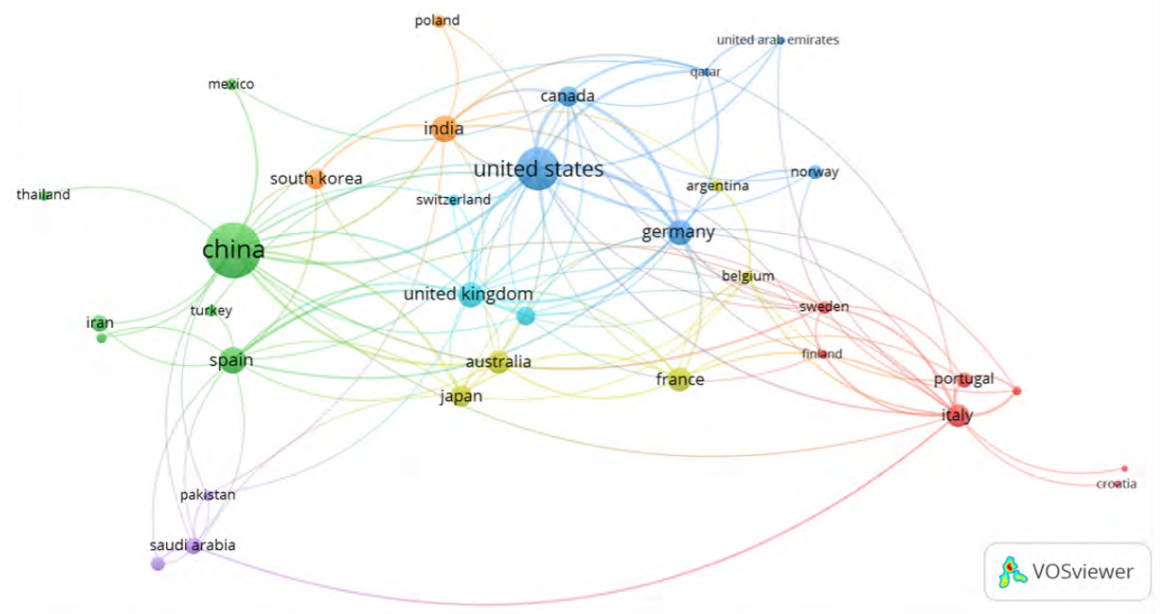
Figura 7 – Publicações com a palavra-chave "*UV Filter*" na Área Ambiental



Fonte: Dimensions.ai [36]

No mapa de referências, que mostra a relação entre as citações realizadas, apresentado na Figura 8, é possível verificar que os países que lideram as publicações nesta área são, principalmente, China e Estados Unidos, mas as diversas relações de citação entre muitos outros países, mostra o crescente interesse e aumento de publicações em diferentes áreas de estudo sobre a presença dos filtros solares em compartimentos ambientais.

Figura 8 – Relação de citações com palavra-chave "*UV Filter*" na Área Ambiental



Fonte: Autor da tese utilizando base de dados Dimensions.ai [36]

Algumas destas referências evidenciam os impactos causados pelos filtros UV orgânicos em espécies marinhas, como efeitos no sistema endócrino, causando estresse nos genes de embriões e larvas de peixes, alterações reprodutivas e comportamentais causadas por BP3 ou enzacamene (4-MBC) [37] [38].

Além das espécies marinhas, também já foi observada a presença de filtros UV em peixes e espécies macro invertebradas, evidenciando a característica de bioacumulação dos compostos 4-MBC, OMC, BP3 e benzophenona-4 (BP4), além de outras benzofenonas [39] [40] [41] [42].

Diversos ensaios com compostos absorvedores de radiação UV mostraram atividade estrogênica tanto in vivo, quanto in vitro, bem como outros alvos hormonais, como antiandrogênico e disruptor tireoidiano e endócrino, e até mesmo efeitos no sistema nervoso central e outros tecidos, causados pelos filtros UV BP3, OMC, 4-MBC, benzofenona-1 (BP1), benzofenona-2 (BP2) e outros filtros UV orgânicos testados individualmente e em combinações [43] [27] [44] [45].

Alguns filtros UV, como BP3, 4-MBC e OCT, podem causar inibição de alimentação em insetos aquáticos, o que pode levar à efeitos perigosos em termos de crescimento e desenvolvimento dos organismos e influenciar na dinâmica da população afetada [46]. Altas concentrações de filtros UV orgânicos, como BMDM, vêm sendo detectadas em fígados, cérebros, rins, guelras e músculos de peixes, o que pode indicar persistência e a especificidade da distribuição [47]. Também há evidências de efeitos tóxicos e deficiências de desenvolvimento ou reprodutivas causadas por BP3, 4-MBC, OMC em organismos marinhos [48] [49] [50].

Além dos efeitos adversos citados, os filtros UV são amplamente estudados por causarem branqueamento dos corais, que são ecossistemas formados por diversas colônias de animais encontrados no ambiente marinho, os corais secretam carbonato de cálcio o que mantem as espécies juntas e dá aos recifes sua textura. Os recifes de corais são extremamente sensíveis a alterações de temperatura e variações ambientais. Quando os corais estão sob estresse eles passam pelo processo de branqueamento, que não necessariamente significa que

estão mortos, mas que estão sob risco de morte [51]. Os filtros UV mais estudados por causarem branqueamento dos corais são benzofenona-3 e octinoxato e a hipótese é de que estes compostos acumulam nos corais e causam infecções, provocando a liberação das algas que dão a cor aos corais e causam seu branqueamento [52].

Por conta dos estudos publicados com informações de toxicidade dos filtros UV e da problemática do branqueamento dos corais, alguns locais já tomaram medidas regulatórias e baniram a utilização de produtos com compostos filtros UV específicos, dentre eles benzofenona-3, octinoxato e octocrileno, para evitar a ocorrência de efeitos adversos, são estes locais as Ilhas Virgens Americanas, Hawaii, Key West (cidade no estado da Flórida), Bonaire, Aruba, Palau e Praia do Atalaia em Fernando de Noronha [53]. Estes compostos são classificados como poluentes emergentes [4, 5], e diversos estudos com o objetivo de quantificar filtros UV vem sendo realizados em países como Grécia [7], Espanha [8], Japão [9] [10] e China [11]. Um resumo dos efeitos adversos causados por filtros UV, que foram evidenciados em diferentes pesquisas realizados em todo o mundo, está apresentado na Figura 9.

Figura 9 – Resumo de como os filtros UV podem afetar diferentes espécies marinhas

Fonte: Adaptado de *National Oceanic and Atmospheric Administration* [54]

Os filtros UV são contaminantes encontrados em baixas concentrações (nível de ng mL^{-1} ou menor), desta forma, é necessária a utilização de uma técnicas de preparo de amostra que permita a redução de ocorrência de efeito de matriz ou interferência de outros componentes da amostra, e técnica analítica que seja seletiva, e sensível para que os compostos sejam determinados em baixas concentrações mesmo em matrizes complexas, como a água do mar, evitando que erros do tipo α (falso positivo) ou β (falso negativo) ocorram [12].

4.5 Métodos Analíticos para determinação de filtros UV em água do mar

Diferentes métodos analíticos já foram desenvolvidos para determinação de filtros UV em água do mar, nestes métodos diferentes técnicas de extração e análise são empregadas para a determinação de diferentes combinações de compostos. Considerando a literatura disponível de métodos analíticos para determinação dos compostos abordados neste estudo, em água do mar e utilizando LC-MS como técnica de análise, a maioria dos trabalhos utilizam como metodologia de preparo de amostra os cartuchos de extração em fase sólida, ou SPE (do inglês *solid phase extraction*).

Geralmente são utilizados cartuchos do tipo C18 [11], que podem reter diferentes compostos orgânicos de amostras aquosas, apesar de outros cartuchos com outras formas de interação com os analitos também serem utilizados, como os poliméricos e outros ligantes [55] [56] que são indicados para estudos mais focados em classes específicas de compostos [5] [57]. Os métodos que utilizam SPE geralmente apresentam recuperação entre 60 e 100% e DPR inferior a 10% [58] [11].

Em alguns métodos é realizada a adição de Na_2EDTA às amostras antes da etapa de SPE para preservação destas e melhorar a extração de alguns compostos, evitando a formação de complexos com metais e tornando estes analitos mais disponíveis, obtendo assim melhores resultados de recuperação [59].

A técnica SBSE (do ingês *Stir-bar sortive extraction*), que é uma técnica baseada na absorção dos analitos em um filme na superfície de uma barra

magnética e após a etapa de extração é utilizada a técnica de desorção líquida (LD – *liquid desorption*) ou térmica (TD – *thermal desorption*) dos analitos para análise [60]. Esta técnica utiliza baixos volumes de amostra (10 a 50 mL) com recuperação em torno de 80 a 130% utilizando TD, e entre 30 e 80% usando LD e DPR inferior a 15% [61].

No próximo capítulo serão descritas as técnicas utilizadas neste trabalho, tanto para extração quanto para análise dos filtros UV.

5 TÉCNICAS APLICADAS E DESENVOLVIMENTO ANALÍTICO

5.1 Micro Extração Líquido-líquido Dispersiva com Solvente Demulsificante (*SD-DLLME*)

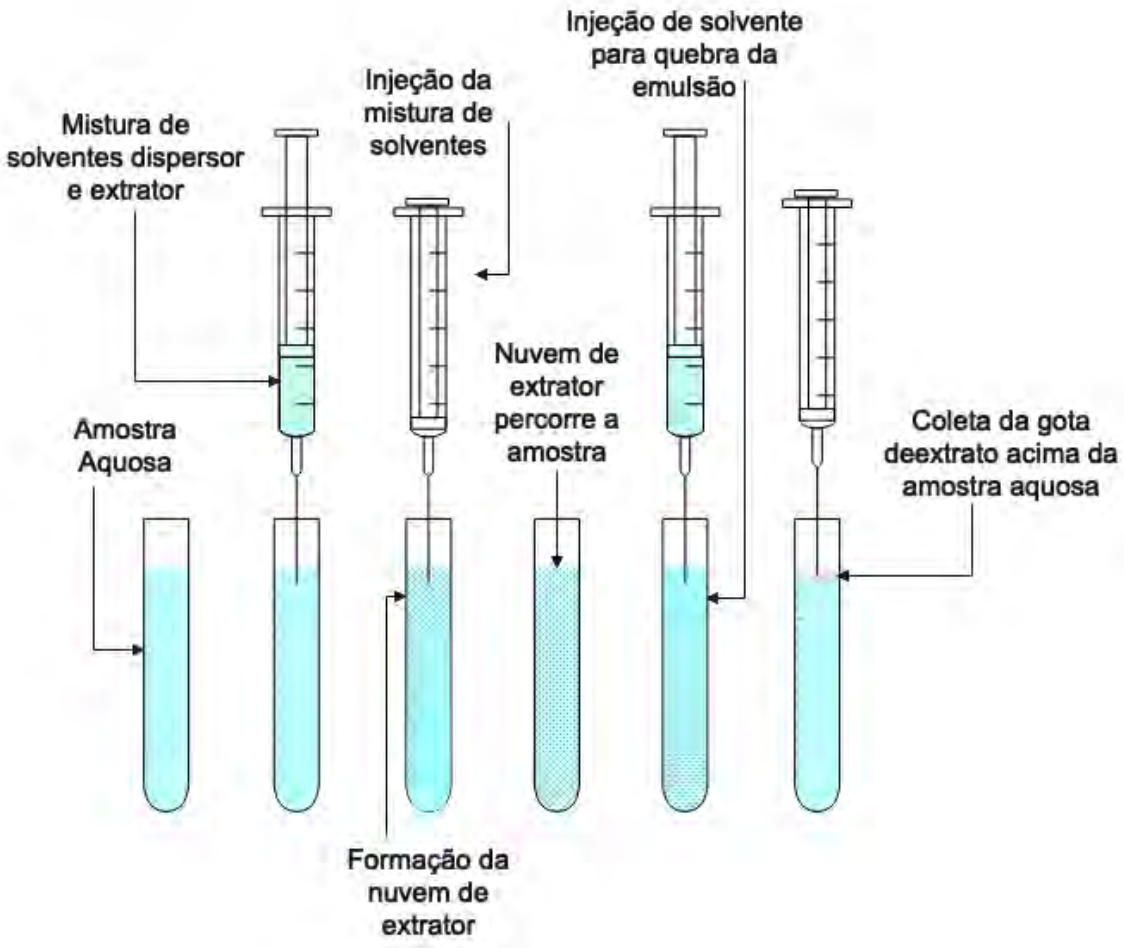
O método de extração mais utilizado para análise de filtros UV em matrizes ambientais é a extração em fase sólida (SPE do inglês *solid phase extraction*), no entanto, esta técnica de preparo de amostra possui algumas desvantagens como, utilização de alto volume de amostra e altos volumes de solventes, variações de resultados de acordo com o lote dos cartuchos utilizados e encarecimento do processo de preparo [12], tornando crescente a demanda de etapas de preparo de amostra mais econômicas e eficientes.

Uma alternativa de preparo de amostra é a técnica micro extração líquido-líquido dispersiva, desenvolvida para análise de pesticidas em amostras ambientais e começou a ser aplicada para outras áreas da química analítica. Esta técnica possui como vantagens o alto fator de enriquecimento dos analitos, é simples, fácil de realizar, utiliza baixo volume de amostra, baixo custo e baixo consumo de solventes orgânicos [62].

Esta extração consiste na injeção de uma mistura de solventes (extrator e dispersor) em um volume de amostra aquosa. O solvente dispersor forma uma nuvem de gotículas do extrator, com maior área superficial, este percola a amostra e promove a extração dos analitos. O princípio da extração é a partição dos analitos entre duas fases imiscíveis (uma orgânica e apolar e outra aquosa e polar). Originalmente o solvente extrator é mais denso que a água, assim a gota que deve ser coletada fica na parte inferior da amostra. Assim, modificações da técnica original foram realizadas para permitir a utilização de solventes menos densos que a água e a coleta da gota de solvente na parte superior da amostra [15].

Esta modificação da DLLME foi desenvolvida por Chen *et al.* (2010) e se dá pela adição de um solvente demulsificante para quebra da emulsão e coleta da gota de solvente extrator acima da fase aquosa, sem necessidade de centrifugação como mostrado no esquema apresentado na Figura 10, e é conhecida como Micro Extração Líquido-Líquido dispersiva com solvente demulsificante (SD-DLLME) ou terminada com adição de Solvente (ST-DLLME) [15].

Figura 10 – Esquema gráfico da extração SD-DLLME



Fonte: Autor da tese

5.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada à Espectrometria de Massas (LC-MS)

A técnica LC-MS trata-se do acoplamento de duas técnicas analíticas, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (LC), que é essencialmente uma técnica

de separação, e a Espectrometria de Massas (MS), uma técnica analítica com alta seletividade onde o analito é identificado por sua razão massa/carga (*m/z*).

Os modos de aquisição destas técnicas acopladas permitem a identificação, caracterização e quantificação de compostos químicos com alta seletividade, baseando-se na massa molecular do analito, padrão de fragmentação do mesmo em determinadas energias, razão de intensidade entre os fragmentos formados e tempo de retenção [63].

Para permitir melhor entendimento da técnica LC-MS é importante consolidar alguns conceitos básicos, que vão permitir melhor entendimento das partes dos equipamentos, do funcionamento da técnica e modos de aquisição utilizados, estes conceitos estão detalhados no item 5.2.1 deste trabalho.

5.2.1 Alguns Conceitos Básicos

O primeiro conceito importante para o entendimento da técnica LC-MS é o de separação cromatográfica, que é um processo para separação de misturas utilizando a interação dos compostos com as fases estacionária e fases móveis. Estas interações permitem a separação dos compostos por tempo de retenção, que é o tempo em que este composto é eluído da coluna cromatográfica, ou seja, o tempo que o composto sai da coluna e é identificado. Em determinadas condições do método, cada composto tem um tempo de retenção determinado, e esta informação é também um fator de identificação do analito. Estes resultados são vistos no cromatograma, que é o produto gerado das análises por cromatografia, um gráfico com ordenadas em intensidade e abcissas em tempo [64].

É importante considerar que, o tempo de retenção não é único e específico para cada composto, então quando dois analitos eluem da coluna cromatográfica no mesmo tempo de retenção, então eles estão coeluindo, em alguns casos, não é possível diferenciar estes dois analitos, pois formarão apenas um pico no cromatograma. Porém, quando há a separação completa de picos de compostos diferentes, então é considerado que há resolução cromatográfica, ou seja, é possível identificar o pico no cromatograma de modo que é observada uma

gaussiana que sai da linha de base e retorna à linha de base, sem que haja coeluição entre picos. Estes conceitos de cromatografia citados acima, se aplicam mesmo com a utilização de detectores como arranjo de diodos, ultravioleta-visível (UV), amperométrico entre outros. Mas quando é utilizado o acoplamento com espectrometria de massas, outros conceitos e questões também devem ser considerados.

Utilizando um sistema de análises do tipo LC-MS além do tempo de retenção observado no cromatograma, também serão gerados os espectros de massas, onde é possível identificar o analito por sua razão massa/ carga (*m/z*), os mecanismos envolvidos nesta análise e como esta identificação é realizada estão descritos no decorrer deste capítulo [65].

O primeiro conceito a se considerar para o entendimento da análise por espectrometria de massa é a massa atômica, afinal é a partir deste parâmetro que os compostos serão analisados e identificados. Os principais conceitos utilizados são o de massa monoisotópica (massa exata de uma molécula calculada a partir do isótopo mais abundante de cada elemento) e massa exata (massa calculada para uma molécula considerando isótopos específicos de cada átomo). O valor de massa correto a ser utilizado para identificar o analito no espectro de massas vai depender da resolução do espectrômetro de massas utilizado nas análises [66, 67].

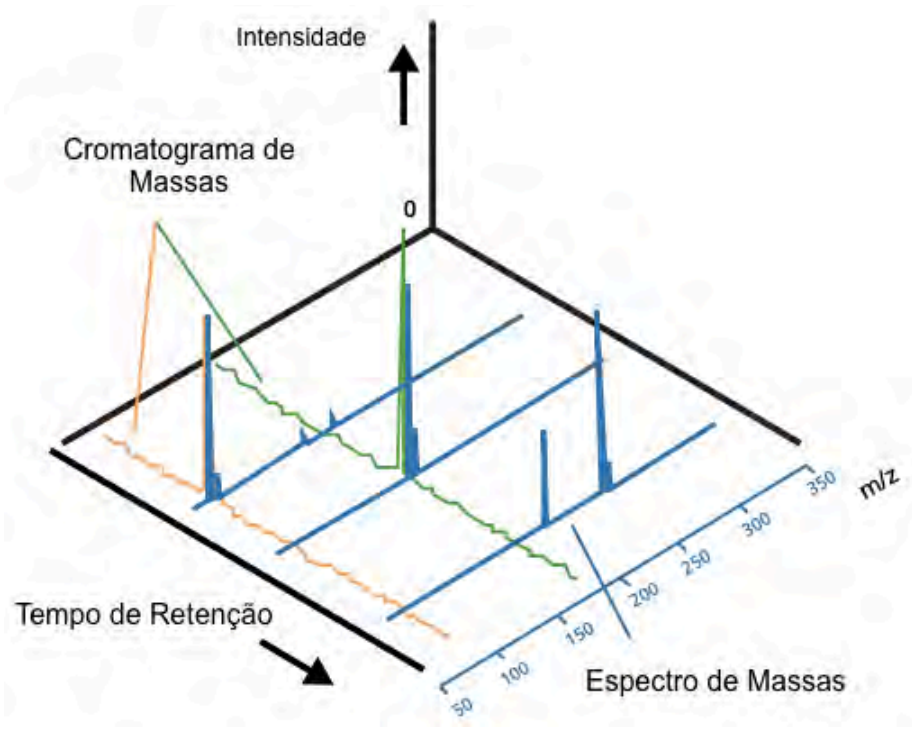
Resolução de massas é o valor de m/z observado dividido pela menor diferença de m/z para dois íons que podem ser separados: $\frac{m}{z}/(\frac{\Delta m}{z})$, e é característica de cada equipamento, podendo ser unitária, por exemplo ou em equipamentos de alta resolução pode chegar a 30 000, onde é possível separar compostos por sua massa exata [66].

Outro conceito que está aliado à análises em alta resolução é a exatidão de massas, e está associado ao erro observado entre a massa medida e a massa exata do analito, e é calculada por meio de $\Delta m_i(ppm) = \frac{(m_i - m_e)}{m_e}\ x\ 10^6$, onde m_i é a massa analisada em alta resolução e m_e é a massa exata do composto, este erro está diretamente associado à calibração do analisador. Este conceito é muito

importante, uma vez que na maioria das vezes as análises em alta resolução tem finalidade exploratória, e impacta diretamente na confiabilidade das identificações e atribuições de fórmula e estrutura molecular realizadas por meio de ferramentas software [68].

Também é importante ressaltar que utilizando métodos LC-MS os conceitos de cromatografia citados devem ser avaliados de maneira diferenciada, pois além do tempo de retenção, os analitos serão identificados por sua *m/z*, então mesmo que coeluam serão identificados separadamente, ou seja, com a espectrometria de massas as identificações são realizadas com uma terceira dimensão, como ilustrado na Figura 11.

Figura 11 – Resultados obtidos com LC-MS



Fonte: Adaptado de Shimadzu [64]

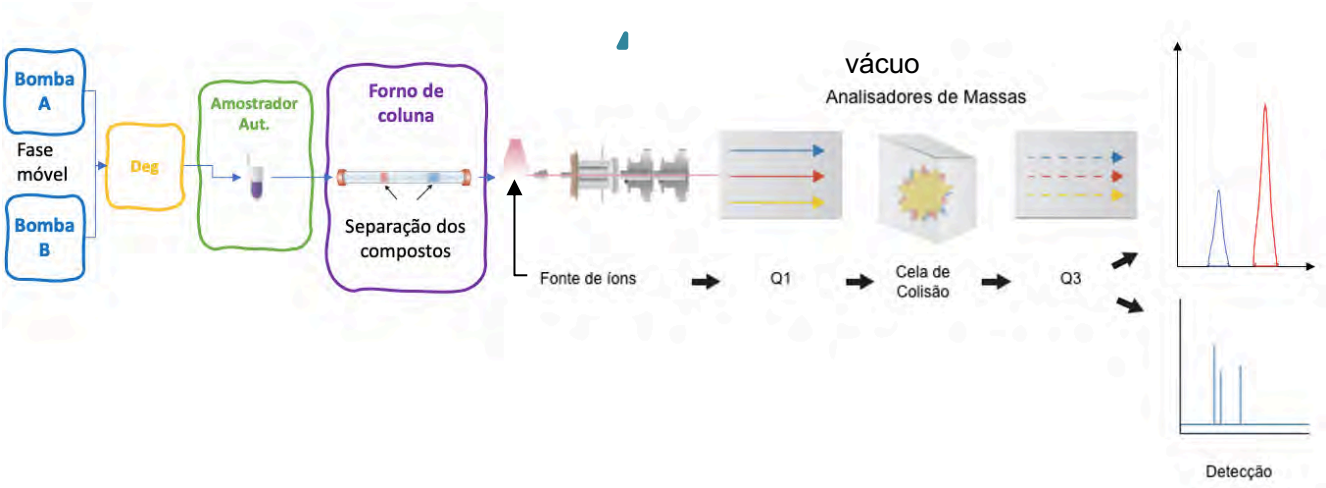
Porém, a utilização da cromatografia como ferramenta para separação de interferentes que podem influenciar na ionização dos analitos (supressão ou incremento de sinal), isômeros e isóbaros é crucial para a obtenção de resultados ótimos. Além da capacidade de concentrar os analitos em um único pico que elui em um tempo específico, conferindo maior sensibilidade às quantificações.

Além dos modos de aquisição em LC-MS, também é possível realizar aquisições em modo MS/MS, em equipamentos que possuem mais de um analisador de massas, mais informações sobre estes equipamentos e modos de aquisição serão abordados posteriormente.

5.2.2 LC-MS - Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência acoplado ao espectrômetro de massas

O sistema de LC-MS é formado por um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (HPLC - geralmente composto por fases móveis, bombas, degaseificador, injetor, forno de coluna e uma controladora para a comunicação entre os módulos) responsável pela separação cromatográfica e introdução de amostra e o sistema de MS (composto por fonte ionização, interface, analisador(es) de massas, detector e sistema de vácuo), conforme indicado na Figura 12.

Figura 12 – Sistema de LC-MS



Fonte: Adaptado de Shimadzu [64]

O sistema também pode conter uma válvula para seleção de fluxo entre descarte e MS, utilizada para evitar contaminação do espectrômetro de massas com interferentes indesejados.

A Cromatografia Líquida é uma técnica de separação de componentes de uma mistura, onde esta separação se dá pela interação dos compostos desta mistura com uma fase móvel (eluentes) e uma fase estacionária (Coluna analítica).

Existem diferentes tipos de cromatografia líquida, mas o mais utilizado é a cromatografia líquida de fase reversa, onde são utilizadas fases móveis polares e uma fase estacionária apolar e a ordem de eluição dos componentes é inversamente proporcional à interação com a fase estacionária (compostos mais polares eluem primeiro).

O sistema é constituído por solventes utilizados como fases móveis acondicionados em garrafas na parte superior do equipamento, estes solventes passam por um degaseificador para a retirada de gases presentes e evitar a formação de bolhas no sistema.

Como mostrado na Figura 12 o sistema utilizado pode ser composto por uma ou duas bombas, permitindo a realização de gradientes de fase móvel, ou seja, a variação da proporção entre solventes durante a corrida cromatográfica, proporcionando métodos mais rápidos e obtenção de picos mais finos. A utilização de dois módulos de bombas permite a utilização de gradientes de alta pressão, onde a mistura de solventes do gradiente é realizada após as bombas, permitindo menor volume morto, menor tempo de resposta às mudanças de composição do gradiente, menor variação da pressão do sistema e maior precisão de composição da fase, ideal para análises de alta velocidade por LC-MS.

Também fazem parte do sistema o injetor automático, responsável pela injeção da amostra no fluxo de solventes de forma rápida e precisa, conforme volume de amostra indicado, e sem ocorrência de efeito memória (*carryover*), e o forno de coluna, onde a coluna analítica fica acondicionada sob temperatura controlada. O HPLC também possui uma controladora, responsável pela comunicação e controle de todos os módulos do equipamento e uma válvula de seleção de fluxo que permite a alternância entre o descarte e o MS, evitando o fluxo de fase para o MS em etapas de limpeza, consequentemente evitando a entrada de sujidades e contaminação no equipamento.

O espectrômetro de massas é composto por uma fonte de íons, lentes de focalização de íons, analisador(es) de massas, detector e um computador para a decodificação das informações e obtenção dos resultados, conforme indicado na

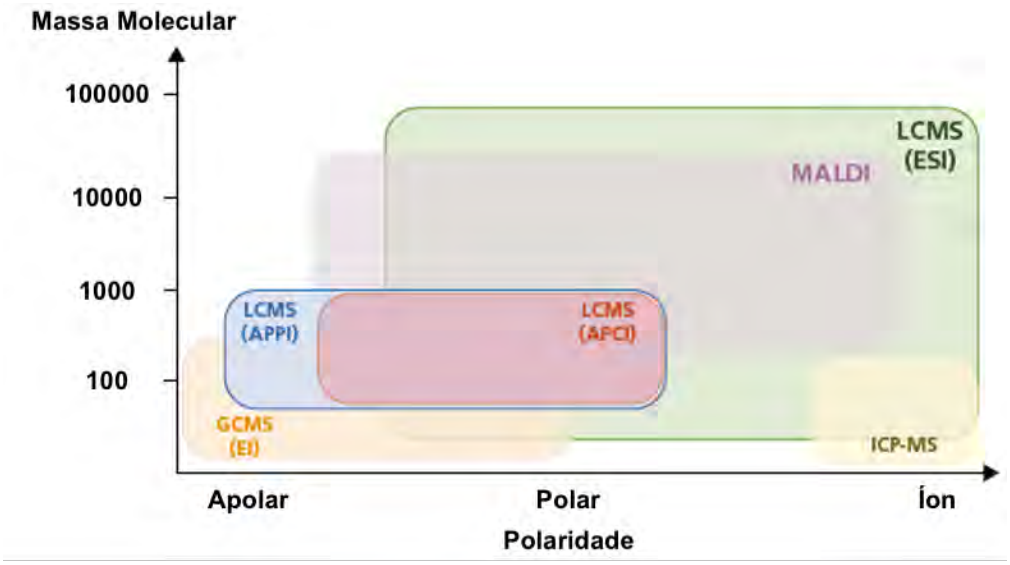
Figura 12. Para possibilitar a identificação dos analitos pelos analisadores de massas é necessário a ionização deles, uma vez que os analitos serão identificados em função da sua razão massa/ carga (*m/z* – sendo a massa em Daltons - Da), desta forma, moléculas neutras não serão identificadas pelos analisadores. Cada parte do espectrômetro de massas e alguns dos diferentes tipos de analisadores serão apresentados nos itens abaixo.

5.2.2.1 Fonte de Íons

A fonte de íons tem a função de formar os íons dos compostos de interesse. Existem diferentes fontes de íons e a fonte a ser utilizada deve ser escolhida levando em consideração características do(s) analito(s). As fontes de íons mais utilizadas em LC-MS são as fontes de Ionização em pressão atmosférica (*API*), como Electrospray, utilizada para a maioria dos métodos e a fonte de Ionização Química sob Pressão Atmosférica (APCI). Os íons podem ser formados tanto com polaridade positiva quanto em polaridade negativa [65].

Conforme indicado na Figura 13 a escolha da fonte de íons se deve principalmente à polaridade do composto e à sua massa molecular.

Figura 13 – Aplicação para diferentes fontes de ionização

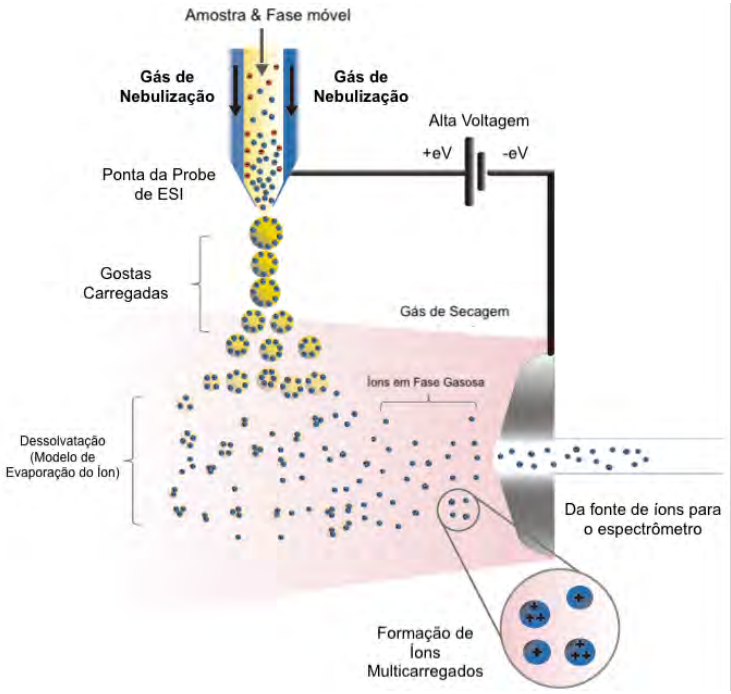


Fonte: Adaptado de Shimadzu [64]

A fonte de ESI foi desenvolvida em 1984 e é uma das fontes de íons mais utilizada mundialmente para diferentes áreas de aplicação. Como mostrado na Figura 14 A, possui um spray da fase móvel contendo a amostra e estas gotículas passam por um fluxo de gás (N_2) que realiza a secagem, explosão da gota e formação de íons que são levados para dentro do MS. Esta fonte é indicada para compostos que possuem sítios de ionização pela presença de heteroátomos e é considerada uma fonte de ionização branda, ou seja, geralmente os íons não sofrem fragmentação na fonte [69, 67].

Após a ionização do analito, ele passa pelas lentes que são responsáveis pela interface entre a região em pressão atmosférica e a parte interna do equipamento, sob vácuo, e fazem a focalização dos íons para os analisadores [70, 67].

Figura 14 – Fonte de ionização ESI



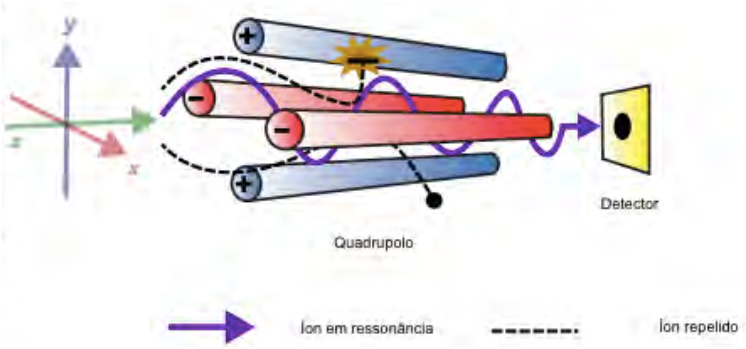
Fonte: Adaptado de Shimadzu [64]

5.2.2.2 Analisadores de Massas: Quadrupolos

Existem diferentes analisadores de massas, e cada um destes têm características de funcionamento diferentes, além de proporcionares diferentes modos de aquisição e aplicações [64]. Os analisadores mais utilizados são os

quadrupolos, estes possuem quatro barras concêntricas, com cargas opostas, que desviam a trajetória dos íons em vácuo de acordo com energias específicas aplicadas, de modo a filtrar apenas a *m/z* do íon a que se deseja analisar, como mostrado na Figura 15.

Figura 15 – Quadrupolo



Fonte: Adaptado de Shimadzu [64]

Os íons são filtrados por uma oscilação estável em um determinado campo elétrico gerado entre as barras do quadrupolo, a oscilação de outros íons com *m/z* diferentes é instável, causando a colisão destes com os polos e serem repelidas, portanto estas não chegam ao detector. Esta oscilação dos íons ocorre de acordo com a Equação de Mathieu (3), de acordo com esta equação a oscilação estável depende da massa e frequência de oscilação do íon [64, 67].

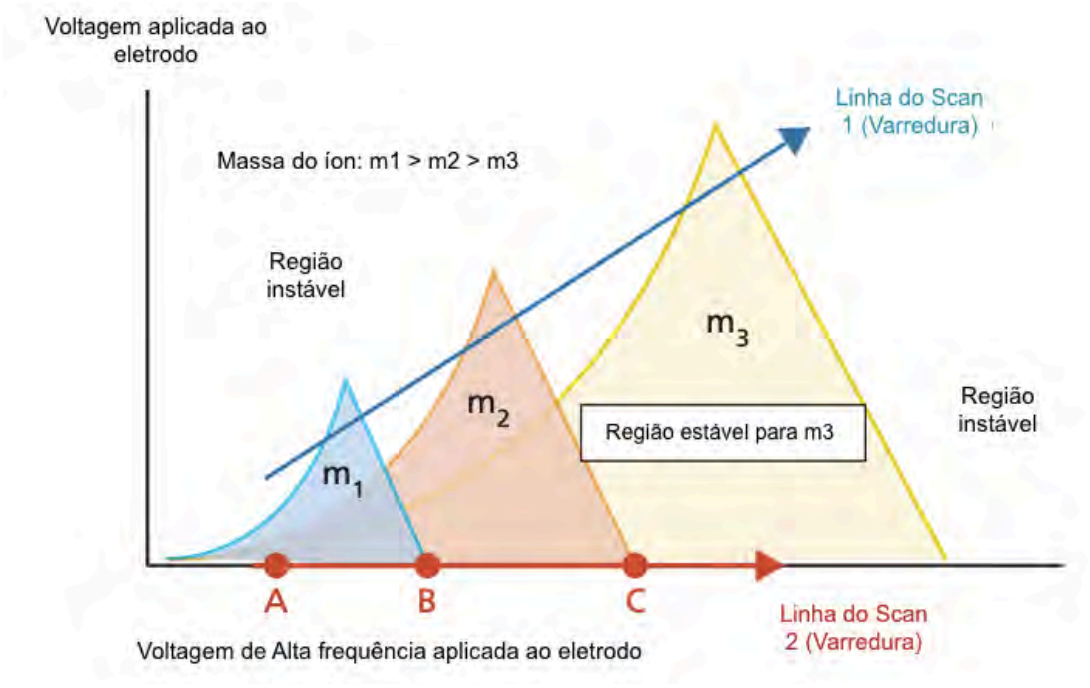
$$\frac{m}{z} = k\frac{v}{r^2\omega^2} \tag{3}$$

Onde:

m = massa; z = carga; k = constante; v = voltagem aplicada; r = distância entre os eletrodos; ω = frequência de oscilação.

Como apresentado na Figura 16, que representa o comportamento dos íons de acordo com a equação de Mathieu, a região de estabilidade dos íons m1, m2 e m3 é diferente, embora seja possível realizar a variação da voltagem aplicada ao eletrodo e obter uma linha de varredura que passe pela região de estabilidade de m1, m2 e m3 [64].

Figura 16 – Comportamento dos íons de acordo com equação de Mathieu



Fonte: Adaptado de Shimadzu [64]

Os quadrupolos permitem a realização de aquisição de dados em modo SIM (*Single Ion Monitoring*), onde as voltagens são mantidas para análise de um único íon, e modo *Scan* (Varredura) onde uma faixa de massas é selecionada para a realização das análises. É importante ressaltar que estas análises são realizadas em milissegundos (msec).

Os quadrupolos também são os analisadores mais utilizados, pois permitem o acoplamento com mais de um analisador, permitindo trabalhar com equipamentos do tipo triploquadrupolo (TQ), onde há outras possibilidades de modos de aquisição e ganho de sensibilidade e seletividades, quando comparado ao monoquadrupolo.

No TQ a possibilidade de alternância entre os modos de aquisição *Scan*, ou *SIM* em Q1 e Q3, com a cela de colisão (Q2). Além da energia de colisão (CE), aplicada aos íons na cela de colisão para fragmentá-los, também há a presença de um gás de colisão que permite a ocorrência de dissociação induzida por colisão (*CID*). Utilizando o TQ é possível utilizar diferentes modos de aquisição e obtenção

de muitas informações sobre os analitos, os modos de aquisição estão descritos abaixo:

- Modo *Scan*

O *Scan* pode ser feito tanto em Q1 quanto em Q3 e apenas um quadrupolo trabalhará no modo *Scan* enquanto os outros farão apenas a transmissão dos íons. O *Scan* em Q1 é mais interessante para compostos lábeis que podem facilmente degradar dentro do equipamento e nem mesmo serem identificados em Q3. Enquanto o *Scan* em Q3 não permite que os íons dissipem dentro do equipamento antes de chegar no detector, gerando picos mais estreitos [64].

- Modo *SIM*

Da mesma forma que o *Scan* o *SIM* também pode ser feito tanto em Q1 quanto em Q3, mas neste caso a aquisição é voltada para uma *m/z* específica [64].

- Varredura de Íon Produto

Neste modo de aquisição é realizada a varredura de todos os fragmentos formados a partir de um determinado íon precursor, em uma determinada energia de colisão, ou em diferentes energias de colisão. Neste modo de aquisição Q1 trabalha em modo *SIM* em uma m/z fixa, Q2 fragmenta este íon e Q3 faz a varredura dos produtos gerados, uma faixa de aquisição pode ser determinada. É importante ressaltar que, quanto maior a energia de colisão aplicada menores e menos específicos são os fragmentos gerados, porém algumas moléculas são mais sensíveis e geram muitos fragmentos com baixa intensidade, mesmo com baixa energia de colisão [64].

- Varredura de Íon Precursor

Neste modo de aquisição é possível identificar quais íon precursores formam um determinado íon produto, assim Q1 trabalha em modo *Scan*, Q2 como cela de colisão e Q3 filtra apenas produtos com uma determinada m/z. Este modo

de aquisição pode ser utilizado para identificação de moléculas de um grupo específico, que possuem alguma ramificação ou grupo funcional característico [64].

- Modo *SRM/MRM*

Os métodos de análise geralmente utilizados em um sistema triplo quadrupolo, para a quantificação de analitos (alvos), é o *Multiple Reaction Monitoring (MRM)*, para múltiplos analitos em um mesmo método, ou *Single Reaction Monitoring (SRM)*, para um analito. Neste modo de aquisição é monitorada a massa do analito (íon precursor) em Q1, Q2 é uma célula de colisão, onde é realizada a fragmentação da molécula com energia controlada, de modo a obter fragmentos (íons produto) estáveis e característicos, e em Q3 é realizado o monitoramento dos íons produto mais estáveis e intensos. Costuma-se monitorar os 2 íons produto mais intensos (o mais intenso para quantificação e outro para confirmação da identidade do analito). Assim é possível realizar quantificações com maior sensibilidade, devido à alta seletividade das transições, o que confere uma linha de base mais baixa nas análises [64].

- Perda Neutra

Como o analisador de massa não identifica moléculas neutras, a perda neutra funciona também como uma ferramenta de software. Neste caso tanto Q1 como Q3 trabalham em modo *scan*, mantendo sempre uma diferença específica entre os íons identificados em Q1 e Q3, e Q2 trabalha como cela de colisão. Permitindo a identificação de íons que, após a colisão possuem uma perda neutra específica [64].

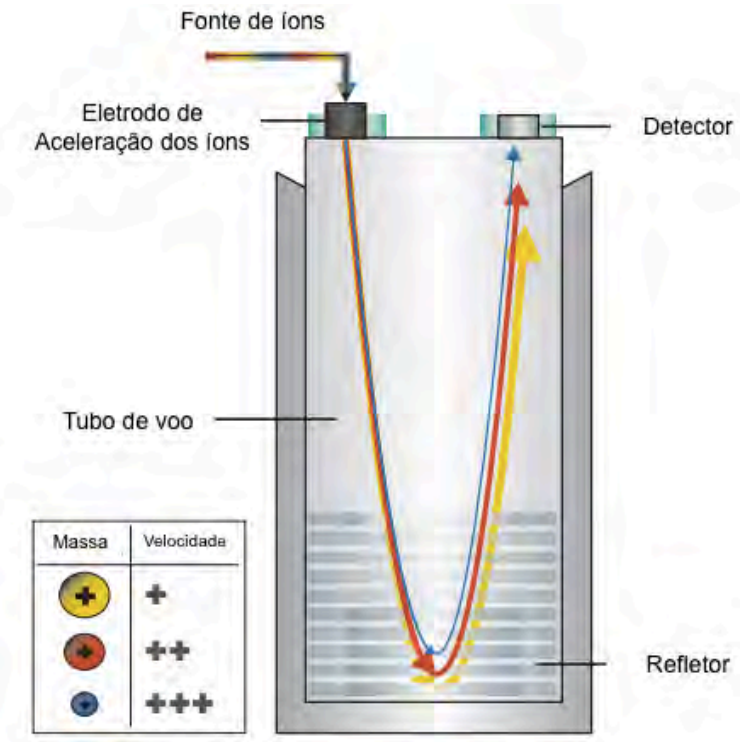
O resultado das análises por LC-MS(/MS) é o cromatograma de massas, geralmente apresentado como Cromatograma de íons totais (*Total Ion Chromatogram – TIC*), obtido pelo somatório (total) da intensidade de sinais de íons em cada um dos espectros de massas de uma série adquirida em função do tempo de retenção cromatográfico, mas também é possível ver o Cromatograma de pico base (*Base Peak Chromatogram – BPC*), obtido pela representação gráfica da intensidade absoluta do pico base ou o Cromatograma de íons extraídos (*Extracted*

ion chromatogram – XIC), que é criado pelo registro da intensidade do sinal observado para um determinado valor ou conjunto de valores de m/z em uma série de espectros de massas gravados em função do tempo de retenção [66]. Também é possível avaliar os resultados utilizando outras formas de visualização.

5.2.2.3 Analisadores de Massas: Tempo de Voo

O analisador do tipo tempo de voo, diferentemente do quadrupolo não trabalha por varredura, mas sim em pulsos. Ele basicamente é composto por um eletrodo que acelera os íons em um tubo de voo, sob vácuo, um refletor que muda a trajetória dos íons em direção ao detector, como pode ser visto na Figura 17 [67, 64].

Figura 17 – Analisador tipo tempo de voo



Fonte: Adaptado de Shimadzu [64]

Neste analisador os íons são acumulados e acelerados, e sua massa é separada de acordo com o tempo que estes demoram para percorrer o tubo de voo, de acordo com as equações (4) e (5) [64].

$$Energia\ Cinética_{íon} = \frac{1}{2}mv^2 = zeV \quad (4)$$

$$T = \frac{distância}{velocidade} = \sqrt{\frac{m}{z}} \times \frac{L}{\sqrt{2eV}} \quad (5)$$

T = tempo de voo; m = massa do íon; v = velocidade do íon; z = carga do íon; e = carga elementar; V = Voltagem de aceleração aplicada aos íons; L = distância de voo no tubo de voo.

Dada uma voltagem de aceleração constante, bem como energia cinética, cada íon voa em uma velocidade específica pelo tubo de voo até alcançar o detector, esta velocidade é maior para íons com menor massa e menor para íons com maior massa. Por conta deste princípio de funcionamento que o TOF somente trabalha com pulsos. O TOF permite análises com alta resolução para identificação de compostos de acordo com sua massa exata, sendo assim mais utilizado para análises exploratórias [64, 69, 67].

Também é possível acoplar o analisador TOF a outros analisadores de massas, como o acoplamento do quadrupolo ao TOF, obtendo assim um equipamento híbrido (com diferentes analisadores e massas) que permite a fragmentação das moléculas e sua identificação com alta resolução. O QTOF permite aquisição de dados nos modos *Scan*, *SIM*, *MRM* e os modos *MS/MS Data-Dependent Acquisition* (*DDA*) e *Data-Independent Acquisition* (*DIA*), descritos abaixo:

- *DDA* – Aquisição dependente de dados

Em um método de aquisição *DDA* é realizado o ajuste do método de análise no modo *scan* e à medida que íons são identificados acima de um limite de intensidade determinado, é acionada a fragmentação de uma quantidade de íons mais intensos, também determinada pelo analista. No desenvolvimento desta metodologia vários parâmetros podem ser especificados, como um atraso no acionamento da fragmentação, para favorecer a realização da fragmentação mais próximo ao ápice do pico de interesse, pode ser realizada a fragmentação com uma

faixa de energia de colisão, uma vez que esta será aplicada a todos íons da faixa de massas selecionada na varredura, além de listas de inclusão e exclusão para a fragmentação. Este tipo de análise é realizado para obtenção de informações estruturais e confirmação da identidade de analitos utilizando não somente a massa exata do íon precursor e sua distribuição isotópica, mas também informações de partes da molécula. Os métodos *DDA* exigem mais tempo do analista na etapa de desenvolvimento, mas favorecem o tratamento dos dados obtidos com amostras complexas e com alta concentração.

- *DIA* - Aquisição Independente de dados

Diferente do método *DDA*, no *DIA* todos os íons identificados no *scan* são fragmentados. São determinadas faixas de fragmentação específicas e todos os íons são fragmentados. Estas metodologias facilitam a etapa de desenvolvimento, porém, o grande volume de íons fragmentados exige tempo para o processamento dos dados e uma avaliação minuciosa do que realmente é importante, além de gerar arquivos de dados mais pesados. Os métodos DIA podem favorecer análises exploratórias de amostras mais limpas onde os íons de interesse estão em concentrações menores.

5.2.2.4 Detectores

Os detectores mais utilizados nos espectrômetros de massas são as Multiplicadoras de Elétrons (do inglês *Electron Multiplier – EM*), podendo ter diferentes geometrias, estes detectores com dinodos discretos utilizam um cátodo metálico que perde elétrons ao ser atingida por um íon, os elétrons são atraídos para o eletrodo seguinte promovendo novas colisões e multiplicação dos elétrons, promovendo esta multiplicação em cascata. Assim, para cada íon identificado muitos elétrons são gerados e coletados pelo ânodo, estes detectores são comumente utilizados em quadrupolos [71].

Outro tipo de detector de EM com dinodo contínuo é o prato multicanal, ou MCP, onde uma série de multicanais de elétrons de dinodo contínuo construídos em paralelo em formato de um disco. Os íons são multiplicados e ao saírem do

microcanal são coletados em um ânodo para detecção da corrente, estes detectores são utilizados em equipamentos como QTOF, por exemplo, que permite a coleta de grande quantidade de íons sem perda de sensibilidade [71].

5.2.2.5 Sistema de vácuo

O sistema de vácuo em um espectrômetro de massas é extremamente importante para manter o bom funcionamento do equipamento, e o sistema é mantido sob vácuo desde a interface, após a fonte de íons quando se utiliza uma fonte tipo API, até o detector. O sistema de vácuo geralmente é formado por uma ou mais bombas turbomoleculares, montadas dentro do equipamento, e uma bomba de vácuo rotativa de apoio para manter o sistema.

Em um espectrômetro de massas o vácuo tem a função de permitir que somente os íons da amostra sejam analisados, evitando interferência de compostos presentes no ambiente, evitar a absorção de espécies pelos quadrupolos causando perda de eficiência e evitar a colisão de íons com o detector de forma desnecessária, uma vez que a EM é um consumível e perde sua eficiência com sua utilização. O nível de vácuo necessário difere de acordo com o(s) analisador(es) de massas utilizado(s), por exemplo, em um quadrupolo o nível de vácuo chega a 10^{-3} Pa, já em um QTOF chega a 10^{-5} Pa [64].

5.3 Validação de Métodos Analíticos

Validação é a verificação na qual os requisitos especificados para o método analítico são adequados ao uso pretendido, portanto, todos os métodos não normatizados ou desenvolvidos fora do escopo da norma ou ampliações de um método normatizado precisam passar por uma série de testes que comprovem que o método é adequado para sua finalidade [72].

Existem diferentes guias e normas, de órgãos como União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), Organização Internacional para Padronização (ISO), Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), INMETRO, ICH, FDA entre outros, que são utilizados internacionalmente para diferentes áreas de aplicação, mas os critérios determinados para cada parâmetro

de validação devem levar em consideração não somente as informações da literatura, mas também a complexidade da matriz, complexidade do método analítico e nível de concentração dos analitos. E a quantidade de parâmetros avaliados depende do tipo de ensaio [73].

A validação pode contemplar seletividade, sensibilidade/ linearidade/ faixa de trabalho, tendência/recuperação, robustez, precisão, limite de detecção e limite de quantificação, e nos itens abaixo estes parâmetros de validação serão abordados.

5.3.1 Seletividade

De acordo com o Vocabulário Internacional de Metrologia (VIM) seletividade é Propriedade dum sistema de medição, utilizado com um procedimento de medição especificado, segundo a qual o sistema fornece valores medidos para um ou vários mensurandos, tais que os valores de cada mensurando sejam independentes uns dos outros ou de outras grandezas associadas ao fenômeno, corpo ou substância em estudo [74]. E de acord com a IUPAC é a capacidade de um método de determinar e/ ou separar diversos analitos de interesse em uma numa mistura complexa, sem sofrer interferência de outros componentes presentes na matriz [75].

Assim a seletividade vai evidenciar que o resultado atribuído à determinado analito não se refere à algum interferente ou a outro analito, ou caso alguma interferência ocorra esta deve ser determinada e conhecida [73].

5.3.2 Faixa de Trabalho e Linearidade

Faixa de Trabalho pode ser definida como o conjunto de valores de grandezas da mesma natureza, que pode ser medido por um dado instrumento de medição ou sistema de medição, com incerteza de medição instrumental especificada, sob condições determinadas, e linearidade é a capacidade de um método analítico de gerar resultados proporcionais à concentração do analito [76]. Então, realizando os estudos de faixa de trabalho e linearidade é possível

determinar a concentração do analito em amostras desconhecidas, pois assim o comportamento da curva analítica para cada analito é conhecido.

Se linear, a curva analítica é uma relação da concentração do analito com o sinal medido, obtendo-se uma equação da reta [73].

5.3.3 Limite de Detecção

O LD é a concentração de uma substância medida que pode certamente ser distinguida de zero [74], mas também pode ser definido como a menor quantidade de analito na amostra que pode ser detectada [76]. É um valor medido onde a probabilidade de indicar falsamente a presença de um elemento é α e de indicar sua ausência é β (Geralmente os valores de α e β são 0,05, como indicado pela IUPAC) [74].

O Limite de detecção do método (LD) é a menor concentração que pode ser detectada pelo equipamento em uma amostra que passou por todas as etapas do método analítico, como extração, armazenamento e análise nas condições especificadas e estes valores podem alterar caso o método seja implementado em um equipamento diferente [77].

5.3.4 Limite de Quantificação

O Limite de Quantificação do Método, ou LQ é a menor quantidade do analito na amostra que pode ser quantitativamente determinada com precisão e exatidão aceitáveis [76] [77]. Existem diferentes métodos para determinação deste parâmetro, mas é importante ressaltar que os critérios podem ser diferentes para este limite, uma vez que é um ponto crítico para a quantificação dos analitos.

5.3.5 Precisão

É o grau de concordância que se obtém entre as diversas medidas realizadas em um mesmo objeto. A precisão pode ser avaliada em termos de repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade, conforme descrito a seguir [73]:

- Repetitividade avalia a precisão sob as mesmas condições, mesmo analista, mesmo equipamento e menor tempo possível entre as replicatas [73];
- Precisão Intermediária avalia a precisão sob algumas condições variadas, como mesmo analista, mesmo equipamento e diferentes dias entre as análises, outras condições também podem ser variadas, como o analista ou instrumento [73].
- Reprodutibilidade avalia a precisão sob o máximo de condições variadas, ou seja, em tempos diferentes, diferentes analistas, diferentes laboratórios, entre outras condições [73].

5.3.6 Recuperação

É a concordância entre o valor medido e o valor nominal. E é utilizada para avaliar a exatidão do método analítico [73].

A exatidão não é considerada uma grandeza, portanto não pode ser atribuído valor numérico, desta forma a exatidão é avaliada numericamente por meio da recuperação ou tendência. De acordo com o VIM a exatidão de medição é o grau de concordância entre um valor medido e o valor nominal ou valor verdadeiro atribuído a este. Assim um valor é considerado exato quando o erro de medição é o menor possível [73].

5.3.7 Robustez

É a capacidade de manter o método analítico estável por variações nas suas condições [73]. Este estudo pode ser utilizado para otimizar o método analítico, quando está sendo desenvolvido, ou então pode ser utilizado para verificar a influência de fatores que podem variar caso o método seja implantado em outros laboratórios [78]. Este estudo não é obrigatória durante a validação, mas ele é importante para a avaliação das influências que o método pode sofrer, e quais variáveis devem ser cuidadosamente controladas durante sua utilização.

6 MATERIAIS & MÉTODOS

Neste capítulo serão descritas todas as etapas para o desenvolvimento e otimização das metodologias de análise utilizando *LC-MS/MS* e extração *SD-DLLME* e todos os métodos utilizados para avaliação dos resultados das amostras.

6.1 Instrumentação

Para a realização das extrações foram utilizados tubos de fundo cônico de vidro com volume aproximado de 15 mL e micropipetas automáticas para adição dos solventes e coleta dos extratos.

As análises de quantificação de filtros UV foram realizadas utilizando um HPLC, com duas bombas LC-40XR e gradiente de alta pressão, degaseificador DGU-405, amostrador automático SIL-40C XR e forno de coluna CTO-40C, válvula de seleção de fluxo MS/descarte FCV-0206 e Triploquadrupolo modelo LCMS-8045 com fonte de ionização ESI com gás aquecido.

Para as análises exploratórias foi utilizado HPLC, com duas bombas LC-40X3 e gradiente de alta pressão, degaseificador DGU-405, amostrador automático SIL-40C X3 e forno de coluna CTO-40S acoplado ao QTOF modelo LCMS-9030 com válvula de seleção de fluxo MS/descarte, fonte de ionização ESI e *Calibrant Delivery System* (*CDS*) para calibração do equipamento.

Todos os equipamentos utilizados são da marca Shimadzu Corporation (Kyoto, Japão).

6.2 Reagentes, Solventes e Materiais

Todos os solventes, aditivos e reagentes utilizados são de graus de pureza HPLC ou superior para garantir a qualidade dos resultados e evitar que sujidades possam impactar na eficiência do equipamento.

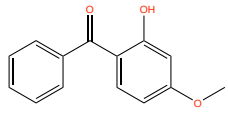
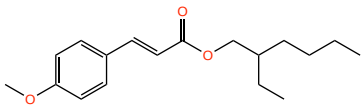
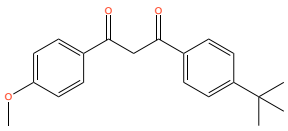
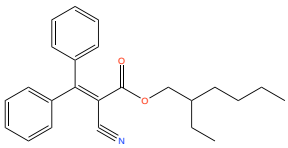
Os padrões analíticos de BP3, OMC, BMDM e OCT foram comprados da Sigma Aldrich com pureza de 98 % ou superior, conforme informações adicionais dos padrões analíticos indicadas no Anexo 1.

6.3 Desenvolvimento Analítico do método de quantificação

6.3.1 Método MRM

Na Tabela 1 estão apresentadas as estruturas moleculares e outras informações relevantes para a otimização dos analitos.

Tabela 1 – Estrutura molecular, Transições e outras informações dos analitos

Analito	Estrutura Molecular	Outras informações
BP3		MM: 228.24 g mol^{-1} $C_{14}H_{12}O_3$ pka = 7.07
OMC		MM: 290.4 g mol^{-1} $C_{18}H_{26}O_3$ Não tem átomos ionizáveis
BMDM		MM: 310.4 g mol^{-1} $C_{20}H_{22}O_3$ pka = 6.55
OCT		MM: 361.5 g mol^{-1} $C_{24}H_{27}NO_2$ Sem átomos ionizáveis

Fonte: Autor da tese

Para o desenvolvimento da metodologia *Multiple Reaction Monitoring* (*MRM*) foram utilizados padrões analíticos individuais de alta pureza em concentração de 200 ng mL^{-1}.

No método desenvolvido são monitorados os íons precursores e ao menos 2 íons produto para quantificação e confirmação. Todos os testes de desenvolvimento e validação foram realizados apenas para as transições de quantificação (transições mais intensas), pois as demais transições são utilizadas apenas para confirmação e não interferem nas quantificações

6.3.2 Método Cromatográfico

Após a otimização das energias e transições do método MRM, foi realizado o desenvolvimento cromatográfico utilizando uma solução da mistura dos analitos na concentração de 10 ng mL^{-1}. O objetivo nesta etapa foi obter um método eficiente, seletivo e rápido.

Para aquisição foi utilizado o software LabSolutions LCMS e todos os dados foram processados utilizando o software LabSolutions Insight LCMS.

6.3.3 Otimização da extração por SD-DLLME

O processo de preparo das amostras e extração dos analitos reduz a interferência da matriz ou de outros compostos, simultaneamente enriquecendo a concentração do analito. Desta forma, o método apresenta maior sensibilidade e menor susceptibilidade a interferentes.

A técnica de extração utilizada foi a SD-DLLME, para a determinação das melhores condições de extração foi realizado um estudo estatístico multifatorial, utilizando o planejamento de experimento de Youden, onde se utiliza uma combinação de fatores para avaliar a influência de cada um deles no processo estudado. Para a realização desta otimização foram selecionadas 7 variáveis e foi proposta uma alteração para cada uma delas. Os fatores estudados e os níveis avaliados estão apesentados na Tabela 2, e levaram em consideração o estudo univariado desenvolvido por Barbosa (2015) e as características físico-químicas

mais relevantes dos analitos [16]. Nesta tabela os valores nominais estão indicados pela letra maiúscula e a letra minúscula indica a alteração proposta.

Tabela 2 – Fatores e variações estudadas

Fator	Níveis testados	Relevância
Ajuste de pH	A: 100 μL de HCl 1 M a: 500 μL de HCl 1 M	De acordo com o pKa da molécula, quando a espécie está em estado neutro (não ionizado) em solução, esta possui mais afinidade por solventes apolares, facilitando a extração pelo solvente orgânico [16].
Adição de sal	B: Nenhum b: 1 mL $MgSO_4$ 100 mg mL^{-1}	A adição de sal na matriz onde será realizada a extração aumenta a polaridade do meio, fazendo com que o delta de polaridade entre a fase aquosa e orgânica seja ainda maior, melhorando a eficiência da extração [16].
Volume de extrator	C: 200 μL c: 150 μL	O volume de extrator deve ser otimizado para que não haja saturação do solvente responsável pela extração dos analitos da fase aquosa, mas também não haja diluição excessiva no procedimento [16].
Tempo de ultrassom	D: Nenhum d: 5 min	A utilização de ultrassom pode aumentar o contato das gotículas do solvente extrator com a matriz, melhorando a extração [16].
Solvente demulsificante	E: Acetona e: Acetonitrila	O demulsificante utilizado deve ser capaz de quebrar a emulsão formada na solução para a coleta da gota de solvente extrator [16].
Volume de demulsificante	F: 750 μL f: 1000 μL	
Solvente final	G: Metanol g: Metanol/ Acetonitrila (1:1 v/v)	O solvente utilizado para avolumar deve ser compatível com a técnica analítica utilizada e não pode causar precipitação [16].

Fonte: Autor da tese

Para a realização das análises, foram preparadas e analisadas 8 amostras, conforme combinações indicadas na Tabela 3.

Tabela 3 – Combinação de ensaios para a avaliação da robustez de acordo com o Teste de Youden

	Combinação Ensaiada							
Variável	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**
A/ a	**A**	**A**	**A**	**A**	a	a	a	a
B/ b	**B**	**B**	b	b	**B**	**B**	b	b
C/ c	**C**	c	**C**	c	**C**	c	**C**	c
D/ d	**D**	**D**	d	d	d	d	**D**	**D**
E/ e	**E**	e	**E**	e	e	**E**	e	**E**
F/ f	**F**	f	f	**F**	**F**	f	f	**F**
G/ g	**G**	g	g	**G**	g	**G**	**G**	g
Resultado	**s**	**t**	**u**	**v**	**w**	**x**	**y**	**z**

Fonte: INMETRO [73]

Para a avaliação dos resultados foi realizado a subtração dos resultados obtidos com níveis diferentes de cada variável, conforme exemplo apresentado na Equação (6).

$$Efeito\ \mathrm{A/a} = \left(\frac{s+t+u+v}{4}\right) - \left(\frac{w+x+y+z}{4}\right) \tag{6}$$

Utilizando estes dados foram utilizadas duas formas de avaliação gráfica, primeiramente foi realizada a Ordenação de Fatores, onde os efeitos com resultado positivo apresentaram melhor extração com o valor nominal dos fatores avaliados, já os negativos apresentaram melhor extração com a alteração proposta.

E a segunda avaliação gráfica foi a elaboração do gráfico de rankit, com as informações de Margem de Erro (ME) e Margem de Erro Simultânea (MES), calculados conforme equações (7) e (8). De acordo com a Heyden *et al.* se o efeito estiver entre ME e SME pode ser considerado possivelmente significativo, ou seja, um sinal de atenção para variações naquele efeito, e se o fator apresentar

resultados acima de MES é considerado um fator significativo para o resultado das análises [78].

$$\mathrm{ME} = t_{(1-\alpha/2,df)} . s_1 \quad (7)$$

Onde: ME = Margem de Erro; t = valor da probabilidade t de student; $1 - \alpha/2$ = 0,975; df = m = número de efeitos absolutos com valor menor que 2,5 S_0, sendo $s_0 = 1{,}5. \underset{i}{mediana} |E_i|$ e $s_1 = \sqrt{m^{-1} \sum E_i^2}$

$$\mathrm{MES} = t_{(1-\alpha^*/2,df)} . s_1 \quad (8)$$

Onde: α^* = 1 – $(1 - \alpha)^{(1/m)}$ (nível de significância Sidak).

Para a otimização da extração foram realizados testes com matriz e concentração de 50 ng mL^{-1}, para garantir que variações maiores pudessem ser observadas.

6.4 Validação de métodos analíticos

A validação seguiu o documento orientativo Documento Orientativo de Qualidade da Coordenação Geral de Acreditação (DOQ CGCRE) 008 de junho de 2020 [79], as etapas estão listadas abaixo. Os cálculos foram realizados utilizando a planilha de dados de Furusawa (2007) [80].

6.4.1 Faixa de Trabalho

A faixa de trabalho do método foi determinada levando em consideração o limite de detecção e o desvio padrão relativo menor que 30% (DPR%) entre cinco replicatas. Este critério foi determinado com base nos critérios de precisão apresentados na corneta de Horwitz para análise de concentrações em torno de 1 ppb (ng mL^{-1}) [81].

6.4.2 Seletividade

A otimização correta do método analítico no espectrômetro de massas, para a identificação das transições referentes ao composto de interesse, impacta diretamente neste parâmetro de validação, portanto, foram utilizados padrões analíticos certificados e de alta pureza para as otimizações realizadas.

Além da otimização do método utilizando uma transição MRM para quantificação e duas transições MRM para confirmação dos analitos, o que confere certo nível de seletividade intrínseca ao método, também foi utilizado critério de 20% para variação da razão de intensidade entre as transições e identificação do tempo de retenção.

Além das avaliações citadas acima, foi realizada a comparação entre cinco replicatas das curvas analíticas com e sem matriz (água ultrapura salinizada a 3%) e Teste T para comparação da inclinação das curvas analíticas e identificar a amplitude de diferença entre curvas, para as curvas serem consideradas estatisticamente semelhantes $T_{calculado}$ deve ser menor que $T_{tabelado}$, ou seja, como todos os valores de $T_{calculado}$ apresentaram resultado maior que $T_{tabelado}$ (95% de confiança). [82].

6.4.3 Premissas

A avaliação de premissas é importante para assegurar que os dados possuem distribuição normal e não há *outliers* no conjunto de dados, de modo que os testes estatísticos, como teste t e ANOVA.

Utilizando os dados das curvas analíticas, que representam as concentrações na faixa de trabalho estudada em matriz, foi avaliada a presença de *outliers* utilizando Teste de Grubbs [83], onde os resultados de $Z_{calculado}$ devem ser menores que $Z_{crítico}$ para evidenciar ausência de *outliers*.

A homoscedasticidade dos dados foi avaliada por meio da análise de resíduos, como indicado por descrita por Barros Neto *et al.* [84], utilizando os dados das curvas analíticas, na faixa de trabalho estudada, em matriz.

6.4.4 Linearidade

Para o estudo de linearidade foi realizada avaliação visual, análise do coeficiente de correlação (r) com critério de aceitação > 0,9, avaliação dos gráficos de resíduos normalizados onde o critério foi a observação da distribuição dos resíduos entre ± 2 desvios padrão e Análise de Variância (ANOVA), onde $F_{calculado}$ da regressão deve ser maior que $F_{crítico}$ para evidenciar a significância da regressão e $F_{calculado}$ da falta de ajuste deve ser menor que $F_{crítico}$, indicando que não há falta de ajuste, além do percentual de variação explicada e explicável serem próximos de 100%, indicando alta correlação do modelo linear.

Para avaliação da linearidade foram preparadas cinco replicatas independentes de cada nível de concentração da curva analítica.

6.4.5 LD e LQ

O Limite de Detecção foi determinado empiricamente, testando baixos níveis de concentração e avaliando a relação sinal/ ruído dos resultados obtidos, para esta avaliação foram analisadas três replicatas de cada teste.

O Limite de Quantificação foi determinado como o primeiro ponto da curva analítica, onde foi possível obter relação sinal/ ruído acima de 10 e resultados com precisão e exatidão adequados. Foram utilizadas cinco replicatas para a avaliação do limite de quantificação.

6.4.6 Precisão

A Repetibilidade foi avaliada por meio do cálculo de desvio padrão relativo (DPR) de dez replicatas da análise de 2 níveis de concentração e a Precisão intermediária foi avaliada por meio do DPR de vinte replicatas independentes, preparadas e analisadas em dias diferentes. O critério de aceitação determinado foi de DPR menor ou igual 30%, conforme critérios de precisão apresentados na corneta de Horwitz para análise de concentrações em torno de 1 ppb (ng mL^{-1}) [81].

6.4.7 Recuperação

A recuperação do método foi avaliada por meio da média da quantificação de quatro replicatas de três níveis de concentração diferentes, as adições foram realizadas antes do processo de extração e os resultados comparados com o valor nominal. O critério de aceitação determinado foi de Recuperação entre 40 e 120%, conforme critérios de precisão apresentados na corneta de Horwitz para análise de concentrações em torno de 1 ppb (ng mL^{-1}) [81].

6.4.8 Estabilidade 24h

A avaliação de estabilidade foi realizada com a análise dos padrões da curva analítica no tempo 0 (T0), em triplicata, e após 24 horas (T24), também em triplicata, e comparação dos resultados obtidos.

6.4.9 Robustez

Para a avaliação da robustez do método analítico foram alterados três parâmetros importantes que podem influenciar diretamente na identificação do pico dos analitos, são eles temperatura do forno de coluna ($\pm$ 2 °C), percentual de fase orgânica na fase móvel ($\pm$ 2%) e variação do fluxo de fase móvel ($\pm$ 0,1 mL min^{-1}).

Outros parâmetros de ionização foram otimizados durante a etapa de desenvolvimento analítico e o objetivo da robustez é avaliar pequenas variação involuntárias que podem ocorrer por variações no equipamento.

Os resultados foram avaliados por meio da observação de variações nos cromatogramas e resultados e alterações de parâmetros do método, como pressão do sistema. Para esta avaliação foi analisada uma amostra no ponto intermediário da curva alterando somente as condições do instrumento.

6.5 Coleta de Amostra

As amostras foram coletadas com maré baixa, onde é observada menor efeito de diluição de contaminantes próximos à orla, e acondicionadas em frascos de vidro âmbar, mantidas protegidas da luz e sob refrigeração, e para aplicação do método analítico, foram determinados pontos de coleta nos municípios de Santos, São Vicente e Ubatuba [85, 86] [57]. Nas três cidades é realizada a avaliação de balneabilidade pela Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) semanalmente, em diferentes pontos.

6.6 Áreas de Estudo

6.6.1 Baía de Santos e São Vicente

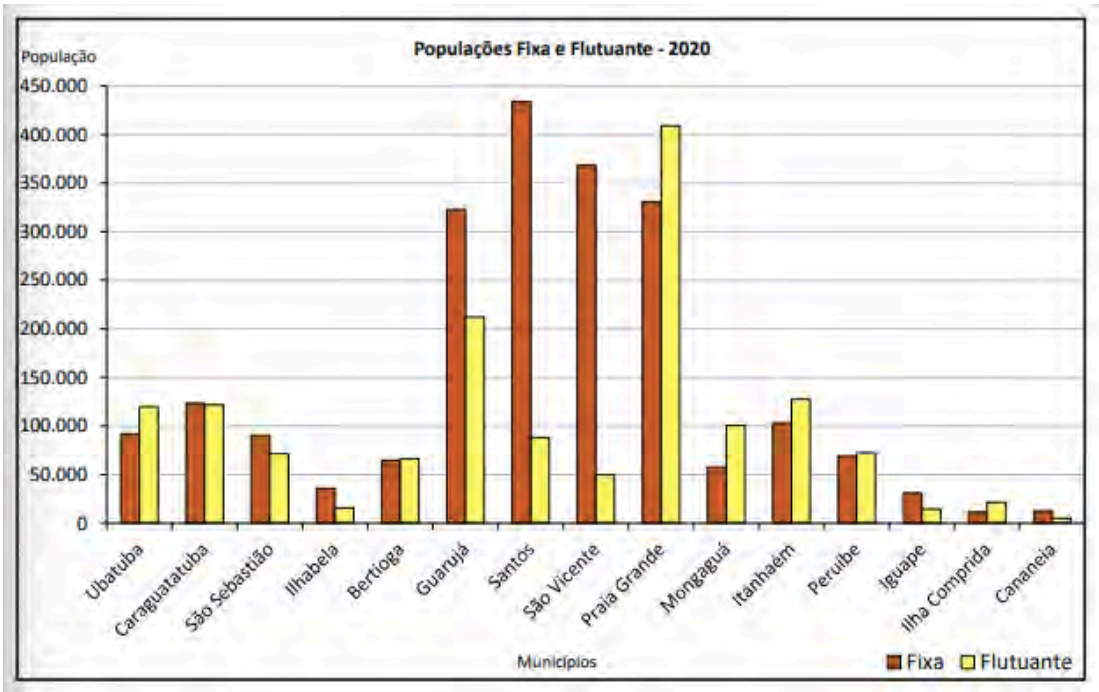
Nos municípios de Santos e São Vicente, foram definidos 7 pontos de coleta. A seleção destes pontos levou em consideração a avaliação de balneabilidade das praias realizada pela CETESB (uma vez que estes pontos já possuem um histórico de informações de outras análises de qualidade da água), a extensão da Baía e distribuição dos pontos ao longo da orla (de modo que fosse possível realizar uma avaliação de toda a extensão da orla) e localização do emissário de efluente de Santos.

Santos é um município localizado a 72 km de distância da capital (São Paulo) do estado de São Paulo, e compõe o litoral sul paulista. Com uma população de 419.400 (Segundo Censo 2010) habitantes, possui 280,6 km^2 de área total e 7 km de praia [87]. Em Santos está situado o maior porto da América Latina, por onde

passa mais de um quarto de todas as cargas que entram e saem do país, além de ser um polo turístico em alta temporada (durante o verão) [88].

São Vicente é cidade vizinha ao município de Santos, fica a 71,2 km de distância de São Paulo e possui 365 798 habitantes [89]. A Baixada Santista concentra mais de 80% da população do litoral paulista, sendo que Santos e São Vicente são alguns dos municípios que mais concentram a população. Nestes municípios também deve-se levar em consideração a população flutuante, que é aquela que não possui residência fixa no município, mas frequenta a região principalmente no período de férias e feriados, em Santos e São Vicente a população flutuante é em torno de 10 a 20% da população fixa (Figura 18). Em Santos o esgoto sanitário não possui tratamento, somente uma Estação de pré-condicionamento (EPC), onde são removidos sólidos e material flutuante do esgoto, e o emissário submarino, chamado sistema de disposição oceânica, fica localizado na praia José Menino.

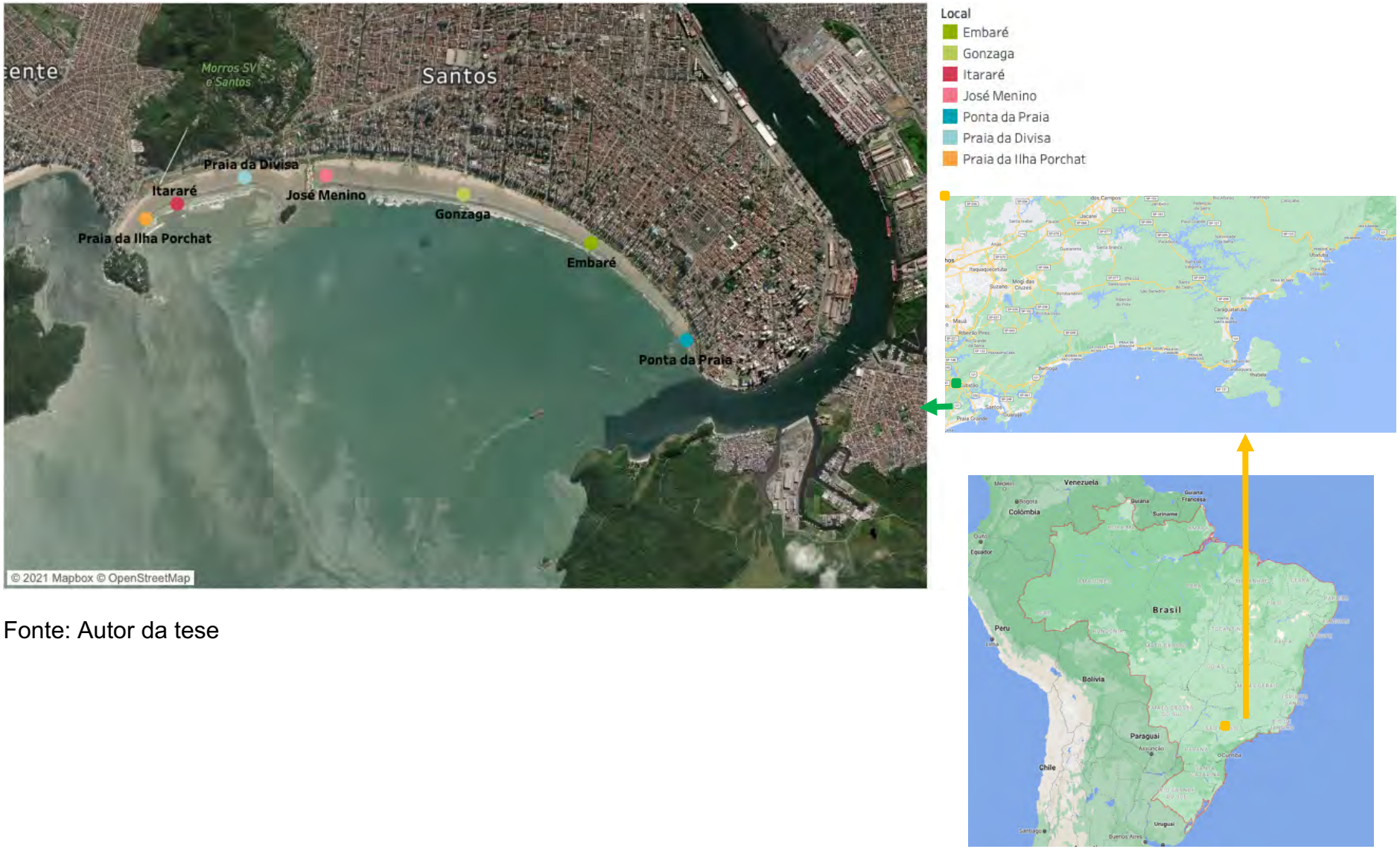
Figura 18 – População flutuante dos municípios do litoral de São Paulo



Fonte: CETESB [90]

A coleta nos municípios de Santos e São Vicente foi realizada em janeiro de 2018 e os pontos de coleta estão apresentados na Figura 19.

Figura 19 – Pontos de coleta em Santos, São Vicente



Fonte: Autor da tese

Algumas informações de referência dos pontos de coleta estão apresentadas na Tabela 4 e as informações de georreferenciamento estão no Apêndice A deste trabalho.

Tabela 4 – Referências dos pontos de coleta em Santos e São Vicente

Nome do Ponto	Referência
Ponta da Praia	Em frente ao Aquário Municipal e ponto mais próximo do porto de Santos.
Embaré	Em frente ao Orfanato Casa da Vovó Anita
Gonzaga	Em frente à Avenida Ana Costa
José Menino	Em frente à Rua Olavo Bilac, próximo ao emissário de efluentes
Praia da Divisa	Em frente ao Quiosque Talismã
Itararé	Em frente ao Posto 2 de Salvamento
Praia da Ilha Porchat	Em frente à Rua Onze de Junho, última praia da Baía

Fonte: Autor da tese

6.6.2 Ubatuba

Para a realização das coletas em Ubatuba foi firmada uma parceria com a equipe do Laboratório de Sistemas Planctônicos (LAPS) do Instituto Oceanográfico da USP, e foram definidos 16 pontos para amostragem.

Ubatuba localiza-se a 250 km da capital, tem população de cerca de 90 000 habitantes, possui 723 km^2 de área total, 3 Parques de Preservação Ambiental e um dos maiores índices de Mata Atlântica preservada do Brasil [89]. Junto com outros quatro municípios, Ubatuba forma o litoral norte paulista e concentra 15% da população total do litoral. Como apresentado na Figura 18 a população flutuante de Ubatuba supera a população fixa do município, o que significa que em períodos de férias a feriado a população total do município é maior que o dobro da população fixa.

Em Ubatuba o esgoto sanitário também é destinado por meio de sistema de disposição oceânica, a EPC e emissário ficam localizados na praia da Enseada.

Outra questão crítica que pode impactar a qualidade da água do mar nesta região são as ocupações irregulares, onde não é possível implantar nenhum sistema de saneamento básico, estima-se que em Ubatuba de 21 a 40% do esgoto sanitário é coletado. Algumas informações de referência dos pontos de coleta estão apresentadas na Tabela 5 e as informações de coordenadas geográficas estão no Apêndice A deste trabalho.

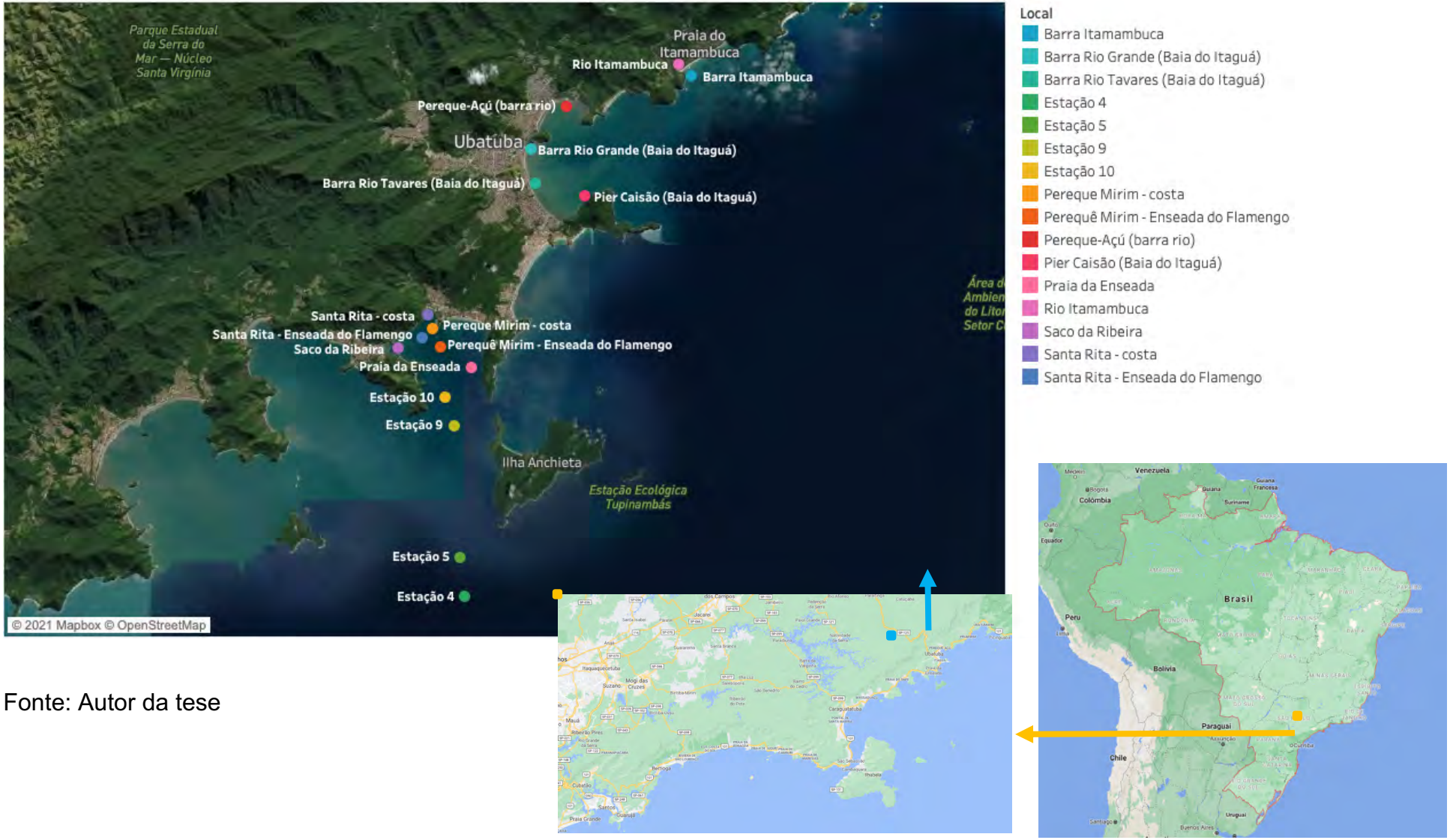
Tabela 5 – Referências dos pontos de coleta em Ubatuba

Nome do Ponto	Referência
Barra de Itamambuca	Próximo ao Rio Itamambuca, que possui grande área de ocupação irregular no seu entorno
Barra do Rio Grande	Local onde se concentram pescadores e embarcações de pesca – Região central
Barra do Rio Tavares	Praia na região central de Ubatuba
Estação 4	Ponto em alto mar mais longe da costa, próximo à Ilha
Estação 5	Ponto em alto mar, próximo à Ilha Anchieta
Estação 9	Ponto em alto mar, próximo à costa
Estação 10	Ponto em alto mar, mais próximo à costa
Perequê-mirim	Praia na região central de Ubatuba
Perequê-açu	Praia na região central de Ubatuba
Pier Caisão	Próximo ao píer interditado
Praia da Enseada	Praia localizada ao sul de Ubatuba com estrutura para
Rio Itamambuca	Próximo ao Rio Itamambuca, que possui grande área de ocupação irregular no seu entorno
Saco do Ribeira	Maior ancoradouro de Ubatuba e polo do turismo náutico, praia pouco frequentada, ponto de acesso para passeios.
Santa Rita	Acessada por Perequê-mirim ou praia da Enseada, localizada ao sul de Ubatuba

Fonte: Autor da tese

As coletas no município de Ubatuba foram realizadas em janeiro de 2019 e janeiro de 2020, os pontos de coleta definidos estão apresentados na Figura 20 e as fotos tiradas na coleta estão apresentadas no Apêndice B deste trabalho.

Figura 20 – Pontos de coleta em Ubatuba



Fonte: Autor da tese

6.7 Análise Complementar

Para complementação dos resultados e obter mais informações da área de estudo foi realizada uma análise exploratória utilizando espectrometria de massas de alta resolução (HRAM – *High Resolution Accurate Mass*).

6.7.1 Análises HRAM QTOF

Para as análises exploratórias por alta resolução foram utilizadas as condições analíticas abaixo, baseadas no método analítico desenvolvido para quantificação.

Como fase móvel foi utilizado, Fase móvel A – água com 0,1% de ácido fórmico e fase móvel B: Metanol. O gradiente de eluição foi realizado com fluxo constante de 0,3 mL min^{-1}, iniciou com 10% de B de 0 a 1 min, a concentração de B foi aumentada para 100% em 9 min e mantida assim por 4 minutos, então a condição inicial foi retomada e mantida por 2 min para estabilização da pressão. Estas condições foram determinadas para a eluição de compostos de polaridades diferentes ao longo do método. A coluna analítica utilizada foi a Shim-pack Velox C18 2,1 x 100 mm, 1,8 μm (Shimadzu Corporation – Kyoto, Japão), mantida a 40 °C por toda a corrida cromatográfica.

Após otimização as condições de ionização utilizando fonte *ElectroSpray* foram: fluxo do gás de nebulização (*Nebulizing Gas Flow*) de 3 L min^{-1}; fluxo do gás de aquecimento (*Heating Gas Flow*) a 10 L min^{-1}; temperatura da interface (interface temperature) a 300 °C; temperatura da linha de dessolvatação (*DL temperature*) de 250 °C; temperatura do bloco de aquecimento (*Heat Block Temperature*) de 400 °C e fluxo do gás de secagem (*Drying Gas flow*) de 3 L min^{-1}.

Foi utilizado maior tempo de corrida cromatográfica e uma coluna analítica de maiores dimensões, uma vez que não haviam compostos alvo, portanto, o método não foi otimizado de forma específica.

A aquisição do espectrômetro de massas foi realizada utilizando método DIA (*Data Independent Aquisition*), em modo positivo e negativo, onde um evento

de varredura e diferentes eventos de MS/MS são realizados em sequência para a fragmentação dos íons identificados no espectro. Os parâmetros de aquisição do método DIA estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Parâmetros de aquisição do método DIA

Evento #	Tipo de Aquisição	m/z do íon precursor	TOF start m/z	TOF end m/z	CE	CE spread (+/-)
1	MS	-	100,0000	600,0000	30,0	25,0
2	MS/MS	110,00	50,0000	600,0000	30,0	25,0
3	MS/MS	130,00	50,0000	600,0000	30,0	25,0
4	MS/MS	150,00	50,0000	600,0000	30,0	25,0
5	MS/MS	170,00	50,0000	600,0000	30,0	25,0
6	MS/MS	190,00	50,0000	600,0000	30,0	25,0
7	MS/MS	210,00	50,0000	600,0000	30,0	25,0
8	MS/MS	230,00	50,0000	600,0000	30,0	25,0
9	MS/MS	250,00	50,0000	600,0000	30,0	25,0
10	MS/MS	270,00	50,0000	600,0000	30,0	25,0
11	MS/MS	290,00	50,0000	600,0000	30,0	25,0
12	MS/MS	310,00	50,0000	600,0000	30,0	25,0
13	MS/MS	330,00	50,0000	600,0000	30,0	25,0
14	MS/MS	350,00	50,0000	600,0000	30,0	25,0
15	MS/MS	370,00	50,0000	600,0000	30,0	25,0
16	MS/MS	390,00	50,0000	600,0000	30,0	25,0
17	MS/MS	410,00	50,0000	600,0000	30,0	25,0
18	MS/MS	430,00	50,0000	600,0000	30,0	25,0
19	MS/MS	450,00	50,0000	600,0000	30,0	25,0
20	MS/MS	470,00	50,0000	600,0000	30,0	25,0
21	MS/MS	490,00	50,0000	600,0000	30,0	25,0
22	MS/MS	510,00	50,0000	600,0000	30,0	25,0
23	MS/MS	530,00	50,0000	600,0000	30,0	25,0
24	MS/MS	550,00	50,0000	600,0000	30,0	25,0
25	MS/MS	570,00	50,0000	600,0000	30,0	25,0
26	MS/MS	590,00	50,0000	600,0000	30,0	25,0

Fonte: Autor da tese

Para aquisição foi utilizado o software LabSolutions LCMS e todos os dados foram processados utilizando o software LabSolutions Insight Explore.Os compostos procurados pesquisados nas amostras estão listados na Tabela 7 à Tabela 12.

Tabela 7 – Compostos pesquisados na análise utilizando HRAM QTOF – Parte 1

Composto	Fórmula Molecular	Composto	Fórmula Molecular
10,11-Dihydro=12*arbamazepine	$C_{15}H_{14}N_2O$	Fluphenazine	$C_{22}H_{26}F_3N_3OS$
4-Hydroxy Diclofenac	$C_{14}H_{11}Cl_2NO_3$	Gabapentine	$C_9H_{17}NO_2$
Allopurinol	$C_5H_4N_4O$	Gefitinib	$C_{22}H_{24}ClFN_4O_3$
Azelnidipine	$C_{33}H_{34}N_4O_6$	Gestodene	$C_{21}H_{26}O_2$
Doxycycline	$C_{22}H_{24}N_2O_8$	Glibenclamide	$C_{23}H_{28}ClN_3O_5S$
Ceftriaxone	$C_{18}H_{18}N_8O_7S_3$	Haloperidol	$C_{21}H_{23}ClFNO_2$
Chlorhexidine	$C_{22}H_{30}Cl_2N_{10}$	Heptaminol	$C_8H_{19}NO$
Cytarabine	$C_9H_{13}N_3O_5$	Hydrochlorothiazide	$C_7H_8ClN_3O_4S_2$
Esmolol	$C_{16}H_{25}NO_4$	Hydroxymetronidazole	$C_6H_9N_3O_4$
Ethylparaben	$C_9H_{10}O_3$	Hydroxyprogesterone caproate	$C_{27}H_{40}O_4$
Etoposide	$C_{29}H_{32}O_{13}$	Ibrutinib	$C_{25}H_{24}N_6O_2$
Fosamprenavir	$C_{25}H_{36}N_3O_9PS$	Ifosfamide	$C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P$
Maduramicin	$C_{47}H_{83}NO_{17}$	Imidapril	$C_{20}H_{27}N_3O_6$
Methylparaben	$C_8H_8O_3$	Imipramine	$C_{19}H_{24}N_2$
Norfloxacine	$C_{16}H_{18}FN_3O_3$	Indomethacin	$C_{19}H_{16}ClNO_4$
Oxolinic acid	$C_{13}H_{11}NO_5$	Iobitridol	$C_{20}H_{28}I_3N_3O_9$
Oxytetracycline	$C_{22}H_{24}N_2O_9$	Iohexol	$C_{19}H_{26}I_3N_3O_9$
Prednisolone	$C_{21}H_{28}O_5$	Tipranavir	$C_{31}H_{33}F_3N_2O_5S$
Rifampicine	$C_{43}H_{58}N_4O_{12}$	Ipratropium	$C_{20}H_{30}NO_3$+
Triclosan	$C_{12}H_7Cl_3O_2$	Irbesartan	$C_{25}H_{28}N_6O$
17ª-Estradiol	$C_{18}H_{24}O_2$	Ketorolac	$C_{15}H_{13}NO_3$
17ª-Ethinylestradiol	$C_{20}H_{24}O_2$	Lamivudine	$C_8H_{11}N_3O_3S$
Acetaminophen	$C_8H_9NO_2$	Iopromide	$C_{18}H_{24}I_3N_3O_8$
Acetazolamide	$C_4H_6N_4O_3S_2$	Lenvatinib	$C_{21}H_{19}ClN_4O_4$
Acetylsulfamethoxazole	$C_{12}H_{13}N_3O_4S$	Levamisole	$C_{11}H_{12}N_2S$
Afatinib	$C_{24}H_{25}ClFN_5O_3$	Lincomycin	$C_{18}H_{34}N_2O_6S$
Alimemazine	$C_{18}H_{22}N_2S$	Lopinavir	$C_{37}H_{48}N_4O_5$

Fonte: Autor da tese

Tabela 8 – Compostos pesquisados na análise utilizando HRAM QTOF – Parte 2

Composto	Fórmula Molecular	Composto	Fórmula Molecular
Aminopyrine	$C_{13}H_{17}N_3O$	Loratadine	$C_{22}H_{23}ClN_2O_2$
Amiodarone	$C_{25}H_{29}I_2NO_3$	Lorazepam	$C_{15}H_{10}Cl_2N_2O_2$
Amprolium	$C_{14}H_{19}ClN_4$	Losartan	$C_{22}H_{23}ClN_6O$
Androstenedione	$C_{19}H_{26}O_2$	Loxapine	$C_{18}H_{18}ClN_3O$
Azithromycin	$C_{38}H_{72}N_2O_{12}$	Loxoprofen	$C_{15}H_{18}O_3$
Benzylpenicillin	$C_{16}H_{18}N_2O_4S$	Mefenamic acid	$C_{15}H_{15}NO_2$
Bithionol	$C_{12}H_6Cl_4O_2S$	Meloxicam	$C_{14}H_{13}N_3O_4S_2$
Caffeine	$C_8H_{10}N_4O_2$	Mepivacaine	$C_{15}H_{22}N_2O$
Cefotaxime	$C_{16}H_{17}N_5O_7S_2$	Metoclopramide	$C_{14}H_{22}ClN_3O_2$
Cerdulatinib	$C_{20}H_{27}N_7O_3S$	Metoprolol	$C_{15}H_{25}NO_3$
Ceritinib	$C_{28}H_{36}ClN_5O_3S$	Metronidazole	$C_6H_9N_3O_3$
Chloramphenicol	$C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$	Midazolam	$C_{18}H_{13}ClFN_3$
Chlorpromazine	$C_{17}H_{19}ClN_2S$	Midodrine	$C_{12}H_{18}N_2O_4$
Ciprofloxacine	$C_{17}H_{18}FN_3O_3$	Mirtazapine	$C_{17}H_{19}N_3$
Clarithromycin	$C_{38}H_{69}NO_{13}$	Molindone	$C_{16}H_{24}N_2O_2$
Clorsulon	$C_8H_8Cl_3N_3O_4S_2$	Monensin A	$C_{36}H_{62}O_{11}$
Closantel	$C_{22}H_{14}Cl_2I_2N_2O_2$	Nadolol	$C_{17}H_{27}NO_4$
Crizotinib	$C_{21}H_{22}Cl_2FN_5O$	Narasin	$C_{43}H_{72}O_{11}$
Dacomitinib	$C_{24}H_{25}ClFN_5O_2$	Nelfinavir	$C_{32}H_{45}N_3O_4S$
Danofloxacin	$C_{19}H_{20}FN_3O_3$	Nevirapine	$C_{15}H_{14}N_4O$
Diosmetin	$C_{16}H_{12}O_6$	Nicardipine	$C_{26}H_{29}N_3O_6$
Doxepin	$C_{19}H_{21}NO$	Nifedipine	$C_{17}H_{18}N_2O_6$
Gemfibrozil	$C_{15}H_{22}O_3$	Niflumic acid	$C_{13}H_9F_3N_2O_2$
Drospirenone	$C_{24}H_{30}O_3$	Nilotinib	$C_{28}H_{22}F_3N_7O$
Enrofloxacine	$C_{19}H_{22}FN_3O_3$	Nintedanib	$C_{31}H_{33}N_5O_4$
Estrone	$C_{18}H_{22}O_2$	Norethisterone	$C_{20}H_{26}O_2$
Furosemide	$C_{12}H_{11}ClN_2O_5S$	Norgestimate	$C_{23}H_{31}NO_3$
Genistein	$C_{15}H_{10}O_5$	Norgestrel	$C_{21}H_{28}O_2$
Imatinib	$C_{29}H_{31}N_7O$	Norquetiapine	$C_{17}H_{17}N_3S$
Iopamidol	$C_{17}H_{22}I_3N_3O_8$	Omeprazole	$C_{17}H_{19}N_3O_3S$
Isoquinoline	C_9H_7N	Oxazepam	$C_{15}H_{11}ClN_2O_2$
Josamycin	$C_{42}H_{69}NO_{15}$	Pentoxifylline	$C_{13}H_{18}N_4O_3$
Ketoprofen	$C_{16}H_{14}O_3$	Perindopril	$C_{19}H_{32}N_2O_5$
Marbofloxacine	$C_{17}H_{19}FN_4O_4$	Phenacetin	$C_{10}H_{13}NO_2$
Medroxyprogesterone	$C_{22}H_{32}O_3$	Phenytoin	$C_{15}H_{12}N_2O_2$

Fonte: Autor da tese

Tabela 9 – Compostos pesquisados na análise utilizando HRAM QTOF – Parte 3

Composto	Fórmula Molecular	Composto	Fórmula Molecular
Mestranol	$C_{21}H_{26}O_2$	Lamotrigine	$C_9H_7Cl_2N_5$
Metaflumizone	$C_{24}H_{16}F_6N_4O_2$	Pindolol	$C_{14}H_{20}N_2O_2$
Metformin	$C_4H_{11}N_5$	Piribedil	$C_{16}H_{18}N_4O_2$
Methotrexate	$C_{20}H_{22}N_8O_5$	Piroxicam	$C_{15}H_{13}N_3O_4S$
Methylphenidate	$C_{14}H_{19}NO_2$	Prazepam	$C_{19}H_{17}ClN_2O$
Miconazole	$C_{18}H_{14}Cl_4N_2O$	Prilocaine	$C_{13}H_{20}N_2O$
Naftidrofuryl	$C_{24}H_{33}NO_3$	Primidone	$C_{12}H_{14}N_2O_2$
Nicotine	$C_{10}H_{14}N_2$	Propranolol	$C_{16}H_{21}NO_2$
Nitrendipine	$C_{18}H_{20}N_2O_6$	Propyphenazone	$C_{14}H_{18}N_2O$
O-desmethylnaproxen	$C_{13}H_{12}O_3$	Pyrimethamine	$C_{12}H_{13}ClN_4$
Ofloxacine	$C_{18}H_{20}FN_3O_4$	Ramipril	$C_{23}H_{32}N_2O_5$
Oxyclozanide	$C_{13}H_6Cl_5NO_3$	Ranitidine	$C_{13}H_{22}N_4O_3S$
Paraxanthine	$C_7H_8N_4O_2$	Ritonavir	$C_{37}H_{48}N_6O_5S_2$
Perindoprilat	$C_{17}H_{28}N_2O_5$	Roxithromycin	$C_{41}H_{76}N_2O_{15}$
Phenazine	$C_{12}H_8N_2$	Rufinamide	$C_{10}H_8F_2N_4O$
Pravastatine	$C_{23}H_{36}O_7$	Salbutamol	$C_{13}H_{21}NO_3$
Pristinamycin IIA	$C_{28}H_{35}N_3O_7$	Ceftiofur	$C_{19}H_{17}N_5O_7S_3$
Propylparaben	$C_{10}H_{12}O_3$	Saquinavir	$C_{38}H_{50}N_6O_5$
Ribavirin	$C_8H_{12}N_4O_5$	Sildenafil	$C_{22}H_{30}N_6O_4S$
Rociletinib	$C_{27}H_{28}F_3N_7O_3$	Sorafenib	$C_{21}H_{16}ClF_3N_4O_3$
Ronidazole	$C_6H_8N_4O_4$	Sotalol	$C_{12}H_{20}N_2O_3S$
Sertraline	$C_{17}H_{17}Cl_2N$	Sotrastaurin	$C_{25}H_{22}N_6O_2$
Spiramycin	$C_{43}H_{74}N_2O_{14}$	Sulfachloropyridazine	$C_{10}H_9ClN_4O_2S$
Sulfamethoxazole	$C_{10}H_{11}N_3O_3S$	Sulfadiazine	$C_{10}H_{10}N_4O_2S$
Tamoxifen	$C_{26}H_{29}NO$	Sulfadimethoxine	$C_{12}H_{14}N_4O_4S$
Tenofovir	$C_9H_{14}N_5O_4P$	Sulfamerazine	$C_{11}H_{12}N_4O_2S$
Teriflunomide	$C_{12}H_9F_3N_2O_2$	Sulfamethazine	$C_{12}H_{14}N_4O_2S$
Tetracaine	$C_{15}H_{24}N_2O_2$	Sulfamethizole	$C_9H_{10}N_4O_2S_2$
Salicylic acid	$C_7H_6O_3$	Sulfapyridine	$C_{11}H_{11}N_3O_2S$
Tolfenamic acid	$C_{14}H_{12}ClNO_2$	Sulfaquinoxaline	$C_{14}H_{12}N_4O_2S$
Trimetazidine	$C_{14}H_{22}N_2O_3$	Sulfasalazine	$C_{18}H_{14}N_4O_5S$
Vortioxetine	$C_{18}H_{22}N_2S$	Sulfathiazole	$C_9H_9N_3O_2S_2$
Abacavir	$C_{14}H_{18}N_6O$	Sulfisoxazole	$C_{11}H_{13}N_3O_3S$
Acebutolol	$C_{18}H_{28}N_2O_4$	Sumatriptan	$C_{14}H_{21}N_3O_2S$
Albendazole	$C_{12}H_{15}N_3O_2S$	Sunitinib	$C_{22}H_{27}FN_4O_2$

Fonte: Autor da tese

Tabela 10 – Compostos pesquisados na análise utilizando HRAM QTOF – Parte 4

Composto	Fórmula Molecular	Composto	Fórmula Molecular
Altrenogest	$C_{21}H_{26}O_2$	Tadalafil	$C_{22}H_{19}N_3O_4$
Amitriptyline	$C_{20}H_{23}N$	Terbutaline	$C_{12}H_{19}NO_3$
Amlodipine	$C_{20}H_{25}ClN_2O_5$	Thiabendazole	$C_{10}H_7N_3S$
Amoxapine	$C_{17}H_{16}ClN_3O$	Ticlopidine	$C_{14}H_{14}ClNS$
Amprenavir	$C_{25}H_{35}N_3O_6S$	Timolol	$C_{13}H_{24}N_4O_3S$
Antipyrine	$C_{11}H_{12}N_2O$	Tofacitinib	$C_{16}H_{20}N_6O$
Atazanavir	$C_{38}H_{52}N_6O_7$	Tramadol	$C_{16}H_{25}NO_2$
Atenolol	$C_{14}H_{22}N_2O_3$	Triclabendazole	$C_{14}H_9Cl_3N_2OS$
Atenolol acid	$C_{14}H_{21}NO_4$	Triclocarban	$C_{13}H_9Cl_3N_2O$
Atorvastatin	$C_{33}H_{35}FN_2O_5$	Trimethoprim	$C_{14}H_{18}N_4O_3$
Baclofen	$C_{10}H_{12}ClNO_2$	Trimipramine	$C_{20}H_{26}N_2$
Bezafibrate	$C_{19}H_{20}ClNO_4$	Tylosin	$C_{46}H_{77}NO_{17}$
Bisoprolol	$C_{18}H_{31}NO_4$	Vardenafil	$C_{23}H_{32}N_6O_4S$
Buflomedil	$C_{17}H_{25}NO_4$	Venlafaxine	$C_{17}H_{27}NO_2$
Bupropion	$C_{13}H_{18}ClNO$	Verapamil	$C_{27}H_{38}N_2O_4$
Butylparaben	$C_{11}H_{14}O_3$	Virginiamycin B	$C_{45}H_{54}N_8O_{10}$
Cabozantinib	$C_{28}H_{24}FN_3O_5$	Warfarin	$C_{19}H_{16}O_4$
Candesartan	$C_{24}H_{20}N_6O_3$	Zolpidem	$C_{19}H_{21}N_3O$
Capmatinib	$C_{23}H_{17}FN_6O$	Zonisamide	$C_8H_8N_2O_3S$
Carazolol	$C_{18}H_{22}N_2O_2$	1,3-Dihydroxybenzene (Resorcinol)	$C_6H_6O_2$
Carbadox	$C_{11}H_{10}N_4O_4$	2-Hydroxybenzaldehyde (Salicylaldehyde)	$C_7H_6O_2$
Carbamazepine	$C_{15}H_{12}N_2O$	Benzoic acid	$C_7H_6O_2$
Carvedilol	$C_{24}H_{26}N_2O_4$	4-Methoxybenzoic acid (4-anisic acid)	$C_8H_8O_3$
Carbamazepine epoxide	$C_{15}H_{12}N_2O_2$	2,4-Dimethylanisole	$C_9H_{12}O$
Cetirizine	$C_{21}H_{25}ClN_2O_3$	p-tert-butylbenzoic acid (4-t-butylbenzoic acid)	$C_{11}H_{14}O_2$
Chlormadinone	$C_{21}H_{27}ClO_3$	(Z)-3-hydroxy-1-(4-methoxycyclohexa-2,4-dien-1-yl)-3-(4-methoxyphenyl)prop-2-en-1-one	$C_{17}H_{16}O_4$

Fonte: Autor da tese

Tabela 11 – Compostos pesquisados na análise utilizando HRAM QTOF – Parte 5

Composto	Fórmula Molecular	Composto	Fórmula Molecular
Citalopram	$C_{20}H_{21}FN_2O$	1,4-bis(4-methoxyphenyl)butane-1,4-dione	$C_{18}H_{18}O_4$
Clemastine	$C_{21}H_{26}ClNO$	4-Methoxybenzaldehyde	$C_8H_8O_2$
Clenbuterol	$C_{12}H_{18}Cl_2N_2O$	2-Ethylhexanol	$C_8H_{18}O$
Clindamycin	$C_{18}H_{33}ClN_2O_5S$	2-(2-oxoethyl)hexyl3-(4-methoxyphenyl)acrylate	$C_{18}H_{24}O_4$
Clomipramine	$C_{19}H_{23}ClN_2$	4-amino-hydoxybenzoic acid	$C_7H_7NO_3$
Clonazepam	$C_{15}H_{10}ClN_3O_3$	4-hydroxybenzoic acid	$C_7H_6O_3$
Clonidine	$C_9H_9Cl_2N_3$	Methyl 4-aminobenzoate	$C_8H_9NO_2$
Clopidogrel	$C_{16}H_{16}ClNO_2S$	2-Ethylhexylp-methylaminobenzoate	$C_{16}H_{25}NO_2$
Clotrimazole	$C_{22}H_{17}ClN_2$	x-Hydroxy 2-ethylhexyl4-aminobenzoate	$C_{15}H_{23}NO_3$
Clozapine	$C_{18}H_{19}ClN_4$	Methyl4-(dimethylamino)benzoate	$C_{10}H_{13}NO_2$
Cotinine	$C_{10}H_{12}N_2O$	(dioxy)2-Ethylhexyl4-(dimethylamino)benzoate	$C_{17}H_{23}NO_4$
Cyamemazine	$C_{19}H_{21}N_3S$	2-Ethylhexyl 4-(Nmethylformanmido) benzoate	$C_{17}H_{25}NO_3$
Cyclophosphamide	$C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P$	4-(Methylamino)benzoic acid	$C_8H_9NO_2$
Darunavir	$C_{27}H_{37}N_3O_7S$	Hexyl 2-(4-amino-2-hydroxybenzoyl)benzoate	$C_{20}H_{23}NO_4$
Dasatinib	$C_{22}H_{26}ClN_7O_2S$	Hexyl 2-(4-(diethylamino)-2-hydroxybenzoyl)-hydroxybenzoate	$C_{24}H_{31}NO_5$
Desipramine	$C_{18}H_{22}N_2$	Hexyl 2-(4-(ethylamino)-2-hydroxybenzoyl)benzoate	$C_{22}H_{27}NO_4$

Fonte: Autor da tese

Tabela 12 – Compostos pesquisados na análise utilizando HRAM QTOF – Parte 6

Composto	Fórmula Molecular	Composto	Fórmula Molecular
Desloratadine	$C_{19}H_{19}ClN_2$	Benzophenone-1	$C_{13}H_{10}O_3$
Desmethyldiazepam	$C_{15}H_{11}ClN_2O$	Benzophenone-2	$C_{13}H_{10}O_5$
Desvenlafaxine	$C_{16}H_{25}NO_2$	Benzophenone-3	$C_{14}H_{12}O_3$
Diazepam	$C_{16}H_{13}ClN_2O$	Benzophenone-4	$C_{14}H_{12}O_6S$
Diazinon	$C_{12}H_{21}N_2O_3PS$	Benzophenone-6	$C_{15}H_{14}O_5$
Diazoxide	$C_8H_7ClN_2O_2S$	Benzophenone-8	$C_{14}H_{12}O_4$
Dibucain	$C_{20}H_{29}N_3O_2$	Isopentyl 4-Methoxycinnamate	$C_{15}H_{20}O_3$
Diclofenac	$C_{14}H_{11}Cl_2NO_2$	Octinoxate	$C_{18}H_{26}O_3$
Dicyclanil	$C_8H_{10}N_6$	Etocrilene	$C_{18}H_{15}NO_2$
Dihydroergotamine	$C_{33}H_{37}N_5O_5$	Benzyl salicylate	$C_{14}H_{12}O_3$
Diltiazem	$C_{22}H_{26}N_2O_4S$	2-ethylhexyl salicylate	$C_{15}H_{22}O_3$
Diphenhydramine	$C_{17}H_{21}NO$	Homosalate	$C_{16}H_{22}O_3$
Domperidone	$C_{22}H_{24}ClN_5O_2$	Enzacamene	$C_{18}H_{22}O$
Enzacamene	$C_{18}H_{22}O$	Drometrizole Trisiloxane	$C_{24}H_{39}N_3O_3Si_3$
Erlotinib	$C_{22}H_{23}N_3O_4$	Methyl anthranilate	$C_8H_9NO_2$
Erythromycin	$C_{37}H_{67}NO_{13}$	Octocrylene	$C_{24}H_{27}NO_2$
Fenbendazole	$C_{15}H_{13}N_3O_2S$	Hexyl 2-(4-(Diethylamino)-2-Hydroxybenzoyl)Benzoate	$C_{24}H_{31}NO_4$
Fenofibrate	$C_{20}H_{21}ClO_4$	Padimate-O;	$C_{17}H_{27}NO_2$
Fenofibric acid	$C_{17}H_{15}ClO_4$	Ensulizole	$C_{13}H_{10}N_2O_3S$
Flumequine	$C_{14}H_{12}FNO_3$	Avobenzone	$C_{20}H_{22}O_3$
Fluoxetine	$C_{17}H_{18}F_3NO$	4-Aminobenzoic Acid	$C_7H_7NO_2$

Fonte: Autor da tese

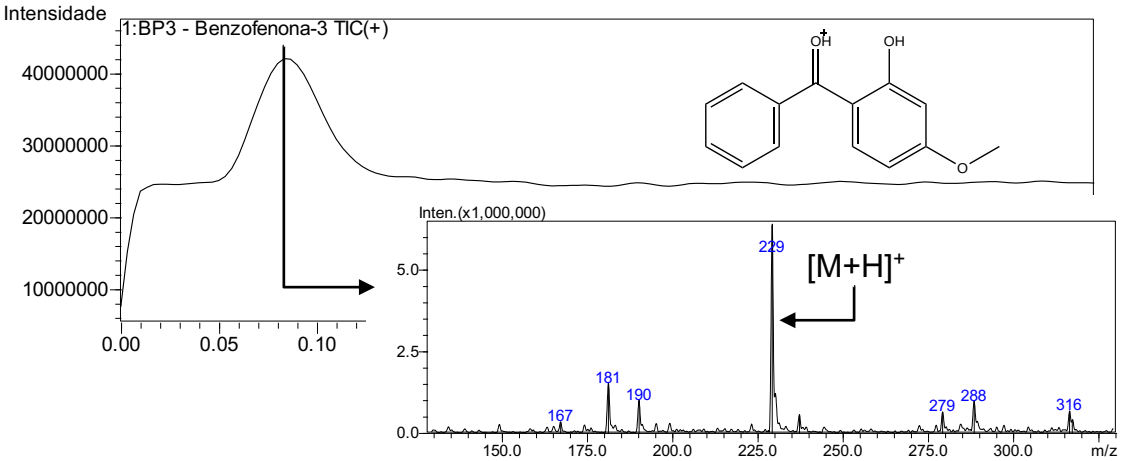
7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

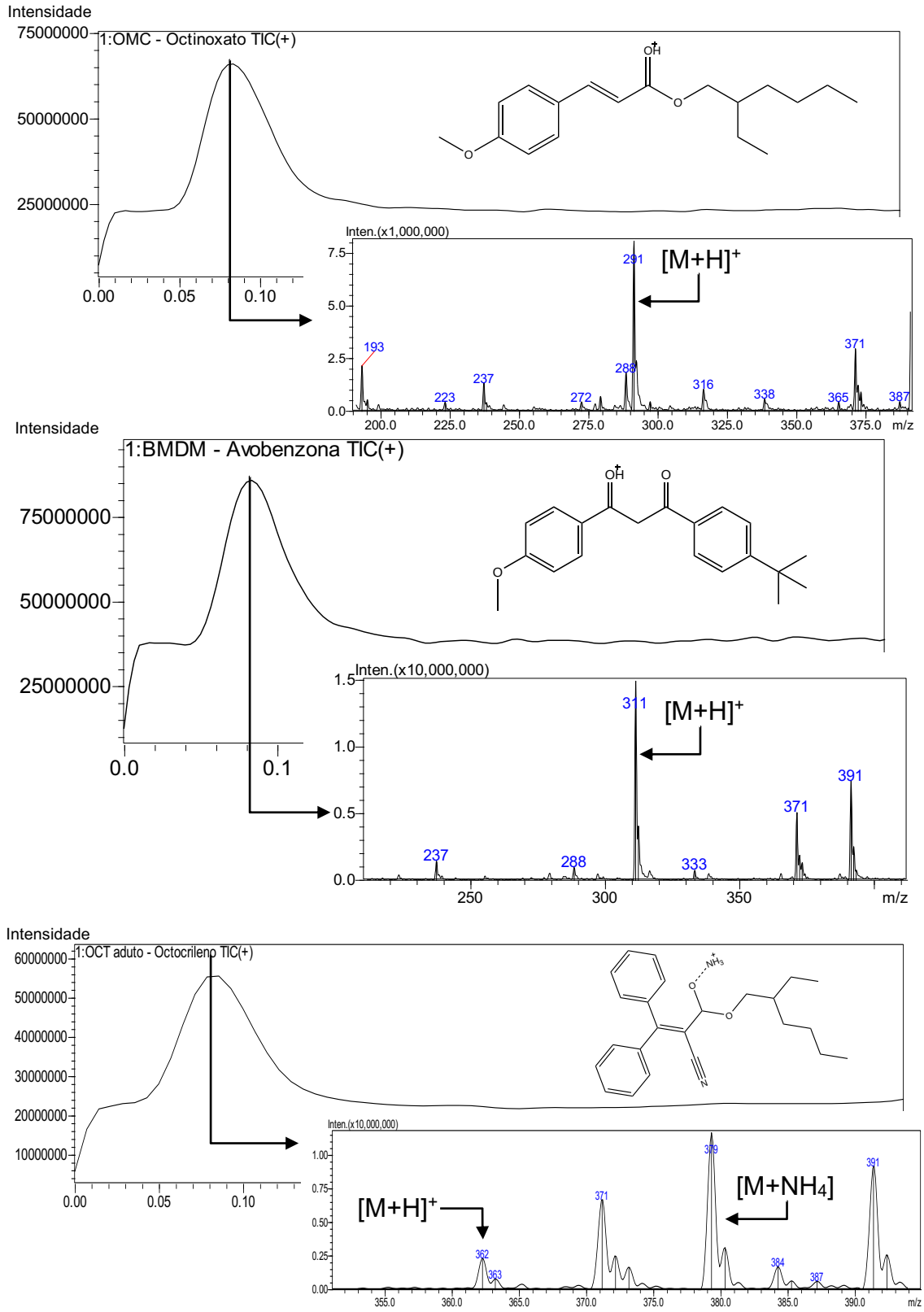
7.1 Desenvolvimento de Método LC-MS/MS

Na primeira etapa da otimização do método *MRM*, foi realizada a seleção dos íons precursores. Nos espectros de massas apresentados na Figura 21 é possível observar que todos os analitos apresentaram ionização em modo positivo sendo protonados ($[M+H]^+$), exceto o octocrileno (OCT) que apresentou maior intensidade de sinal como íon aduto de amônio ($[M+NH_4]^+$), portanto, suas transições foram otimizadas utilizando este íon como precursor.

A obtenção de íons adutos no processo de ionização é comum e pode ser utilizada como estratégia para obtenção de melhor sensibilidade na realização das análises.

Figura 21 – Cromatogramas e espectro de varredura dos íons precursores



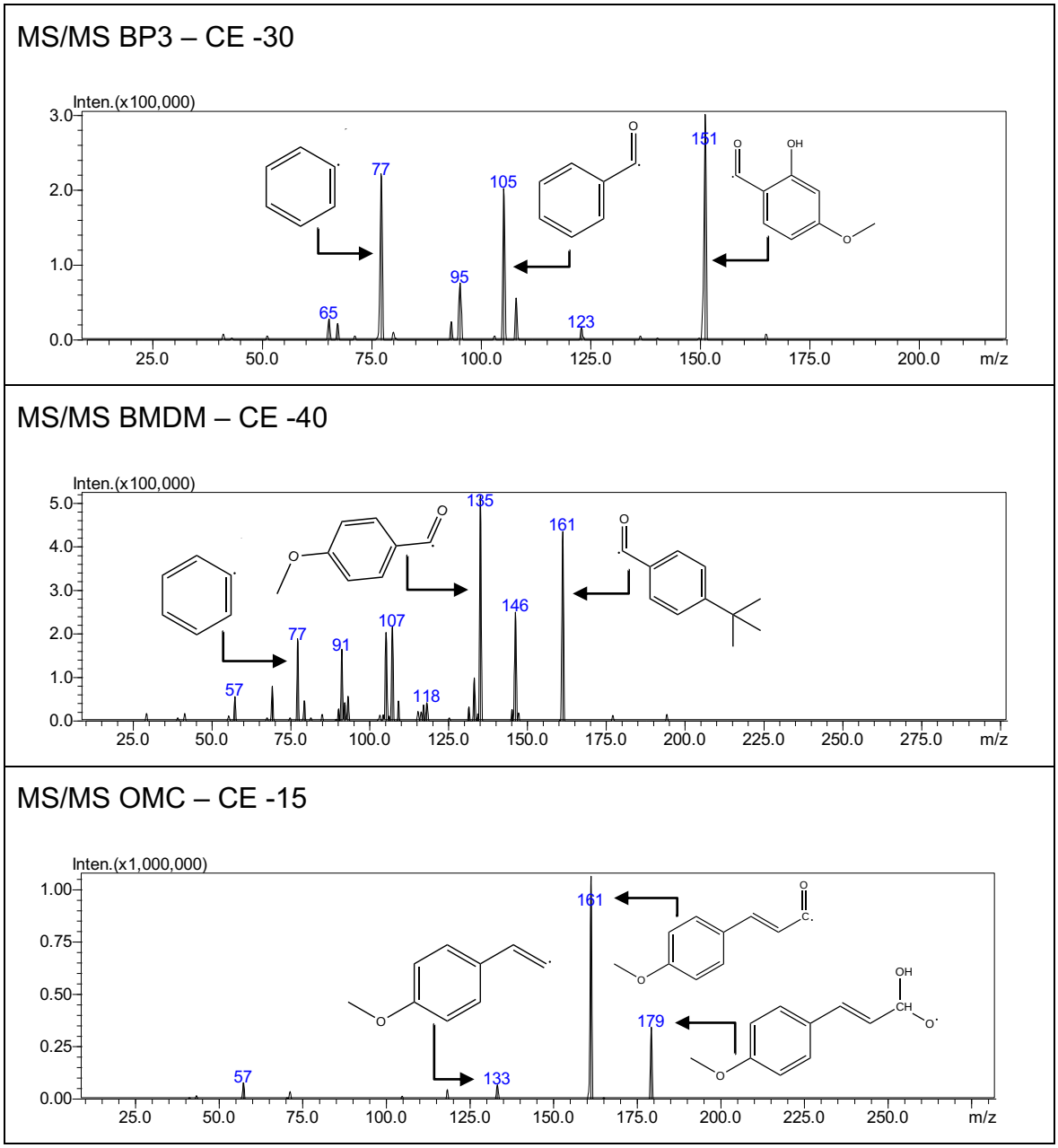


Fonte: Autor da tese

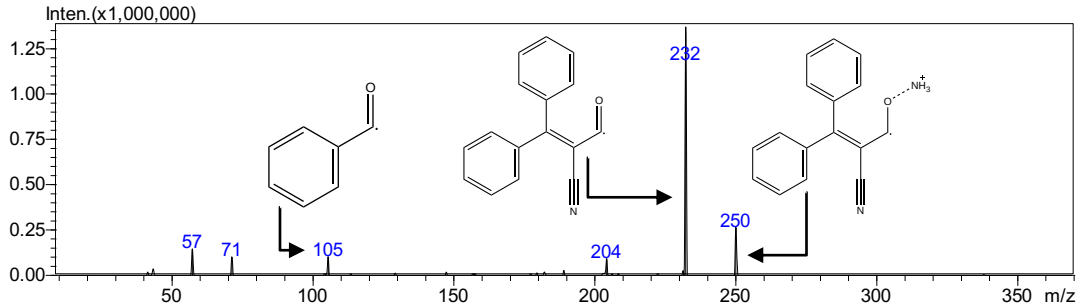
Posteriormente, diferentes energias de colisão foram testadas para a seleção dos íons produto mais intensos e foi feito ajuste fino da energia de colisão

específica para os três íons produto mais intensos, selecionados pelo software, e otimização das energias Q1 Pre-Bias e Q3 Pre-Bias. Como apresentado na Figura 22 foi realizada a atribuição dos fragmentos selecionados na otimização do método, para garantir a seleção de íons que confirmam a identidade dos analitos.

Figura 22 – Atribuição dos fragmentos selecionados



MS/MS OCT – CE -25



Fonte: Autor da tese

As transições e energias otimizadas estão apresentadas na Tabela 13. Também foi ajustado o tempo de aquisição do espectrômetro de massas para cada evento, de acordo com o tempo de retenção do analito, de modo que o equipamento não dedique tempo às análises de forma desnecessária.

Tabela 13 – Transições e energias otimizadas

Analito	Prec Ion	Prod Ion	CE	Q1 Pre-Bias	Q3 Pre-Bias
		151,15	-19,0	-25,0	-30,0
BP3	229,10	105,15	-20,0	-12,0	-12,0
		77,15	-38,0	-24,0	-30,0
		161,15	-18,0	-15,0	-18,0
OMC	291,20	179,15	-8,00	-15,0	-20,0
		133,15	-31,0	-22,0	-25,0
		161,20	-22,0	-16,0	-17,0
BMDM	311,20	135,10	-21,0	-16,0	-15,0
		77,15	-53,0	-16,0	-30,0
		250,20	-12,0	-19,0	-29,0
OCT	379,25	232,10	-23,0	-19,0	-26,0
		105,20	-37,0	-19,0	-20,0

Fonte: Autor da tese

Após a otimização das transições MRM foi realizada a otimização do método cromatográfico, onde o objetivo foi obter um método analítico sensível, confiável e rápido. Dentre as condições cromatográficas testadas, o método

descrito na Tabela 14 apresentou os melhores resultados, levando em consideração os critérios apresentados.

Por conta da presença de 1-octanol no extrato final da amostra, verificou-se que em algumas condições de gradiente ou composição de fase móvel os picos apresentavam cauda ou aumento gradativo da pressão, portanto, foi utilizado método isocrático para separação e eluição dos compostos da coluna cromatográfica, com 85% de B de 0 a 2,5 minutos, e uma vez que o solvente 1-octanol tem afinidade aos sítios ativos da coluna, ao final da corrida foi realizado um gradiente de limpeza para evitar perda de eficiência, aumentando a concentração de B para 100% em 3 minutos e mantendo em 100% por 0,5 minutos, então a condição inicial foi retomada e mantida por 1,5 minutos para estabilização da pressão, totalizando 5 minutos de análise.

Tabela 14 – Condições cromatográficas

Parâmetro	Condição Final
Fase Móvel A	Água ultrapura + 0,1% ácido fórmico
Fase Móvel B	Metanol
Fluxo de fase móvel	0,4 mL min^{-1}
Temperatura do forno de coluna	40 °C
Coluna Analítica	Shim-pack Scepter C18-120 (2,1 x 50 mm, 1,9 um)
	Shimadzu Corporation – Kyoto, Japão

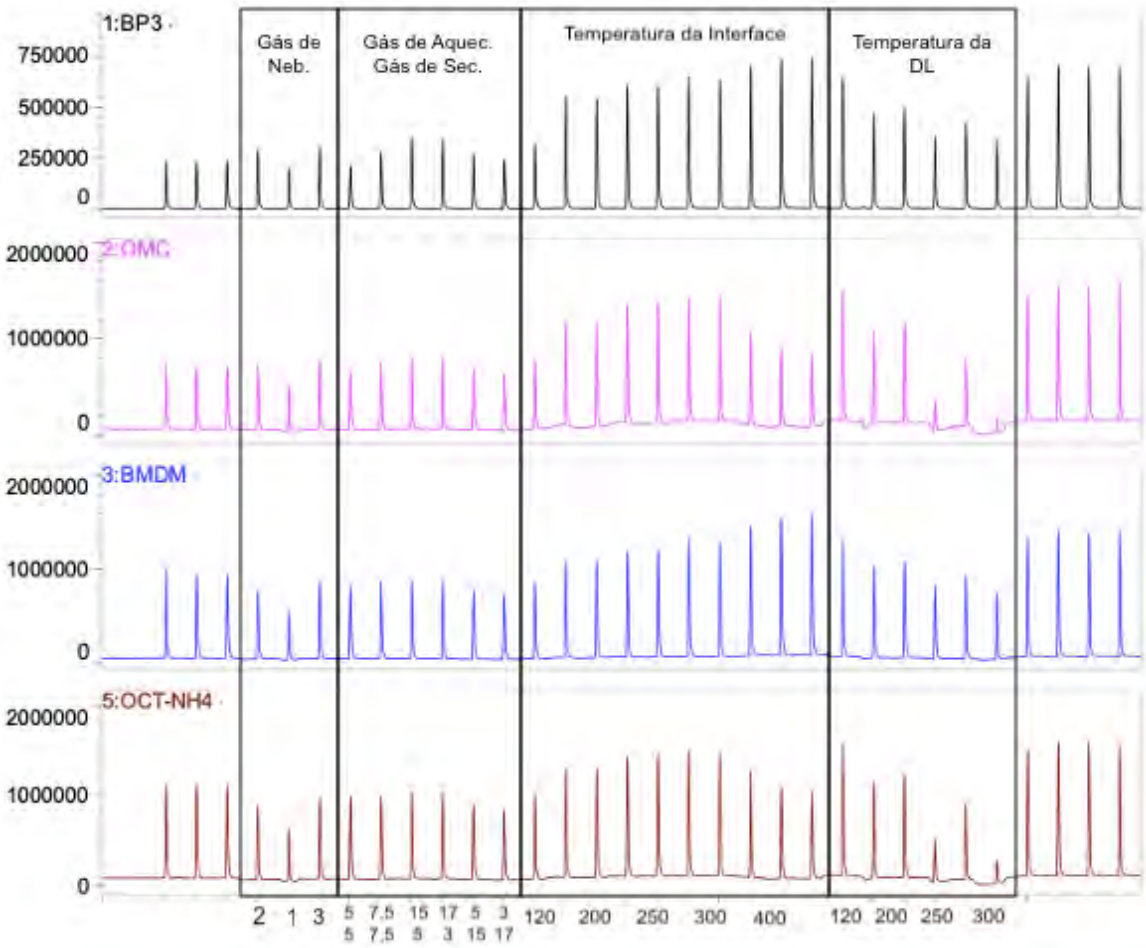
Fonte: Autor da tese

Foi utilizada uma mistura de Acetonitrila, metanol, água e isopropanol (1:1:1:1 v/v) como solução de lavagem da agulha.

Também foi realizada a otimização dos parâmetros da fonte de ionização, que beneficiam o processo de ionização dos analitos, é importante ressaltar que estes parâmetros são determinados para o método, ou seja, não são especificados por composto, assim é importante avaliar as perdas e ganhos para todos os analitos e buscar favorecer os analitos críticos, ou seja, aqueles que apresentam menor sensibilidade, devido à dificuldade de ionização. Os parâmetros da fonte de ionização fluxo do gás de nebulização (*nebulizing gas flow)*, fluxo do

gás de aquecimento (*heating gas flow*), fluxo do gás de secagem (*drying gas flow*) e temperatura da linha de dessolvatação (*DL temperature*) foram alterados como mostrado na Figura 23.

Figura 23 – Testes dos parâmetros de interface



Fonte: Autor da tese

Como pode ser, o aumento da temperatura da interface influenciou bastante no ganho de sinal para todos os analitos, já o aumento da temperatura da linha de dessolvatação causou a redução do sinal dos analitos, o que pode ter ocorrido por fragmentação das moléculas devido às altas temperaturas na interface. Os parâmetros de interface otimizados estão apresentados na Tabela 15.

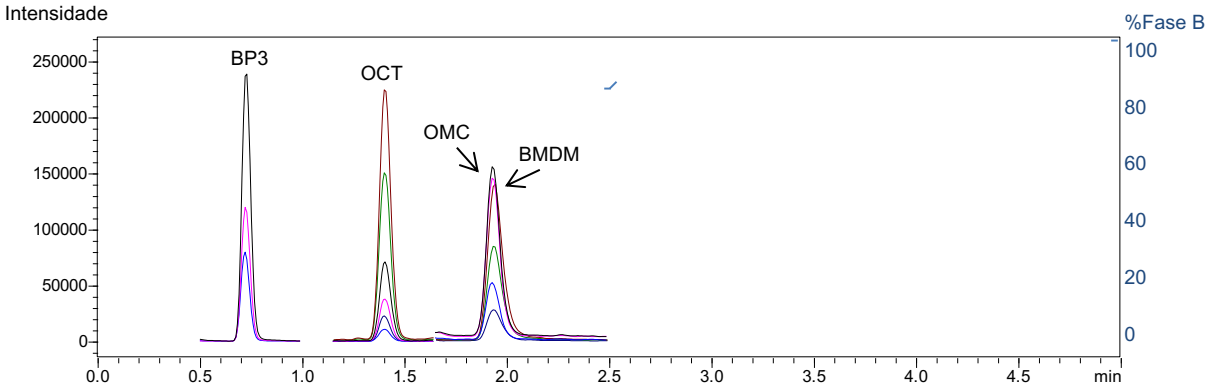
Tabela 15 – Parâmetros de interface otimizados

Parâmetro	Valor
Nebulizing Gas	3 L min^{-1}
Heating Gas	15 L min^{-1}
Interface Temperature	300 °C
DL Temperature	120 °C
Heat Block Temperature	400 °C
Drying Gas	5 L min^{-1}

Fonte: Autor da tese

O cromatograma final obtido está apresentado na Figura 24, com as três transições otimizadas para cada analito. É possível observar que não houve separação cromatográfica entre os analitos OMC e BMDM, porém estes possuem *m/z* diferente, então não foi necessário obter separação cromatográfica.

Figura 24 – Cromatograma dos analitos em concentração de 100,00 ng mL^{-1} em solução



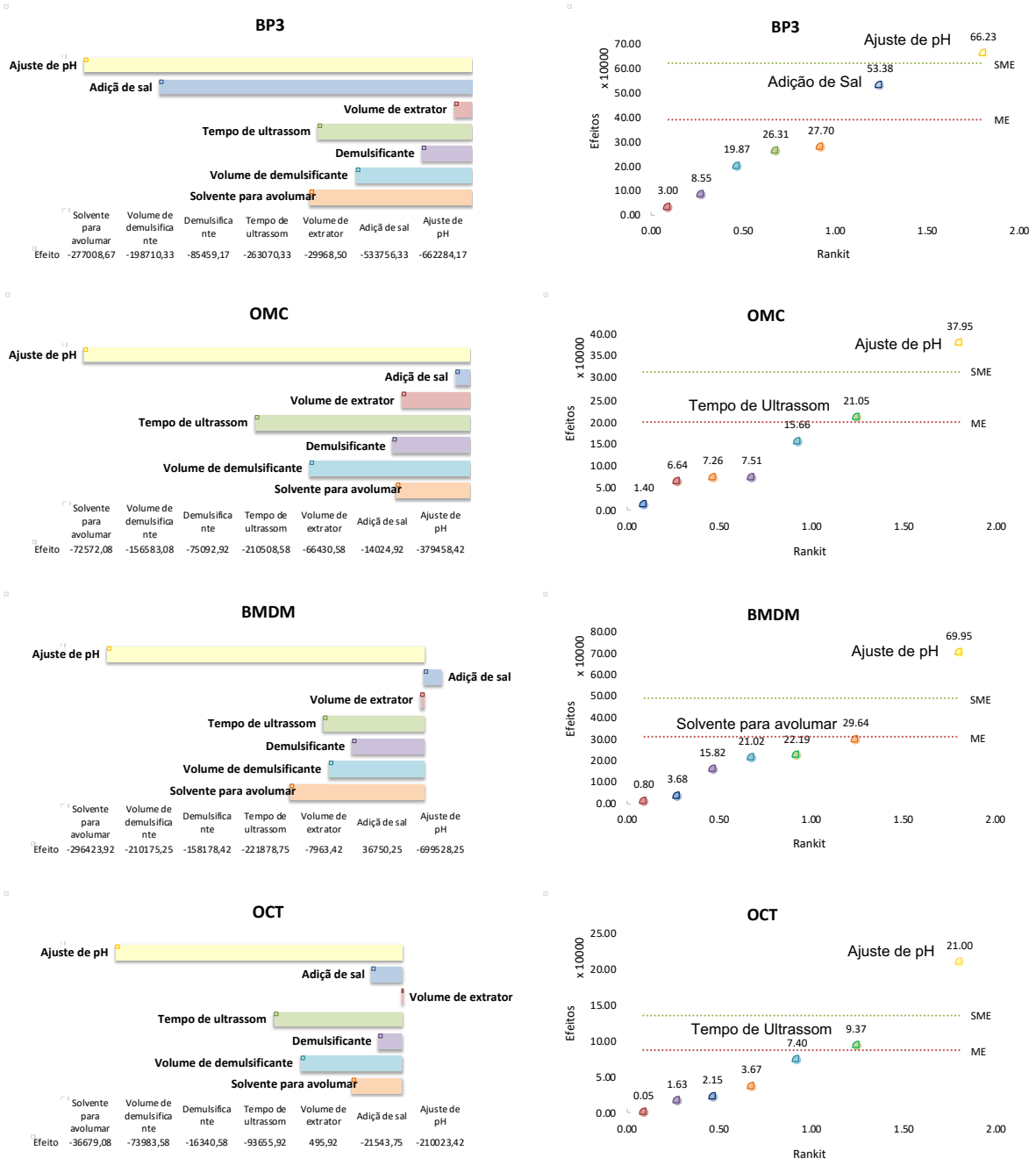
Fonte: Autor da tese

7.2 Otimização da Extração SD-DLLME

Após a realização das análises obtidas a partir do planejamento de experimento e cálculos para obtenção dos resultados, foram elaborados os Gráficos de Ordenação dos fatores e Rankit para avaliação dos dados e escolha das melhores condições de extração dos analitos.

Como pode ser visto na Figura 25, a alteração proposta para o processo de extração favoreceu a extração dos analitos na maioria dos casos, uma vez que apresentaram resultados negativos na ordenação dos fatores.

Figura 25 – Ordenação de Fatores e Gráfico Rankit para otimização da SD-DLLME



Fonte: Autor da tese

Uma vez que é realizada a extração de forma uma única para diferentes analitos, é importante avaliar os parâmetros de extração individualmente, mas a

escolha da condição final deve ser avaliada cuidadosamente, já que condições diferentes podem favorecer analitos diferentes.

Na otimização realizada, somente foi observado resultados divergentes para a adição de sal na extração de BMDM, único analito que teve a extração favorecida com a condição nominal, e volume de extrator para OCT, também único analito com a extração favorecida com a condição nominal, porém estes parâmetros não apresentaram impacto representativo para a extração destes analitos, como pode ser visto no gráfico Rankit.

As alterações propostas para otimizar a extração levaram em consideração as características físico-químicas dos analitos, a presença de sal na matriz e o nível de concentração que se espera trabalhar (baixo ng mL^{-1}).

A adição de maior volume de HCl 1 M reduz o pH da amostra com maior eficiência, uma vez que a alta carga de sal pode dificultar a alteração do pH, e devido ao pKa ácido dos analitos é indicado manter o pH da amostra 2 unidades mais baixo (pH ~ 5) os analitos encontram-se neutros, o que confere mais afinidade com a fase apolar (solvente orgânico), favorecendo a extração [91]. É importante salientar que, devido à dificuldade de manter o pH de amostras de água do mar estável, todo o processo de extração foi realizado imediatamente após o ajuste de pH.

A adição de $MgSO_4$ no processo de extração auxilia no aumento da diferença de polaridade entre as fases da extração, causando o efeito *salting out*, onde a saturação da solução também diminui a solubilidade dos analitos na fase aquosa, mesmo a água do mar contendo aproximadamente 3% de concentração de sal naturalmente, a adição de $MgSO_4$ também contribuiu para o processo de extração [91].

A menor quantidade de solvente extrator mostrou-se suficiente para extração dos analitos, sem efeito significativo de diluição do extrato, o que promove maior fator de enriquecimento sem que ocorra a saturação do solvente, além da

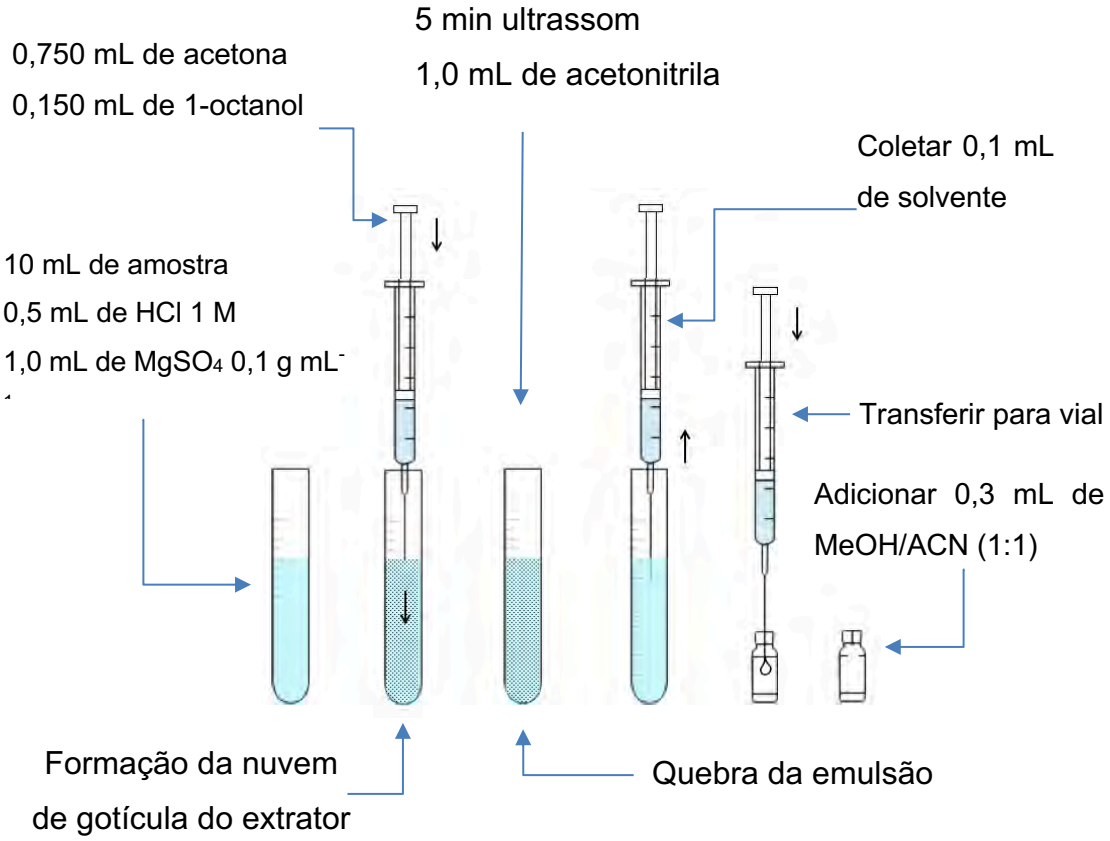
possibilidade de maior quantidade de solvente adicionada diminuir a polaridade da água, perdendo assim eficiência da extração [92] [93].

A exposição das amostras a 5 minutos de ultrassom após a injeção da mistura de solventes dispersor e extrator auxilia no contato da nuvem de gotículas com a amostra o que dá mais eficiência à extração com a mesma quantidade de solvente utilizada, por conta da estabilidade da emulsão, o que se mostrou eficiente para outros analitos em outros estudos [94].

Como já avaliado em outras referências o tipo de demulsificante, volume utilizado e o solvente utilizado para avolumar o extrato devem ser testados e avaliados empiricamente e pode apresentar diferentes resultados, dependendo das características dos analitos e da matriz também [93] [94] [92] [16].

Como mostrado na gráfico rankit mostrado na Figura 25, o único fator crítico (resultados acima do limite MES) para todos analitos foi o ajuste de pH. E os fatores adição de sal, tempo de ultrassom e solvente para avolumar também apresentaram resultados significativos para a otimização do método de extração. As condições finais para a realização da extração estão apresentadas na Figura 26.

Figura 26 - Esquema do Procedimento de extração



Fonte: Autor da tese

apresenta de forma resumida o processo de extração após otimização, e devido à utilização de água como eluente no método cromatográfico e para evitar maior degradação da coluna analítica, a fase orgânica coletada foi diluída na proporção 1:3 com o solvente mais compatíveis com a técnica analítica e com a solubilidade dos analitos (solvente final).

7.3 Validação de Método

Para avaliação dos resultados foram utilizados os critérios de avaliação indicados pelo DOQ CGCRE 008 [82]. Todos os relatórios, contendo os cromatogramas e áreas dos testes de validação estão apresentados no Apêndice C.

1.1.1. Faixa de Trabalho

Para a determinação da faixa de trabalho considerou-se que os compostos estudados se encontram em concentrações baixas (em torno de 1 ng mL^{-1}). Assim, os parâmetros limitantes foram a sensibilidade do método analítico, precisão e exatidão. Nos pontos mais concentrados, foi levado em consideração a eficiência da extração e a linearidade da curva obtida.

Também foi definido como critério de precisão DPR menor ou igual 30% [81] (concentrações ~1 ng mL^{-1}) para avaliar a dispersão dos resultados. Portanto, conforme resultados apresentados na Tabela 16, os pontos definidos para a curva analítica foram considerados satisfatórios.

Tabela 16 – Desvio padrão relativo (DPR) obtido para cinco replicatas de cada ponto da curva analítica

		DPR (%)			
Ponto	Concentração (ng mL^{-1})	BP3	OMC	BMDM	OCT
P1	0,10	5,59	19,09	11,47	19,61
P2	0,25	3,41	16,20	9,50	20,53
P3	0,50	12,24	14,00	10,92	17,57
P4	1,00	7,37	10,94	9,53	14,30
P5	3,00	14,00	14,36	13,06	7,96
P6	4,00	10,66	12,51	13,41	7,47
P7	5,00	9,26	9,02	8,25	4,59

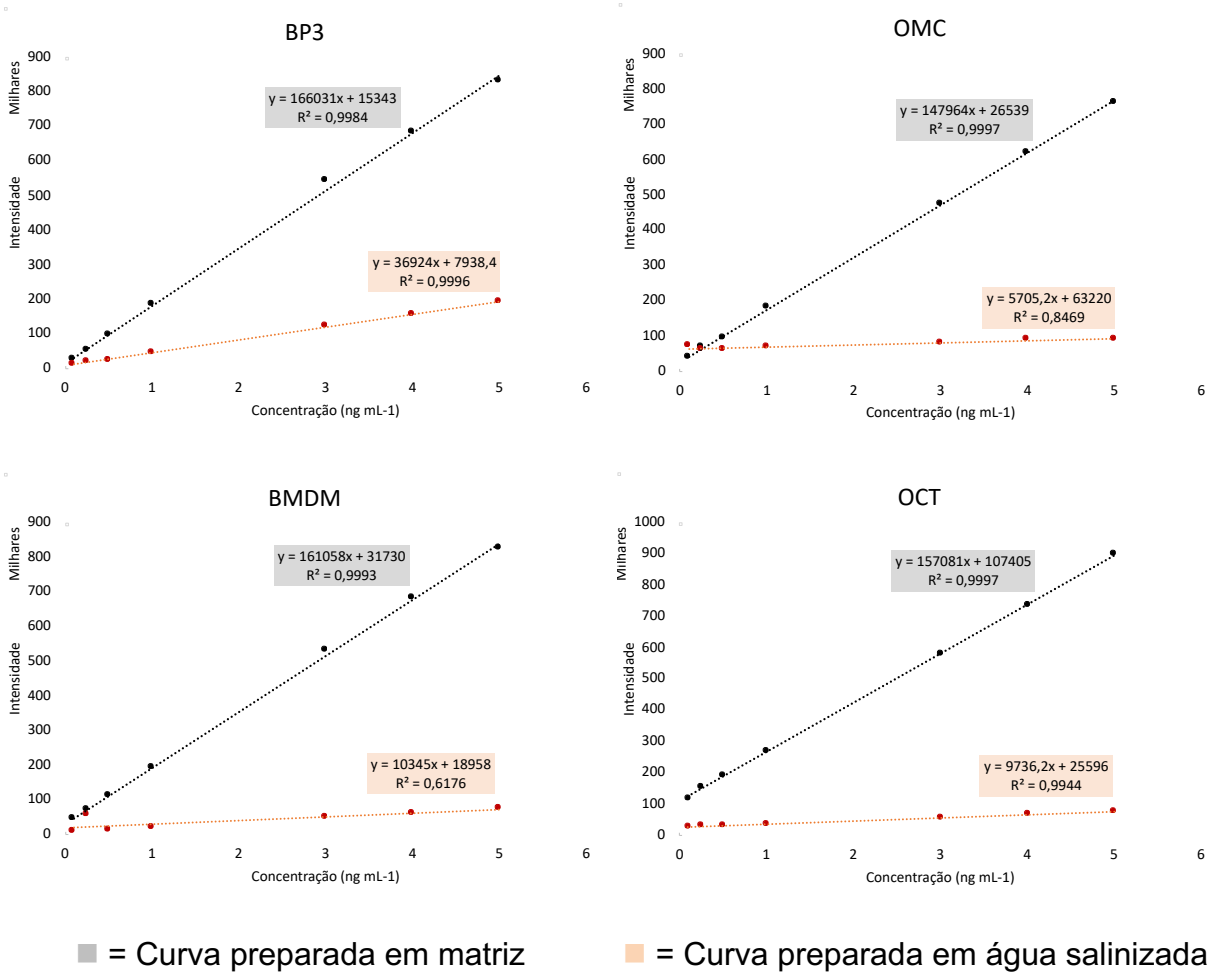
Fonte: Autor da tese

1.1.2. Seletividade

Como pode ser observado na Figura 27, a inclinação das curvas analíticas com e sem matriz é diferente, esta diferença pode ser evidenciada mesmo em uma avaliação visual. Observando as curvas analíticas sem matriz (curvas preparadas em água salina) é possível observar que os resultados são inferiores às extrações em matriz, o que pode ter ocorrido devido à menor eficiência da extração. Muito embora os padrões tenham sido preparados em água contendo uma quantidade de sal (NaCl) similar ao presente em água do mar (cerca de 3%),

as amostras reais possuem outros componentes que podem contribuir com a diferença de polaridade entre as fases, facilitando a partição dos analitos e favorecendo a extração pelo solvente orgânico.

Figura 27 – Comparação entre curvas analíticas preparadas sem matriz (água salinizada) e com matriz



Fonte: Autor da tese

Para corroborar com a avaliação visual realizada, também foi realizado o teste t para comparação da inclinação das curvas (Tabela 17). Para as curvas serem consideradas estatisticamente semelhantes $T_{calculado}$ deve ser menor que $T_{tabelado}$, ou seja, como todos os valores de $T_{calculado}$ apresentaram resultado maior que $T_{tabelado}$ (95% de confiança, n = 5), foi evidenciado que a inclinação das curvas analíticas com matriz é significativamente diferente da inclinação das curvas analíticas sem matriz. O que impacta diretamente nas quantificações realizadas.

Assim, para todos os analitos, as curvas analíticas utilizadas para as quantificações devem ser preparadas em matriz.

Tabela 17 – Teste T para comparação entre as inclinações das retas

	$T_{calculado}$			
$T_{tabelado}$	BP3	OMC	BMDM	OCT
2,23	758	960	963	954

Fonte: Autor da tese

A partir desta avaliação, todas as quantificações realizadas nos demais testes de validação, foram realizadas utilizando curvas analíticas preparadas em matriz.

1.1.3. Premissas

Para dar continuidade aos testes estatísticos da validação do método, foram avaliadas as premissas de presença de outliers e homoscedasticidade dos dados obtidos com a análise das curvas analíticas preparadas em matriz. Como é possível observar na Tabela 18, todos os resultados apresentaram $Z_{calculado}$ abaixo de $Z_{crítico}$, indicando que não há *outliers* no conjunto de dado avaliado.

Tabela 18 – Valor máximo de Z calculado para 35 observações

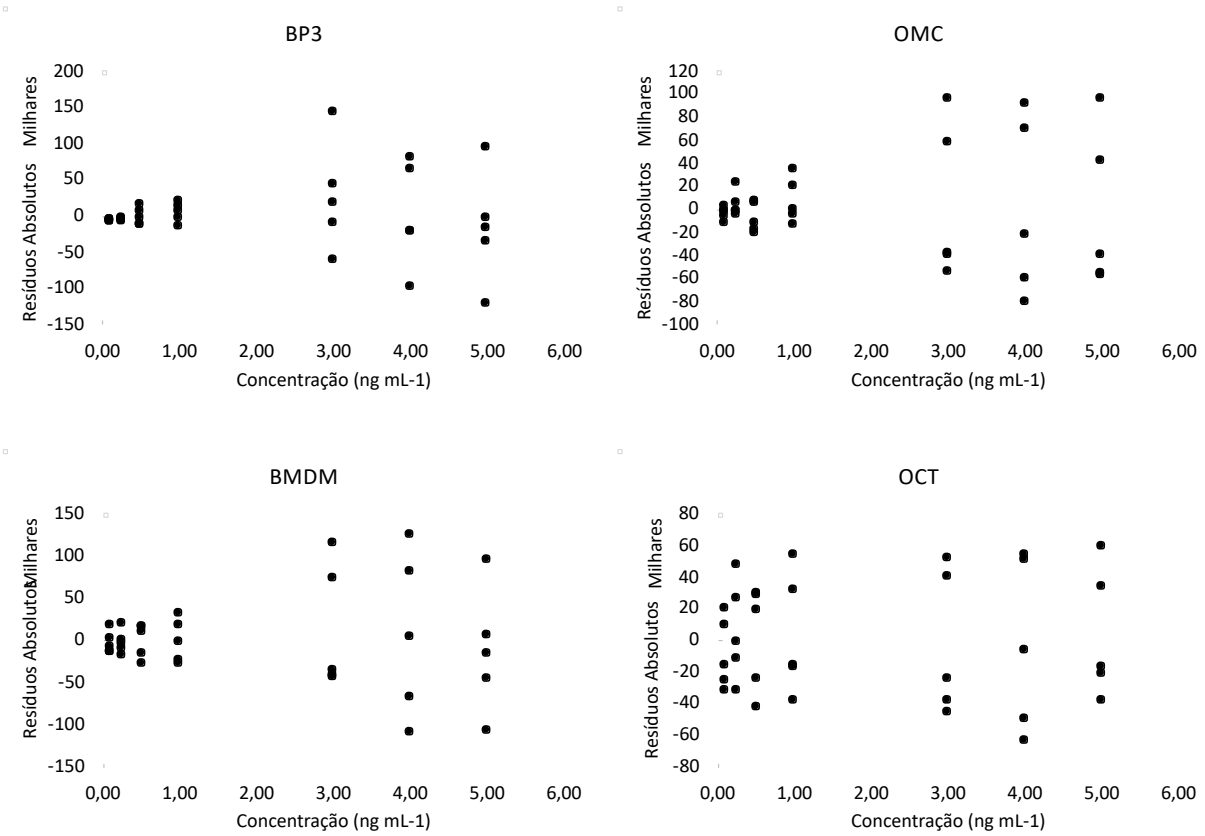
Analito	BP3	OMC	BMDM	OCT
Z_{Max}	1,89	1,93	1,90	1,80

p: 0,05 e $Z_{crítico}$: 2,98

Fonte: Autor da tese

Avaliando os resíduos absolutos apresentados na Figura 28, conforme indicação de Barros Neto *et al*. (2002) [84], verificou-se que não há tendência, ou seja os resíduos apresentam dispersão para mais e menos em todos os pontos, portanto, os dados são considerados homoscedásticos.

Figura 28 – Gráfico dos Resíduos Absolutos

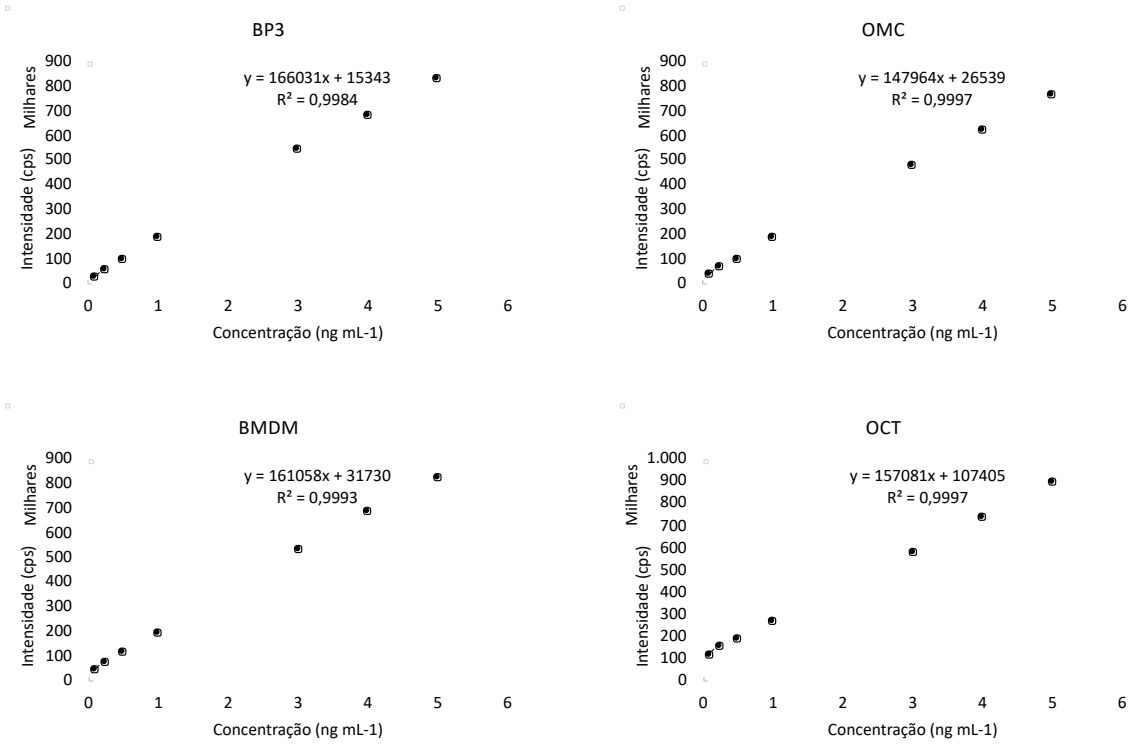


Fonte: Autor da tese

1.1.4. Linearidade

Para avaliar a linearidade do método analítico proposto, foram utilizados cinco replicatas das curvas analíticas preparadas em matriz. Como é possível observar na Figura 29 todas as curvas analíticas apresentaram r maior ou igual a 0,99, indicando alta correlação.

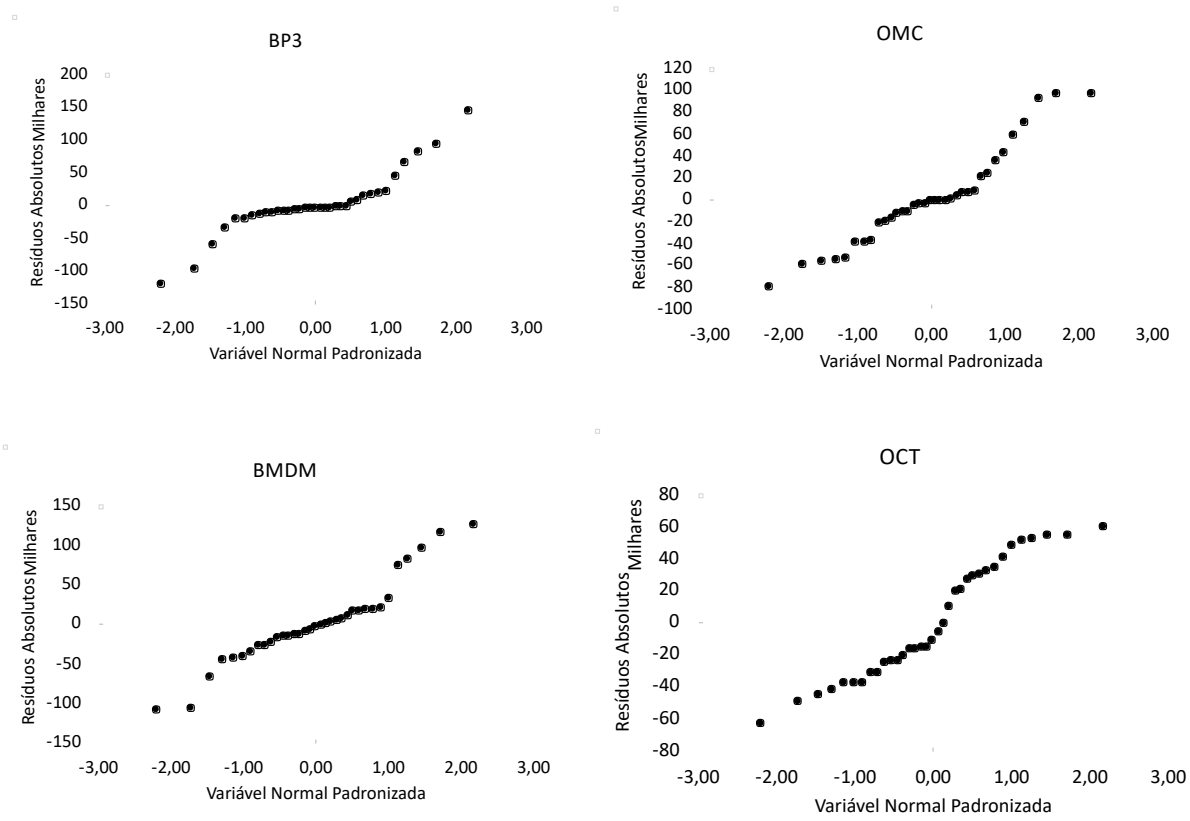
Figura 29 – Curvas Analíticas com equação da reta e r^2



Fonte: Autor da tese

Os resíduos normalizados apresentados na Figura 30, apresentaram comportamento linear, indicando distribuição normal, e variação entre $\pm$ 2 desvios padrão, evidenciando intervalo de confiança de 95% dos dados avaliados.

Figura 30 – Gráficos de Resíduos Normalizados



Fonte: Autor da tese

Na Tabela 19 os resultados da ANOVA são apresentados, para os quais todas as observações de $F_{calculado}$ da regressão maiores que $F_{crítico}$. O $F_{calculado}$ da falta de ajuste menor que $F_{crítico}$, indicando que a regressão é significativa e não há falta de ajuste, além do percentual de variação explicada e explicável ser próximo de 100%, corroborando com alta correlação indicada pelo coeficiente de correlação.

Tabela 19 – Resultados da Análise de Variância (ANOVA)

	Parâmetro	BP3	OMC	BMDM	OCT
Estatística da Regressão	r	0,9956	0,9990	0,9759	0,9950
	r^2	0,9913	0,9981	0,9524	0,9901
	r^2 ajustado	0,9905	0,9979	0,9485	0,9893
Regressão (GL = 1)	Soma Quadrática	$1,20.10^{12}$	$8,94.10^{11}$	$1,13.10^{12}$	$1,23.10^{12}$
	Média Quadrática	$1,20.10^{12}$	$8,94.10^{11}$	$1,13.10^{12}$	$1,23.10^{12}$
	F	1361,55	6189,41	240,30	1199,98
Residual (GL = 12)	Soma Quadrática	$1,05.10^{10}$	$1,73.10^{9}$	$5,63.10^{10}$	$1,23.10^{10}$
	Média Quadrática	$8,79.10^{8}$	$1,44.10^{8}$	$4,69.10^{9}$	$1,03.10^{9}$
Falta de Ajuste (GL = 1)	Soma Quadrática	$3,03.10^{9}$	$7,05.10^{8}$	$1,17.10^{10}$	$2,37.10^{9}$
	Média Quadrática	$6,05.10^{8}$	$1,41.10^{8}$	$2,34.10^{9}$	$4,74.10^{8}$
	F	0,56	0,96	0,37	0,33
Erro Puro (GL = 7)	Soma Quadrática	$7,52.10^{9}$	$1,03.10^{9}$	$4,46.10^{10}$	$9,94.10^{9}$
	Média Quadrática	$1,07.10^{9}$	$1,47.10^{8}$	$6,38.10^{9}$	$1,42.10^{9}$
Total (GL = 13)	Soma Quadrática	$1,21.10^{12}$	$8,96.10^{11}$	$1,18.10^{12}$	$1,24.10^{12}$
	Variação Explicada	99,13	99,81	95,24	99,01
	Variação Explicável	99,38	99,89	96,23	99,20

GL: Graus de Liberdade; $F_{crítico\ regressão}$: 4,75; $F_{crítico\ falta\ de\ ajuste}$: 3,97

Fonte: Autor da tese

1.1.5. Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ) do Método

Os resultados de LD e LQ estão apresentados na Tabela 20.

Em análises por LC-MS é muito comum utilizar o critério de razão Sinal/ Ruído (S/R) para determinar o LD e LQ do método analítico, porém o valor determinado com esta estratégia é teórico e não leva em consideração variações que podem acontecer no processo de extração em concentrações mais baixas. Assim os testes empíricos são importantes para avaliar a capacidade do método analítico e a precisão do método em concentrações mais baixas, onde pequenas variações podem impactar significativamente os resultados.

Como o método analítico desenvolvido neste estudo envolve a análises de compostos em nível de traço (em torno de 1 ng mL^{-1}), com matriz complexa e preparo de amostra com etapas manuais, o Limite de Detecção do método foi determinado empiricamente, testando um limite de concentração onde o pico dos analitos pudesse ser identificado.

No teste realizado a menor concentração testada foi de 0,02 ng mL^{-1} e esta foi determinada como LD, porém avaliando os cromatogramas é possível verificar que para alguns analitos como BP3, OCT e BMDM seria possível chegar a resultados mais baixos para este parâmetro. Esta concentração limite foi determinada para o teste de LD por conta das dificuldades de preparo de amostra em concentrações muito baixas.

O Limite de Quantificação do método foi determinado como o primeiro ponto da curva analítica, que apresentou S/R adequado e DPR satisfatório, garantindo assim a qualidade dos resultados nesta concentração.

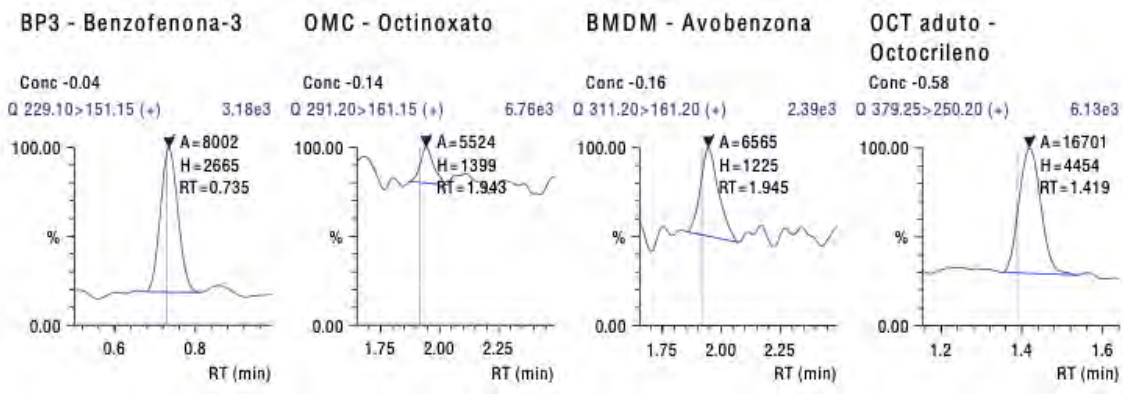
Os cromatogramas obtidos no LD estão apresentados na Figura 31.

Tabela 20 – Resultados de Limite de Detecção do Método, n = 3

		BP3	OMC	BMDM	OCT
LD (ng mL^{-1})		0,02	0,02	0,02	0,02
LQ	Conc. (ng mL^{-1})	0,1	0,1	0,1	0,1
	S/R	19,2	19,02	61,3	61,9
	DPR%	5,59	19,09	11,47	19,61

Fonte: Autor da tese

Figura 31 – Cromatogramas obtidos no LD - concentração de 0,02 ng mL^{-1}



Fonte: Autor da tese

1.1.6. Precisão

Como citado anteriormente, a precisão do método foi avaliada em termos de Repetibilidade e precisão intermediária. Os resultados de repetibilidade estão apresentados na Tabela 21, e é possível observar que o critério de aceitação foi atendido (DPR menor ou igual 30%) [81] para a análise de dez replicatas, portanto, os resultados foram considerados satisfatórios.

Tabela 21 – Resultados de Repetibilidade

Analito	Conc. (ng mL^{-1})	DPR (%)	Conc. (ng mL^{-1})	DPR (%)
BP3	0,25	5,68	4,00	5,38
OMC		12,13		11,93
BMDM		17,25		4,65
OCT		18,67		3,52

Fonte: Autor da tese

Os resultados de precisão intermediária estão apresentados na Tabela 22, e é possível observar que o critério de aceitação foi atendido (DPR menor ou igual 30%) [81], para a análise de vinte replicatas, portanto, os resultados foram considerados satisfatórios.

Tabela 22 – Resultados de Precisão Intermediária

Analito	Conc. (ng mL^{-1})	DPR (%)	Conc. (ng mL^{-1})	DPR (%)
BP3	0,25	7,89	4,00	7,30
OMC		29,32		19,83
BMDM		28,11		14,46
OCT		29,25		7,27

Fonte: Autor da tese

1.1.7. Recuperação

Para a avaliação da recuperação foram escolhidos três níveis de concentrações de modo a abranger toda a faixa de trabalho, desde o LQ até pontos mais altos da curva analítica, com quatro replicatas por nível. Para avaliar a recuperação o critério definido foi entre 40% e 120%, como definido por Horwitz para níveis de concentração em torno de 1 ng mL^{-1} [81].

Como pode ser observado na Tabela 23, a recuperação na concentração de 0,1 ng mL^{-1} para os analitos OMC e BMDM apresentou resultados acima de 120%, mas levando em consideração a complexidade do processo de extração, os baixos níveis de concentração analisados e a recuperação obtida em outros métodos analíticos publicados na literatura utilizando outras técnicas de preparo de amostra, como SPE e SBSE, a recuperação entre 72,54 e 139,33 % no LQ e entre 100,43 e 121,00% nos demais pontos da faixa de trabalho, foi considerada satisfatória.

Tabela 23 – Resultados de Recuperação

Analito	Conc. (ng mL^{-1})	Rec (%)	Conc. (ng mL^{-1})	Rec (%)	Conc. (ng mL^{-1})	Rec (%)
BP3	0,1	72,54	0,25	100,43	4,00	103,43
OMC		127,46		117,17		115,06
BMDM		139,33		121,00		118,53
OCT		113,95		119,68		112,43

Fonte: Autor da tese

1.1.8. Estabilidade em 24 horas

Após avaliação de estabilidade das amostras, mantidas no auto amostrador, foi obtido o resultado apresentado na Tabela 24, comparando a análise das mesmas amostras no tempo 0. É possível observar que não houve degradação dos analitos, e que houve um aumento nas áreas após 24 horas, provavelmente devido à volatilização de solventes. Assim é importante ressaltar que a temperatura do auto amostrador deve ser controlada durante todo o período de análise das amostras.

Tabela 24 – Resultados do teste de Estabilidade após 24 horas

	Recuperação (%)			
	BP3	OMC	BMDM	OCT
Rec. Média	109,21	104,74	117,30	117,69

Fonte: Autor da tese

1.1.9. Robustez

Para a avaliação da Robustez foram alterados três parâmetros importantes que podem influenciar diretamente na identificação do pico dos analitos, são eles temperatura do forno de coluna (± 2 °C), percentual de fase orgânica na fase móvel (± 2%) e variação do fluxo de fase móvel (± 0,1 mL min^{-1}). Outros parâmetros de ionização foram avaliados durante a otimização do método e o objetivo da robustez é avaliar pequenas variação involuntárias que podem ocorrer por variações no equipamento.

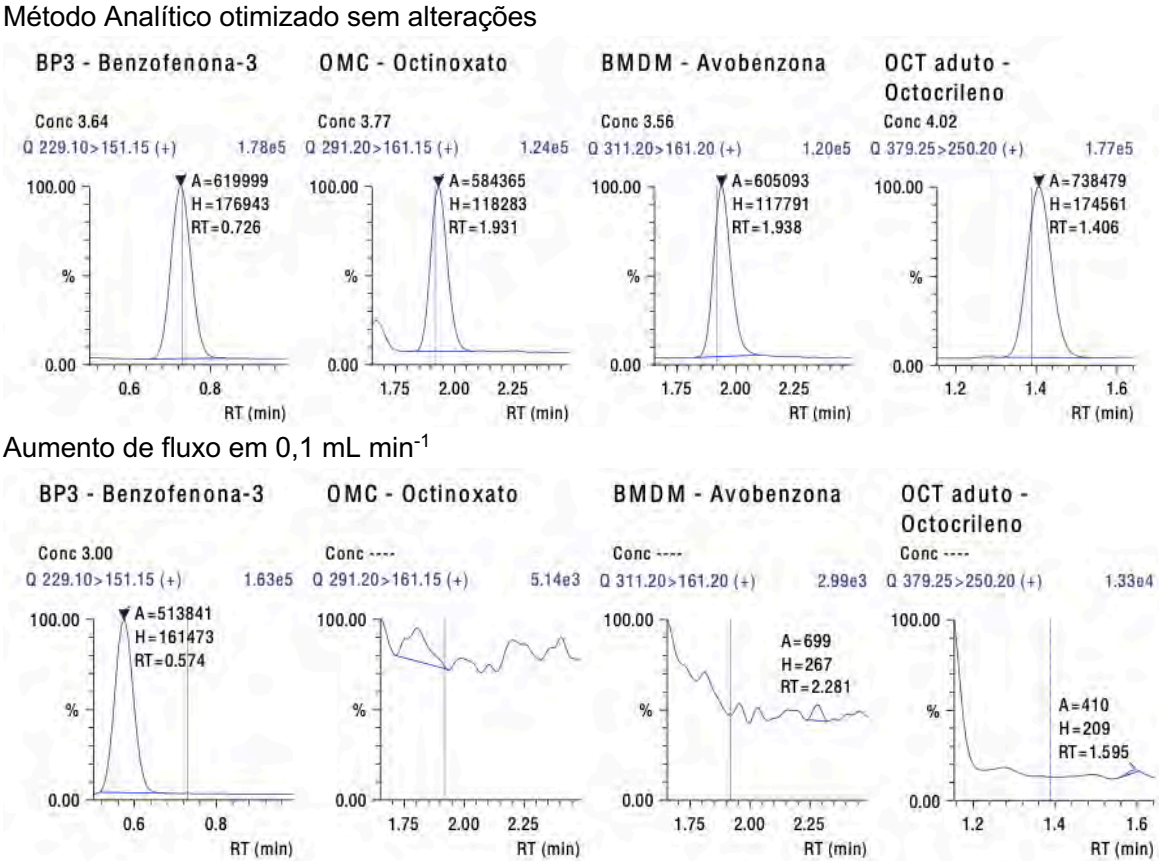
Como é possível observar nos cromatogramas abaixo, as alterações realizadas na temperatura do forno de coluna, não impactaram significativamente na identificação do pico do analito, mesmo com alteração de 2 °C é possível identificar todos os analitos, porém é importante ressaltar que este tipo de variação pode não influenciar as quantificações, desde que a curva analítica seja analisada nas mesmas condições que as amostras.

Avaliando as análises realizadas variando o percentual de fase orgânica na composição da fase móvel e no fluxo de fase móvel, é possível verificar que estas variações impactaram no tempo de retenção que os picos saíram da janela de aquisição previamente determinada no método (tempo de retenção $\pm$ 1 min), impossibilitando a determinação dos compostos. Assim, estes parâmetros foram identificados como parâmetros críticos do método.

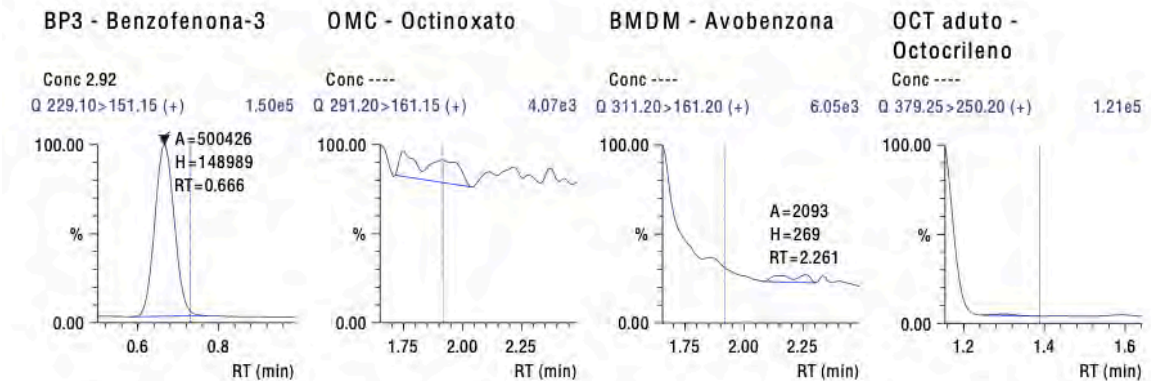
Para evitar quaisquer problemas com a identificação dos analitos é muito importante realizar todas as manutenções no equipamento, como troca de selos da bomba e monitorar a exatidão e precisão do fluxo de fase móvel, além de monitorar variações da pressão do sistema durante a análise das sequências de amostras.

As variações de tempo de retenção e outros problemas para identificação dos picos podem ser observadas nos cromatogramas apresentados na Figura 32.

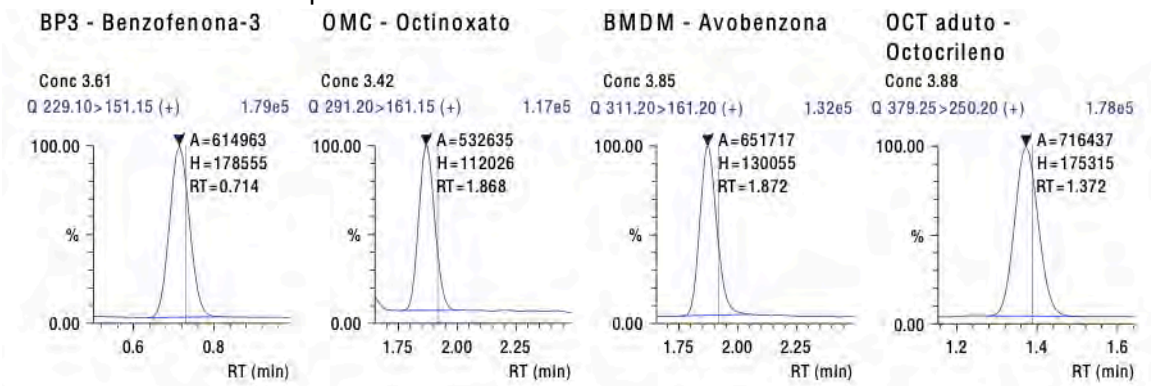
Figura 32 – Cromatogramas dos testes de Robustez do Método Analítico



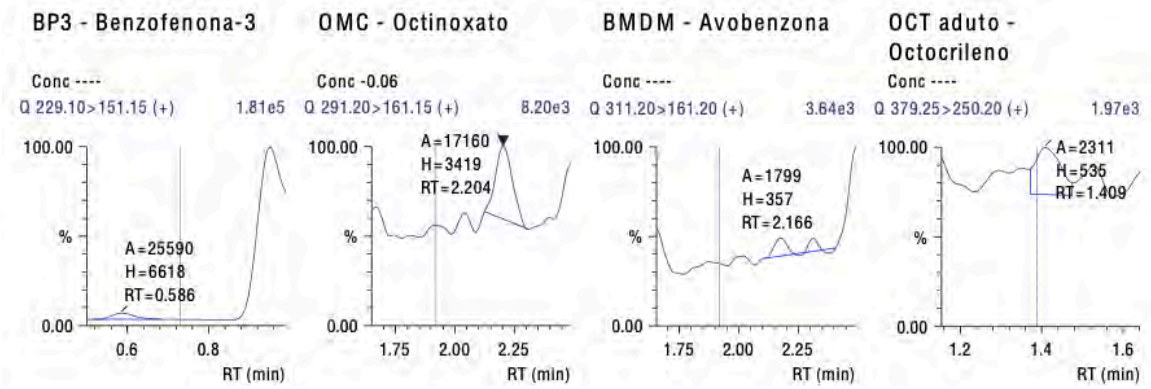
Gradiente de fase móvel com aumento de 2% de solvente orgânico



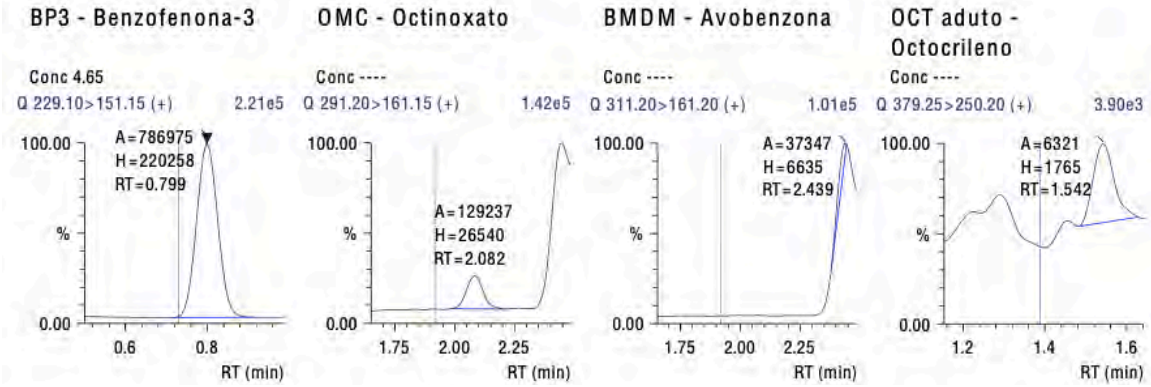
Aumento de 2 °C na temperatura do forno de coluna



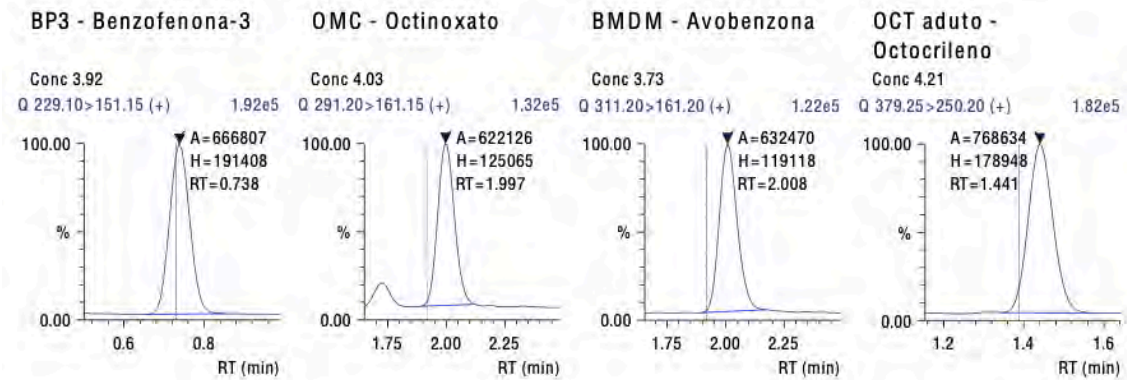
Redução de fluxo em 0,1 mL min^{-1}



Gradiente de fase móvel com redução de 2% de solvente orgânico



Redução de 2 °C na temperatura do forno de coluna



Fonte: Autor da tese

Na corrida cromatográfica com as condições otimizadas do método foi observada pressão de 25 MPa, com fluxo de 0,5 mL min^{-1} foi observada pressão de 27,5 Mpa, com 87% de fase orgânica foi observada pressão de 26 MPa, com aumento de temperatura do forno para 42 °C também foi observada pressão de 26 MPa.

Baixando o fluxo para 0,3 mL min^{-1} foi observada pressão de 24 MPa, com 83% de fase orgânica foi observada pressão de 26,5 MPa, e com temperatura da coluna de 38 °C foi observada pressão de 26,5 MPa.

7.4 Análise de Amostras

7.4.1 Coleta de Santos - 2018

As amostras coletas nos municípios de Santos e São Vicente em janeiro de 2018 foram analisadas, para determinação dos compostos BP3, OMC, BMDM e OCT utilizando a metodologia proposta, otimizada e validada. Os resultados obtidos para as praias de Santos estão apresentados na Tabela 25.

Tabela 25 – Resultados das amostras coletadas em Santos - 2018

	Concentração (ng mL^{-1})			
Amostra	BP3	OMC	BMDM	OCT
PO - Fundo	<LQ	0,15	<LQ	0,14
Ponta da Praia	<LQ	0,11	<LQ	<LQ
Embaré	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Gonzaga	<LQ	0,11	0,16	0,32
José Menino	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Praia da Divisa	<LQ	0,15	<LQ	0,26
Itararé	<LQ	0,15	<LQ	<LQ
Praia da Ilha Porchat	<LQ	0,14	<LQ	<LQ

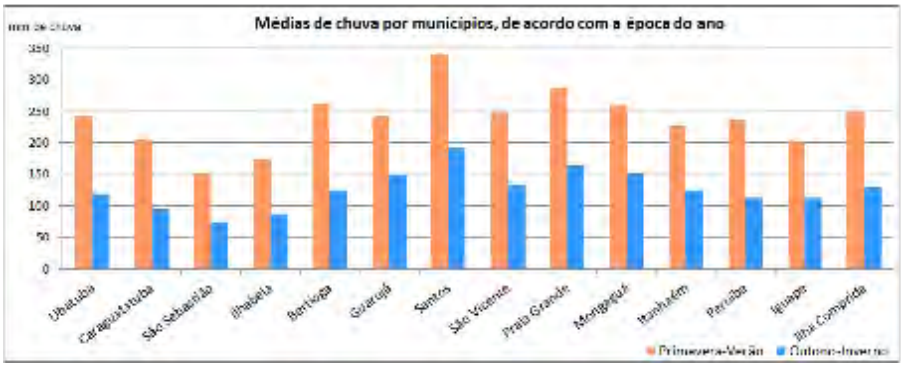
<LQ: Menor que o limite de quantificação

Fonte: Autor da tese

É possível observar que 6 pontos apresentaram resultados acima do LQ para algum dos analitos estudados, porém todas as concentrações identificadas estão próximas aos pontos mais baixos da faixa de trabalho.

Muito embora a Baixada Santista seja uma região turística e a coleta tenha sido realizada em período de alta estação, Santos é a cidade que possuiu maior média pluviométrica dos municípios litorâneos no ano de 2018 (vide Figura 33), o que pode ter impactado diretamente na quantificação de compostos presentes na água em nível de traço, uma vez que a água da chuva também pode ter agido como diluidor destes contaminantes.

Figura 33 – Média de chuvas por municípios, de acordo com a época do ano



Fonte: CIIAGRO [95]

Na praia de Santos não há estação de tratamento de esgoto, é utilizada uma estação de pré-condicionamento e emissário de efluente na praia José Menino, as estações de pré-condicionamento e o emissário tem a função de lançar o efluente longe da costa e não faz remoção de contaminantes do efluente, Santos possui 97% de coleta de esgoto, mas também possui áreas de ocupação irregular que contribuem para o lançamento de esgoto nos canais que afluem para o mar, impactando na qualidade da água nas praias [96].

Baías, como a de Santos, possuem fator de diluição inferior e menor taxa de renovação das águas, contribuindo para a concentração de poluentes, porém em Santos há 7 canais que afluem para o mar por comportas que são abertas quando ocorrem chuvas fortes, estes canais estão em José Menino (2 canais), Gonzaga, Embaré, Aparecida e Ponta da Praia. Os canais presentes em São Vicente estão situados em Prainha, Gonzaguinha, Milionários, Ilha Porchat, Itararé e Praia da Divisa. Estes afluentes são bastante comprometidos pelo despejo de esgoto sanitário, oriundos de áreas de ocupação irregular, refletindo na balneabilidade das praias e na diluição de poluentes presentes em menor concentração no mar [96] [97].

Em 2018, no município de Santos apenas a praia Gonzaga foi classificada como ruim e as demais como péssimas, em São Vicente apenas a praia da Ilha Porchat e Itararé receberam classificação como ruim e as demais como péssima. A Figura 34 mostra a classificação das praias em janeiro de 2018, onde é possível verificar que próximo à data da coleta apenas as praias Itararé e Praia da Ilha Porchat estavam próprias, segundo a classificação de balneabilidade da CETESB [96].

Figura 34 – Classificação das praias em janeiro de 2018

Praia - Local de amostragem	Janeiro			
	7	14	21	28
PONTA DA PRAIA	■	■	●	■
APARECIDA	■	■	●	■
EMBARÉ	■	■	●	■
BOQUEIRÃO	■	■	●	■
GONZAGA	■	■	●	■
JOSÉ MENINO (R. O. Bilac)	■	■	●	■
JOSÉ MENINO (R. F. Ozanan)	■	■	●	■

Praia - Local de amostragem	Janeiro			
	7	14	21	28
PRAIA DA DIVISA	■	■	■	●
ITARARÉ (POSTO 2)	●	●	●	●
PRAIA DA ILHA PORCHAT	■	●	●	●
MILIONÁRIOS	■	■	■	■
GONZAGUINHA	■	■	■	●
PRAINHA (AV. SANTINO BRITO)	■	■	■	■

■: Praias Impróprias ●: Praias próprias

Fonte: CETESB [96]

As praias de Santos e São Vicente apresentam características de estabilidade dinâmica e baixa mobilidade sedimentar, características de praia dissipativa (ondas com menor energia que quebram mais longe da face da praia, areia com menor tamanho de grão e praia com pouco declive), deixando mais vulneráveis ao acúmulo de contaminantes as praias situadas ao centro da Baía, o que pode ter contribuído para o resultado de maior concentração de OCT nas praias Gonzaga e Praia da Divisa [96] [97].

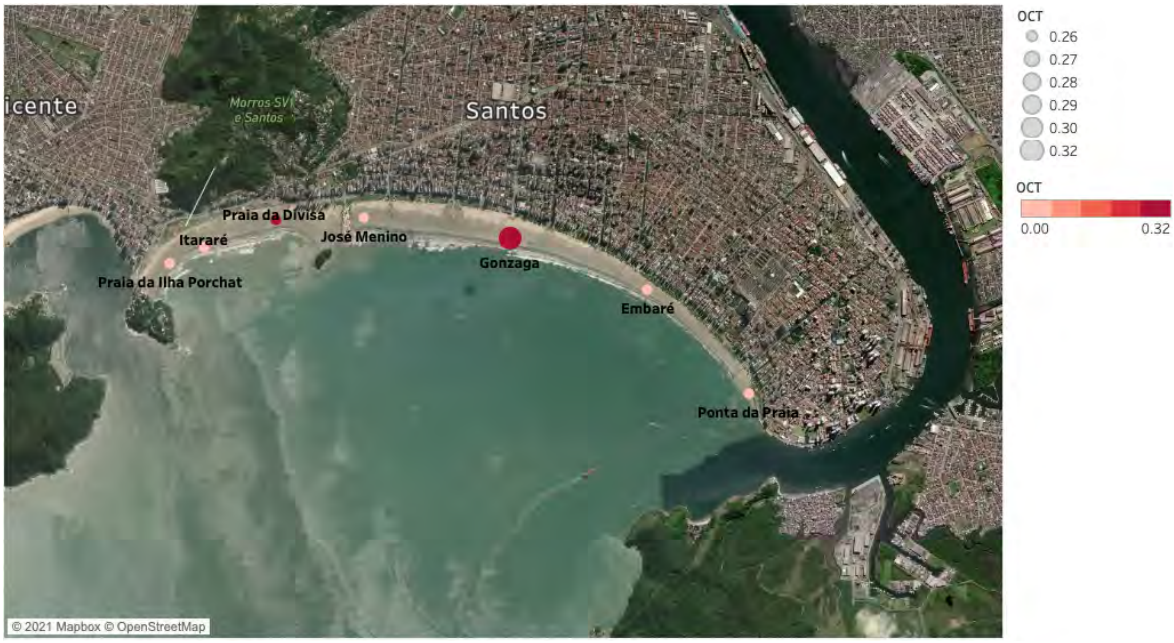
Quando foi realizada a coleta o dia estava chuvoso e na Ponta da Praia estavam sendo realizadas obras, a área estava isolada devido ao uso de máquinas (tratores e caminhões).

Na Figura 35 é possível observar que OCT foi quantificado em maior concentração nas praias Gonzaga e Praia da Divisa, o que pode ter relação com as características da Baía, praias com ondas com menor energia, que quebram mais longe da face da praia e com pouco declive, ou seja, com morfodinânima dissipativa como indicado por Souza em 2020 [97], deixando as prais mais ao centro da Baía mais vulneráveis ao acúmulo de contaminantes.

Na Figura 36 é possível observar que OMC foi quantificado acima do LQ nas praias situadas na região sul da Baía, o que pode indicar uma poluição mais recente. Embora as praias apresentem morfodinâmica dissipativa, com baixa

mobilidade dos sedimentos, o mapa de deriva litorânea da região (Figura 37) indica o transporte dos sedimentos em direção ao Estuário de Santos (de sul para norte).

Figura 35 – Resultados de OCT para a coleta realizada em Santos - 2018

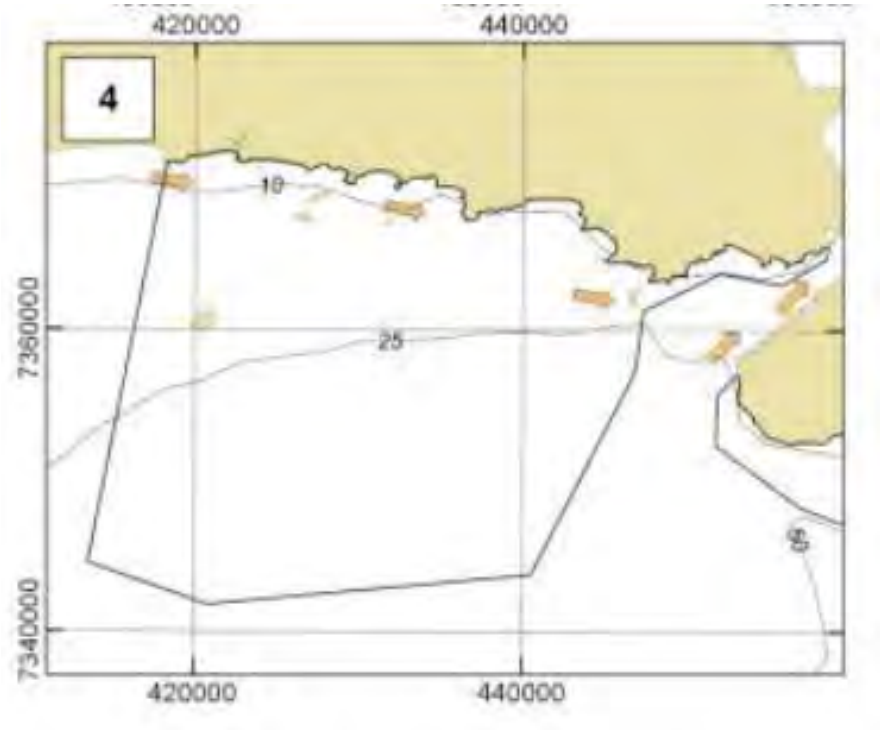


Fonte: Autor da tese

Figura 36 – Resultados de OMC para a coleta realizada em Santos - 2018

Fonte: Autor da tese

Figura 37 – Mapa de deriva litorânea da Baía de Santos



Fonte: Souza, C. R. G [97]

7.4.2 Coletas de Ubatuba – 2019 e 2020

As amostras coletas em Ubatuba em janeiro de 2019 foram analisadas, para determinação dos compostos BP3, OMC, BMDM e OCT. Os resultados obtidos para as praias de Santos estão apresentados na Tabela 26.

Para o composto BP3 é possível observar que as maiores concentrações observadas são nos pontos Barra do Itamambuca, Pier Caisão e P1 Estação 5. Para o composto OMC os pontos onde foi identificado maior concentração foi em Barra do Itamambuca. Somente foi identificado BMDM no ponto Rio Itamambuca e o analito OCT foi quantificado em maior concentração no ponto Perequê Mirim.

Tabela 26 – Resultados das amostras coletadas em Ubatuba - 2019

	Concentração (ng mL^{-1})			
Amostra	BP3	OMC	BMDM	OCT
P0 B Mancha – Estação 4	0,23	<LQ	<LQ	<LQ
P1 – Estação 5	0,33	0,12	<LQ	0,18
P3 – Estação 9	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
P4 – Estação 10	0,10	<LQ	<LQ	0,10
P5 – Praia da Enseada	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
P6 – Perequê Mirim	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
P7 – Santa Rita	0,17	<LQ	<LQ	<LQ
P8 – Perequê Mirim	<LQ	0,15	<LQ	0,32
P9 – Santa Rita Costa	0,17	<LQ	<LQ	<LQ
P10 – Saco do Ribeira	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
P11 – Perequê Açu	0,27	<LQ	<LQ	<LQ
P13 – Barra do Itamambuca	0,99	0,26	<LQ	0,25
P12 – Rio Itamambuca	<LQ	<LQ	0,13	<LQ
P14 – Barra do Rio Grande	<LQ	<LQ	<LQ	0,14
P15 – Itaguá Barra do Rio	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
P18 – Pier Caisão	0,32	<LQ	<LQ	0,14

<LQ: Menor que o limite de quantificação

Fonte: Autor da tese

A praia Itamambuca é uma área onde muitos turistas aproveitam para realizar atividades recreativas, além de ter condomínios no seu entorno, o que pode ter influenciado os resultados encontrados. Também é possível observar na Classificação de balneabilidade das praias de Ubatuba, realizada pela CETESB no ano de 2019 (Tabela 27), que tanto o Rio Itamambuca quanto a praia Itamambuca apresentam alguns eventos de praia imprópria para o banho, principalmente durante alta temporada, o que pode indicar que a região sofre de outras influências antrópicas, além das atividades recreativas realizadas pelos banhistas.

Tabela 27 – Classificação de balneabilidade praias de Ubatuba em 2019

Praia - Local de amostragem	Janeiro			
	6	13	20	27
PICINGUABA	●	●	●	■
PRUMIRIM	●			
FÉLIX	●	●	■	■
ITAMAMBUCA	■	●	●	●
RIO ITAMAMBUCA	■	●	●	●
VERMELHA DO NORTE	●	●	●	●
PEREQUÊ-AÇU	●	●	■	■
IPEROIG	■	●	■	■
ITAGUÁ (Av. Leovegildo, 240)	■	■	■	■
ITAGUÁ (Av. Leovegildo, 1724)	■	■	■	■
TENÓRIO	■	●	●	●
VERMELHA	●	●	●	●
GRANDE	●	●	●	●
TONINHAS	■	■	■	■
ENSEADA	■	●	●	●
SANTA RITA	■	■	■	●
PEREQUÊ-MIRIM	■	■	■	■
SUNUNGA	●	●	●	●
LÁZARO	■	■	■	■
DOMINGAS DIAS	●	●	●	●
DURA	■	●	●	●
LAGOINHA (R. Eng. Velho)	●	●	●	●
LAGOINHA (camping)	●	●	●	●
SAPÉ	●	●	●	●
MARANDUBA	■	■	■	●
PULSO	●			

■: Praias Impróprias

●: Praias próprias

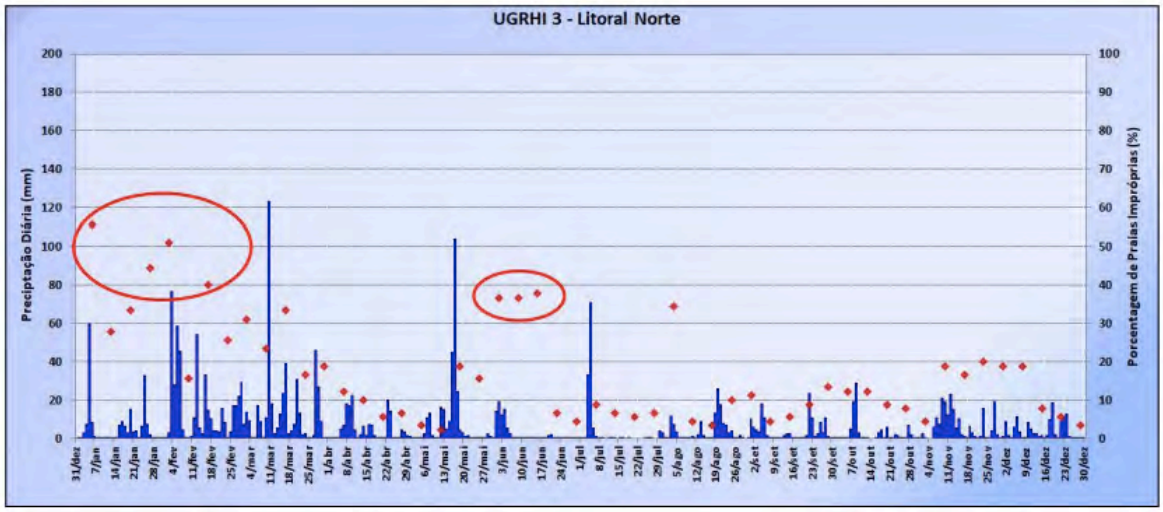
Fonte: CETESB [90]

Também é importante ressaltar que o ponto de coleta do Rio Itamambuca não apresenta as mesmas característica de água do mar, para a qual o método foi desenvolvido e validado, portanto, os resultados obtidos para este ponto podem não apresentar o mesmo desempenho dos demais pontos com salinidade, pH e outras características que foram considerados no estudo de desenvolvimento e validação do método.

No município de Ubatuba também foram observados episódios de praias impróprias quando houve a ocorrência de chuvas fortes (próximo a 100 mm), a Figura 38 mostra o percentual de praias impróprias (indicados nos pontos vermelhos) em épocas de ocorrência de fortes chuvas (gráfico de barras). Assim

como na Baixada Santista, a água dos canais é levada para as praias influenciando diretamente em sua qualidade, uma vez que o município de Ubatuba possui coleta de 34% do esgoto doméstico, o que evidencia a grande incidência de esgoto irregular e clandestino que pode influenciar a qualidade das águas da região. No entanto, o alto índice de chuvas também contribui para a diluição de compostos em nível traço já presentes na água do mar.

Figura 38 – Porcentagem semanal de praias Impróprias em 2019 e chuva diária – Litoral Norte



Fonte: CETESB [90]

Levando em consideração o comportamento de todos os compostos, o ponto que apresentou maior concentração dos filtros UV estudados foi o ponto Praia Itamambuca, com as maiores concentrações para os compostos BP3, OMC e OCT.

No caso das praias de Ubatuba não foi possível avaliar a possível relação das concentrações de filtros UV analisados com a morfodinâmica das praias, uma vez que segundo a literatura do litoral sul para o norte as praias tornam-se mais refletivas, porém não foi identificado uma morfodinâmica única na região de Ubatuba, inclusive este comportamento pode variar na mesma praia, além da observação de características de enseadas e pequenas baías. De forma geral, são mais comuns as praias dissipativas a refletivas de baixa energia (nas baías) [98].

A ocorrência de BP3 nos pontos P0 e P1, pode ter influência do emissário submarino, localizado na praia da enseada. A distribuição dos filtros UV quantificados em Ubatuba no ano de 2019 está apresentada na Figura 39 e Figura 40.

Figura 39 – Resultados de BP3 para a coleta realizada em Ubatuba - 2019

Fonte: Autor da tese

Figura 40 – Resultados de OCT para a coleta realizada em Ubatuba - 2019

Fonte: Autor da tese

Nos resultados obtidos na coleta realizada em janeiro 2020, onde é possível observar na Tabela 28 que o composto BP3 foi quantificado em dois pontos, na praia de Santa Rita e Rio Itamambuca, OMC em Perequê Mirim e Barra do Rio Itamambuca e OCT em Santa Rita e Perequê Mirim, Barra do Rio Itamambuca e no Rio Itamambuca.

Tabela 28 – Resultados das amostras coletadas em Ubatuba - 2020

	Concentração (ng mL^{-1})			
Amostra	BP3	OMC	BMDM	OCT
P0 Estação 4	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
P1 – Estação 5	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
P2 – Estação 7	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
P3 – Estação 9	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
P4 – Estação 10	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
P5 – Praia da Enseada	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
P13 – Barra Itamambuca	<LQ	0,25	<LQ	0,21
P7 – Santa Rita	0,22	<LQ	<LQ	0,17
P8 – Perequê Mirim	<LQ	0,25	<LQ	0,21
P12 – Rio Itamambuca	0,22	<LQ	<LQ	0,17
P10 – Saco do Ribeira	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
P14 – Barra do Rio Grande	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
P16 – Baía Itaguá	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
P15 – Barra do Rio Tavares	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
P18 – Pier Caisão	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ

<LQ: Menor que o limite de quantificação

Fonte: Autor da tese

Neste ano foi observado uma redução das concentrações de filtros UV encontrados nas praias de Ubatuba. No Relatório de Balneabilidade da CETESB do ano de 2020 verificou-se que apenas as praias de Itaguá, Perequê mirim e maramduba apresentaram resultado de imprópria para o banho no mês de janeiro (Figura 41).

Figura 41 – Classificação de balneabilidade para as praias do litoral norte em 2020

UBATUBA	Janeiro			
Praia - Local de amostragem	5	12	19	26
PICINGUABA	●	●	●	●
LAGOA PRUMIRIM	●			
PRUMIRIM	●	●	●	●
FÉLIX	●	●	●	●
ITAMAMBUCA	●	●	●	●
RIO ITAMAMBUCA	●	●	●	●
VERMELHA DO NORTE	●	●	●	●
PEREQUÊ-AÇU	●	●	●	●
IPEROIG	●	●	●	●
ITAGUÁ (Av. Leovegildo, 240)	●	■	■	■
ITAGUÁ (Av. Leovegildo, 1724)	■	■	■	■
TENÓRIO	●	●	●	●
VERMELHA	●	●	●	●
GRANDE	●	●	●	●
TONINHAS	●	●	●	●
ENSEADA	●	●	●	●
SANTA RITA	●	●	●	●
PEREQUÊ-MIRIM	●	●	■	■
SUNUNGA	●	●	●	●
LÁZARO	●	●	●	●
DOMINGAS DIAS	●	●	●	●
DURA	●	●	●	●
LAGOINHA (R. Eng. Velho)	●	●	●	●
LAGOINHA (camping)	●	●	●	●
SAPÉ	●	●	●	●
MARANDUBA	●	●	●	■
PULSO	●			

■: Praias Impróprias

●: Praias próprias

Fonte: CETESB [99]

Verificou-se também que os índices pluviométricos em 2020 foram menores que em 2019, como mostrado na Tabela 29 em janeiro a chuva máxima teve 46 mm, corroborando com a influência de chuvas fortes na qualidade da água do litoral paulista.

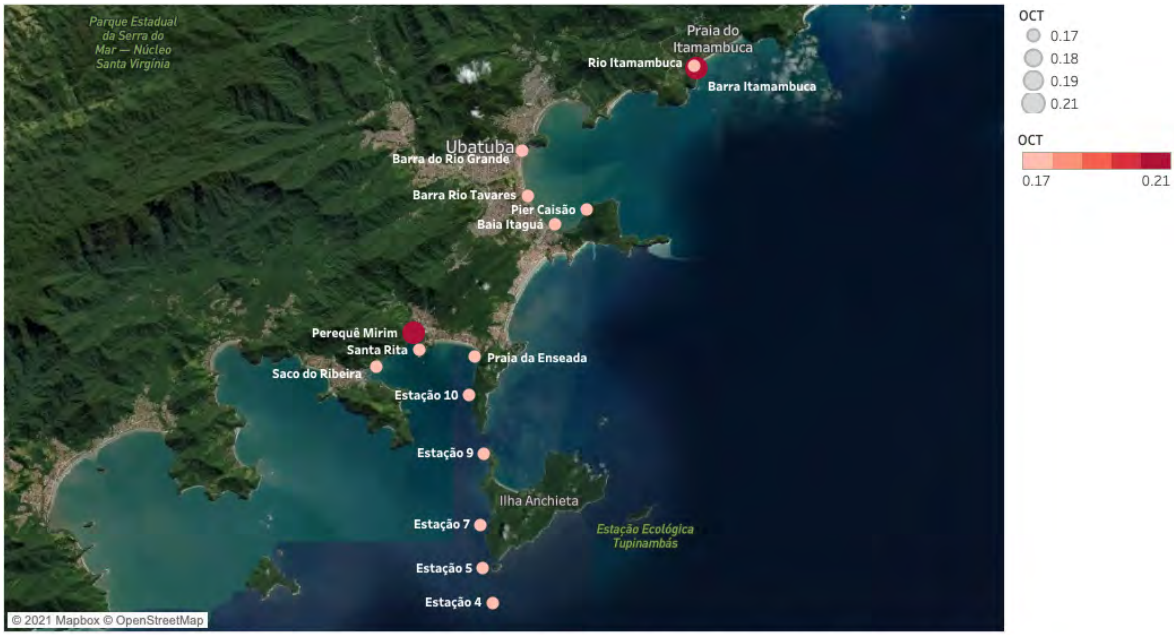
Tabela 29 – Dados mensais do índice pluviométrico para Ubatuba em 2020

CIIAGRO - Dados Mensais no período de 01/01/2020 até 18/05/2020						
Local: Ubatuba						
Mês	Dias	Dias de Chuva	Chuva Total	Média Mensal da Chuva Total	Chuva Máxima	Chuva Mínima
janeiro	26	17	199,5	237,9	46,0	0,2
fevereiro	26	20	422,6	459,2	120,0	0,2
março	26	10	144,4	172,2	62,0	0,2
abril	30	8	36,6	36,6	30,0	0,2
maio	18	8	14,5	25,0	11,4	0,2

Fonte: CIIAGRO [95]

Como pode ser observado nos mapas abaixo (Figura 42, Figura 43 e Figura 44) em 2020 os filtros UV foram quantificados em Barra de Itamambuca, Perequê-Mirim e Santa Rita.

Figura 42 – Resultados de OCT para a coleta realizada em Ubatuba - 2020



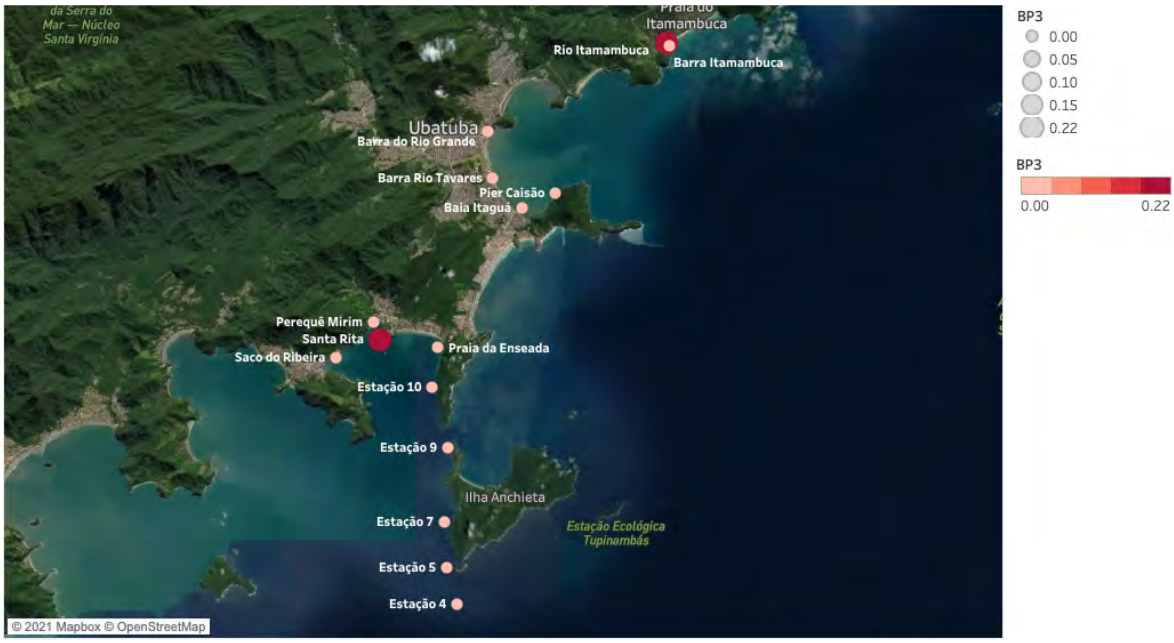
Fonte: Autor da tese

Provavelmente estes pontos de acúmulo sofrem influências diferentes e não há relação entre as fontes dos contaminantes para estas regiões.

Figura 43 – Resultados de OMC para a coleta realizada em Ubatuba - 2020

Fonte: Autor da tese

Figura 44 – Resultados de BP3 para a coleta realizada em Ubatuba - 2020

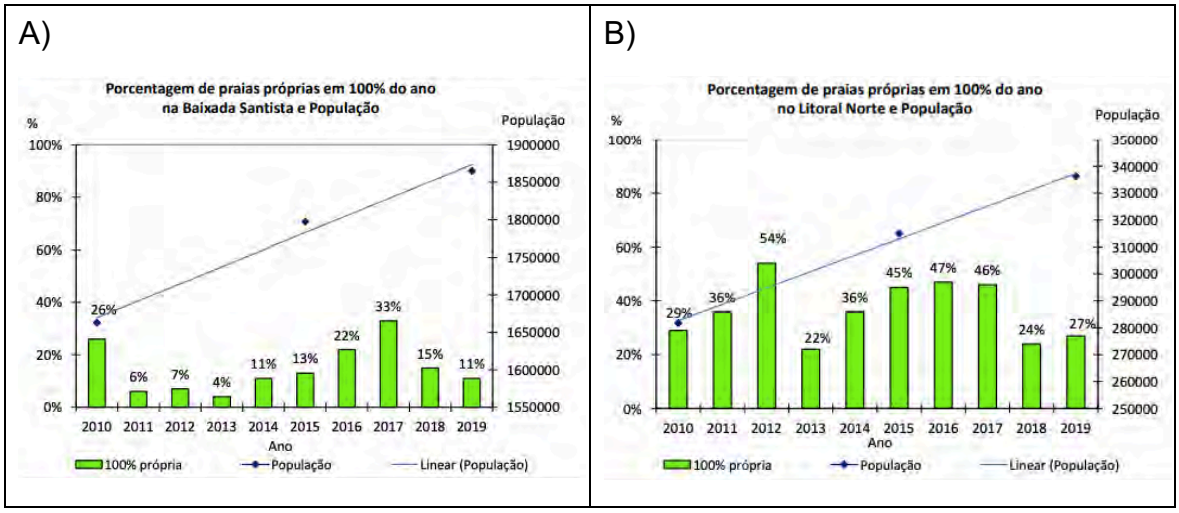


Fonte: Autor da tese

Na Figura 45 é possível ver que, tanto na Baixada Santista como no Litoral Norte houve uma melhora na qualidade da água do mar, o que pode ter relação com os menores índices pluviométricos observados nos últimos anos e ao aumento nos investimentos nas ações de saneamento no litoral paulista. Estas

ações podem contribuir também para a redução do acúmulo de poluentes emergentes como os filtros UV estudados neste trabalho.

Figura 45 – Evolução da porcentagem de praias Próprias em 100% de 2010 a 2019 em comparação com crescimento populacional – A) Baixada Santista; B) Litoral Norte



Fonte: CETESB [90]

7.5 Comparação dos Resultados

Para o filtro UV BP3, não foram observados resultados acima do LQ para as amostras de Santos e São Vicente em 2018, em Ubatuba foram observados resultados entre 0,10 e 0,99 ng mL^{-1} em 2019 e dois resultados de 0,22 ng mL^{-1} em 2020. Em outros estudos realizados, a maior concentração de BP3 ocorreu em Alicante (Espanha), com 3,3 ng mL^{-1} [8], outros trabalhos apresentaram concentrações entre 0,06 e 0,25 ng mL^{-1} em outros locais da Espanha (Valência e Majorca) [100] [9] [10], e no Japão foram encontradas concentrações de até 1,26 ng mL^{-1} [101]. Em Los Angeles (Estados Unidos) foram encontradas concentrações em torno de 0,60 ng mL^{-1} e Shantou (situada na China) concentrações de 0,19 ng mL^{-1} [11].

Para o analito OMC, na coleta realizada em Santos e São Vicente em 2018 foram observados resultados entre 0,11 e 0,15 ng mL^{-1}, em Ubatuba foram observados resultados entre 0,12 e 0,26 ng mL^{-1} em 2019 e dois resultados de 0,25 ng mL^{-1} em 2020. Em Majorca (Espanha) foram observados resultados de 0,08 ng

mL^{-1} [100], em Alicante foram encontradas concentrações mais altas, entre 0,68 e 1,19 ng mL^{-1} [9]. Em Hong Kong foram encontradas concentrações entre 0,09 e 4,0 ng mL^{-1} e entre 0,05 e 0,15 ng mL-1 em Tokyo, Los Angeles e Shantou [11].

BMDM foi quantificado em Santos em 2018 a 0,16 ng mL^{-1} e em Ubatuba a 0,13 ng mL^{-1} em 2019. Este filtro UV também foi identificado no Oceano Ártico em concentrações de 0,07 ng mL^{-1}, provavelmente por conta das correntes oceânicas ou transporte atmosférico. Foram encontradas concentrações de até 0,72 ng mL-1 em Hong Kong e em Tokyo, Nova Iork, Los Angeles e Shantou foram encontradas concentrações entre 0,05 e 0,11 ng mL^{-1} [11].

OCT foi quantificado em Santos em 2018 em concentrações entre 0,14 e 0,32 ng mL^{-1}, em Ubatuba entre 0,10 e 0,32 ng mL^{-1} em 2019 e em 2020 entre 0,17 e 0,21 ng mL^{-1}. Na China OCT foi o composto que apresentou maior concentração (6,81 ng mL^{-1}) [11]. Em Alicante foram observadas concentrações em torno de 0,44 ng mL^{-1} [9]. Em Valência foi identificada concentração de até 3,0 ng mL^{-1} [10].

Nos trabalhos realizados na Grécia não foram encontradas concentrações de filtros UV ou estes foram quantificados em baixas concentrações (entre 0,008 a 0,02 ng mL^{-1}) [7] [102] [103].

As maiores influências para as concentrações de filtros UV em água do mar nos trabalhos consultados foram: atividades recreativas; escoamento superficial e o lançamento de efluentes [85] [12], bem como observado nas cidades de Santos, São Vicente e Ubatuba.

7.6 Análise Exploratória por HRAM

Após a realização das análises foi então feita a busca de 320 compostos utilizando sua massa exata e ferramentas de predição de fórmula molecular, dentre os compostos pesquisados estão listados outros filtros UV, Produtos de Higiene Pessoal e Fármacos – *PPCPs* e alguns metabólitos de filtros UV.

A avaliação por análise exploratória foi realizada nas amostras que apresentaram maior concentração dos filtros UV analisados por LC-MS/MS Triploquadrupolo. Portanto, nesta etapa do trabalho foram avaliadas as amostras Praia da Divisa e Gonzaga, coletadas em Santos em janeiro de 2018, e amostras Barra de Itamambuca e Perequê-Mirim das coletas realizadas em janeiro de 2019 e janeiro de 2020 em Ubatuba.

Bem como mostrado na Figura 46, foi identificada a presença de 17-estradiol na Praia da Divisa em Santos – 2018 e em todas as outras amostras avaliadas [104].

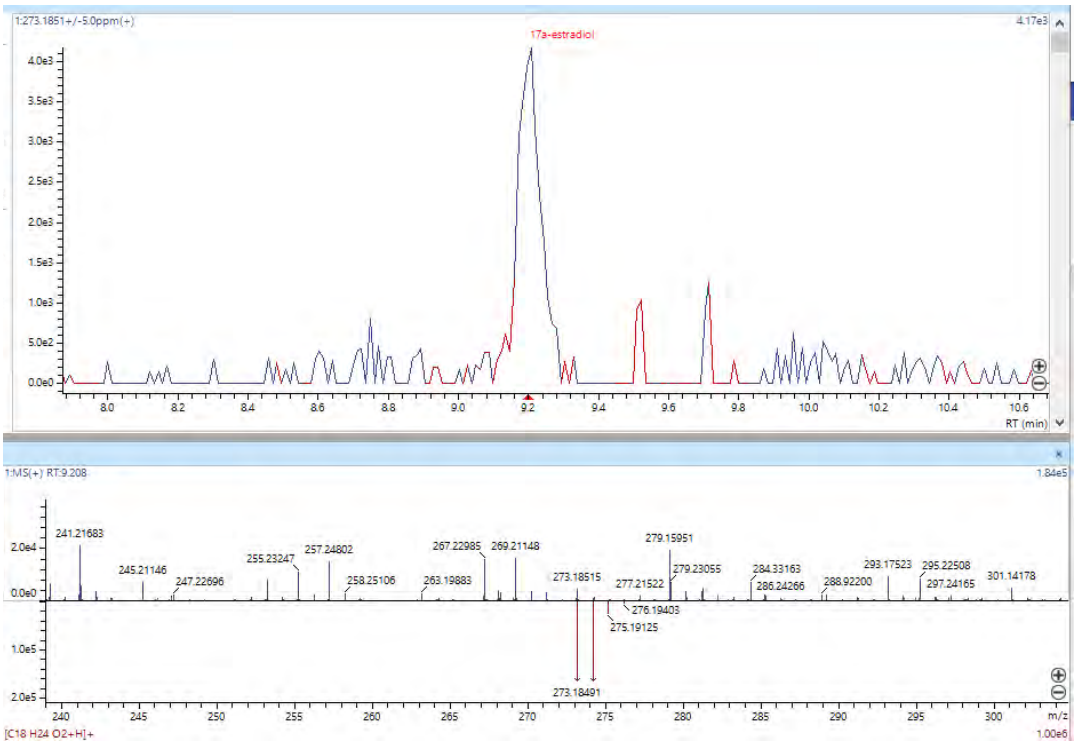
Na Praia da Divisa em Santos, além da presença do estradiol, também foi identificada a presença de 17a-etinilestradiol (Figura 47), ofloxacina (Figura 48), bisoprolol (Figura 49) e atenolol (Figura 50), fármacos que também indicam o lançamento de esgoto doméstico [105].

A presença deste hormônio sintético e fármacos corroboram com as informações de lançamento de esgoto doméstico não tratado na região, conforme citado anteriormente, tanto em Ubatuba, quanto em Santos é realizado o lançamento de efluentes na água do mar por meio de Emissário submarino, além do lançamento de efluentes irregulares nos canais, que chegam até as praias, principalmente quando ocorrem chuvas fortes. Estes efluentes não tratados contribuem com a contaminação da água do mar não somente com filtros UV, mas com diversos outros contaminantes e poluentes emergentes.

O lançamento destas águas no mar pode influenciar na diluição de compostos que estão presentes em menor concentração, como os filtros UV, mas também podem ser os responsáveis pela incidência de outros contaminantes na região.

É importante ressaltar que devido às características físico-químicas dos filtros UV orgânicos, como maior Kow e baixa solubilidade em água estes possuem tendência de acúmulo nos tecidos de animais e no sedimento, desta forma é esperado encontrar baixas concentrações em água [106] [5] [27] [107].

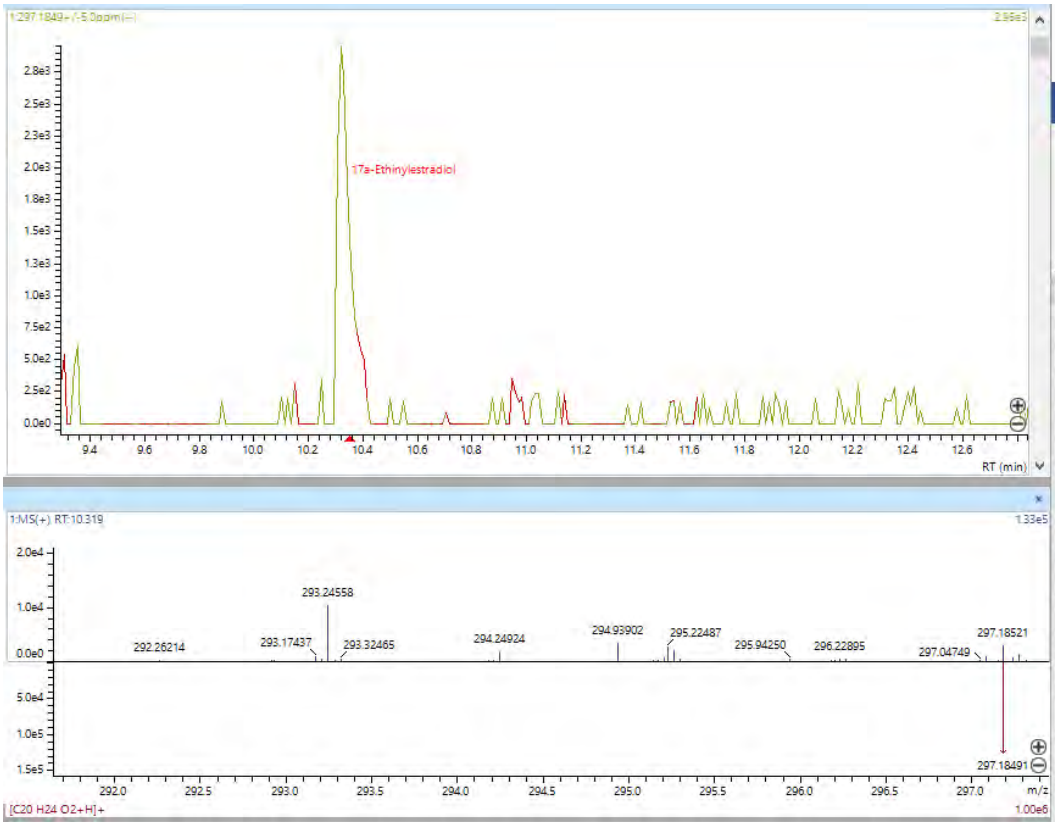
Figura 46 – Cromatograma, espectro de massas e predição de fórmula molecular de 17-estradiol – Praia da Divisa – Santos 2018



#	Score	Pred. (M)	Pred. m/z	Meas. m/z	Diff. (mDa)	Formula (M)	Ion	Diff. (ppm)	Iso Score	DBE
1	99.06	272.17763	273.18491	273.18515	0.24	C18 H24 O2	[M+H]+	0.879	99.39	7.0
2	49.74	255.15119	273.18502	273.18515	0.13	C9 H23 N3 O2 F...	[M+NH4]+	0.476	55.48	0.0

Fonte: Autor da tese

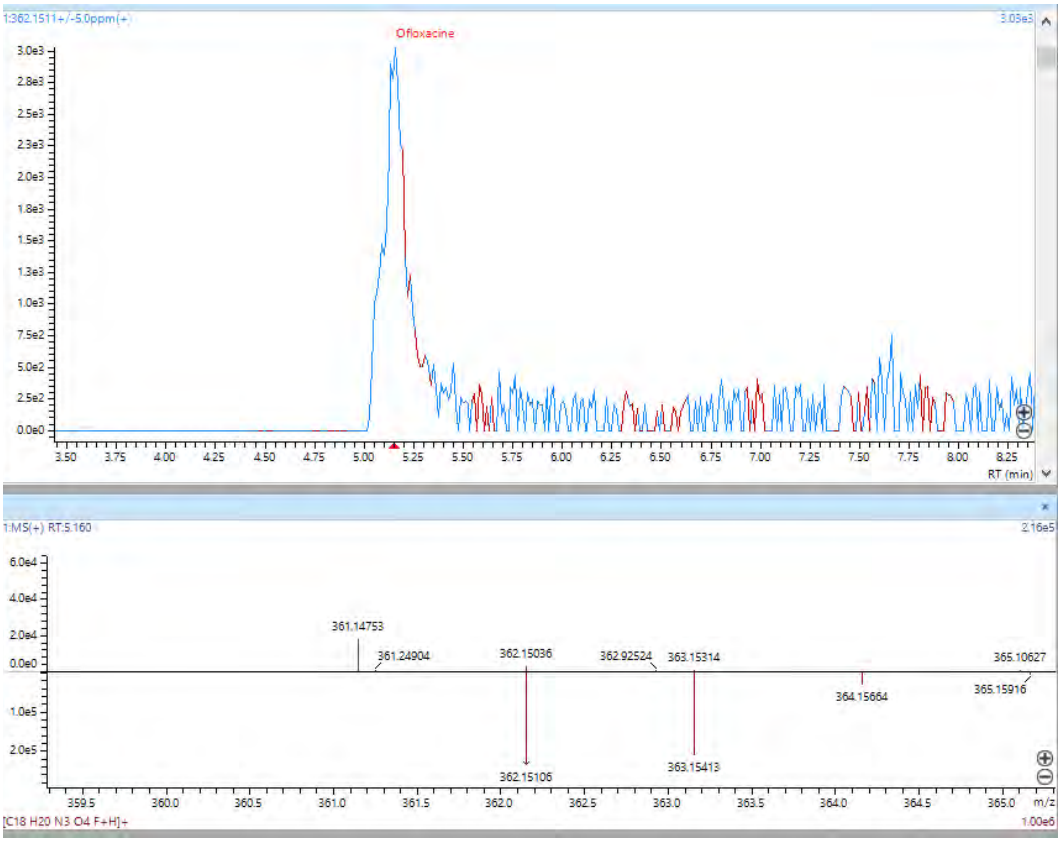
Figura 47 – Cromatograma, espectro de massas e predição de fórmula molecular de 17a-etinilestradiol – Praia da Divisa – Santos 2018



#	Score	Pred. (M)	Pred. m/z	Meas. m/z	Diff. (mDa)	Formula (M)	Ion	Diff. (ppm)	Iso Score	DBE
1	99.64	296.17774	297.18502	297.18521	0.19	C11 H26 N4 O2 ...	[M+H]+	0.639	99.90	1.0
2	99.64	279.15119	297.18502	297.18521	0.19	C11 H23 N3 O2 ...	[M+NH4]+	0.639	99.90	2.0
3	66.86	296.17763	297.18491	297.18521	0.30	C20 H24 O2	[M+H]+	1.009	63.69	9.0
4	48.44	279.15170	297.18553	297.18521	-0.32	C12 H27 N O2 P2	[M+NH4]+	-1.077	54.37	1.0
5	48.44	296.17825	297.18553	297.18521	-0.32	C12 H30 N2 O2 ...	[M+H]+	-1.077	54.37	0.0
6	35.24	296.17877	297.18605	297.18521	-0.84	C17 H25 O3 F	[M+H]+	-2.827	41.11	5.0

Fonte: Autor da tese

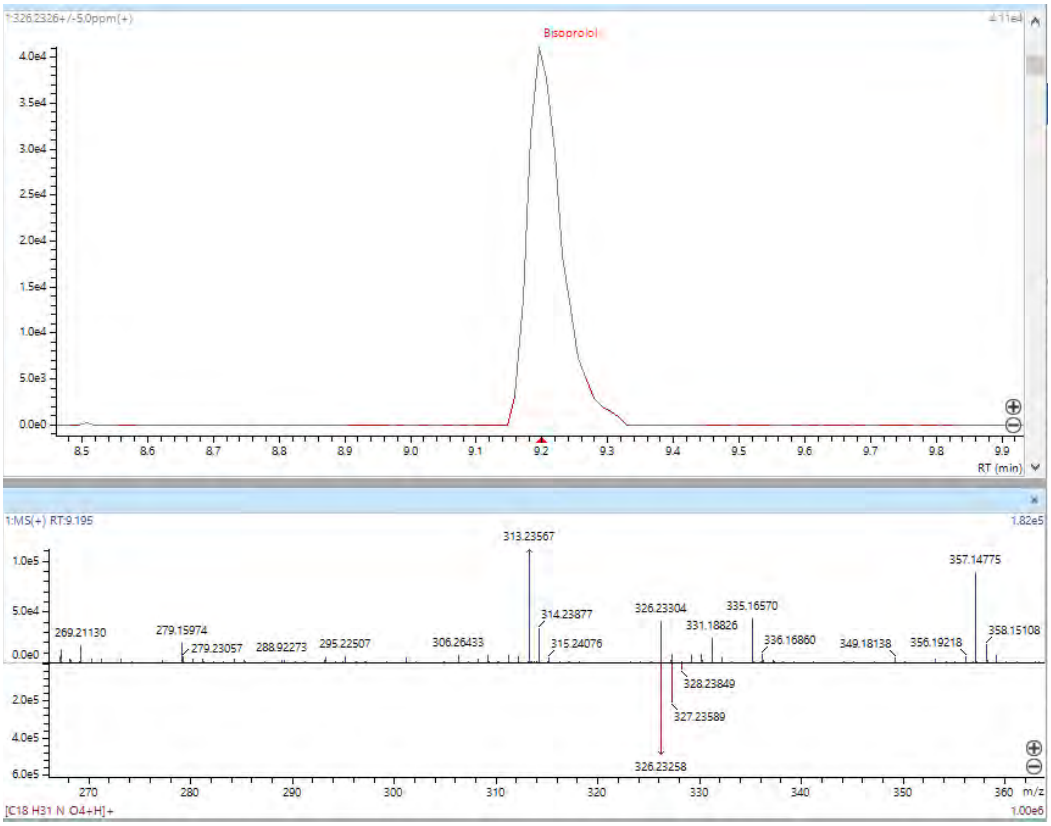
Figura 48 – Cromatograma, espectro de massas e predição de fórmula molecular de ofloxacina– Praia da Divisa – Santos 2018



#	Score	Pred. (M)	Pred. m/z	Meas. m/z	Diff. (mDa)	Formula (M)	Ion	Diff. (ppm)	Iso Score	DBE
1	99.60	339.16128	362.15050	362.15036	-0.14	C18 H22 N5 P	[M+Na]+	-0.387	99.72	11.0
2	96.84	339.16077	362.14999	362.15036	0.37	C17 H18 N7 F	[M+Na]+	1.022	97.01	12.0
3	95.50	344.11609	362.14992	362.15036	0.44	C21 H16 N2 O3	[M+NH4]+	1.215	95.64	15.0
4	95.50	361.14264	362.14992	362.15036	0.44	C21 H19 N3 O3	[M+H]+	1.215	95.64	14.0
5	84.41	344.11724	362.15106	362.15036	-0.70	C18 H17 N2 O4 F	[M+NH4]+	-1.933	83.82	11.0
6	84.41	361.14378	362.15106	362.15036	-0.70	C18 H20 N3 O4 F	[M+H]+	-1.933	83.82	10.0
7	73.83	361.14326	362.15054	362.15036	-0.18	C13 H25 N5 O3 ...	[M+H]+	-0.497	71.15	5.0
8	73.83	344.11671	362.15054	362.15036	-0.18	C13 H22 N4 O3 ...	[M+NH4]+	-0.497	71.15	6.0

Fonte: Autor da tese

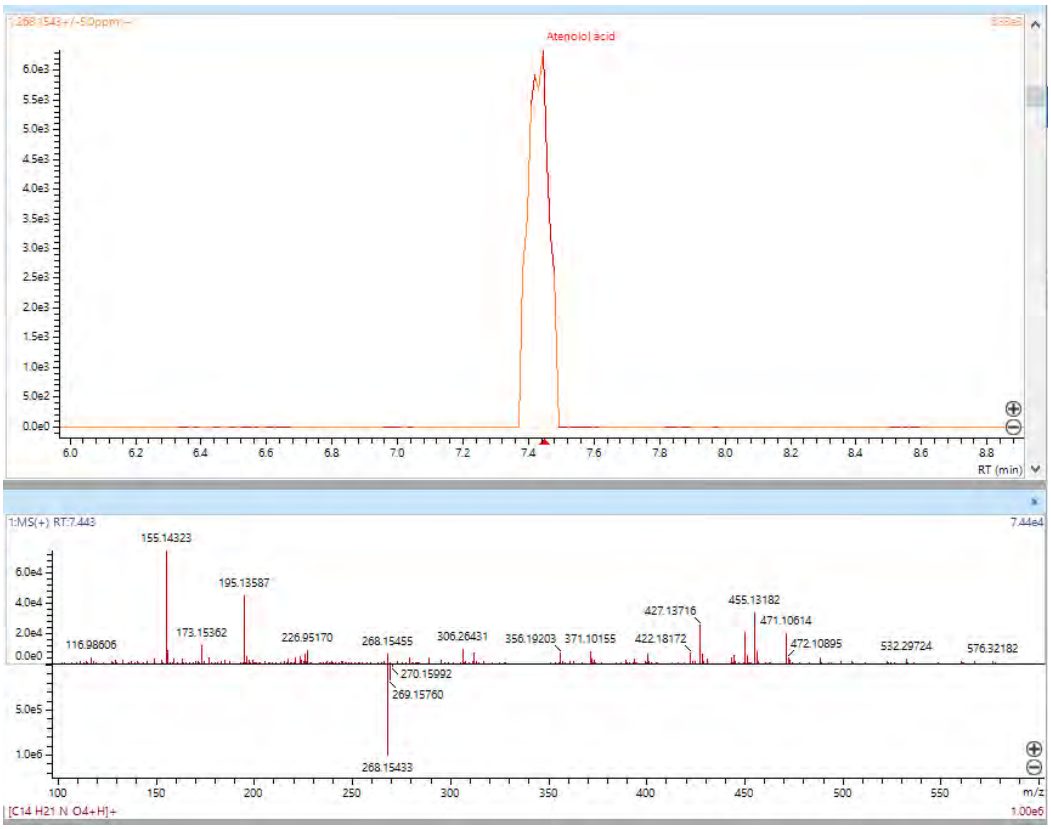
Figura 49 – Cromatograma, espectro de massas e predição de fórmula molecular de bisoprolol – Praia da Divisa – Santos 2018



#	Score	Pred. (M)	Pred. m/z	Meas. m/z	Diff. (mDa)	Formula (M)	Ion	Diff. (ppm)	Iso Score	DBE
1	93.21	325.22531	326.23258	326.23304	0.46	C18 H31 N O4	[M+H]+	1.410	93.22	4.0
2	93.21	308.19876	326.23258	326.23304	0.46	C18 H28 O4	[M+NH4]+	1.410	93.22	5.0
3	91.71	303.24395	326.23317	326.23304	-0.13	C15 H34 N3 O P	[M+Na]+	-0.398	90.97	1.0
4	85.30	325.22665	326.23392	326.23304	-0.88	C19 H27 N5	[M+H]+	-2.697	85.49	9.0
5	85.30	308.20010	326.23392	326.23304	-0.88	C19 H24 N4	[M+NH4]+	-2.697	85.49	10.0
6	76.36	325.22645	326.23373	326.23304	-0.69	C15 H32 N O5 F	[M+H]+	-2.115	75.02	0.0
7	76.36	308.19990	326.23373	326.23304	-0.69	C15 H29 O5 F	[M+NH4]+	-2.115	75.02	1.0
8	47.89	303.24344	326.23266	326.23304	0.38	C14 H30 N5 O F	[M+Na]+	1.165	53.82	2.0

Fonte: Autor da tese

Figura 50 – Cromatograma, espectro de massas e predição de fórmula molecular de atenolol – Praia da Divisa – Santos 2018



#	Score	Pred. (M)	Pred. m/z	Meas. m/z	Diff. (mDa)	Formula (M)	Ion	Diff. (ppm)	Iso Score	DBE
1	75.17	245.16519	268.15441	268.15455	0.14	C10 H20 N5 O F	[M+Na]+	0.522	72.65	3.0
2	49.23	267.14706	268.15433	268.15455	0.22	C14 H21 N O4	[M+H]+	0.820	55.10	5.0
3	49.23	250.12051	268.15433	268.15455	0.22	C14 H18 O4	[M+NH4]+	0.820	55.10	6.0
4	47.82	245.16570	268.15492	268.15455	-0.37	C11 H24 N3 O P	[M+Na]+	-1.380	53.88	2.0

Fonte: Autor da tese

8 CONCLUSÃO

A partir dos resultados observados na etapa de desenvolvimento analítico foi desenvolvida uma metodologia de preparo de amostra por SD-DLLME, utilizando 1-octanol como solvente extrator e acetona como solvente dispersor e Acetonitrila como solvente dispersor, e análise por LC-ESI-MS/MS para determinação dos filtros UV BP3, OMC, BMDM e OCT em 5 min.

Esta metodologia contempla a faixa de trabalho de 0,1 a 5,0 ng mL^{-1} para todos os analitos, sendo 0,1 ng mL^{-1} o Limite de quantificação. Devido ao efeito de matriz observado, as curvas analíticas devem ser preparadas em matriz. O método apresentou precisão com DPR% abaixo de 30%, quando avaliada em termos de Repetibilidade e precisão intermediária.

O método apresentou Recuperação que variou entre 72,54 e 139,33 % no LQ e entre 100,43 e 121,00% nos demais pontos da faixa de trabalho, o que está acima do critério de aceitação, segundo Corneta de Horwitz, considerando nível de concentração em torno de 1 ng mL^{-1}, no entanto foi levado em consideração a complexidade do preparo de amostra e nível de concentração e os resultados foram considerados satisfatórios para a finalidade pretendida.

As amostras apresentam estabilidade em 24 horas, desde que mantidas sob temperatura controlada. E o percentual de solvente orgânico e fluxo de fase móvel são parâmetros críticos para a robustez do método.

Deve-se salientar que a metodologia de preparo SD-DLLME ainda é uma técnica nova, que está sendo estudado e possui poucas informações na literatura, portanto, o desenvolvimento e validação desta metodologia para a determinação dos filtros solares BP3, OMC, BMDM e OCT, é mais um diferencial deste trabalho. Quando comparada com outras técnicas de extração, são vantagens da SD-

DLLME: não necessita de aparatos complexos e grandes investimentos; possui baixo custo; utiliza pouco volume de amostra; utiliza solvente com menor grau de toxicidade; e utiliza volumes baixos de solventes, reduzindo a geração de efluentes tóxicos ao meio ambiente, o que permite a implementação desta metodologia em diferentes laboratórios de forma mais fácil.

Avaliando os resultados das amostras coletadas em Santos e São Vicente (2018) e Ubatuba em 2019 e 2020, o filtro UV BP3 apresentou resultados entre 0,10 e 0,99 ng mL^{-1}, OMC apresentou resultados entre 0,11 e 0,26 ng mL^{-1}, BMDM foi quantificado entre 0,13 ng mL^{-1} e 0,16 ng mL^{-1} e OCT entre 0,10 e 0,32 ng mL^{-1}. As concentrações encontradas de BP3 e BMDM foram consideradas similares aos outros locais encontrados na literatura e as concentrações de OMC e OCT foram consideradas baixas. Também é possível observar que as praias que apresentaram maior concentração de filtros UV foram as praias da Divisa, Gonzaga, Perequê-mirim e Itamambuca.

Provavelmente os resultados foram influenciados por eventos de chuvas fortes, comuns no período de janeiro, as chuvas podem afetar tanto na diluição, como na contribuição de contaminação, uma vez que as comportas dos canais são abertas para evitar enchentes na cidade, e os canais afluem às praias. Estes canais são contaminados pelo descarte de efluentes domésticos não tratados.

Por meio da análise exploratório por HRAM QTOF foi evidenciada a presença de 17-estradiol na amostra da Praia da Divisa, Gonzaga, Barra de Itamambuca e Perequê Mirim e 17ª-etinilestradiol, ofloxacina, bisoprolol e atenolol na Praia da Divisa, pontos onde os filtros UV foram quantificados, evidenciando a contribuição de efluentes domésticos sem tratamento, na região.

É importante salientar que, as mesmas amostras preparadas para análises dos filtros UV BP3, OMC, BMDM e OCT em água do mar também foram utilizadas para a análise exploratória, com a aplicação de métodos de preparo e análise mais específicas para algumas classes de compostos a análises exploratória poderia fornecer resultados mais ricos e conclusivos para identificação

de Produtos de Higiene Pessoal e Fármacos e outros poluentes emergentes, o que pode ser explorado em trabalhos futuros.

Os resultados obtidos neste estudo podem contribuir para avaliações de risco ambiental da região do litoral paulista e avaliações toxicológicas específicas para espécies marinhas da região, contribuindo com a tomada de ações que evitem a ocorrência de impactos ambientais, principalmente em áreas de preservação ambiental, e contribuir com o entendimento de efeitos negativos que estão ocorrendo na atualidade, como o branqueamento de corais e acidificação dos oceanos.

O desenvolvimento de metodologias, sensíveis e confiáveis para a determinação de poluentes emergentes e outros contaminantes, como os filtros UV, permite a quantificação destes analitos em diferentes áreas, permitindo a geração de mais dados científicos, importantes para a implementação de políticas públicas necessárias para a implementação de ferramentas de controle ambiental, de modo a garantir que a biota e bioma sejam preservados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] POIGER, T., BUSER, H., BALMER, M., BERGQVIST, P., & MULLER, M. Occurrence of UV filter compounds from sunscreens in surface waters: regional mass balance in two Swiss lakes. ***Chemosphere***, 14 julho 2004. 951 - 963.

[2] AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÊNCIA SANITÁRIA, ***Resolução RDC N° 30 - Aprova o Regulamento Técnico Mercosul sobre Protetores Solares em Cosméticos e dá outras providências***, 2012.

[3] ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE HIGIENE PESSOAL, PERFUMARIA E COSMÉTICOS, ***Promoções mantêm avanço das vendas de protetor solar***, ABIHPC, 2020. Disponível em: https://abihpec.org.br/2016/01/promocoesmantemavancodasvendasdeprotetorsolar/. Acesso em: 19 fevereiro 2021.

[4] KRAUSE, M., KLIT, A., BLOMBERG, J. M., SOEBERG, T., FREDERIKSEN, H., SCHLUMPF, M., LICHTENSTEIGER, W., SKAKKEBAEK, N. E., DRZWIECKI, K. T. Sunscreens: are they beneficial for health? An overview of endocrine disrupting properties of UV-filters. ***International Journal of Andrology***, junho 2012. 424 - 436.

[5] LIU, J.; WONG, M. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs): A review on environmental contamination in China. ***Environment International***, 06 julho 2013. 208 - 224.

[6] UNITED NATIONS EDUCATIONAL, SCIENTIFIC AND CULTURAL ORGANIZATION. ***Emerging Pollutants in Water and Wastewater*** emerging_pollutants_in_water_and_wastewater.jpg , 2021. Disponivel em: <https://en.unesco.org/emergingpollutantsinwaterandwastewater>. Acesso em: 25 maio 2021.

[7] GIOKAS, D. L., SAKKAS, V. A., ALBANIS, T. A., & LAMPROPOULOU, D. A. Determination of UV- filter residues in bathing waters by liquid chromatography UV-diode array and gas chromatography–mass spectrometry after micelle mediated extraction–solvent back extraction. ***J. Chromatogr. A*** , 2005. 1077, 19 - 27.

[8] TARAZONA, I., CHISVERT, A., LEON, Z., & SALVADOR, A. Determination of hydroxylated benzo- phenone UV filters in sea water

samples by dispersive liquid–liquid microextraction followed by gas chromatography–mass spectrometry. ***J. Chromatogr. A***, 2010. 1217, 4771 - 4778.

[9] ROMAN, I. P.; CHISVERT, A.; CANALS, A. Dispersive solid-phase extraction based on oleic acid-coated magnetic nanoparticles followed by gas chromatography–mass spec- trometry for UV-filter determination in water samples. ***J. Chromatogr. A***, 2011. 1218, 2467 - 2475.

[10] VIDAL, L., CHISVERT, A., CANALS, A., & SALVADOR, A. Ionic liquid-based single-drop microextraction followed by liquid chromatography–ultraviolet spectrophotometry detection to determine typical UV filters in surface water samples. ***Talanta***, 2010. 81, 549 - 555.

[11] TSUI, M. M. et al. Occurrence, distribution and ecological risk assessment of multiple classes of UV filters in surface waters from different countries. ***Water Res.*** , 2014. 67c, 55-65.

[12] RAMOS, S., HOMEM, V., ALVES, A., & SANTOS, L. Advances in analytical methods and occurrence of organic UV-filters in the environment — A review. ***Sci Total Environ***, v. 526, p. 278 - 311, 2015.

[13] AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, ***RDC 47, Aprova o Regulamento Técnico "LISTA DE FILTROS ULTRAVIOLETAS PERMITIDOS PARA PRODUTOS DE HIGIENE PESSOAL, COSMÉTICOS E PERFUMES"***. 2006.

[14] EUROPEAN PARLIAMENT AND COUNCIL. Regulamento (CE) N.o 1223/2009 DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO. ***Official Journal of the European Union***. 2009.

[15] CHEN, H.; CHEN, R.; LI, S. Low-density extraction solvent-based solvent terminated dispersive liquid–liquid microextraction combined with gas chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of carbamate pesticides in water samples. ***Journal of Chromatography A***, 2010. 1244 - 1248.

[16] BARBOSA, S. C. ***Desenvolvimento de métodos baseados na DLLME com demulsificante para determinação multiresíduo de agrotóxicos, fármacos e produtos de cuidado pessoal em amostras de água***, 2015, Tese (Doutorado em química) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande. Disponível em: https://sistemas.furg.br/sistemas/sab/arquivos/bdtd/0000010727.pdf Acesso em: 15 abr. 2019

[17] NORDBERG, G. F., FOWLER, B. A., NORDBERG, M., & FRIBERG, L. T. ***Handbook on the Toxicology of Metals***. 3ª edição. ed. Amsterdam,

BostomHeidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo: Elsevier, 2007.

[18] UMBUZEIRO, G. A. ***Critérios para a Qualidade da Água***, 2011. Disponivel em: <http://www.ilsi.org/Brasil/Documents/Gisela%20Arag%C3%A3o%20Umbuzeiro.pdf>. Acesso em: 12 abril 2015.

[19] UMBUZEIRO, G. ***Padrões de Qualidade de Água***, São Paulo, 2012. Disponivel em: <http://arquivo.ambiente.sp.gov.br/cea/2011/12/GiselaUmbuzeiro.pdf>.

[20] AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITÁRIA, ***Resolução da Diretoria Colegiada - RDC 30,*** 2012. Disponível em: https://www.cosmeticsonline.com.br/ct/painel/fotos/assets/uploads/regulatorios/bef6e-RDC-30.pdf. Acesso em 29 maio 2019.

[21] NATIONAL PARKS ASSOCIATION OF NSW. ***Sun Exposure***, 2020. Disponivel em: <https://www.bushwalking101.org/sun-exposure/>. Acesso em: 08 março 2021.

[22] MINISTÉRIO DA SAÚDE, ***RDC No 69 que Dispõe sobre o "REGULAMENTO TÉCNICO MERCOSUL SOBRE LISTA DE FILTROS ULTRAVIOLETAS PERMITIDOS PARA PRODUTOS DE HIGIENE PESSOAL, COSMÉTICOS E PERFUMES".,*** 2016.

[23] KIRCHHOFF, V. W. J. H. ***Ozônio e Radiação UV-B***. São José dos Campos: Transtec, 1995.

[24] LOWE, N. J.; SHAATH, M. A.; PATHAK, M. A. ***Sunscreens*****:** development, evaluation, and regulatory aspects. New York : Marcel Dekker, 1997.

[25] ENVIRONMENTAL WORKING GROUP. ***EWG*****:** Know Your Environment Protect Yor Health, 2016. Disponivel em: <https://www.ewg.org/sunscreen/report/nanoparticles-in-sunscreen/>. Acesso em: 15 fevereiro 2021.

[26] FLOR, J.; DAVOLOS, M. R.; CORREA, M. A. Protetores Solares. ***Quim. Nova,*** 2007. 153 - 158.

[27] DIAZ-CRUZ, M. S., BACELO, D., Chemical analysis and ecotoxicological effects of organic UV-absorbing compounds in aquatic systems, ***Trends Anal. Chem.,*** vol 28, 708–716., 2009.

[28] LOPES, F. M.; CRUZ, R. O.; BATISTA, K. A. Radiação ultravioleta e ativos utilizados nas formulações de protetores solares. ***Ensaios e ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde***, vol. 16, n. n. 4, 2012.

[29] KULLAVANIJAYA, P.; LIM, H. W. Photoprotection. ***Continuing Medical Education***, 2005. 937 - 958.

[30] DRUG BANK. ***Drugbank***, 2019. Disponivel em: <drugbank.com>. Acesso em: 03 março 2019.

[31] LAUTENSCHLAGER, S.; WULF, H. C.; PITTELKOW, M. R. Photoprotection: Review. ***Lancet***, 2007. 528 - 537.

[32] CABRAL, L. D. S.; PEREIRA, S. O.; PARTATA, A. K. Filtros Solares e Fotoprotetores mais utilizados nas formulações no Brasil. ***Revista científica do ITPAC***, v. 4, n. n. 3, Julho 2011.

[33] DAUGHTON, C. G.; TERNES, T. A. Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Agents of Subtle Change? ***Environmental Health Perspectives***, 107, n. 6, 1999.

[34] BALMER, E. M., BUSER, H.-R., MULLER, M. D., & POIGER, T. Occurrence of Some Organic UV Filters in Wastewater, in Surface Waters, and in Fish from Swiss Lakes. ***Environ. Sci. Technol***, 39, n. 953-962, 2005.

[35] GIOKAS, D. L.; SALVADOR, A.; CHISVERT, A. UV Filters: From sunscreen to human body and the environment. ***Trends in Analytical Chemistry***, 5, n. Vol: 26, 2007.

[36] DIMENSIONS.AI. ***Dimensions***, 2021. Disponivel em: <https://www.dimensions.ai/>. Acesso em: 18 fevereiro 2021.

[37] KRAUSE, M., KLIT, A., BLOMBERG, J. M., SOEBERG, T., FREDERIKSEN, H., SCHLUMPF, M., LICHTENSTEIGER, W., SKAKKEBAEK, N. E., DRZWIECKI, K. T., Sunscreens: are they beneficial for health? An overview of endocrine disrupting properties of UV-filters, **Int. *J. Androl.,*** vol. 35, 424–436, 2012.

[38] OZAEZ, I.; MATINEZ-GUITARTE, J. L.; MORCILLO, G. The UV filter benzophenone 3 (BP-3) activates hormonal genes mimicking the action of ecdysone and alters embryo development in the insect Chironomus riparius (Diptera). ***Environ. Pollut.***, 2014. vol. 192, 19–26.

[39] BUSER, H. R., BALMER, M. E., SCHMID, P., & Kohler, M. Occurrence of UV filters 4- methylbenzylidene camphor and octocrylene in fish from

various Swiss rivers with inputs from wastewater treatment plants. ***Environ. Sci. Technol.***, 2006. Vol. 40, 1427–1431.

[40] CALAFAT, A. M., WONG, L. Y., YE, X., REIDY, J. A., & NEEDHAM, L. L. Concentrations of the sun- screen agent benzophenone-3 in residents of the United States: national health and nutrition examination survey 2003–2004. ***Environ. Health Perspect.***, 2008. v. 116, 893–897.

[41] FRENT, K., KUNZ, P. Y., ZENKER, A., & RAPP, M. A tentative environmental risk assessment of the UV-filters 3-(4-methylbenzylidene-camphor), 2-ethyl-hexyl-4- trimethoxycinnamate, benzophenone-3, benzophenone-4 and 3-benzylidene camphor. ***Mar. Environ. Res.***, 2010. vol. 69, S4–S6.

[42] ZHANG, T., SUN, H., QIN, X., WU, Q., ZHANG, Y., MA, J., & KANNAN, K. Benzophenone-type UV filters in urine and blood from children, adults, and pregnant women in China: partitioning between blood and urine as well as maternal and fetal cord blood. ***Sci. Total Environ.***, 2013. 461-462, 49–55.

[43] SCHLUMPF, M., SCHMID, P., DURRER, S., CONSCIENCE, M., MAERKEL, K., HENSELER, M., GUETTER, M., HERZOG, I., REOLON, S., CECCATELLI, R., FAASS, O., STUTZ, E., JARRY, H., WUTTKE, W., LICHTENSTEIGER, W. Endocrine activity and developmental toxicity of cosmetic UV filters- an update. ***Toxicology***, 2004. 113–122.

[44] KLAMMER, H., SCHLECHT, C., WUTTKE, W., & HARRY, H. Multi-organic risk assessment of estrogenic properties of octyl-methoxycinnamate in vivo. A 5-day subacute pharma- codynamic study in ovariectomized rats. ***Toxicol.***, 2005. vol. 215, 90–96.

[45] KUNZ, P. Y.; FENT, K. Estrogenic activity of UV filter mixtures. ***Toxicol. Appl. Pharmacol.***, 2006. vol. 217, 86–89.

[46] CAMPOS, D., GRAVATO, C., QUINTANEIRO, C., GOLOVKO, O., ZLABEK, V., SOARES, A. M., & PESTANA, J. L. Toxicity of organic UV-filters to the aquatic midge Chironomus riparius. ***Ecotoxicology and Environmental Safety***, 2017. 143, 210 - 216.

[47] MA, B., LU, G., LIU, J., YAN, Z., YANG, H., & PAN, T. Bioconcentration and multi-biomarkers of organic UV filters (BM-DBM and OD-PABA) in crucian carp. ***Ecotoxicology and Environmental Safety***, 2017. 141, 178 - 187.

[48] GIOKAS, D. L.; SALVADOR, A.; CHISVERT, A. UV filters: from sunscreens to human body and the environment. ***TrAC 26***, 2007. 360 - 374.

[49] PAL, A., HE, Y., JEKEL, M., REINHARD, M., & GIN, K. Y.-H. Emerging contaminants of public health significance as water quality indicator compounds in the urban water cycle. ***Environ. Int.***, 2014. 71, 46 - 62.

[50] LIU, J.-L., WONG, M.-H., Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs): a review on environmental contamination in China, ***Environ. Int.,*** 59, 208 - 224, 2013.

[51] RAFFA, R. B., PERGOLIZZI, J. V., TAYLOR JR., R., & KITZEN, J. M. Sunscreen bans: Coral reefs and skin cancer. ***J Clin Pharm Ther.*** , 2019. 44: 134 - 139.

[52] DANOVARO, R., BONGIORNI, L., CORINALDESI, C., GIOVANNELLI, D., DAMIANI, E., ASTOLFI, P., GRECI, L., PUSCEDDU, A. Sunscreens Cause Coral Bleaching by Promoting Viral Infections. ***Environmental Health Perspectives***, 2008. V. 116, N. 4, p. 441-447.

[53] MILLER, I. B., PAWLOWSKI, S., KELLERMANN, M. Y., PETERSEN-THIERY, M., MOELLER, M., NIETZER, S., & SCHUPP, P. J. Toxic efects of UV flters from sunscreens on coral reefs revisited: regulatory aspects for “reef safe” products. ***Environ Sci Eur***, 2021. 33-74.

[54] NATIONAL OCEANIC AND ATMOSPHERIC ADMINISTRATION. ***The effects of ultraviolet filters and sunscreen on corals and aquatic ecosystems***, 2021 March 2021. Disponivel em: <https://www.coris.noaa.gov/activities/effects-ultraviolet-filters-sunscreen-corals/welcome.html>. Acesso em: 25 maio 2021.

[55] RODIL, R., QUINTANA, J. B., CONCHA-GRAÑA, E., LÓPEZ-MAHÍA, P., MUNIATEGUI-LORENZO, S., PRADA-RODRIGUEZ, D., Emerging pollutants in sewage, surface and drinking water in Galicia (NW Spain), ***Chemosphere*** *86,* 1040-1049, 2012.

[56] Ho, Y.-C., Ding, W.-H., Solid-phase extraction coupled simple on-line derivati- zation gas chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of benzophenone-type UV filters in aqueous samples, ***J. Chin. Chem. Soc.*** *59,* 107-113, 2012.

[57] BRATKOVICS, S. D., *Monitoring anf fate of Organic Sunscreen Compounds in the Marine Environment,* 2012, Dissertação (Mestrado em Estudos Ambientais) – College of Charleston, Estados Unidos. Disponível em: https://www.proquest.com/openview/a1d8db12a3268952d237a7156efcf810/1?pq-origsite=gscholar&cbl=18750 Acesso em: 15 abr. 2018

[58] GOKSOYR, A., TOLLEFSEN, K. E., GRUNG, M., LOKEN, K., LIE, E., ZENKER, A., FENT, K., SCHLABACH, M., HUBER, S., alsa raft crossing

the Pacific finds low contaminant levels, ***Environ. Sci****. Technol. 43,* pp. 4783-4790, 2009.

[59] SADUTTO, D., PICO, E Y., Sample Preparation to Determine Pharmaceutical and Personal Care Products in an All-Water Matrix: Solid Phase Extraction, ***Molecules*** *25,* 2-21, 2020.

[60] WONG, C., MACLEOD, S., Recent advances in analysis of pharmaceuticals in the aquatic environment, ***J. Environ. Monit****. 11,* 923-936, 2009.

[61] PEDROUZO, M., BORRULL, F., MARCÉ, R., POCURULL, E., Stir-bar sorptive extraction and ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry for simultaneous analysis of UV filters and antimicrobial agents in water samples, ***Anal. Bioanal. Chem.*** *397,* 2833-2839.

[62] REZAEE, M., ASSADI, Y., HOSSEINI, M. M., AGHAEE, E., AHMADI, F., & BERIJANI, S. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid–liquid microextraction. **Journal of Chromatography**, 2 march 2006. 1-9.

[63] VOGESER, M.; PARHOFER, K. G. Liquid Cromatography Tandem-mass Spectrometry (LC-MS/MS) - Technique and Applications in Endocrinology. **Exp Clin Endocrinol Diabetes**, 2007. 559 - 570.

[64] SHIMADZU CORPORATION, ***Fundamental Guide to Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LCMS)***, Março 2019. Disponível em: https://www.shimadzu.com/an/sites/shimadzu.com.an/files/pim/pim_document_file/brochures/13484/jpo118059.pdf. Acesso em 12 fevereiro 2021.

[65] MURRAY, K. K., BOYD, R. K., EBERLIN, M. N., LANGLEY, G. J., LI, L., & NAITO, Y. Definitions of terms relating to mass spectrometry (IUPAC Recommendations 2013). ***Pure Appl. Chem***, 2013. Vol. 85, No 7, pp. 1515 - 1609.

[66] VESSECCHI, R., LOPES, N. P., GOZZO, F., DORR, F., BUSTILLOS, O. V., & RIVEROS, J. Nomenclaturas de espectrometria de massas em língua portuguesa. ***Química Nova***, 2011. Vol. 34, No 10, 1875 - 1887.

[67] WATSON, J. T.; SPARKMAN, O. D. ***Introduction to Mass Spectrometry***: Instrumentation, Applications and Strategies for Data Interpretation. West Sussex: John Willey & Sons Ltd, 2007.

[68] BRENTON, A. G.; GODFREY, A. R. Accurate Mass Measurement: Terminology andTreatment of Data. ***J. Am. Soc. Mass Spectrom.***, 2010. 21, 1821 - 1835.

[69] SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. ***Principles of Instrumental Analysis***. USA: Saunders College Publishing, 5th edition.

[70] DE HOFFMANN, E.; CHARETTE, J.; STROOBANT, V. ***Mass Spectrometry*:** Principles and Applications. Tradução de J. TROTTIER. Paris: Masson Éditeur, 1996. Reprinted in 1999 and 2000 - Wiley Editorial Office.

[71] LANÇAS, F. M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente "compatíveis"? ***Scientia Chromatographica***, 2009. v. 1 n. 2.

[72] ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. ***ABNT NBR ISO/IEC 17025 - Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração***. [S.l.]. 2017.

[73] INMETRO, ***Orientação Sobre Validação de Métodos Analíticos***, Julho 2018. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/organismos/doc_organismos.asp?torganismo=calibensaios. Acesso em 20 janeiro 2019.

[74] INMETRO. ***Vocabulário Internacional de Metrologia*:** Conceitos Fundamentais, Gerais e Termos Associados. 3ª Edição. ed. Duque de Caxias: INMETRO, 2012a.

[75] INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. ***Compendium of Chemical Terminology (The Gold Book)*** - 2nd edition, 2005 - 2021. Disponivel em: < https://goldbook.iupac.org/terms/search>. Acesso em: 05 março 2021.

[76] ICH. **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, in Q2(R1). ICH Harmonised Tripartite Guideline**. London. 2005.

[77] INMETRO., ***NIT DICLA – 057 - Critérios para Acreditação da Amostragem de Águas e Matrizes Ambientais***, outubro 2020. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/pesquisa_link.asp?seq_tipo_documento=4&cod_uo_numeracao=00778&num_documento=057. Acesso em 20 fevereiro 2021.

[78] HEYDEN, Y. V., NIJHUIS, A., SMEYERS-VERBEKE, J., VANDEGINSTEN, B., & MASSART, D. L. Guidance for robustness/

ruggedness tests in method validation. **Journal of Pharmatical and Biomedical Analysis**, 2001. 723 - 753.

[79] INMETRO., ***DOQ-CGCRE-008: Orientação sobre validação de métodos analíticos***, agosto 2016. Disponível em: www.inmetro.gov.br/Sidoq/pesquisa_link.asp?seq_tipo_documento...008. Acesso em 03 março 2017.

[80] FURUSAWA, H. A., ***Planilha de Validação de Métodos Analíticos****,* São Paulo: IPEN/ CNEN-SP, 2007.

[81] HORWITZ, W.; KAMPS, L. R.; BOYER, R. W. Quality Assurance in the Analysis of Foods for Trace Constituents. ***J. Assoc. Off. Anal. Chem***, 1980. Vol. 63, No. 6, pp. 1344 - 1354.

[82] INMETRO, ***DOQ-CGCRE-008: Orientação sobre validação de métodos analíticos***, junho 2020. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/organismos/doc_organismos.asp?torganismo=calibensaios. Acesso em 03 março 2017.

[83] MOTULSKY, H. J. ***GraphPad Outlier Calculator***. Disponivel em: <https://www.graphpad.com/quickcalcs/grubbs1/>. Acesso em: 25 janeiro 2021.

[84] BARROS NETO, B.; PIMENTEL, M. F.; ARAUJO, M. C. U. Recomendações para Calibração em Química Analítica - parte I, fundamentos e calibração com um componente (Calibração Univariada). ***Química Nova***, 2002. 856 - 865.

[85] TSUI, M. M. P., LEUNG, H. W., WAI, T., YAMASHITA, N., TANIYASU, S., LIU, W., LAM, P. K. S., MURPHY, M. B., Occurrence, distribution and ecological risk assessment of multiple classes of UV filters in surface waters from different countries, ***Water Research****,* 55 - 65, 2014.

[86] NGUYEN, K., SCAPOLLA, C., CARRO, M., & MAGI, E. Rapid and selective determination of UV filters in seawater by liquid chromatography–tandem mass spectrometry combined with stir bar sorptive extraction. ***Talanta****,* 2011. 2375 - 2384.

[87] SÃO SEBASTIÃO, ***Outras Informações de São Sebastião, Litoral Nort,*** 2017. Disponível em: http://www.saosebastiaosp.com.br/informacoes.asp. Acesso em 01 março 2020.

[88] PREFEITURA DE SANTOS. ***Sobre Santos***, 2017. Disponivel em: http://www.turismosantos.com.br/ptb/sobre-santos>. Acesso em: 01 março 2017.

[89] PREFEITURA MUNICIPAL DE UBATUBA. ***Prefeitura Municipal da Estância Balneária de Ubatuba***, 2019. Disponivel em: <ubatuba.sp.gov.br>. Acesso em: 3 fevereiro 2019.

[90] CETESB. ***Relatórios de balneabilidade CETESB - 2019***, 2020. Disponivel em: <https://cetesb.sp.gov.br/praias/wp-content/uploads/sites/31/2020/09/Relatorio-da-Qualidade-das-Praias-Litoraneas-no-Estado-de-Sao-Paulo-2019.pdf>. Acesso em: 12 fevereiro 2021.

[91] ELSEVIER. Chapter 9 Liquid-liquid extraction: Strategies for method development and optimization. ***Progress in Pharmaceutical and Biomedical Analysis.*** David A. Wells, 2003. p. Vol 5, 307-326.

[92] TOICHA, T.; MERDASSA, Y.; MEGERSA, N. Low-density extraction solvent based solvent-terminated dispersive liquid–liquid microextraction for quantitative determination of ionizable pesticides in environmental waters. ***J. Sep. Sci***, 2013. 36, 1119 - 1127.

[93] FATEMI, M. H., R., M., HADJMOHAMMADI, SHAKERI, P., & BIPARVA, P. Extraction optimization of polycyclic aromatic hydrocarbons by alcoholic-assisted dispersive liquid–liquid microextraction and their determination by HPLC. ***J. Sep. Sci.***, 2012. 35, 86 - 92.

[94] YAN, H., WANG, H., QIN, X., LIU, B., & DU, J. Ultrasound-assisted dispersive liquid–liquid microextraction for determination of fluoroquinolones in pharmaceutical wastewater. **Journal of *Pharmaceutical and Biomedical Analysis***, 2011. 54, 53 - 57.

[95] CENTRO INTEGRADO DE INFORMAÇÕES AGROMETROLÓGICAS - CIIAGRO. ***CIIAGRO***, 2008. Disponivel em: <http://www.ciiagro.sp.gov.br/ >. Acesso em: 20 fevereiro 2021.

[96] CETESB. ***Relatórios de balneabilidade CETESB*** - 2018, 2019. Disponivel em: <https://cetesb.sp.gov.br/praias/publicacoes-relatorios/>. Acesso em: 01 março 2020.

[97] SOUZA, C. ***As células de deriva litorânea e a erosão nas praias do estado de São Paulo***, 15 janeiro 2020. Disponivel em: <https://www.infraestruturameioambiente.sp.gov.br/institutogeologico/1997/01/as-celulas-de-deriva-litoranea-e-a-erosao-nas-praias-do-estado-de-sao-paulo/>. Acesso em: 15 janeiro 1997.

[98] SOUZA, C. R. G. Praias arenosas oceânicas do estado de São Paulo (Brasil): síntese dos conhecimentos sobre morfodinâmica, sedimentologia, transporte costeiro e erosão costeira. ***Revista do Departamento de Geografia – USP***, 2012. p 307-371.

[99] CETESB. ***Relatórios de balneabilidade CETESB - 2020***, 2021. Disponivel em: <https://cetesb.sp.gov.br/praias/wp-content/uploads/sites/31/2021/06/Relatorio-de-Qualidade-das-Praias-Litoraneas-no-Estado-de-Sao-Paulo-2020.pdf>. Acesso em: 25 julho 2021.

[100] TOVAR-SÁNCHEZ, A., SÁNCHEZ-QUILES, D., BASTERRETXEA, G., BENEDÉ, J., CHISVERT, A., SALVADOR, A., MORENO-GARRIDO, I. E BLASCO, J., Sunscreen products as emerging pollutants to coastal waters, ***PLoS One*** *8,* p. e65451., 2013.

[101] TASHIRO, Y., KAMEDA, Y., Concentration of organic sun-blocking agents in seawater of beaches and coral reefs of Okinawa Island, Japan, ***Mar. Pollut. Bull.*** *77,* p. 333–340, 2013.

[102] GIOKAS, D., SAKKAS, V., ALBANIS, T., Determination of residues of UV filters in nat- ural waters by solid-phase extraction coupled to liquid chromatography–photodiode array detection and gas chromatography–mass spectrometry, ***J. Chromatogr. A*** *1026,* p. 289–293, 2004.

[103] LAMBROPOULOU, D., GIOKAS, D., SAKKAS, V., ALBANIS, T. E KARAYANNIS, M., Gas chromatographic determination of 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone and octyldimethyl-p-aminobenzoic acid sunscreen agents in swimming pool and bathing waters by solid-phase microextraction, ***J. Chromatogr. A*** *967,* p. 243–253, 2002.

[104] LIMA, P. R.; BERGAMASCO, R. Efeitos da contaminação da água pelo fármaco 17α-etinilestradiol, detecção e tipos de tratamento. ***Evidência***, jul 2017. v. 17, n. 2, p. 119-134.

[105] BORRELY, S. I., CAMINADA, S. L., PONEZI, A. N., SANTOS, D., & SILVA, V. H. Contaminação das águas por resíduos de medicamentos: ênfase ao cloridrato de fluoxetina. **O Mundo de Súde**, 2012. 556-563.

[106] CAMPOS, D. et al. Ecotoxicity of two organic UV-filters to the freshwater caddisfly Sericostoma vittatum. **Environmental Pollution**, 2017. 370 - 377.

[107] GAGO-FERRERO, P.; DIAZ-CRUZ, M. S.; BARCELO, D. An overview of UV-absorbing compounds (organic UV filters) in aquatic biota. **Anal. Bioanal. Chem.**, 2012. 404, 2597–2610.

APÊNDICE A – LOCALIZAÇÃO DOS PONTOS DE COLETA

Tabela A1 – Coordenadas geográficas dos pontos de coleta

Cidade	Ponto	Longitude	Latitude
São Vicente	Ponta da Praia	-46.309243	-23.986553
	Embaré	-46.3195	-23.9769
	Gonzaga	-46.3335	-23.9720
	José Menino	-46.3484	-23.9702
Santos	Praia da Divisa	-46.3573	-23.9704
	Itararé	-46.3647	-23.9730
	Praia da Ilha Porchat	-46.3682	-23.9744
Ubatuba	Estação 4	-45.0922	-23.5886
	Estação 5	-45.0940	-23.5749
	Estação 9	-45.0964	-23.5294
	Estação 10	-45.0996	-23.5197
	Praia da Enseada	-45.0899	-23.5093
	Perequê Mirim - Enseada do Flamengo	-45.1015	-23.5023
	Pereque-Açú (barra rio)	-45.0538	-23.4191
	Pereque Mirim - costa	-45.1043	-23.4959
	Santa Rita - costa	-45.1061	-23.4910
	Saco da Ribeira	-45.1175	-23.5028
	Pier Caisão (Baia do Itaguá)	-45.0469	-23.4499
	Barra Rio Tavares (Baia do Itaguá)	-45.0656	-23.4458
	Santa Rita - Enseada do Flamengo	-45.1084	-23.4990
	Barra Rio Grande (Baia do Itaguá)	-45.0673	-23.4338
	Barra Itamambuca	-45.0070	-23.4084
	Rio Itamambuca	-45.0116	-23.4046

Fonte: Autor da tese

APÊNDICE B – FOTOS DOS PONTOS DE COLETA

Santos e São Vicente

P1 – Ponta da Praia

P2 – Embaré

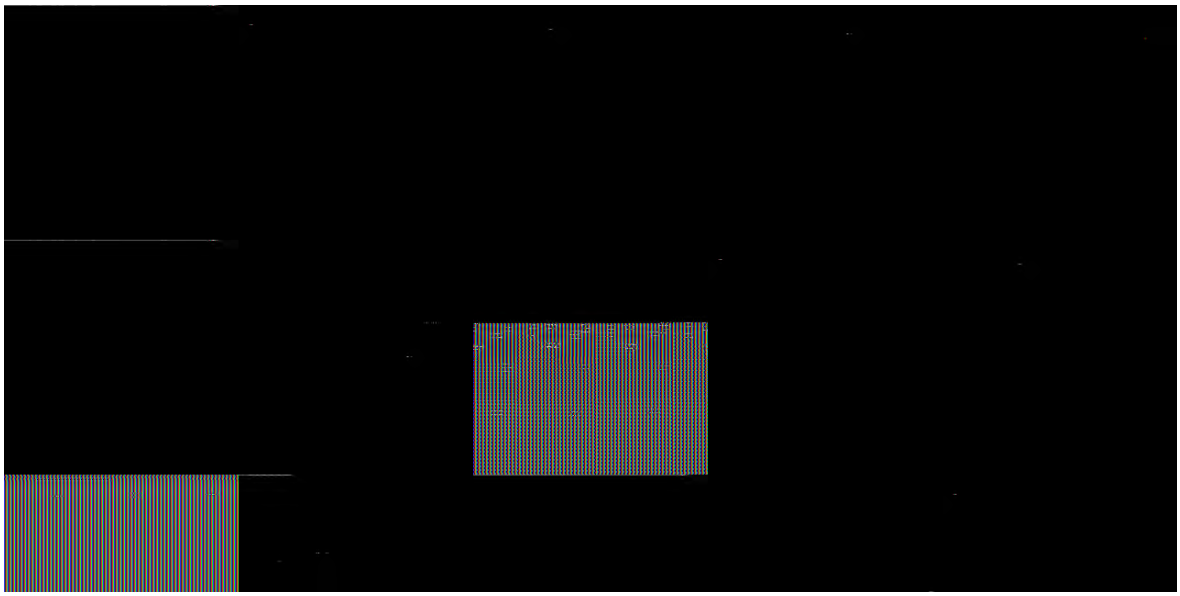
P7 – Praia da Ilha Porchat

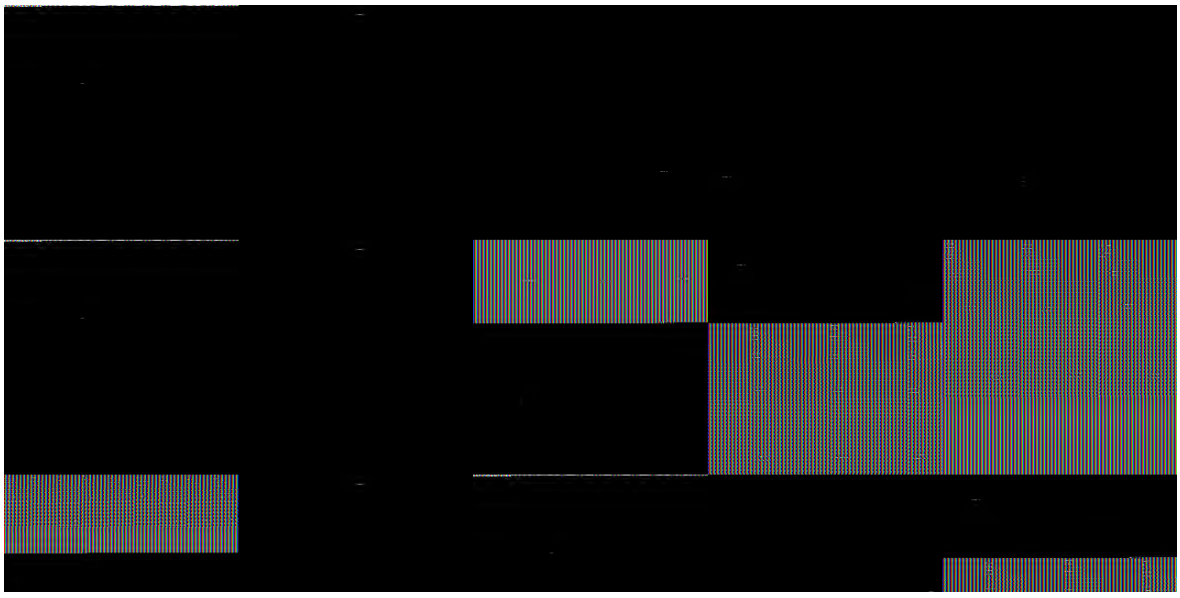
P6 - Itararé

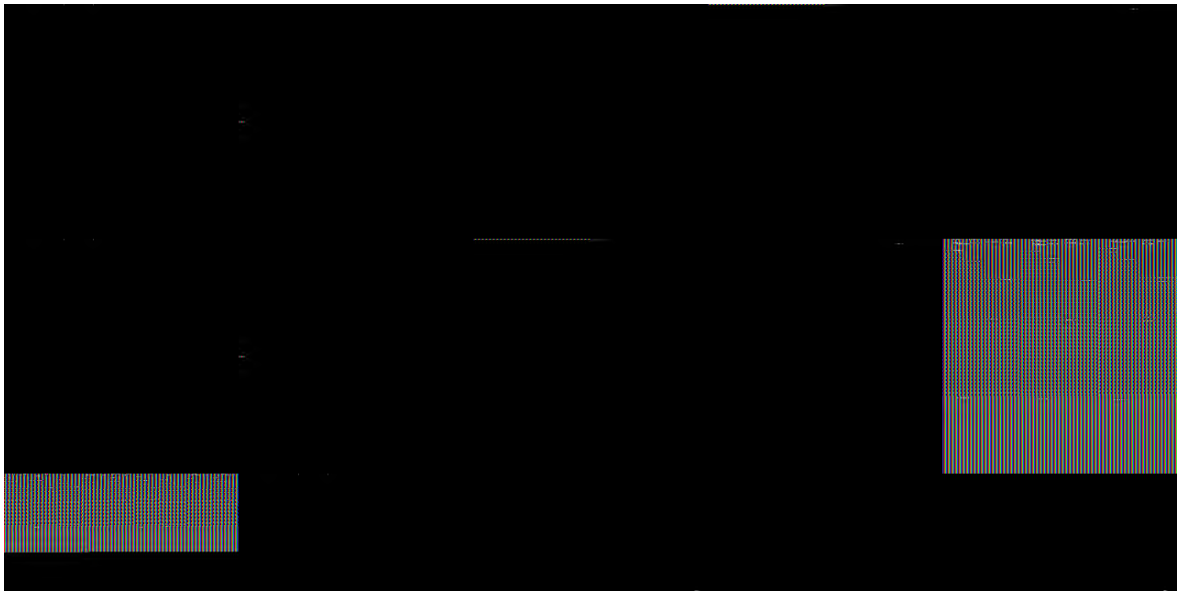
P5 – Praia da Divisa

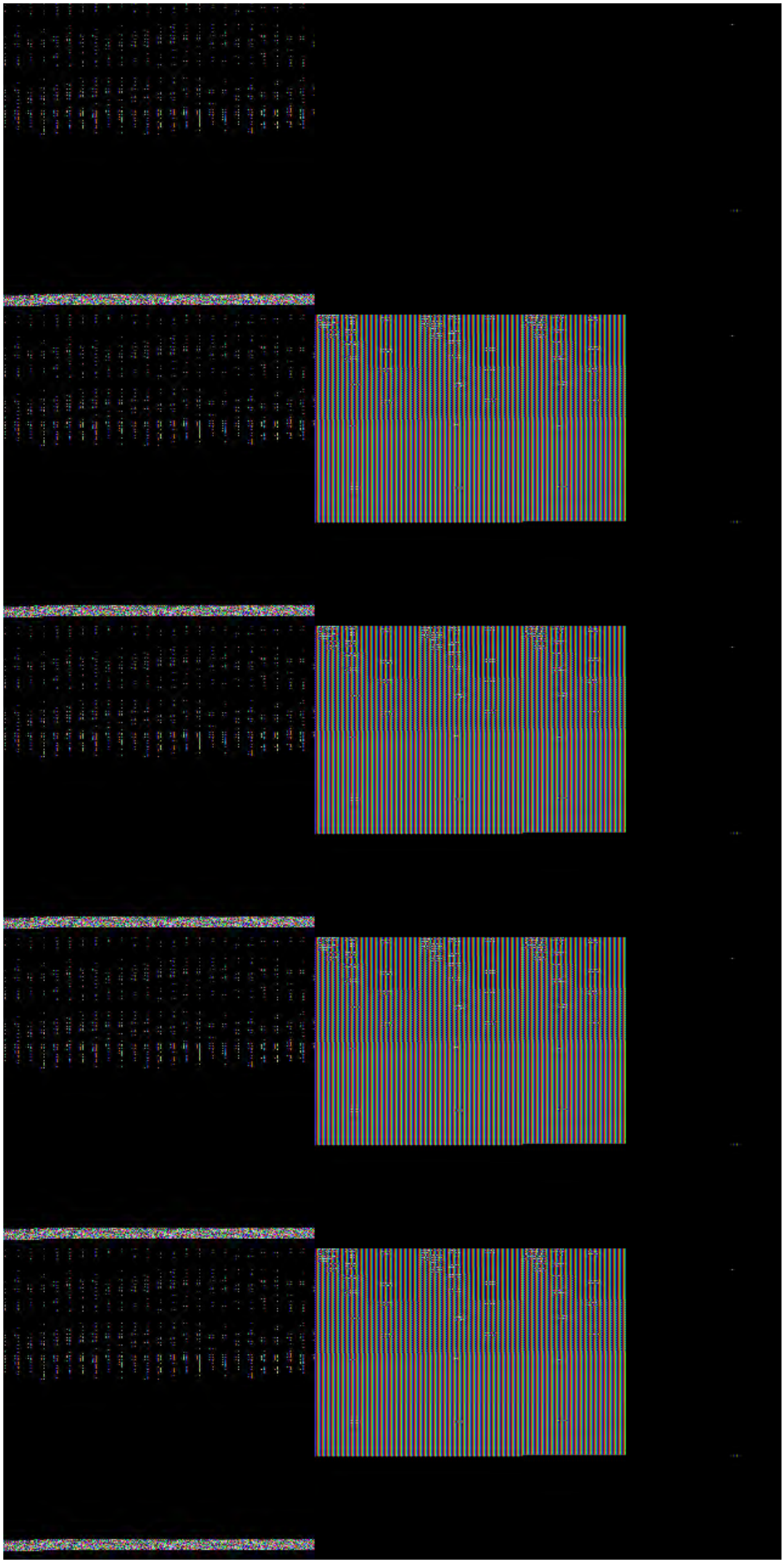
Ubatuba

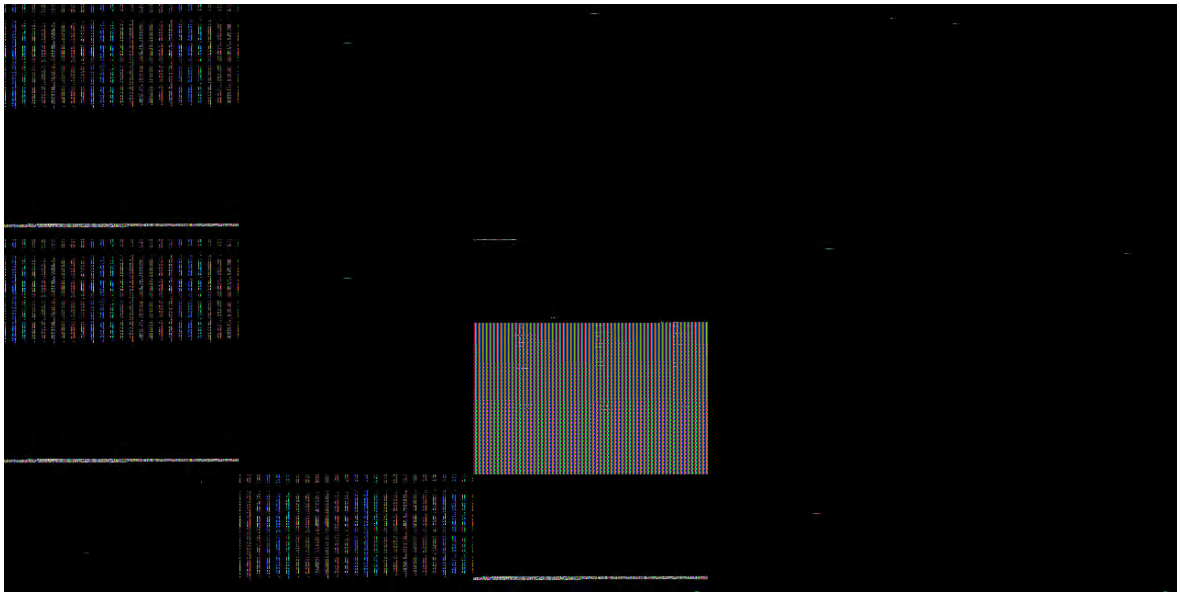
PRAIA PEREQUE-MIRIM



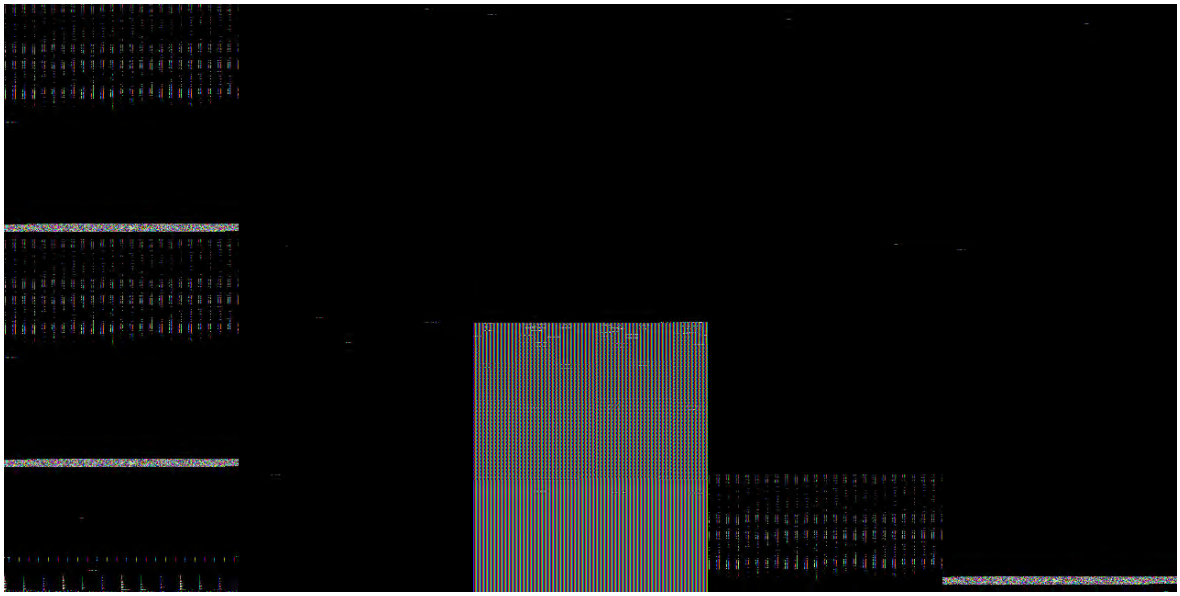


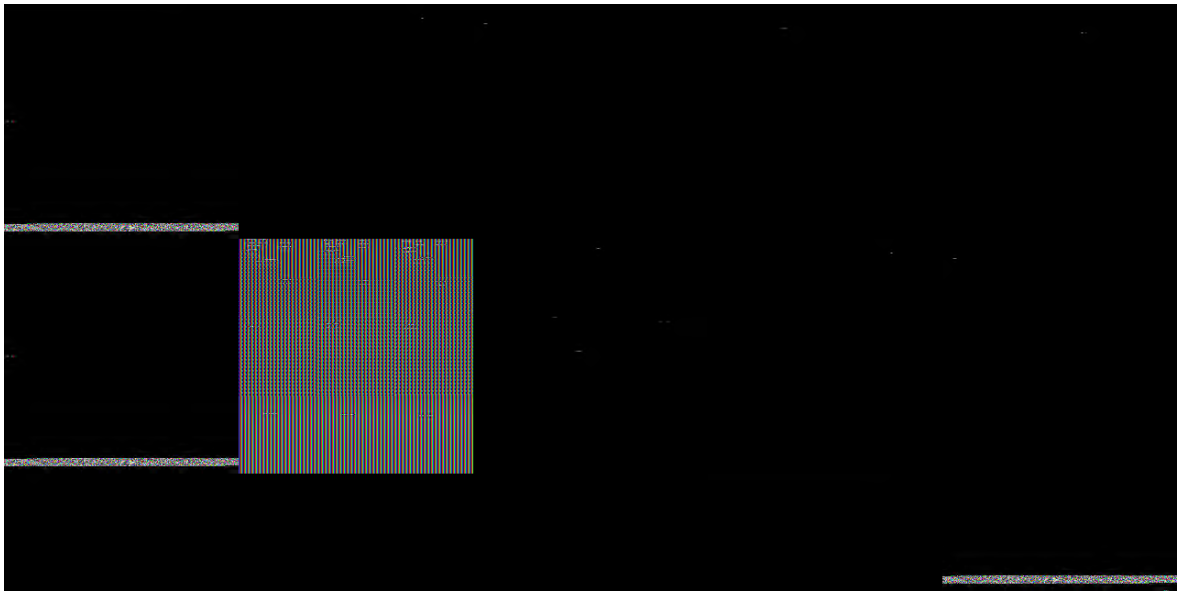


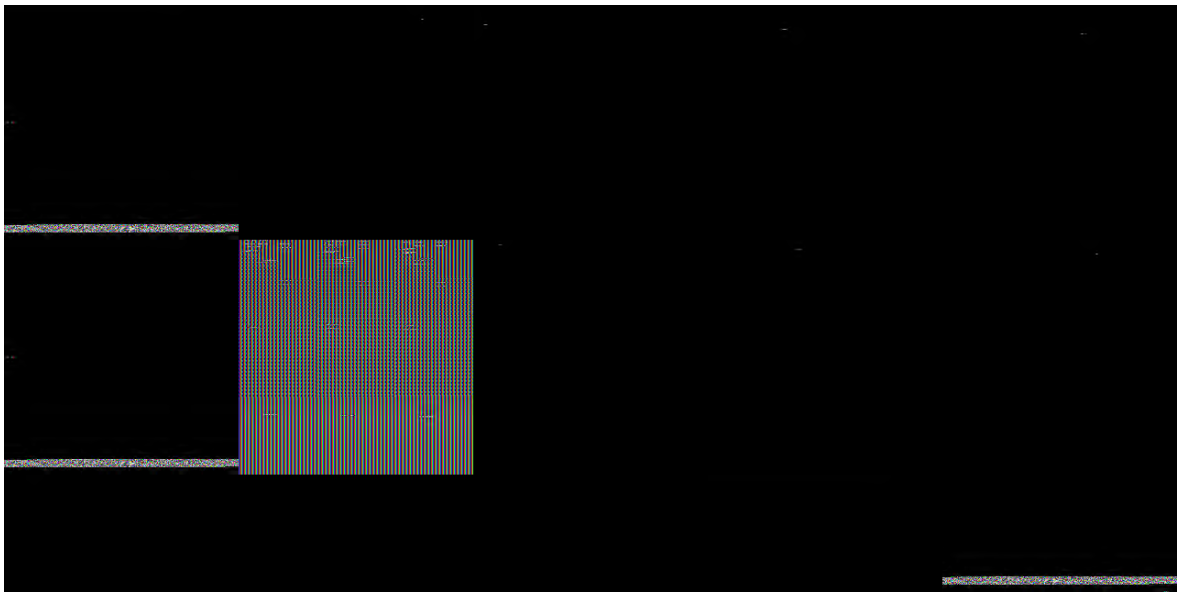


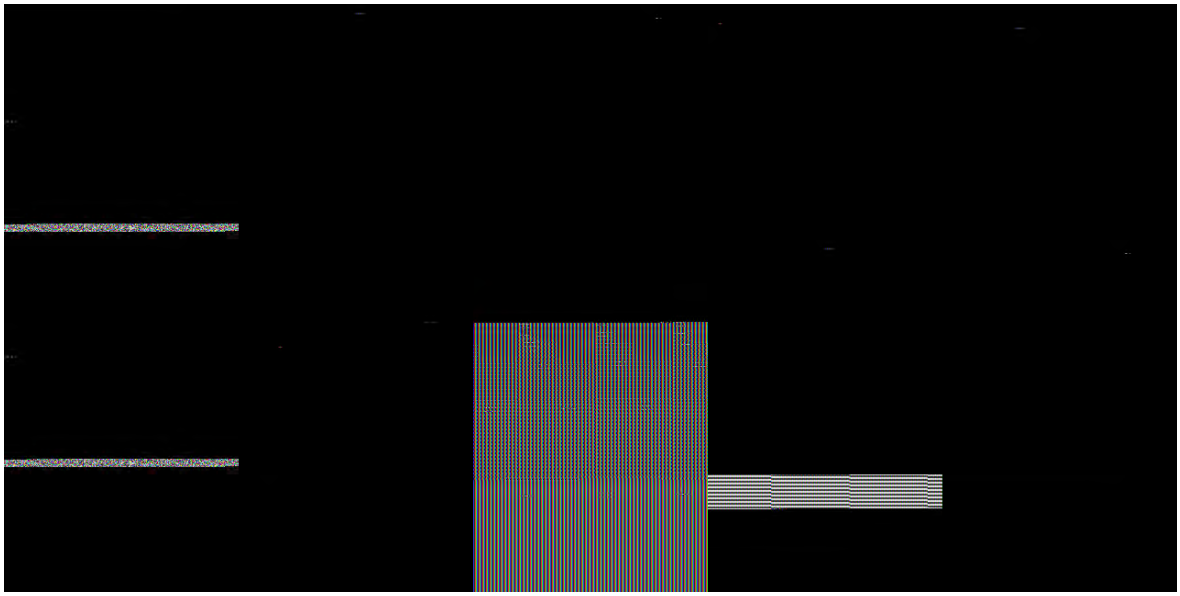


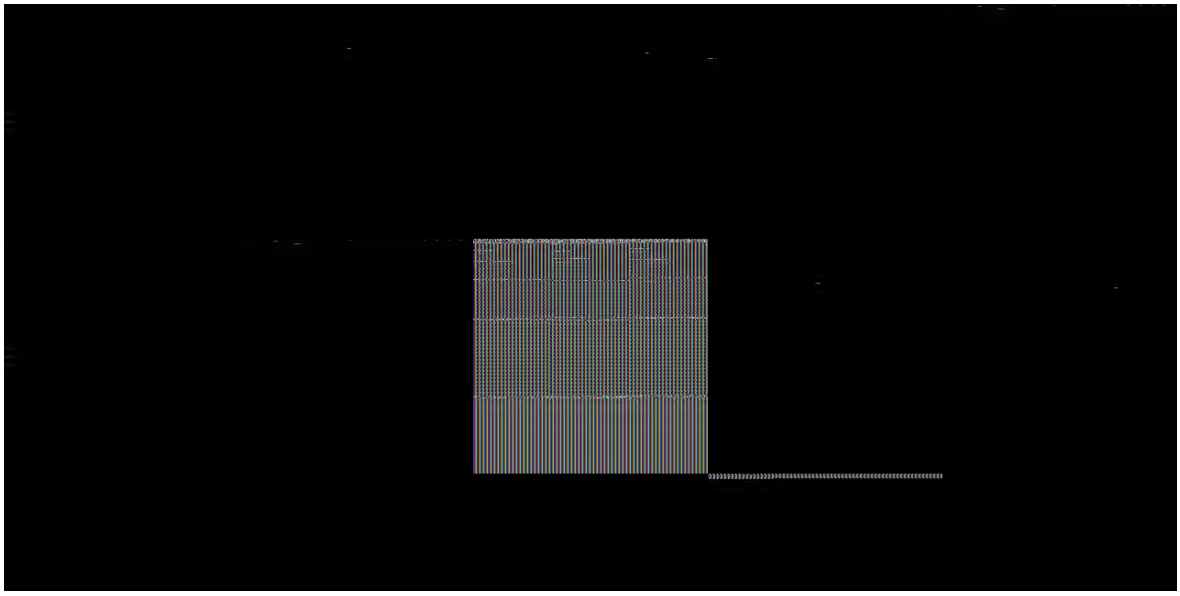
PRAIA DE SANTA RITA

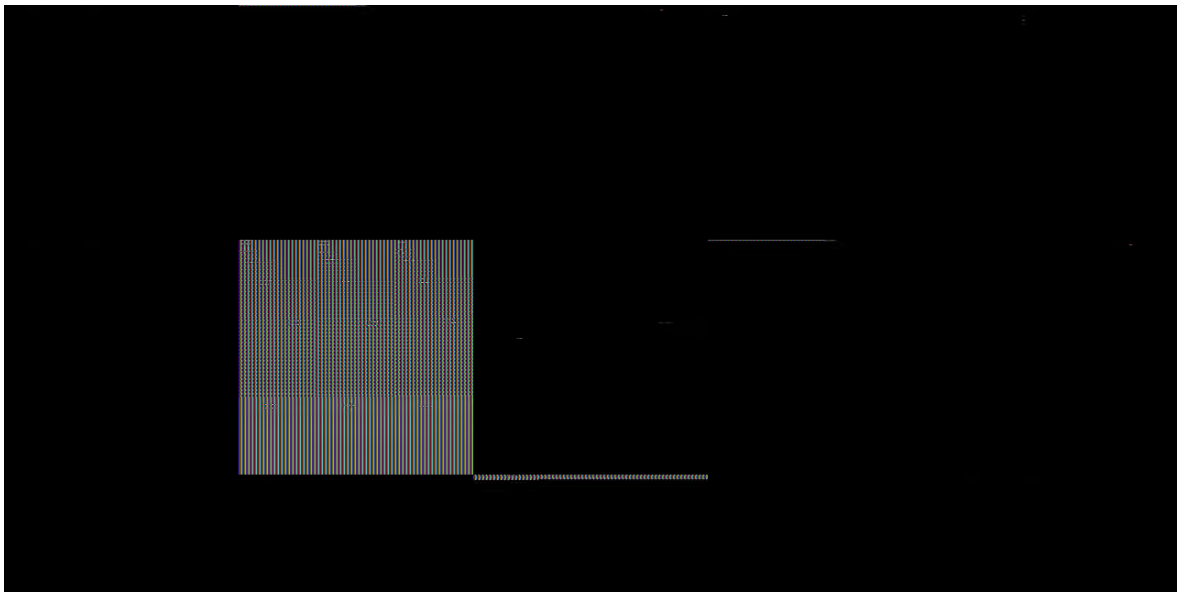




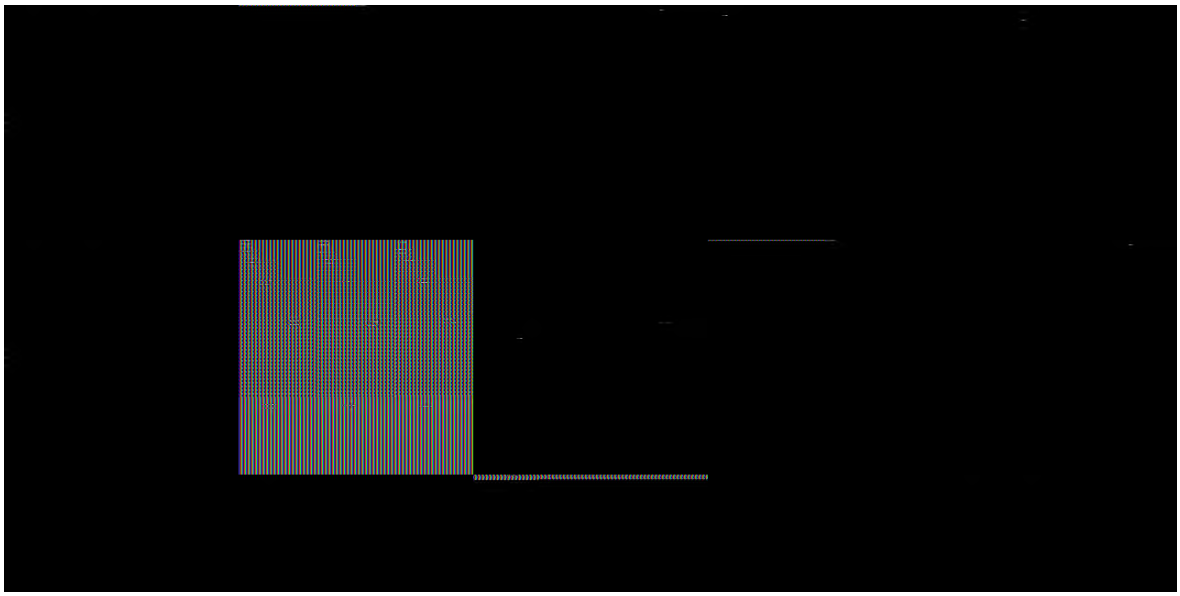


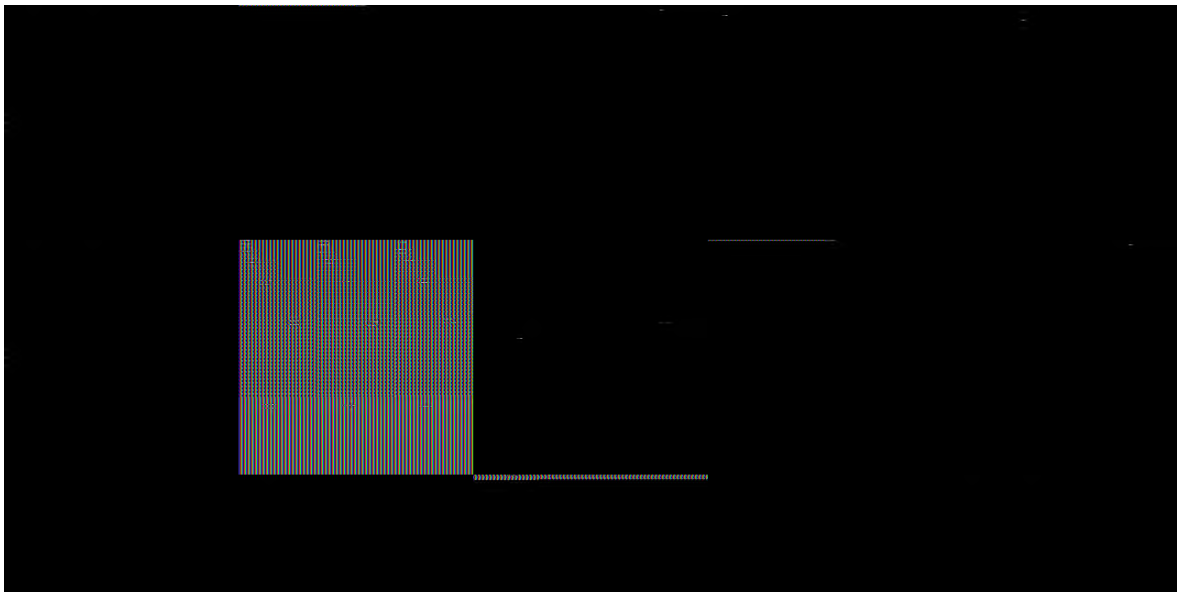


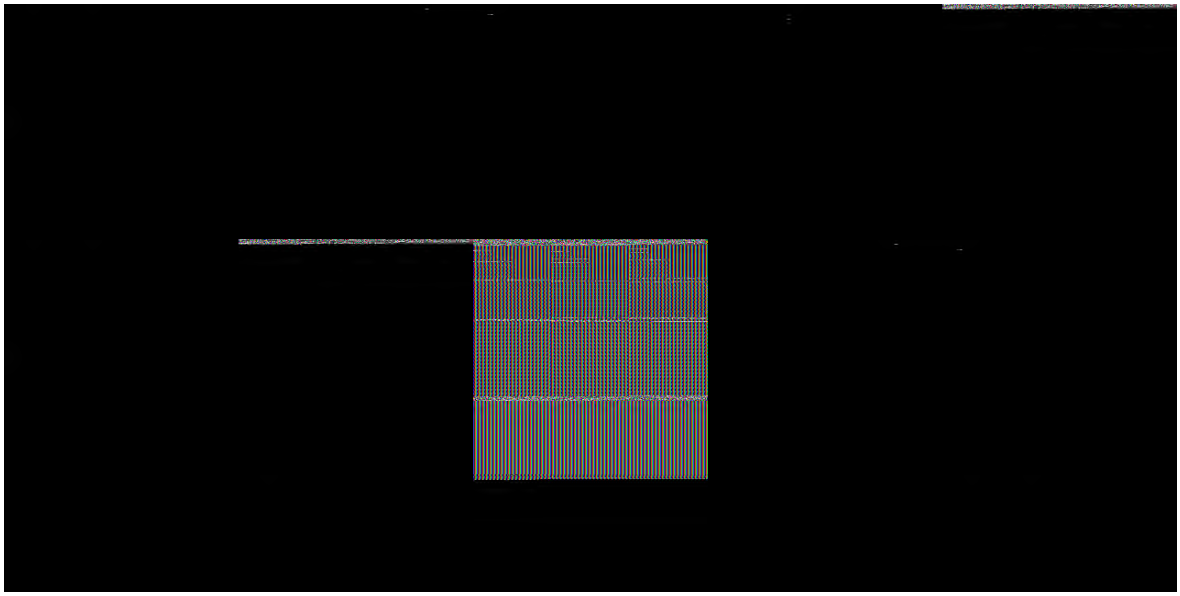


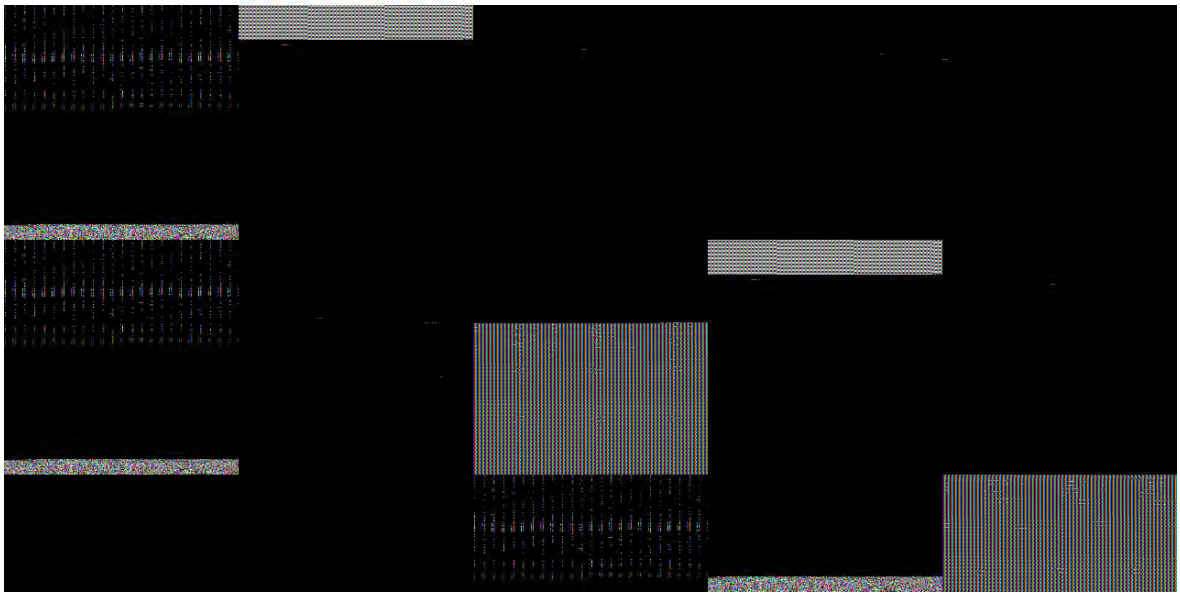


PRAIA DA ENSEADA

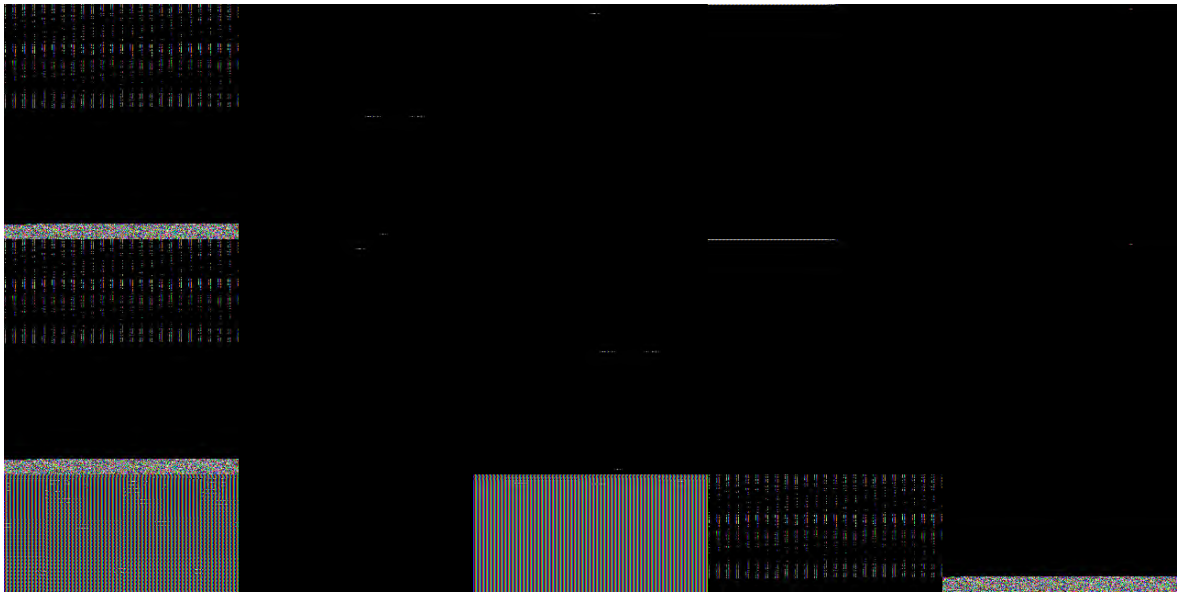


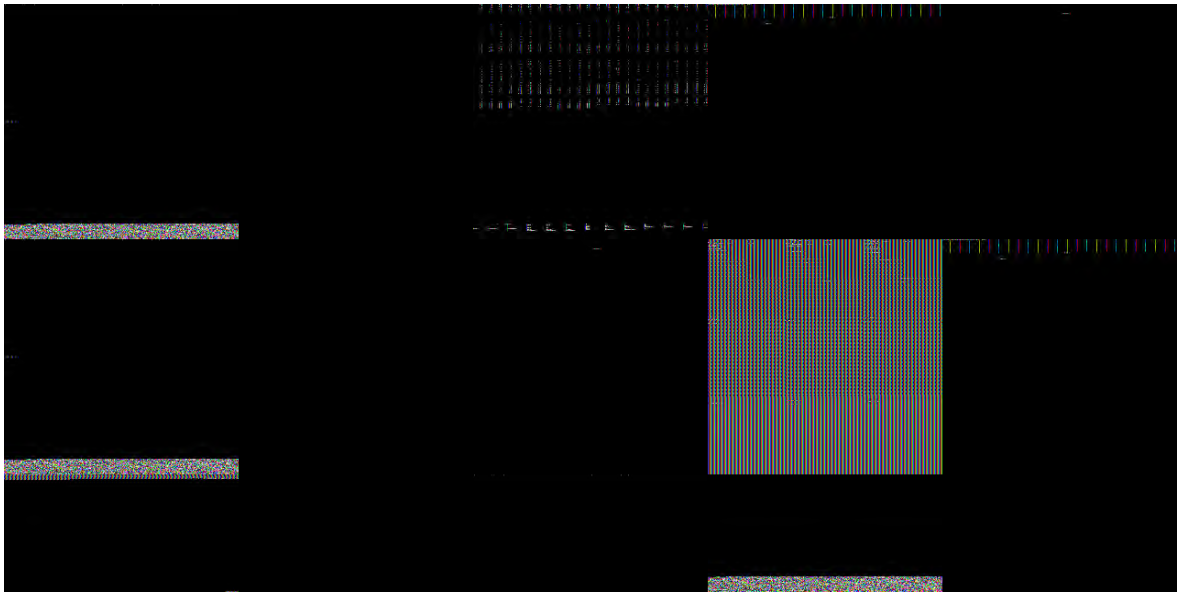




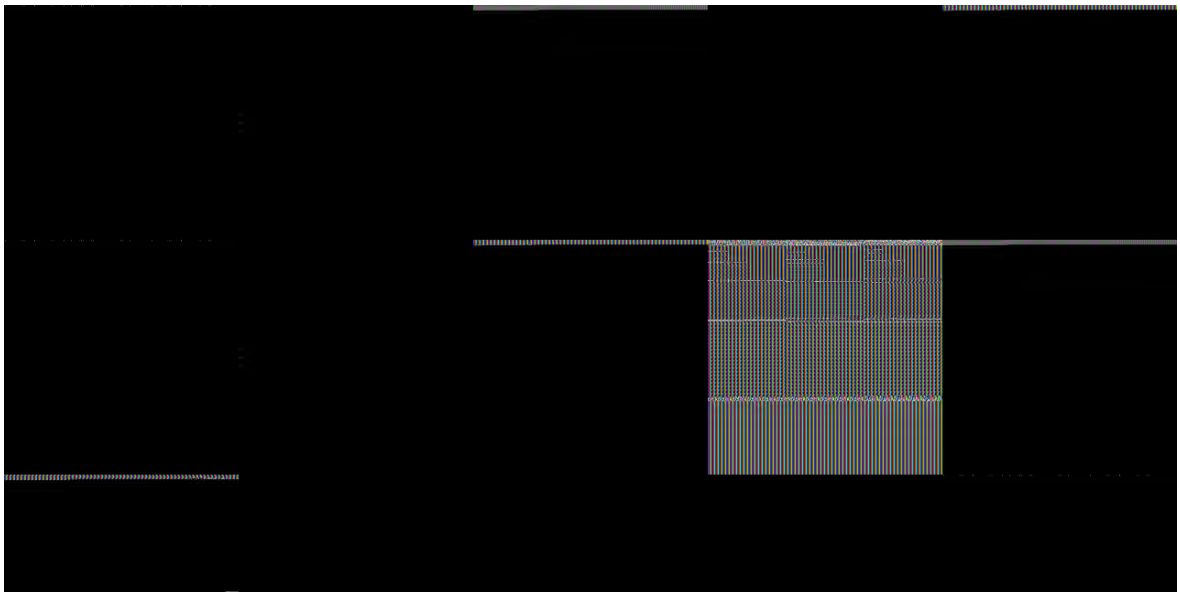


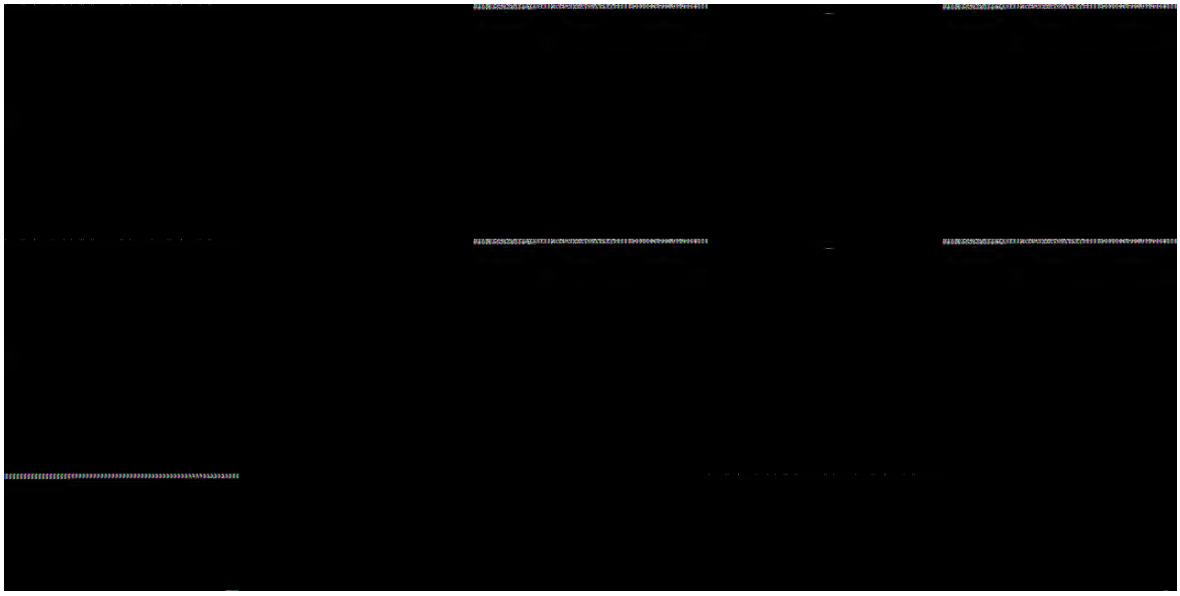
Ponto 4

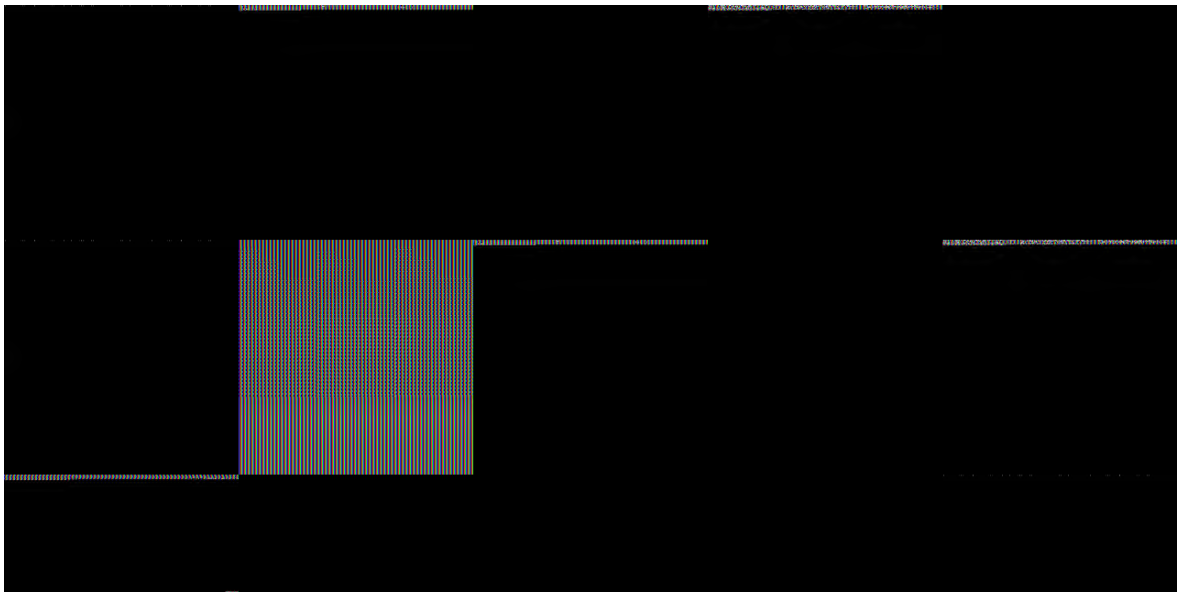




PONTO 3

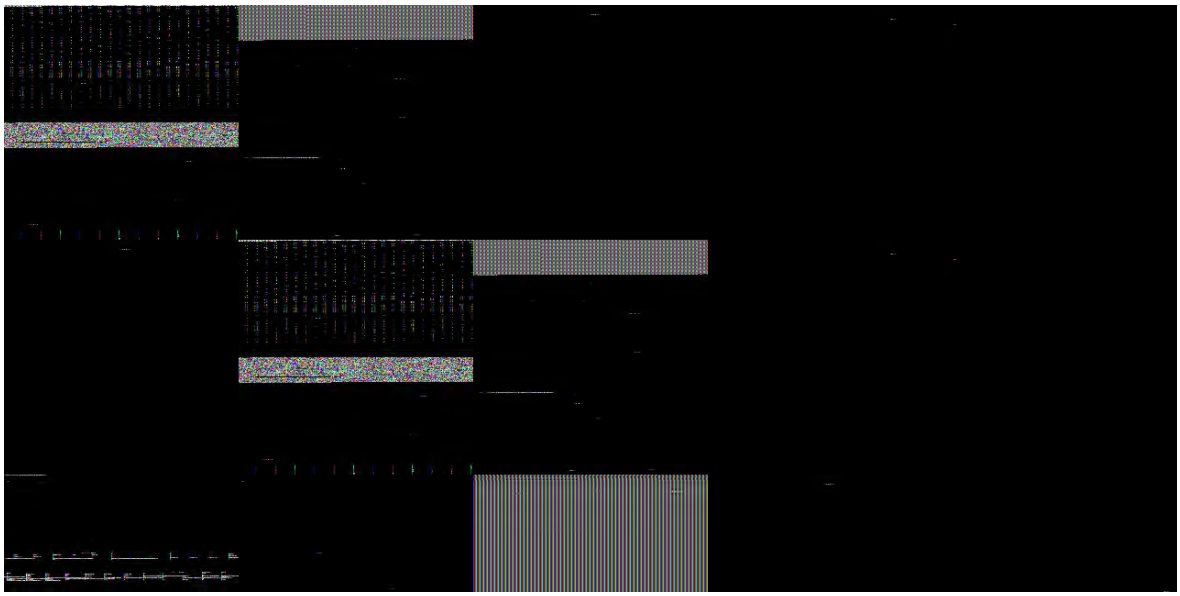


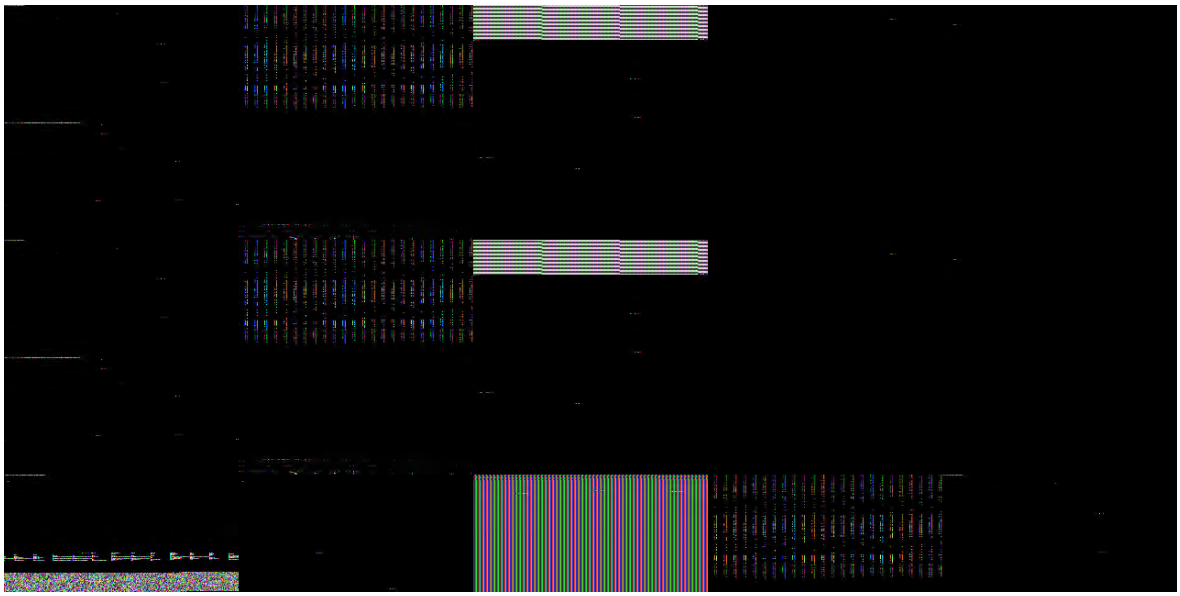


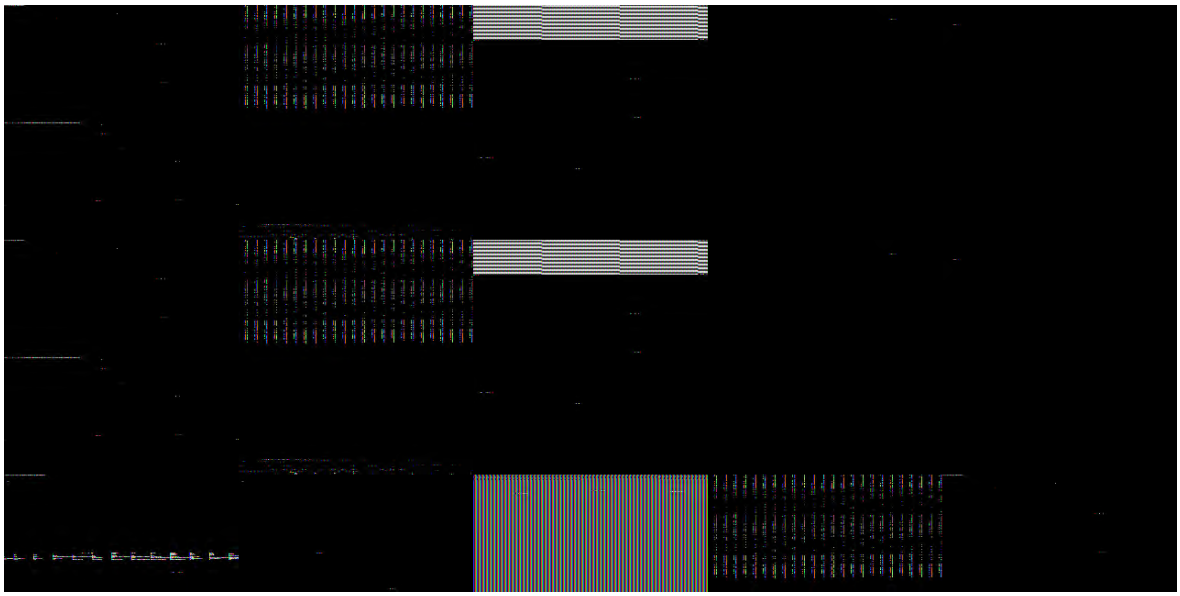


PONTO 2

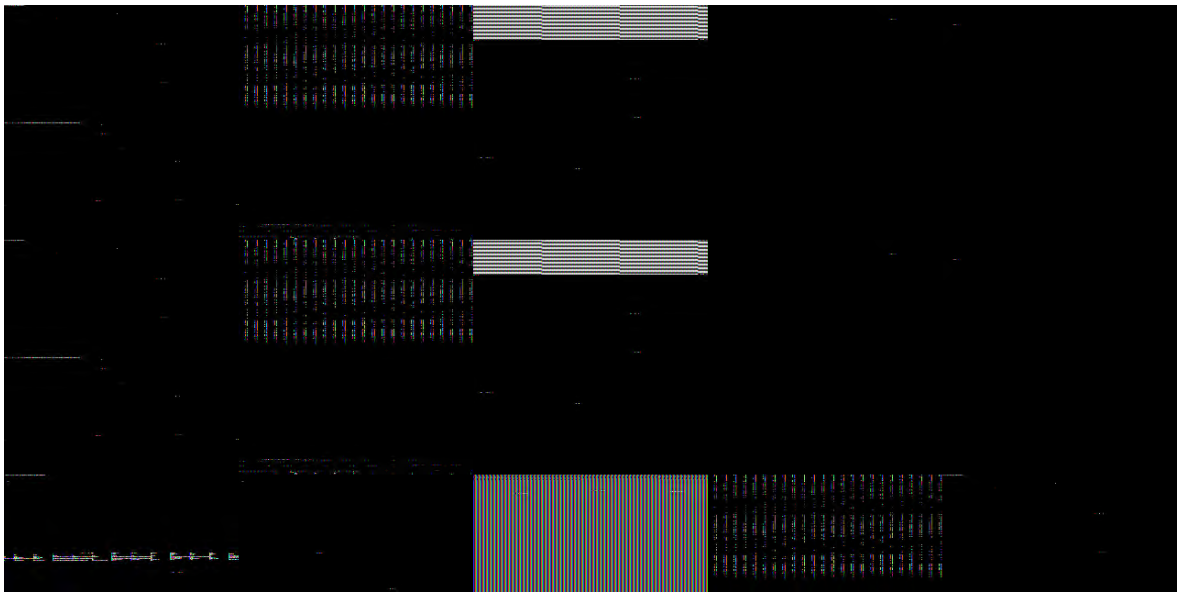
PONTO 1

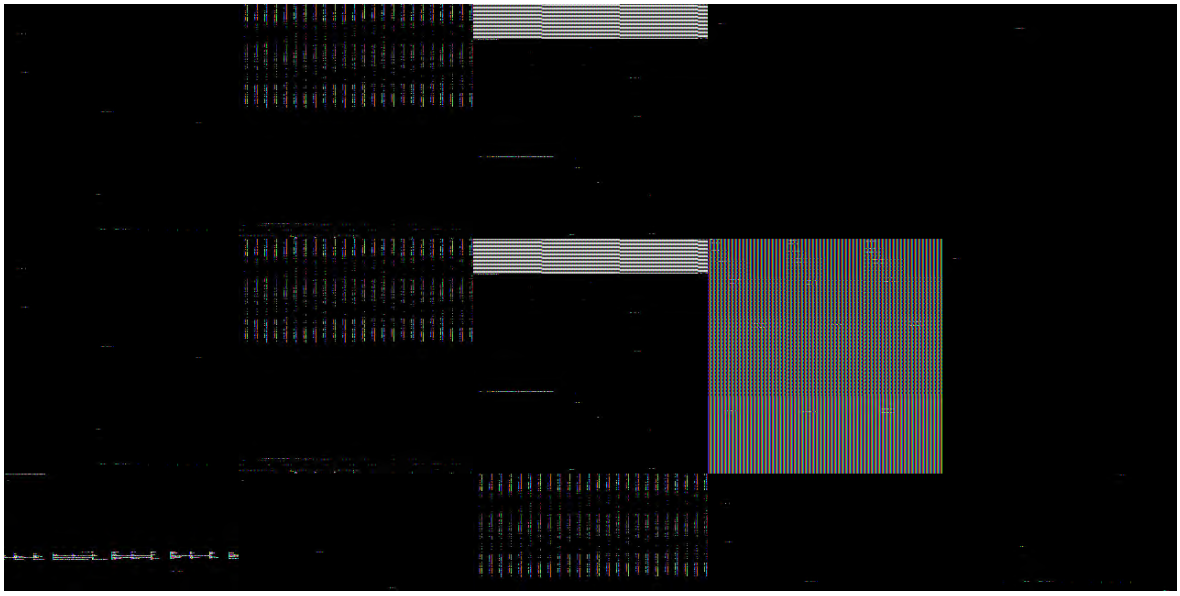


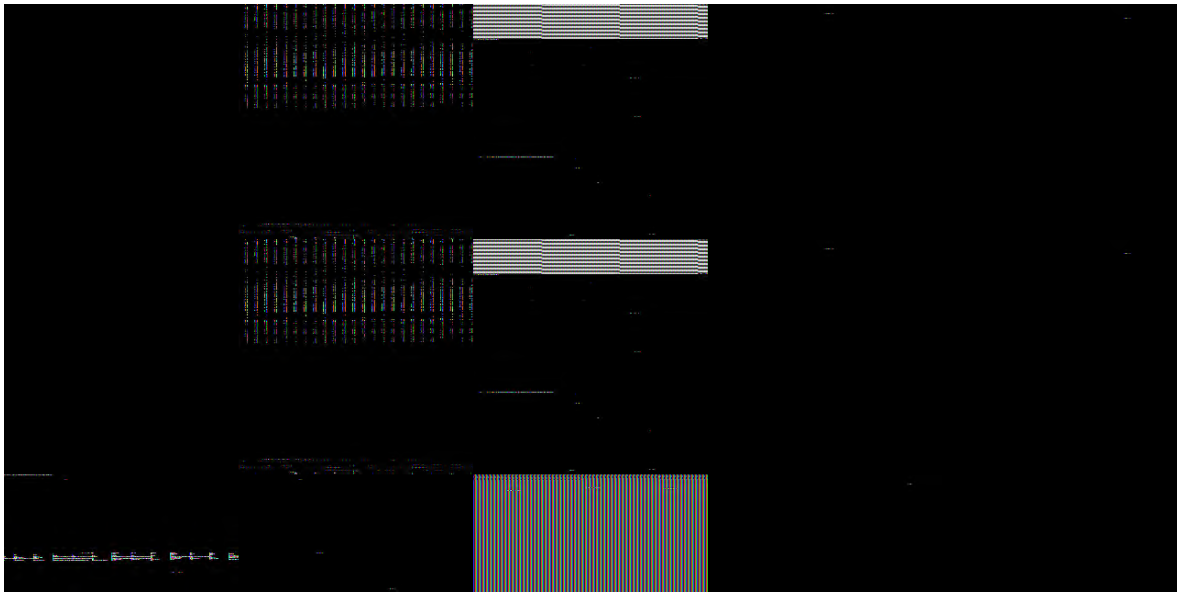


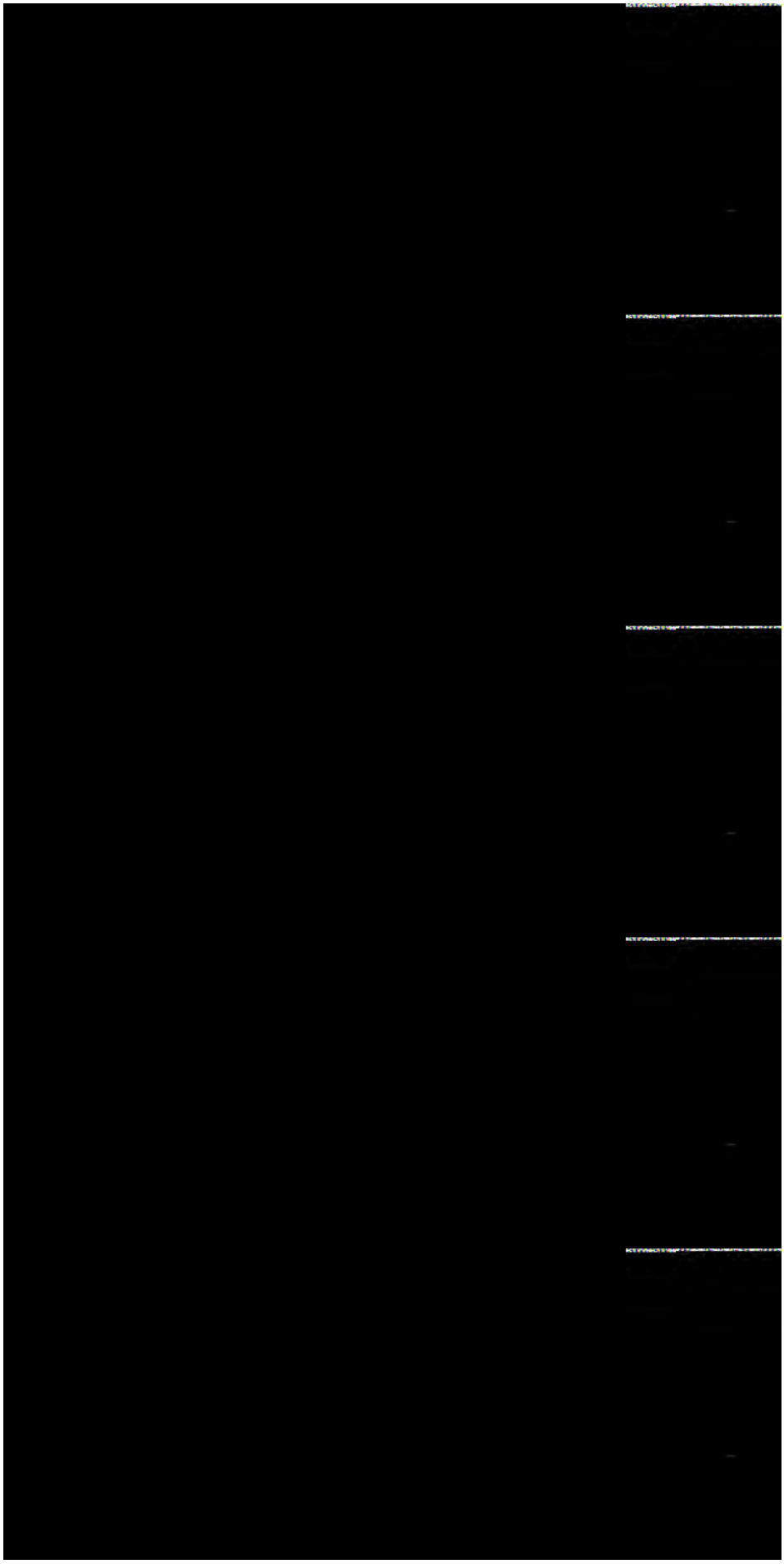


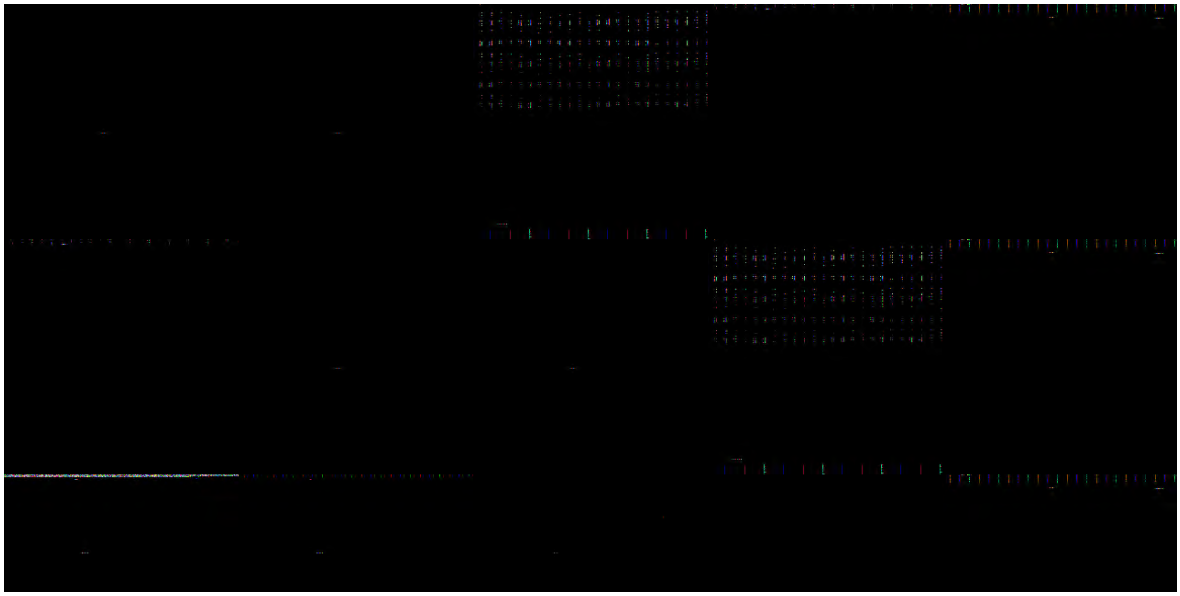
PONTO 0











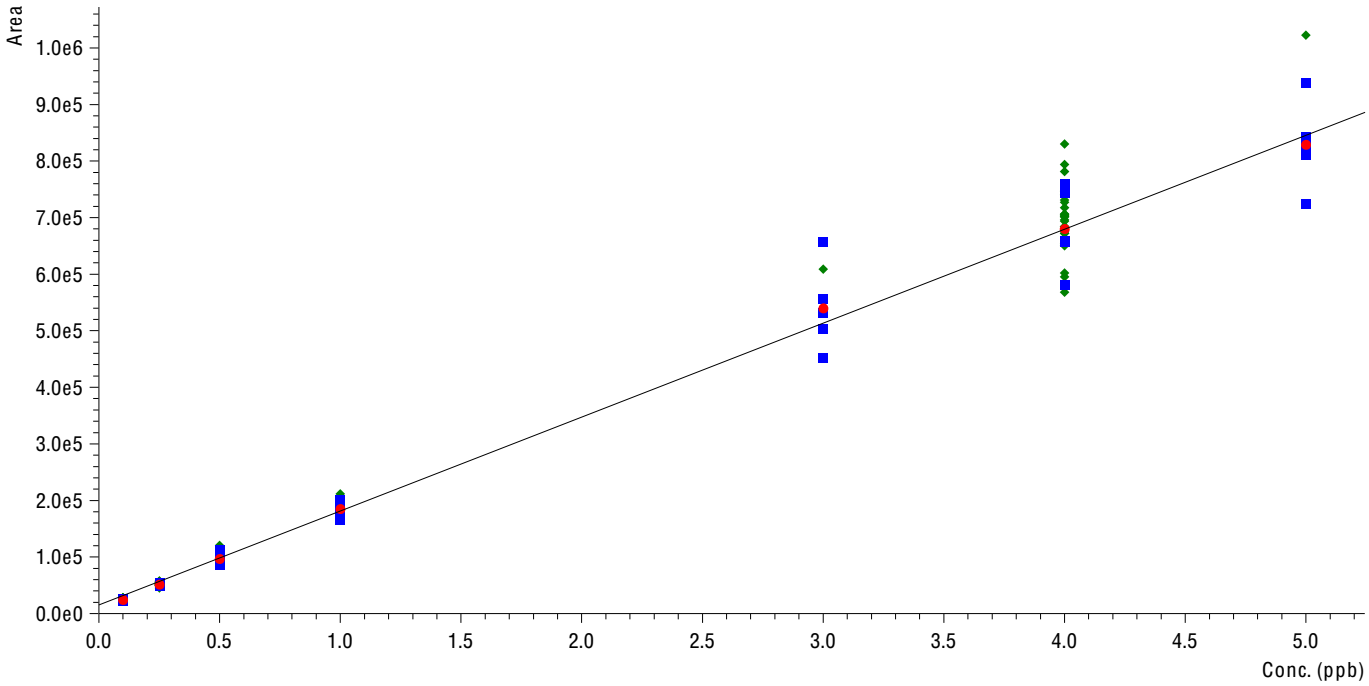
SACO DO RIBEIRA

Insight Report

Printed at 3/30/2021 4:42:45 PM

Compound: BP3 - Benzofenona-3

Curve Fit: Linear | Weighting: None | Zero: Not Forced
Quantitative Method: External Standard
Q 229.10>151.15
R^2 = 0.9983743 R = 0.9991868
y = 166031.5x + 15343.45



Sample Name	Sample ID	Found RT	Area	Conc.	S/N
P0	_1	0.722	9012	-0.04	5.66
P1	_1	0.721	26213	0.07	19.65
P2	_1	0.722	54256	0.23	37.02
P3	_1	0.723	103438	0.53	64.59
P4	_1	0.722	200806	1.12	132.17
P5	_1	0.722	656332	3.86	421.69
P6	_1	0.722	743413	4.39	496.02
P7	_1	0.722	810284	4.79	573.45
P0	_2	0.724	7024	-0.05	4.73
P1	_2	0.723	25763	0.06	16.82
P2	_2	0.722	51618	0.22	29.79
P3	_2	0.722	113338	0.59	72.64
P4	_2	0.722	194078	1.08	120.72
P5	_2	0.722	556373	3.26	459.84
P6	_2	0.723	759372	4.48	581.45
P7	_2	0.723	938753	5.56	626.55
P0	_1	0.726	8368	-0.04	7.06
P1	_1	0.726	23348	0.05	19.46
P2	_1	0.726	50838	0.21	41.46
P3	_1	0.725	94092	0.47	75.99
P4	_1	0.726	186919	1.03	139.62
P5	_1	0.726	503402	2.94	421.37
P6	_1	0.725	657423	3.87	629.53
P7	_1	0.725	843264	4.99	589.58
P0	_2	0.725	10056	-0.03	7.20
P1	_2	0.726	23923	0.05	20.41
P2	_2	0.726	49537	0.21	36.40
P3	_2	0.726	86557	0.43	72.07
P4	_2	0.726	178204	0.98	139.89
P5	_2	0.725	530967	3.11	437.51
P6	_2	0.726	658060	3.87	531.55

Insight Report

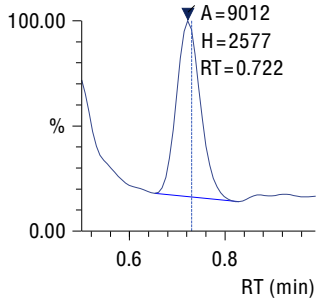
Printed at 3/30/2021 4:42:45 PM

Compound: BP3 - Benzofenona-3 (continued)

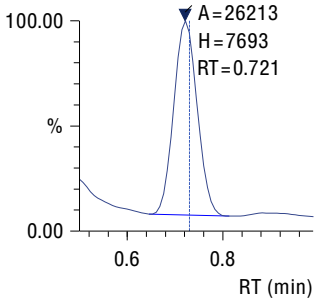
(Table continued from previous page)

Sample Name	Sample ID	Found RT	Area	Conc.	S/N
P7	_2	0.727	724335	4.27	536.70
P0	_3	0.726	9719	-0.03	7.29
P1	_3	0.725	23346	0.05	19.43
P2	_3	0.725	52399	0.22	53.79
P3	_3	0.725	85441	0.42	65.98
P4	_3	0.726	165931	0.91	132.71
P5	_3	0.725	452667	2.63	383.82
P6	_3	0.726	581528	3.41	549.25
P7	_3	0.725	828481	4.90	629.22

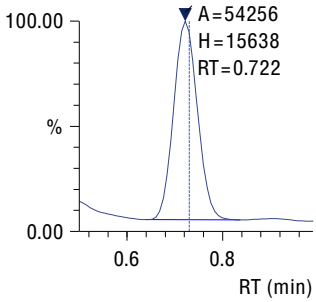
P0
Conc -0.04
Q 229.10>151.15 (+) 2.99e3



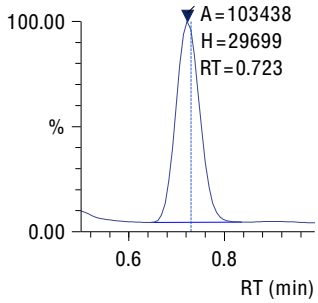
P1
Conc 0.07
Q 229.10>151.15 (+) 8.09e3



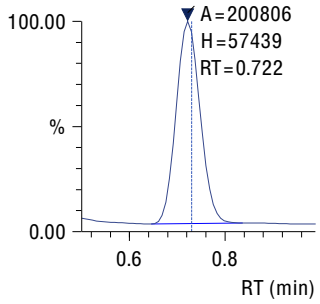
P2
Conc 0.23
Q 229.10>151.15 (+) 1.61e4



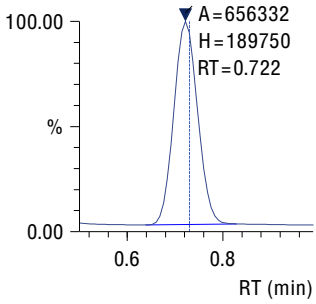
P3
Conc 0.53
Q 229.10>151.15 (+) 3.02e4



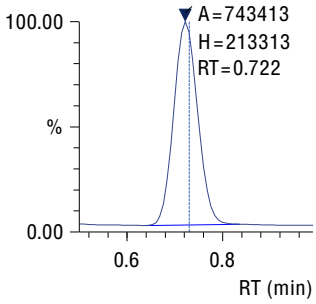
P4
Conc 1.12
Q 229.10>151.15 (+) 5.80e4



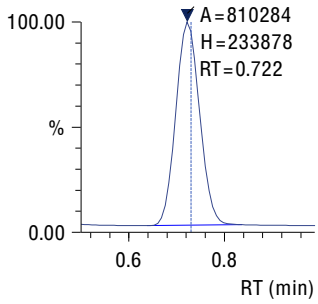
P5
Conc 3.86
Q 229.10>151.15 (+) 1.91e5



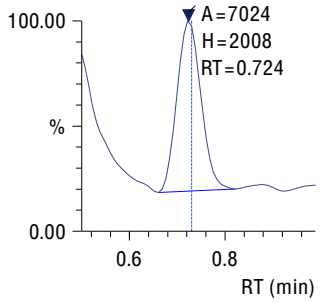
P6
Conc 4.39
Q 229.10>151.15 (+) 2.14e5



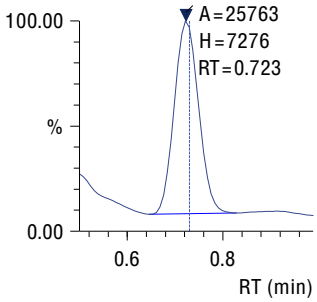
P7
Conc 4.79
Q 229.10>151.15 (+) 2.35e5



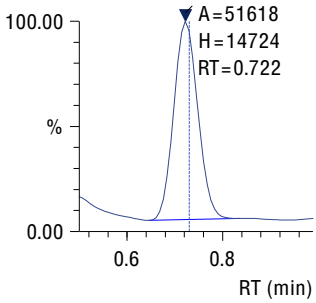
P0
Conc -0.05
Q 229.10>151.15 (+) 2.41e3



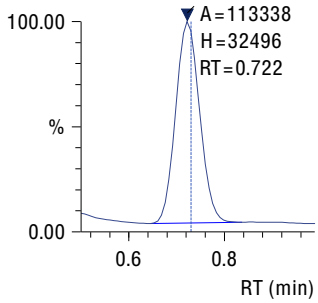
P1
Conc 0.06
Q 229.10>151.15 (+) 7.70e3



P2
Conc 0.22
Q 229.10>151.15 (+) 1.51e4



P3
Conc 0.59
Q 229.10>151.15 (+) 3.30e4

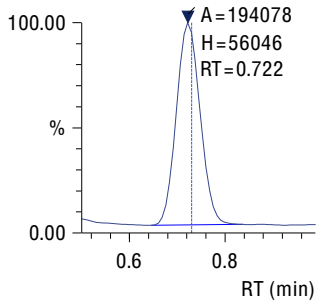


Insight Report

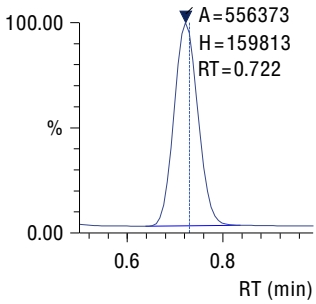
Printed at 3/30/2021 4:42:45 PM

Compound: BP3 - Benzofenona-3 (continued)

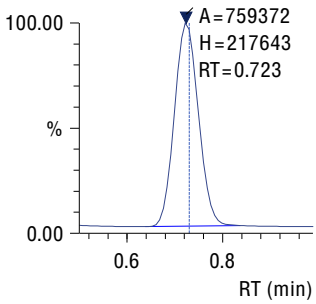
P4
Conc 1.08
Q 229.10>151.15 (+) 5.66e4



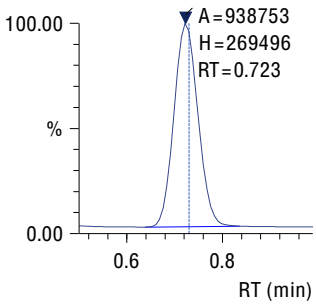
P5
Conc 3.26
Q 229.10>151.15 (+) 1.61e5



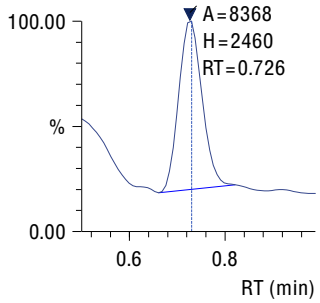
P6
Conc 4.48
Q 229.10>151.15 (+) 2.19e5



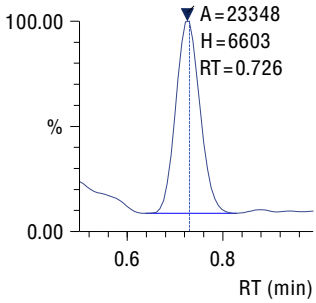
P7
Conc 5.56
Q 229.10>151.15 (+) 2.71e5



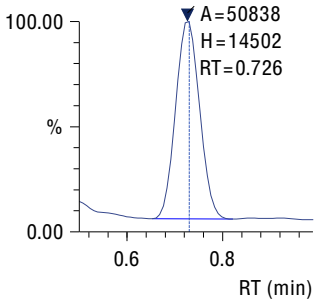
P0
Conc -0.04
Q 229.10>151.15 (+) 2.99e3



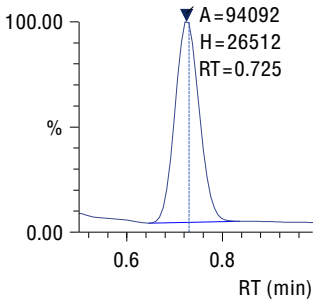
P1
Conc 0.05
Q 229.10>151.15 (+) 7.02e3



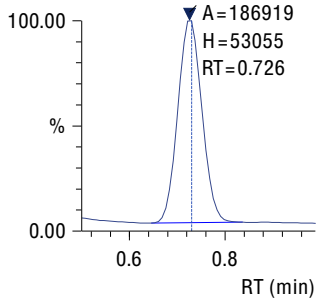
P2
Conc 0.21
Q 229.10>151.15 (+) 1.50e4



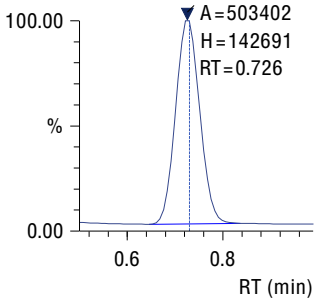
P3
Conc 0.47
Q 229.10>151.15 (+) 2.70e4



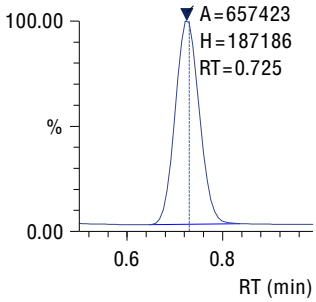
P4
Conc 1.03
Q 229.10>151.15 (+) 5.36e4



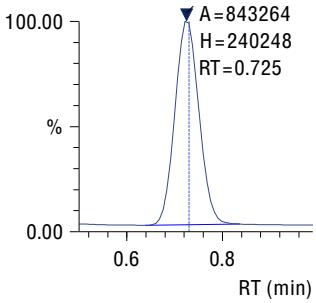
P5
Conc 2.94
Q 229.10>151.15 (+) 1.43e5



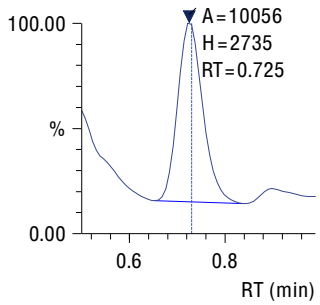
P6
Conc 3.87
Q 229.10>151.15 (+) 1.88e5



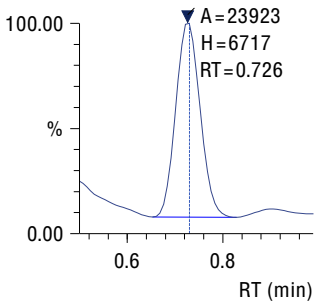
P7
Conc 4.99
Q 229.10>151.15 (+) 2.41e5



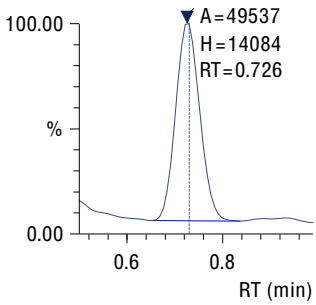
P0
Conc -0.03
Q 229.10>151.15 (+) 3.13e3



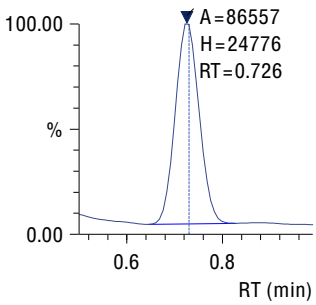
P1
Conc 0.05
Q 229.10>151.15 (+) 7.08e3



P2
Conc 0.21
Q 229.10>151.15 (+) 1.46e4



P3
Conc 0.43
Q 229.10>151.15 (+) 2.53e4

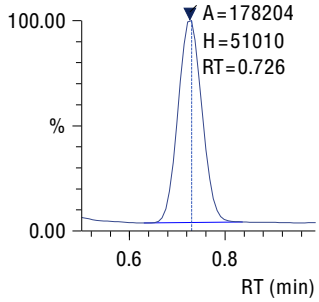


Insight Report

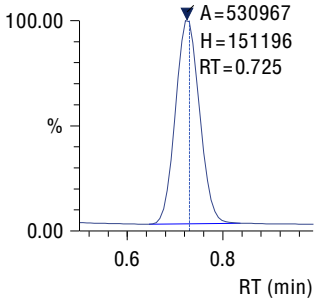
Printed at 3/30/2021 4:42:45 PM

Compound: BP3 - Benzofenona-3 (continued)

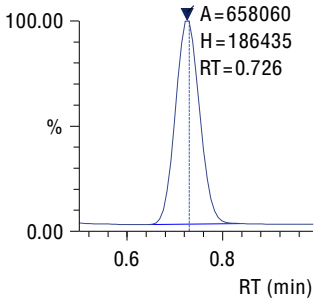
P4
Conc 0.98
Q 229.10>151.15 (+) 5.16e4



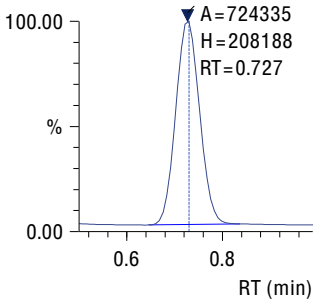
P5
Conc 3.11
Q 229.10>151.15 (+) 1.52e5



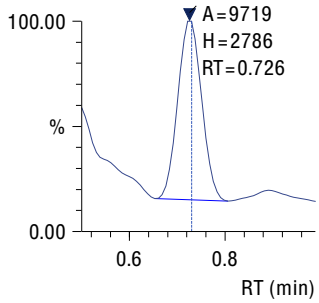
P6
Conc 3.87
Q 229.10>151.15 (+) 1.87e5



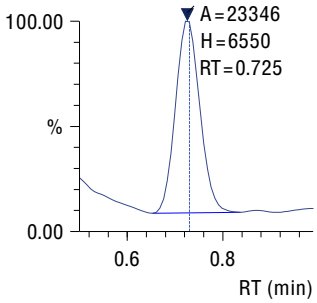
P7
Conc 4.27
Q 229.10>151.15 (+) 2.09e5



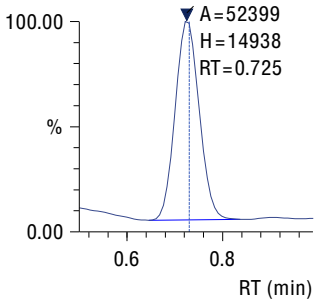
P0
Conc -0.03
Q 229.10>151.15 (+) 3.19e3



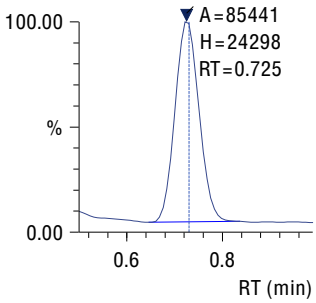
P1
Conc 0.05
Q 229.10>151.15 (+) 6.98e3



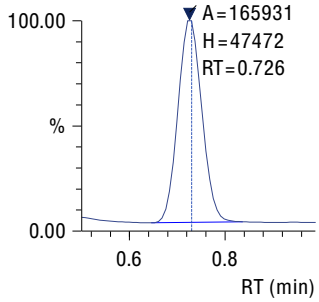
P2
Conc 0.22
Q 229.10>151.15 (+) 1.54e4



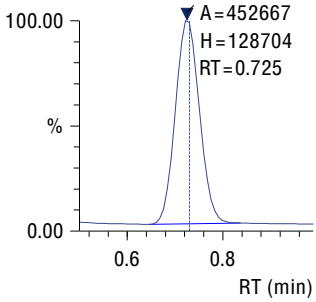
P3
Conc 0.42
Q 229.10>151.15 (+) 2.48e4



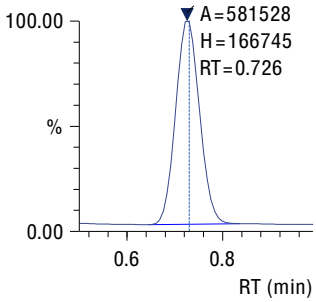
P4
Conc 0.91
Q 229.10>151.15 (+) 4.81e4



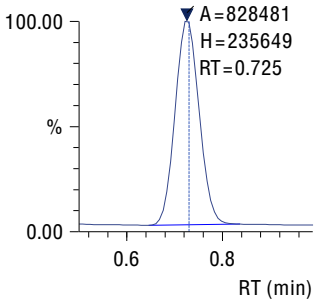
P5
Conc 2.63
Q 229.10>151.15 (+) 1.29e5



P6
Conc 3.41
Q 229.10>151.15 (+) 1.68e5



P7
Conc 4.90
Q 229.10>151.15 (+) 2.37e5

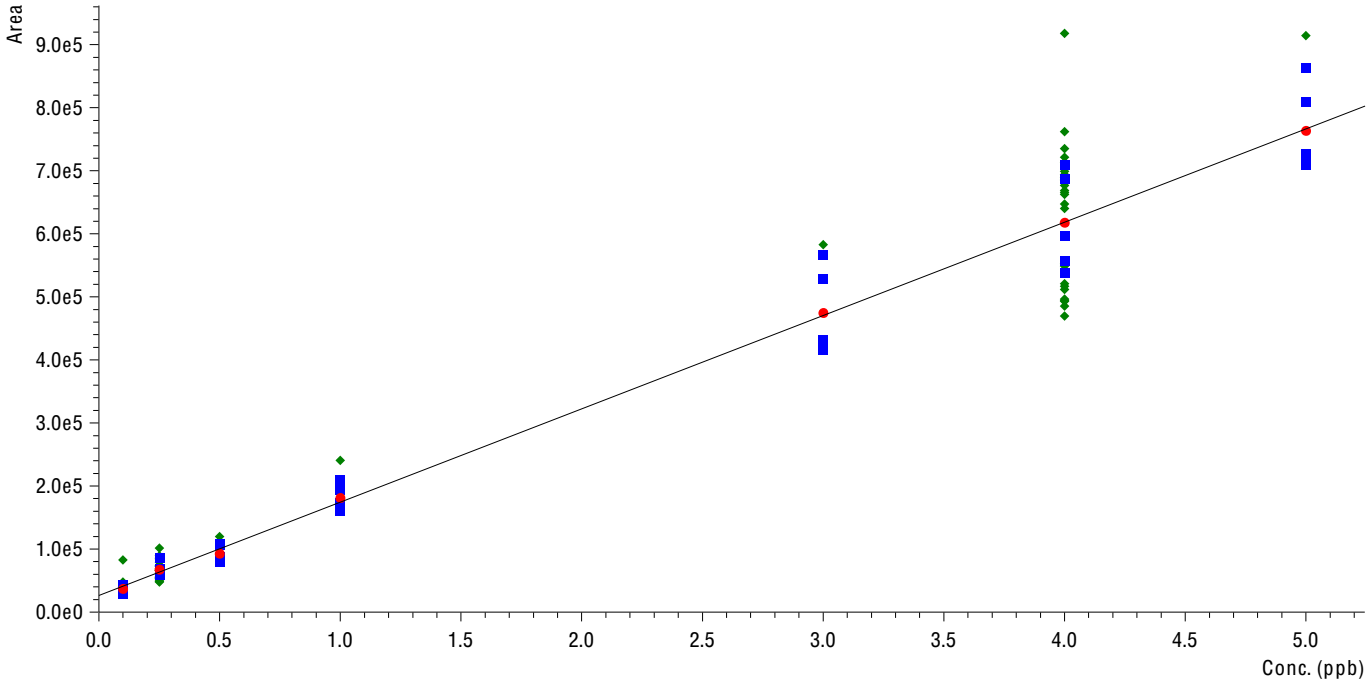


Insight Report

Printed at 3/30/2021 4:42:45 PM

Compound: OMC - Octinoxato

Curve Fit: Linear | Weighting: None | Zero: Not Forced
Quantitative Method: External Standard
Q 291.20>161.15
R^2 = 0.9996864 R = 0.9998432
y = 147964.1x + 26538.75



Sample Name	Sample ID	Found RT	Area	Conc.	S/N
P0	_1	1.918	24399	-0.01	13.62
P1	_1	1.917	35039	0.06	20.90
P2	_1	1.915	85777	0.40	42.30
P3	_1	1.917	107422	0.55	46.21
P4	_1	1.917	209184	1.23	110.56
P5	_1	1.918	566631	3.65	350.61
P6	_1	1.919	709958	4.62	395.57
P7	_1	1.918	808634	5.29	425.01
P0	_2	1.919	27830	0.01	12.97
P1	_2	1.920	39125	0.09	23.39
P2	_2	1.917	62298	0.24	28.03
P3	_2	1.918	106092	0.54	50.06
P4	_2	1.919	194358	1.13	118.58
P5	_2	1.917	528407	3.39	252.04
P6	_2	1.919	688022	4.47	376.14
P7	_2	1.919	862512	5.65	354.35
P0	_1	1.938	22629	-0.03	7.89
P1	_1	1.933	43446	0.11	18.63
P2	_1	1.926	68657	0.28	31.23
P3	_1	1.929	88079	0.42	48.77
P4	_1	1.927	173573	0.99	139.26
P5	_1	1.930	415824	2.63	297.08
P6	_1	1.929	596147	3.85	297.64
P7	_1	1.929	709165	4.61	302.72
P0	_2	----	----	----	----
P1	_2	1.930	29482	0.02	15.70
P2	_2	1.929	58588	0.22	38.22
P3	_2	1.929	82601	0.38	38.14
P4	_2	1.929	169672	0.97	102.77
P5	_2	1.930	430841	2.73	226.75
P6	_2	1.932	557563	3.59	236.41
P7	_2	1.932	710335	4.62	314.41
P0	_3	----	----	----	----
P1	_3	1.928	39501	0.09	16.49

Insight Report

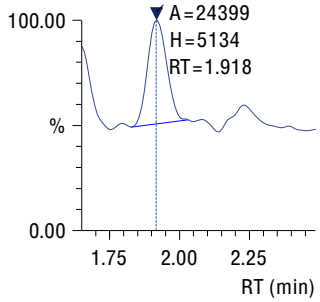
Printed at 3/30/2021 4:42:45 PM

Compound: OMC - Octinoxato (continued)

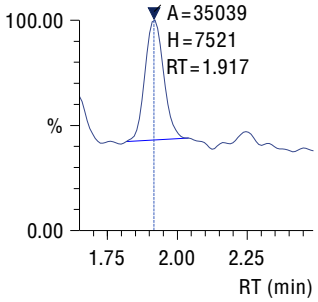
(Table continued from previous page)

Sample Name	Sample ID	Found RT	Area	Conc.	S/N
P2	_3	1.930	61587	0.24	26.69
P3	_3	1.928	80178	0.36	26.56
P4	_3	1.930	160460	0.91	89.52
P5	_3	1.930	431610	2.74	185.97
P6	_3	1.931	538005	3.46	259.21
P7	_3	1.932	726596	4.73	324.11

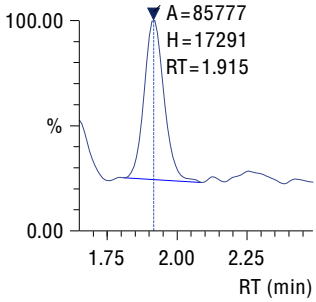
P0
Conc -0.01
Q 291.20>161.15 (+) 1.01e4



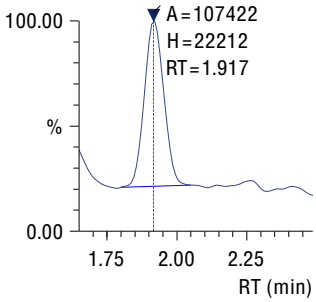
P1
Conc 0.06
Q 291.20>161.15 (+) 1.28e4



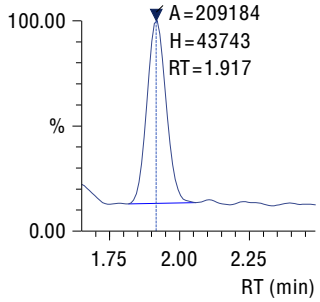
P2
Conc 0.40
Q 291.20>161.15 (+) 2.22e4



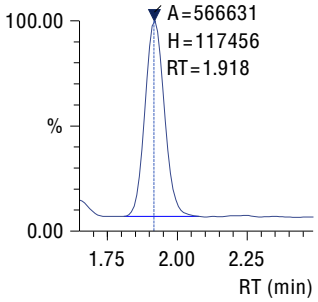
P3
Conc 0.55
Q 291.20>161.15 (+) 2.74e4



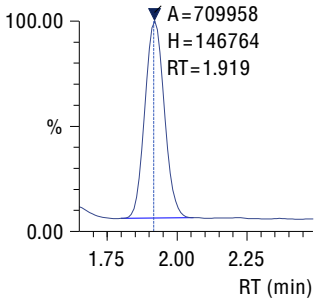
P4
Conc 1.23
Q 291.20>161.15 (+) 4.89e4



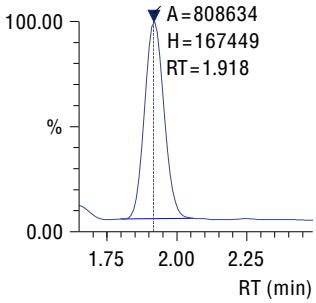
P5
Conc 3.65
Q 291.20>161.15 (+) 1.23e5



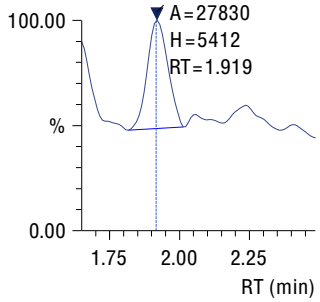
P6
Conc 4.62
Q 291.20>161.15 (+) 1.52e5



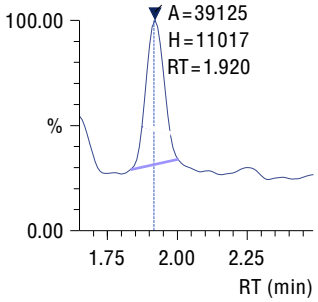
P7
Conc 5.29
Q 291.20>161.15 (+) 1.73e5



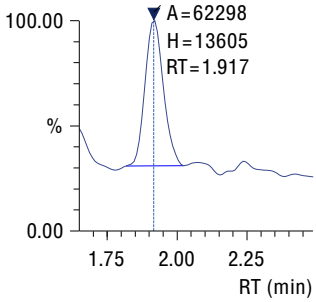
P0
Conc 0.01
Q 291.20>161.15 (+) 1.02e4



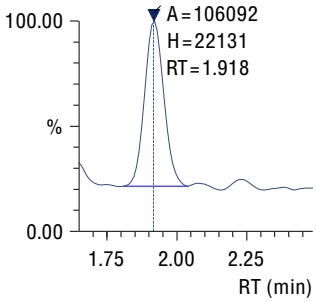
P1
Conc 0.09
Q 291.20>161.15 (+) 2.05e4



P2
Conc 0.24
Q 291.20>161.15 (+) 1.91e4



P3
Conc 0.54
Q 291.20>161.15 (+) 2.74e4

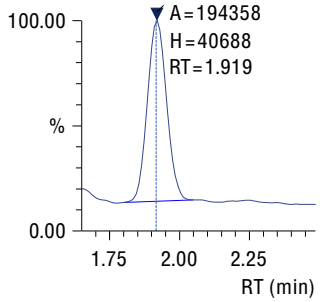


Insight Report

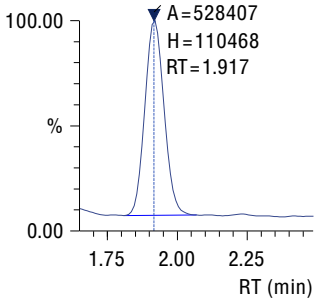
Printed at 3/30/2021 4:42:45 PM

Compound: OMC - Octinoxato (continued)

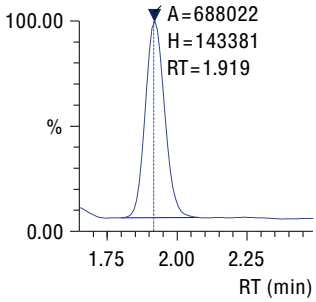
P4
Conc 1.13
Q 291.20>161.15 (+) 4.60e4



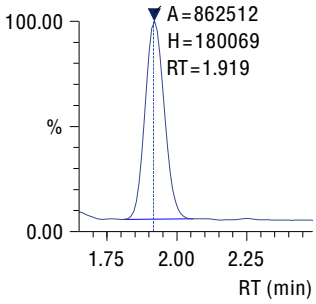
P5
Conc 3.39
Q 291.20>161.15 (+) 1.16e5



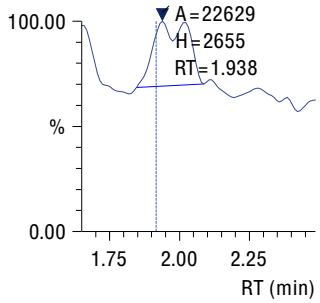
P6
Conc 4.47
Q 291.20>161.15 (+) 1.49e5



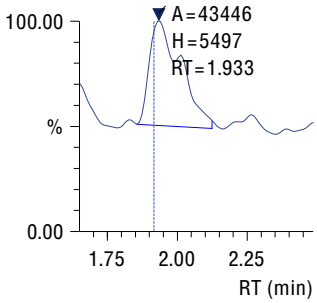
P7
Conc 5.65
Q 291.20>161.15 (+) 1.86e5



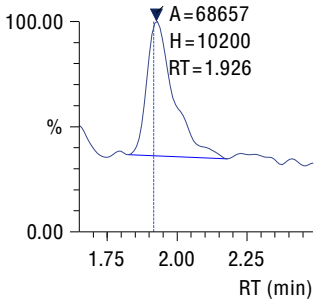
P0
Conc -0.03
Q 291.20>161.15 (+) 8.35e3



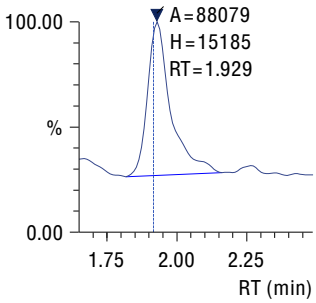
P1
Conc 0.11
Q 291.20>161.15 (+) 1.08e4



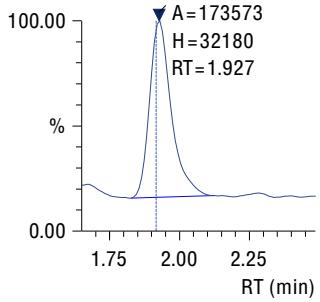
P2
Conc 0.28
Q 291.20>161.15 (+) 1.55e4



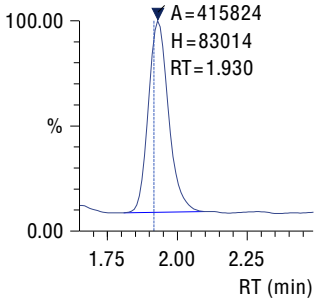
P3
Conc 0.42
Q 291.20>161.15 (+) 2.02e4



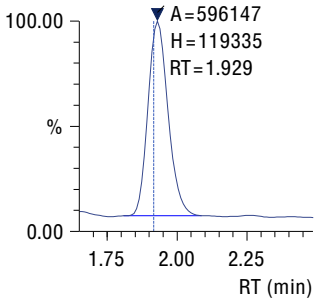
P4
Conc 0.99
Q 291.20>161.15 (+) 3.72e4



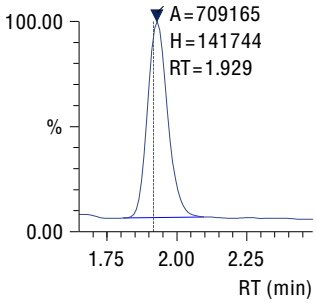
P5
Conc 2.63
Q 291.20>161.15 (+) 8.85e4



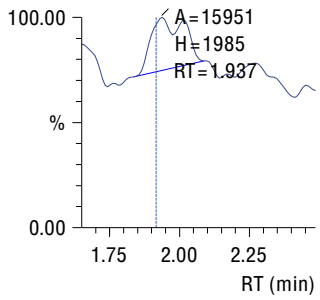
P6
Conc 3.85
Q 291.20>161.15 (+) 1.25e5



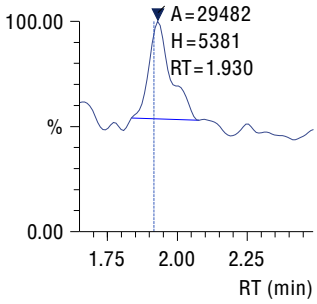
P7
Conc 4.61
Q 291.20>161.15 (+) 1.48e5



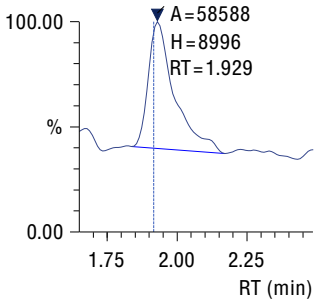
P0
Conc ----
Q 291.20>161.15 (+) 7.63e3



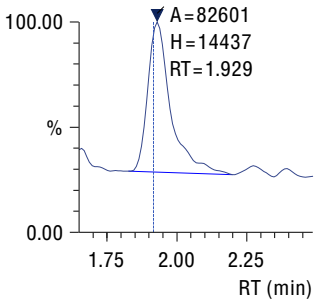
P1
Conc 0.02
Q 291.20>161.15 (+) 1.13e4



P2
Conc 0.22
Q 291.20>161.15 (+) 1.45e4



P3
Conc 0.38
Q 291.20>161.15 (+) 1.96e4

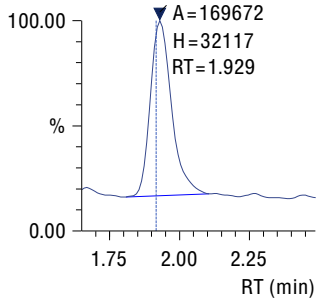


Insight Report

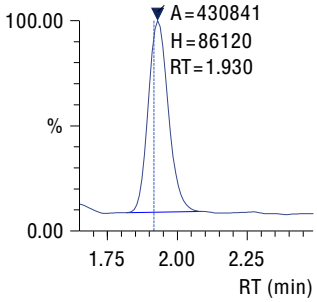
Printed at 3/30/2021 4:42:45 PM

Compound: OMC - Octinoxato (continued)

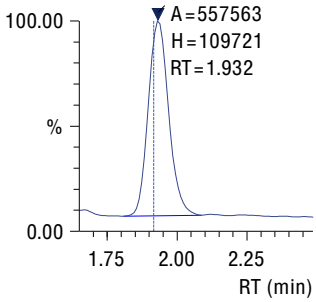
P4
Conc 0.97
Q 291.20>161.15 (+) 3.75e4



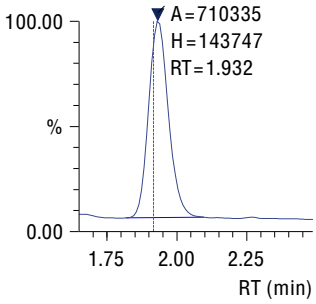
P5
Conc 2.73
Q 291.20>161.15 (+) 9.18e4



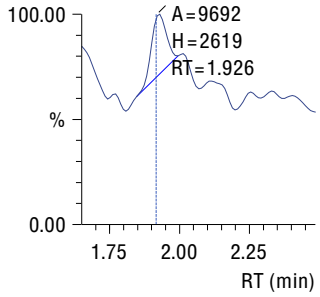
P6
Conc 3.59
Q 291.20>161.15 (+) 1.15e5



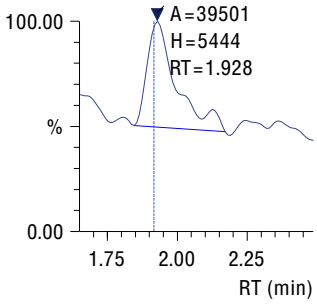
P7
Conc 4.62
Q 291.20>161.15 (+) 1.49e5



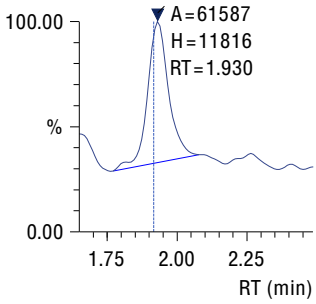
P0
Conc ----
Q 291.20>161.15 (+) 8.86e3



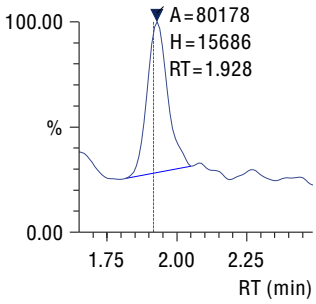
P1
Conc 0.09
Q 291.20>161.15 (+) 1.05e4



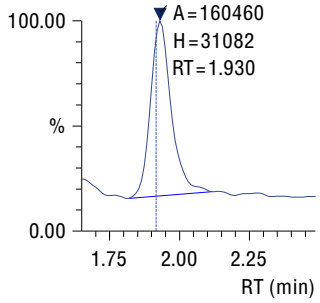
P2
Conc 0.24
Q 291.20>161.15 (+) 1.71e4



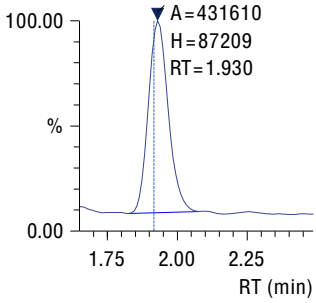
P3
Conc 0.36
Q 291.20>161.15 (+) 2.13e4



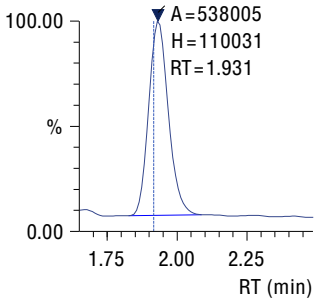
P4
Conc 0.91
Q 291.20>161.15 (+) 3.63e4



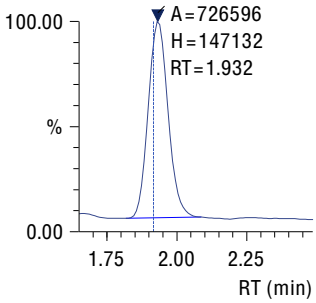
P5
Conc 2.74
Q 291.20>161.15 (+) 9.28e4



P6
Conc 3.46
Q 291.20>161.15 (+) 1.16e5



P7
Conc 4.73
Q 291.20>161.15 (+) 1.53e5

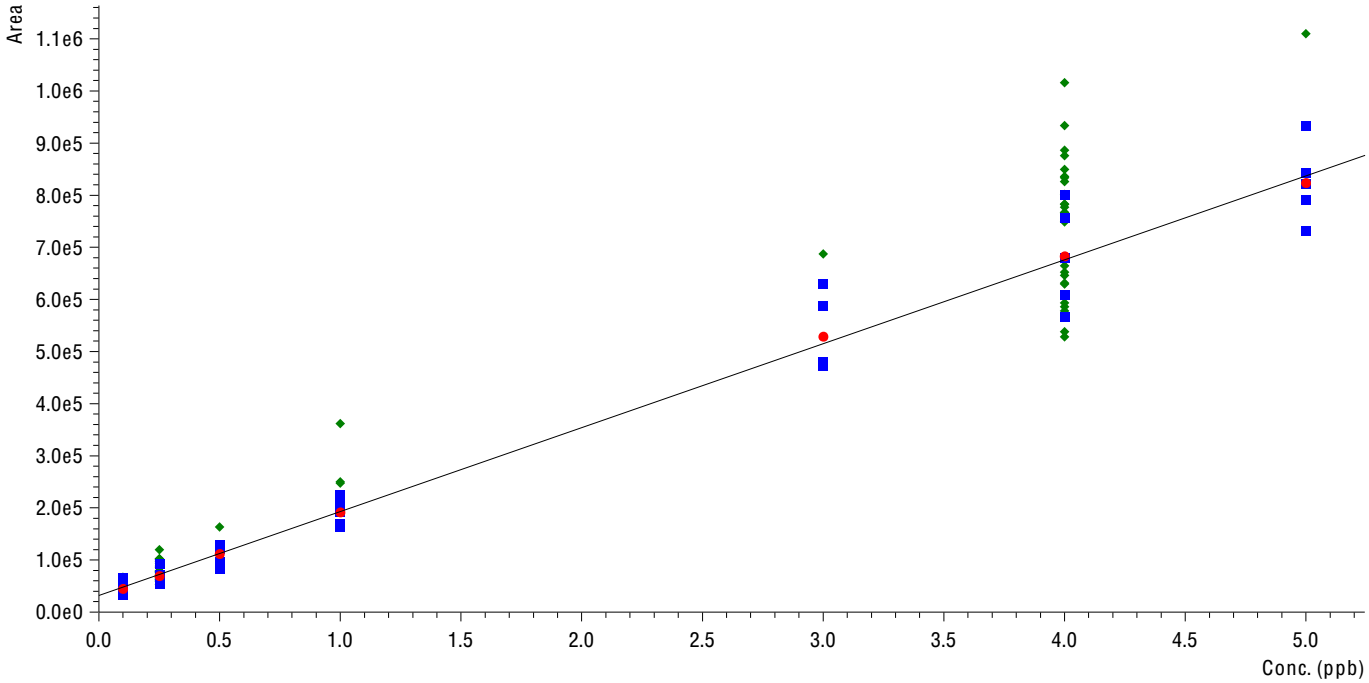


Insight Report

Printed at 3/30/2021 4:42:45 PM

Compound: BMDM - Avobenzona

Curve Fit: Linear | Weighting: None | Zero: Not Forced
Quantitative Method: External Standard
Q 311.20>161.20
R^2 = 0.9992920 R = 0.9996459
y = 161058.5x + 31730.33



Sample Name	Sample ID	Found RT	Area	Conc.	S/N
P0	_1	1.927	31031	0.00	40.94
P1	_1	1.926	49591	0.11	67.00
P2	_1	1.921	92518	0.38	130.60
P3	_1	1.925	127857	0.60	134.98
P4	_1	1.924	223954	1.19	157.23
P5	_1	1.924	630885	3.72	245.60
P6	_1	1.924	801452	4.78	185.24
P7	_1	1.925	842531	5.03	192.40
P0	_2	1.928	31980	0.00	41.21
P1	_2	1.928	65196	0.21	94.92
P2	_2	1.925	71334	0.25	73.33
P3	_2	1.924	122077	0.56	128.37
P4	_2	1.925	210002	1.11	132.35
P5	_2	1.924	588086	3.45	193.62
P6	_2	1.927	757544	4.51	181.05
P7	_2	1.927	932099	5.59	168.32
P0	_1	1.940	30726	-0.01	53.96
P1	_1	1.938	39557	0.05	56.70
P2	_1	1.938	62163	0.19	61.65
P3	_1	1.936	128545	0.60	145.34
P4	_1	1.938	191424	0.99	199.52
P5	_1	1.938	479796	2.78	207.17
P6	_1	1.936	679655	4.02	269.54
P7	_1	1.936	790720	4.71	241.07
P0	_2	1.938	22241	-0.06	31.39
P1	_2	1.941	33752	0.01	41.46
P2	_2	1.937	53658	0.14	52.59
P3	_2	1.936	83765	0.32	116.51
P4	_2	1.938	169956	0.86	194.82
P5	_2	1.937	474082	2.75	195.24
P6	_2	1.937	607910	3.58	284.59
P7	_2	1.940	730651	4.34	219.54
P0	_3	1.937	33671	0.01	57.07
P1	_3	1.936	34677	0.02	46.30

Insight Report

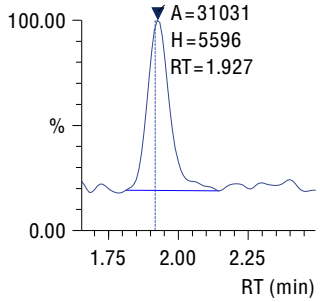
Printed at 3/30/2021 4:42:45 PM

Compound: BMDM - Avobenzona (continued)

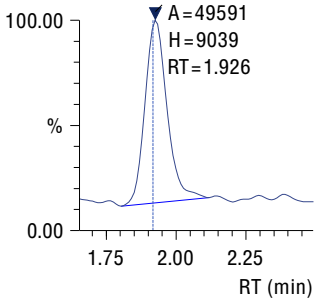
(Table continued from previous page)

Sample Name	Sample ID	Found RT	Area	Conc.	S/N
P2	_3	1.935	67438	0.22	98.62
P3	_3	1.936	95744	0.40	163.85
P4	_3	1.939	164276	0.82	141.84
P5	_3	1.936	471485	2.73	256.70
P6	_3	1.938	567371	3.33	237.04
P7	_3	1.938	822109	4.91	200.80

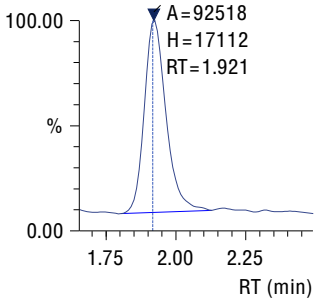
P0
Conc 0.00
Q 311.20>161.20 (+) 6.72e3



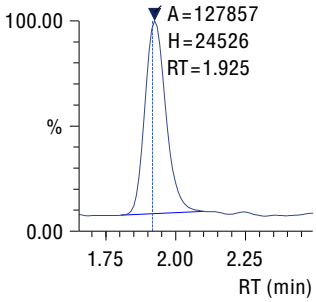
P1
Conc 0.11
Q 311.20>161.20 (+) 1.01e4



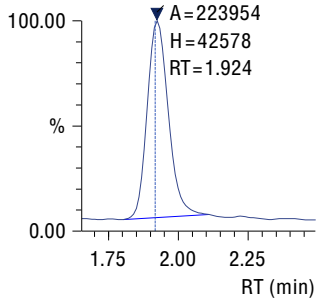
P2
Conc 0.38
Q 311.20>161.20 (+) 1.82e4



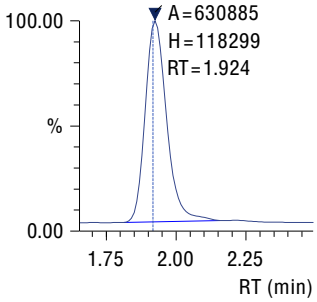
P3
Conc 0.60
Q 311.20>161.20 (+) 2.60e4



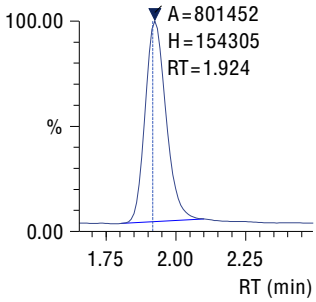
P4
Conc 1.19
Q 311.20>161.20 (+) 4.42e4



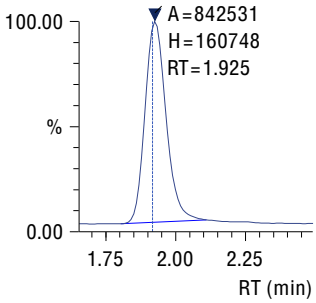
P5
Conc 3.72
Q 311.20>161.20 (+) 1.20e5



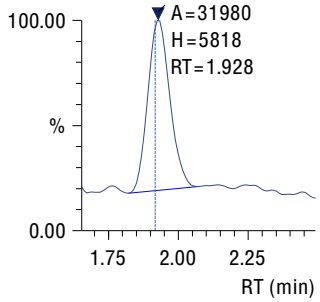
P6
Conc 4.78
Q 311.20>161.20 (+) 1.57e5



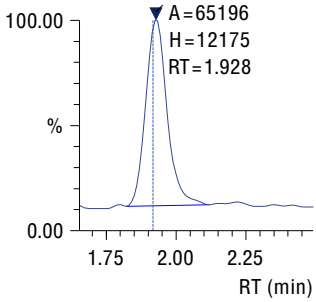
P7
Conc 5.03
Q 311.20>161.20 (+) 1.63e5



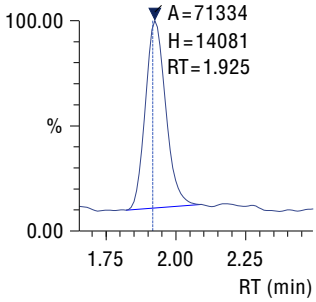
P0
Conc 0.00
Q 311.20>161.20 (+) 6.99e3



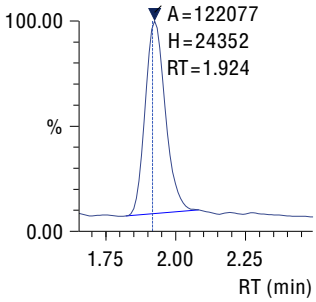
P1
Conc 0.21
Q 311.20>161.20 (+) 1.34e4



P2
Conc 0.25
Q 311.20>161.20 (+) 1.54e4



P3
Conc 0.56
Q 311.20>161.20 (+) 2.58e4

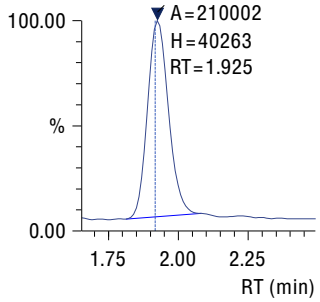


Insight Report

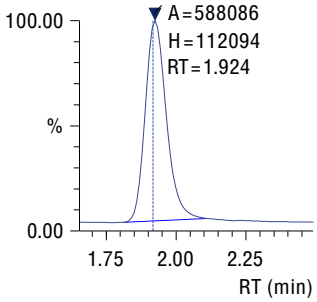
Printed at 3/30/2021 4:42:45 PM

Compound: BMDM - Avobenzona (continued)

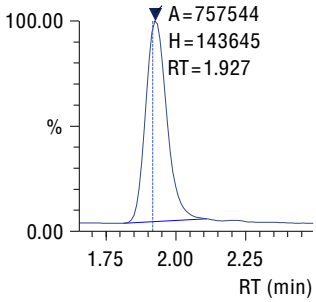
P4
Conc 1.11
Q 311.20>161.20 (+) 4.19e4



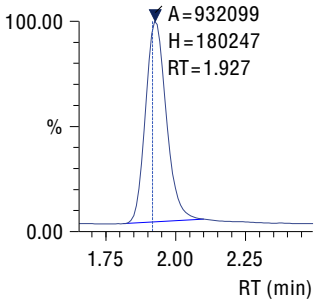
P5
Conc 3.45
Q 311.20>161.20 (+) 1.14e5



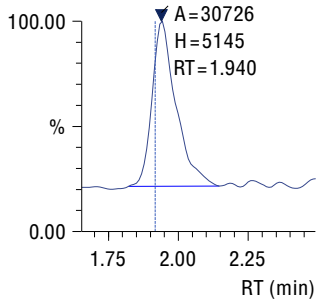
P6
Conc 4.51
Q 311.20>161.20 (+) 1.46e5



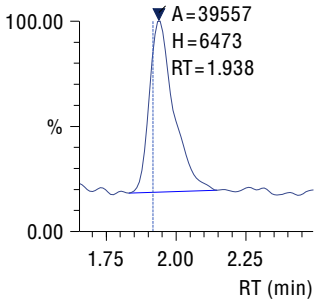
P7
Conc 5.59
Q 311.20>161.20 (+) 1.83e5



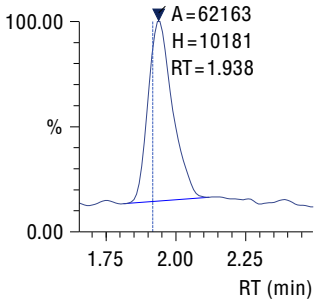
P0
Conc -0.01
Q 311.20>161.20 (+) 6.37e3



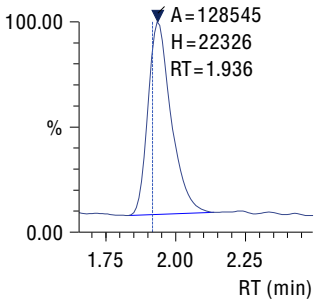
P1
Conc 0.05
Q 311.20>161.20 (+) 7.74e3



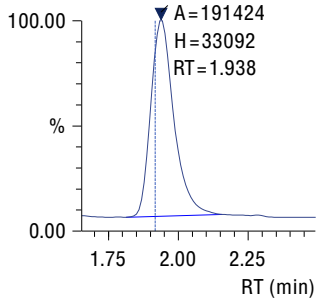
P2
Conc 0.19
Q 311.20>161.20 (+) 1.16e4



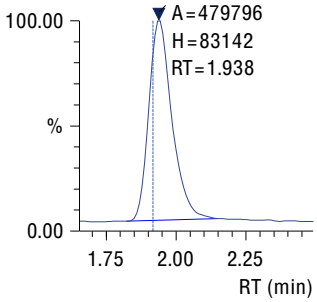
P3
Conc 0.60
Q 311.20>161.20 (+) 2.37e4



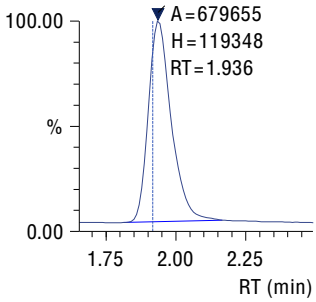
P4
Conc 0.99
Q 311.20>161.20 (+) 3.46e4



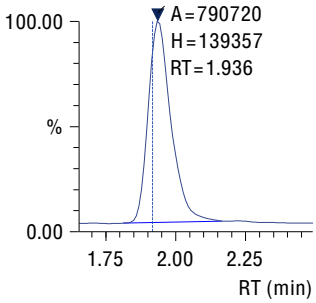
P5
Conc 2.78
Q 311.20>161.20 (+) 8.51e4



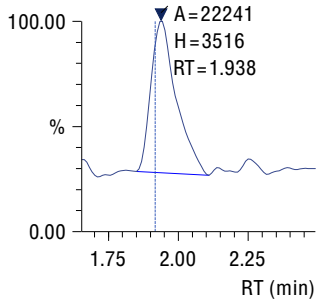
P6
Conc 4.02
Q 311.20>161.20 (+) 1.21e5



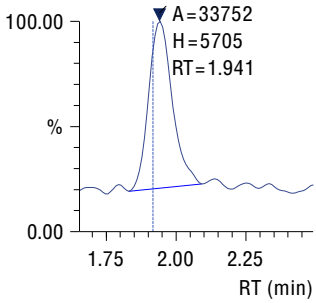
P7
Conc 4.71
Q 311.20>161.20 (+) 1.42e5



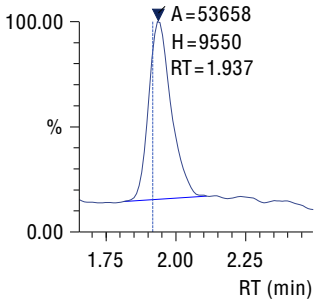
P0
Conc -0.06
Q 311.20>161.20 (+) 4.74e3



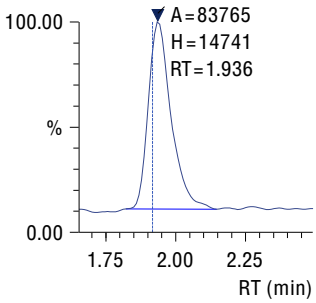
P1
Conc 0.01
Q 311.20>161.20 (+) 6.98e3



P2
Conc 0.14
Q 311.20>161.20 (+) 1.10e4



P3
Conc 0.32
Q 311.20>161.20 (+) 1.61e4

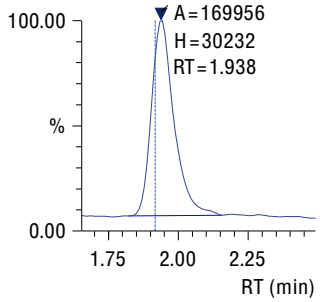


Insight Report

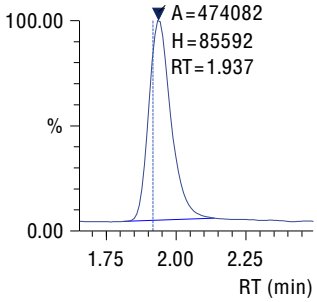
Printed at 3/30/2021 4:42:45 PM

Compound: BMDM - Avobenzona (continued)

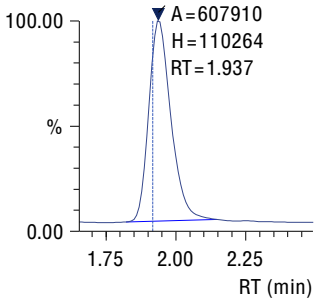
P4
Conc 0.86
Q 311.20>161.20 (+) 3.17e4



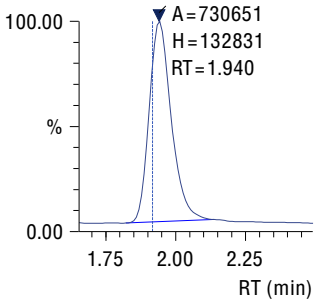
P5
Conc 2.75
Q 311.20>161.20 (+) 8.76e4



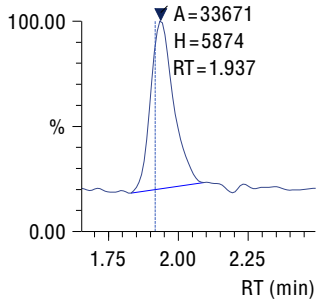
P6
Conc 3.58
Q 311.20>161.20 (+) 1.13e5



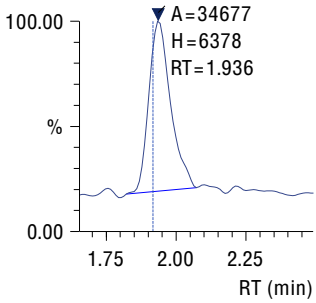
P7
Conc 4.34
Q 311.20>161.20 (+) 1.35e5



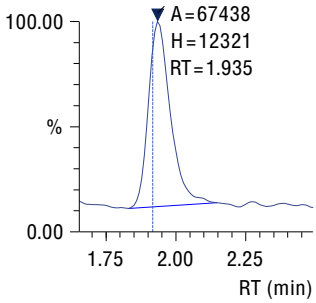
P0
Conc 0.01
Q 311.20>161.20 (+) 7.16e3



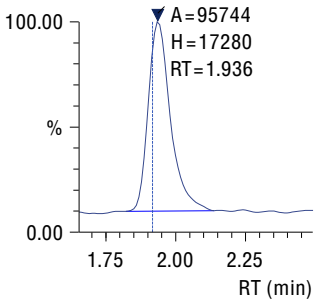
P1
Conc 0.02
Q 311.20>161.20 (+) 7.66e3



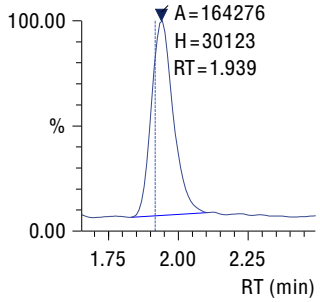
P2
Conc 0.22
Q 311.20>161.20 (+) 1.36e4



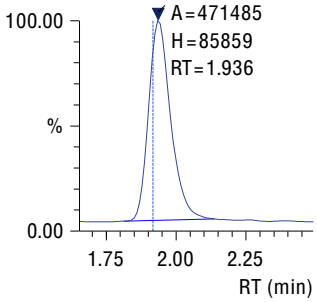
P3
Conc 0.40
Q 311.20>161.20 (+) 1.87e4



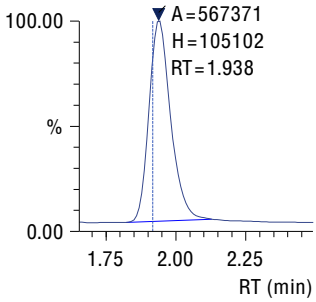
P4
Conc 0.82
Q 311.20>161.20 (+) 3.16e4



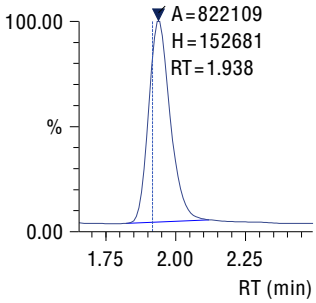
P5
Conc 2.73
Q 311.20>161.20 (+) 8.78e4



P6
Conc 3.33
Q 311.20>161.20 (+) 1.07e5



P7
Conc 4.91
Q 311.20>161.20 (+) 1.55e5

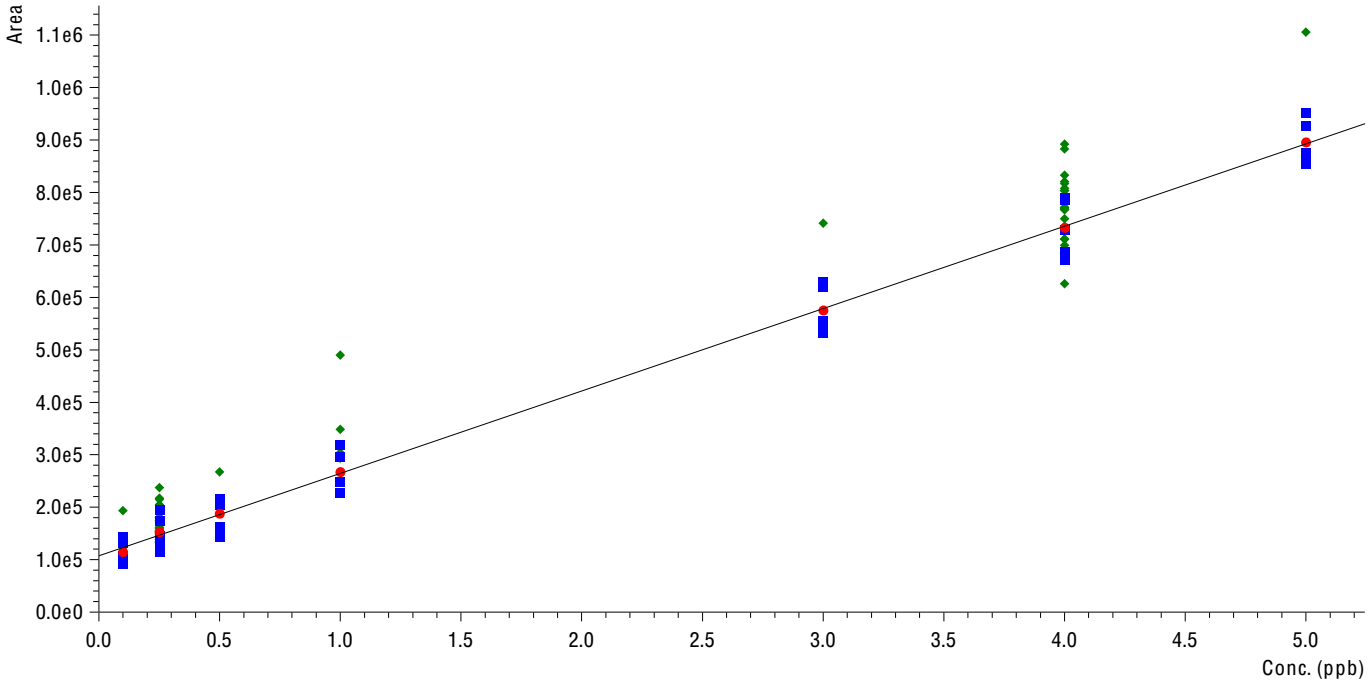


Insight Report

Printed at 3/30/2021 4:42:45 PM

Compound: OCT aduto - Octocrileno

Curve Fit: Linear | Weighting: None | Zero: Not Forced
Quantitative Method: External Standard
Q 379.25>250.20
R^2 = 0.9997386 R = 0.9998693
y = 157080.7x + 107405.4



Sample Name	Sample ID	Found RT	Area	Conc.	S/N
P0	_1	1.394	119117	0.07	69.60
P1	_1	1.392	132736	0.16	74.57
P2	_1	1.391	194404	0.55	94.85
P3	_1	1.394	215302	0.69	116.02
P4	_1	1.392	318841	1.35	158.26
P5	_1	1.392	630448	3.33	238.63
P6	_1	1.392	789566	4.34	245.28
P7	_1	1.393	876178	4.89	352.69
P0	_2	1.396	131137	0.15	52.25
P1	_2	1.393	143409	0.23	75.60
P2	_2	1.394	173367	0.42	81.48
P3	_2	1.392	214344	0.68	99.01
P4	_2	1.393	295991	1.20	132.10
P5	_2	1.392	619292	3.26	269.09
P6	_2	1.396	728864	3.96	317.74
P7	_2	1.395	926978	5.22	382.59
P0	_1	1.403	91673	-0.10	43.00
P1	_1	1.404	107273	0.00	69.63
P2	_1	1.402	135041	0.18	77.02
P3	_1	1.401	205158	0.62	97.96
P4	_1	1.402	247877	0.89	125.50
P5	_1	1.404	533477	2.71	257.58
P6	_1	1.402	786563	4.32	335.42
P7	_1	1.401	854334	4.76	384.21
P0	_2	1.403	79166	-0.18	42.98
P1	_2	1.403	97893	-0.06	46.30
P2	_2	1.403	115165	0.05	71.78
P3	_2	1.402	144005	0.23	70.66
P4	_2	1.403	248520	0.90	116.29
P5	_2	1.403	540023	2.75	223.19
P6	_2	1.403	672415	3.60	361.67
P7	_2	1.405	871691	4.87	372.61
P0	_3	1.402	96391	-0.07	51.18
P1	_3	1.405	91624	-0.10	43.61

Insight Report

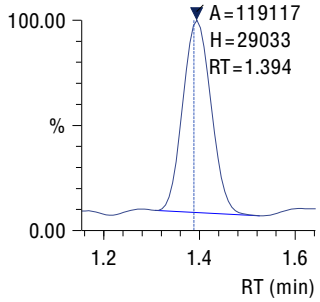
Printed at 3/30/2021 4:42:45 PM

Compound: OCT aduto - Octocrileno (continued)

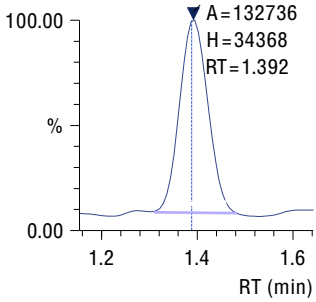
(Table continued from previous page)

Sample Name	Sample ID	Found RT	Area	Conc.	S/N
P2	_3	1.404	145889	0.24	76.48
P3	_3	1.401	161584	0.34	89.72
P4	_3	1.404	226744	0.76	101.99
P5	_3	1.401	554729	2.85	265.69
P6	_3	1.404	685689	3.68	310.26
P7	_3	1.403	951614	5.37	445.08

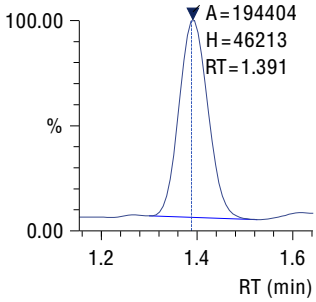
P0
Conc 0.07
Q 379.25>250.20 (+) 3.08e4



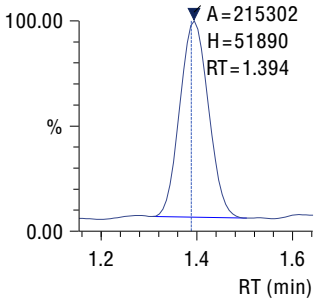
P1
Conc 0.16
Q 379.25>250.20 (+) 3.84e4



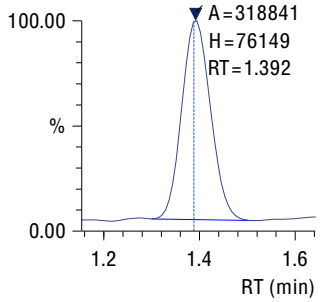
P2
Conc 0.55
Q 379.25>250.20 (+) 4.80e4



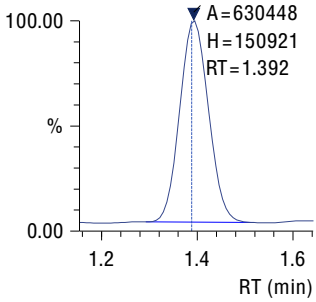
P3
Conc 0.69
Q 379.25>250.20 (+) 5.40e4



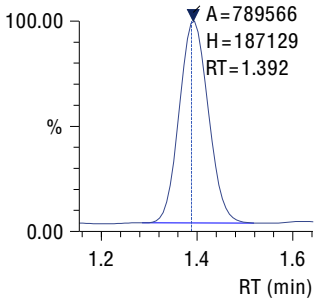
P4
Conc 1.35
Q 379.25>250.20 (+) 7.82e4



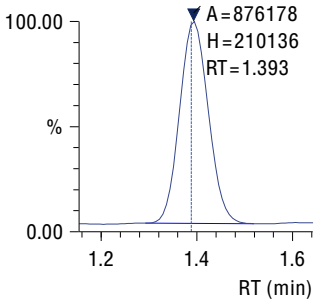
P5
Conc 3.33
Q 379.25>250.20 (+) 1.53e5



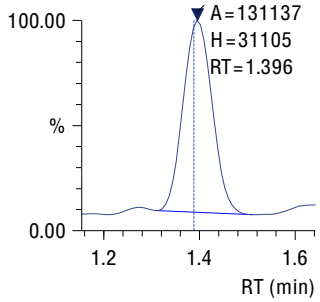
P6
Conc 4.34
Q 379.25>250.20 (+) 1.89e5



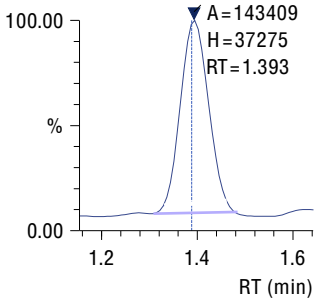
P7
Conc 4.89
Q 379.25>250.20 (+) 2.12e5



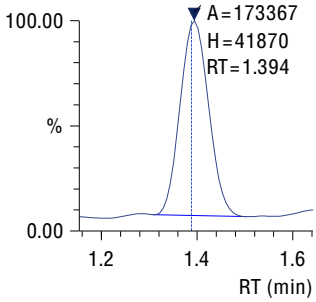
P0
Conc 0.15
Q 379.25>250.20 (+) 3.31e4



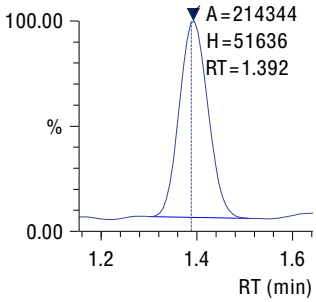
P1
Conc 0.23
Q 379.25>250.20 (+) 4.17e4



P2
Conc 0.42
Q 379.25>250.20 (+) 4.39e4



P3
Conc 0.68
Q 379.25>250.20 (+) 5.37e4

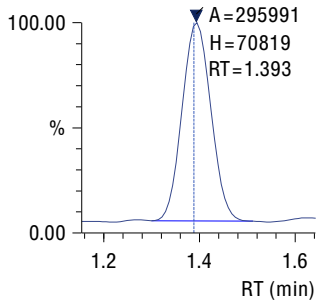


Insight Report

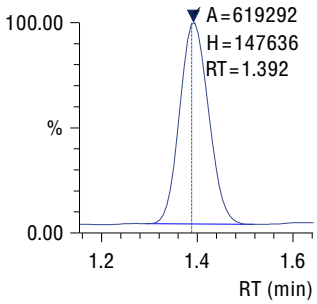
Printed at 3/30/2021 4:42:45 PM

Compound: OCT aduto - Octocrileno (continued)

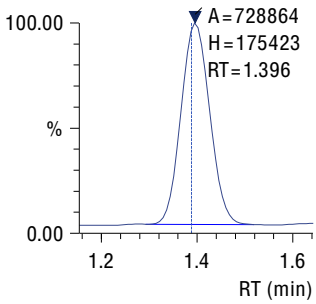
P4
Conc 1.20
Q 379.25>250.20 (+) 7.29e4



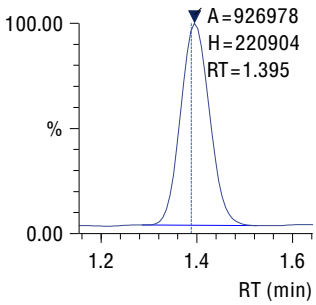
P5
Conc 3.26
Q 379.25>250.20 (+) 1.50e5



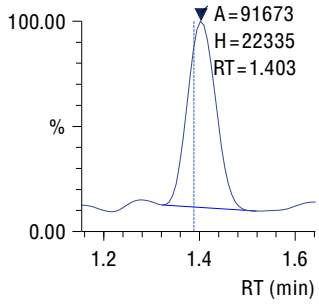
P6
Conc 3.96
Q 379.25>250.20 (+) 1.78e5



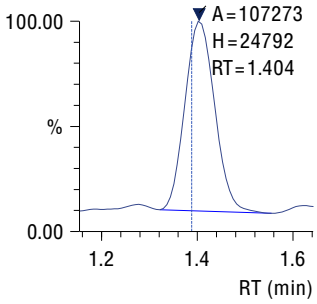
P7
Conc 5.22
Q 379.25>250.20 (+) 2.23e5



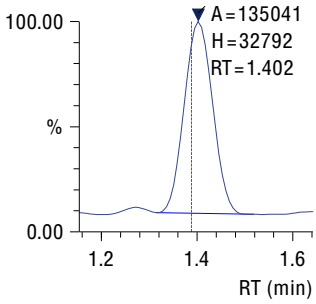
P0
Conc -0.10
Q 379.25>250.20 (+) 2.45e4



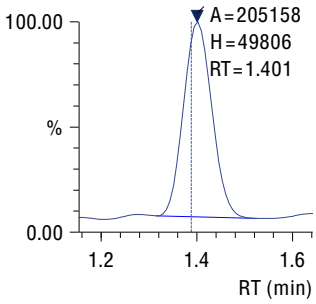
P1
Conc 0.00
Q 379.25>250.20 (+) 2.67e4



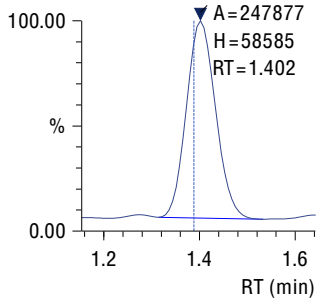
P2
Conc 0.18
Q 379.25>250.20 (+) 3.49e4



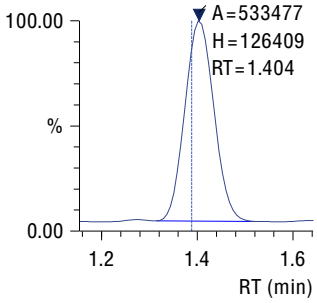
P3
Conc 0.62
Q 379.25>250.20 (+) 5.21e4



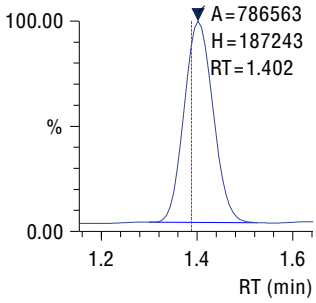
P4
Conc 0.89
Q 379.25>250.20 (+) 6.06e4



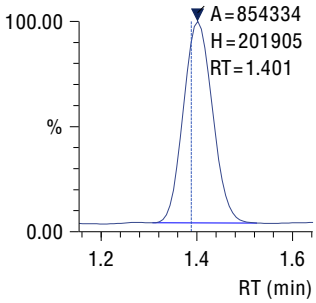
P5
Conc 2.71
Q 379.25>250.20 (+) 1.29e5



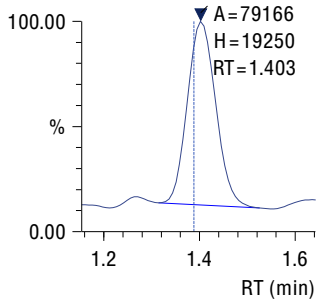
P6
Conc 4.32
Q 379.25>250.20 (+) 1.90e5



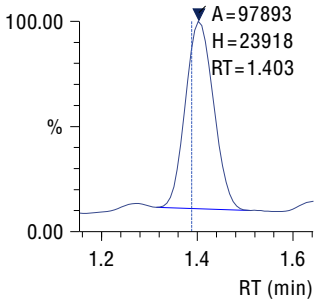
P7
Conc 4.76
Q 379.25>250.20 (+) 2.05e5



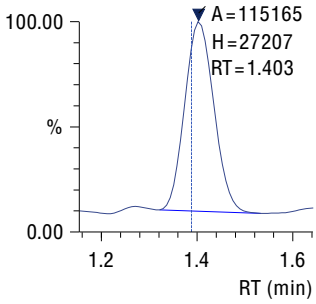
P0
Conc -0.18
Q 379.25>250.20 (+) 2.14e4



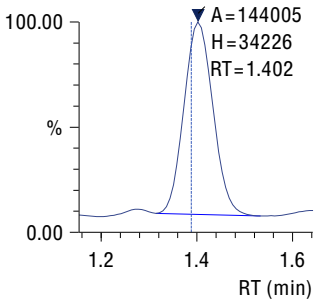
P1
Conc -0.06
Q 379.25>250.20 (+) 2.61e4



P2
Conc 0.05
Q 379.25>250.20 (+) 2.93e4



P3
Conc 0.23
Q 379.25>250.20 (+) 3.63e4

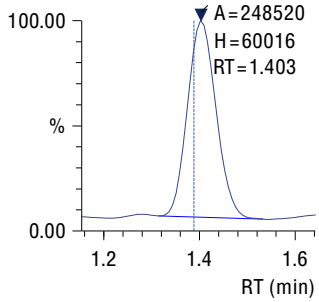


Insight Report

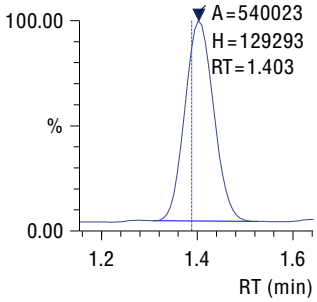
Printed at 3/30/2021 4:42:45 PM

Compound: OCT aduto - Octocrileno (continued)

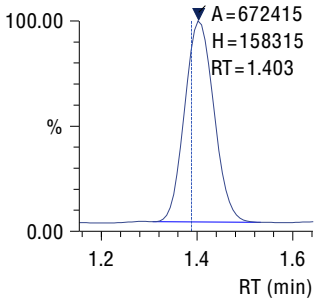
P4
Conc 0.90
Q 379.25>250.20 (+) 6.23e4



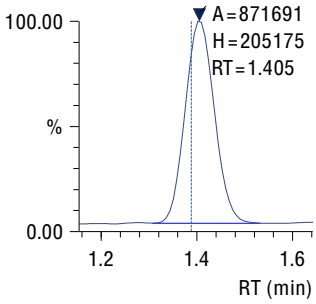
P5
Conc 2.75
Q 379.25>250.20 (+) 1.32e5



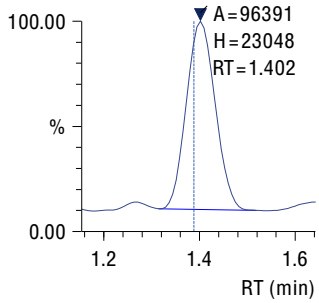
P6
Conc 3.60
Q 379.25>250.20 (+) 1.61e5



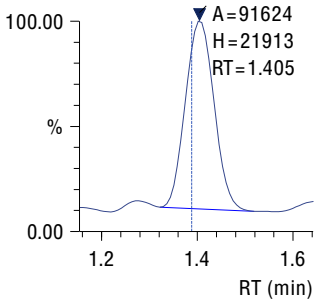
P7
Conc 4.87
Q 379.25>250.20 (+) 2.08e5



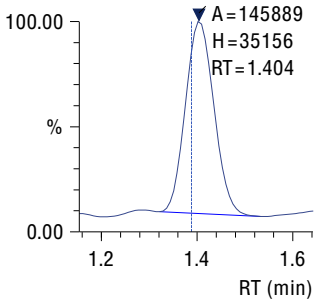
P0
Conc -0.07
Q 379.25>250.20 (+) 2.50e4



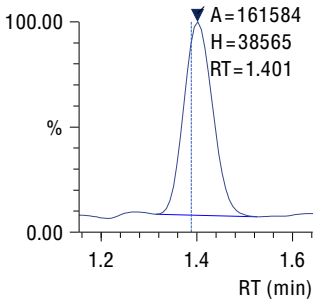
P1
Conc -0.10
Q 379.25>250.20 (+) 2.38e4



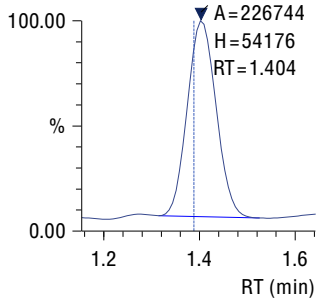
P2
Conc 0.24
Q 379.25>250.20 (+) 3.74e4



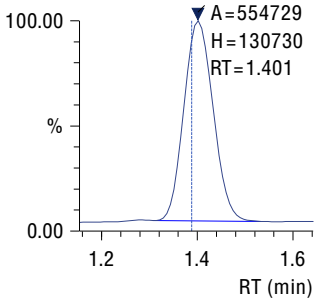
P3
Conc 0.34
Q 379.25>250.20 (+) 4.07e4



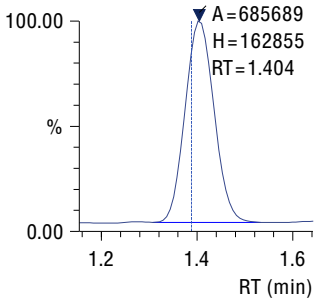
P4
Conc 0.76
Q 379.25>250.20 (+) 5.65e4



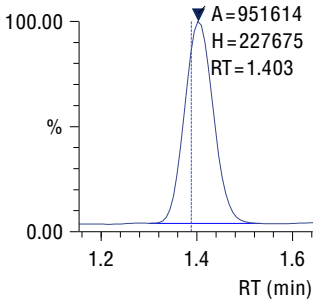
P5
Conc 2.85
Q 379.25>250.20 (+) 1.33e5



P6
Conc 3.68
Q 379.25>250.20 (+) 1.65e5



P7
Conc 5.37
Q 379.25>250.20 (+) 2.30e5

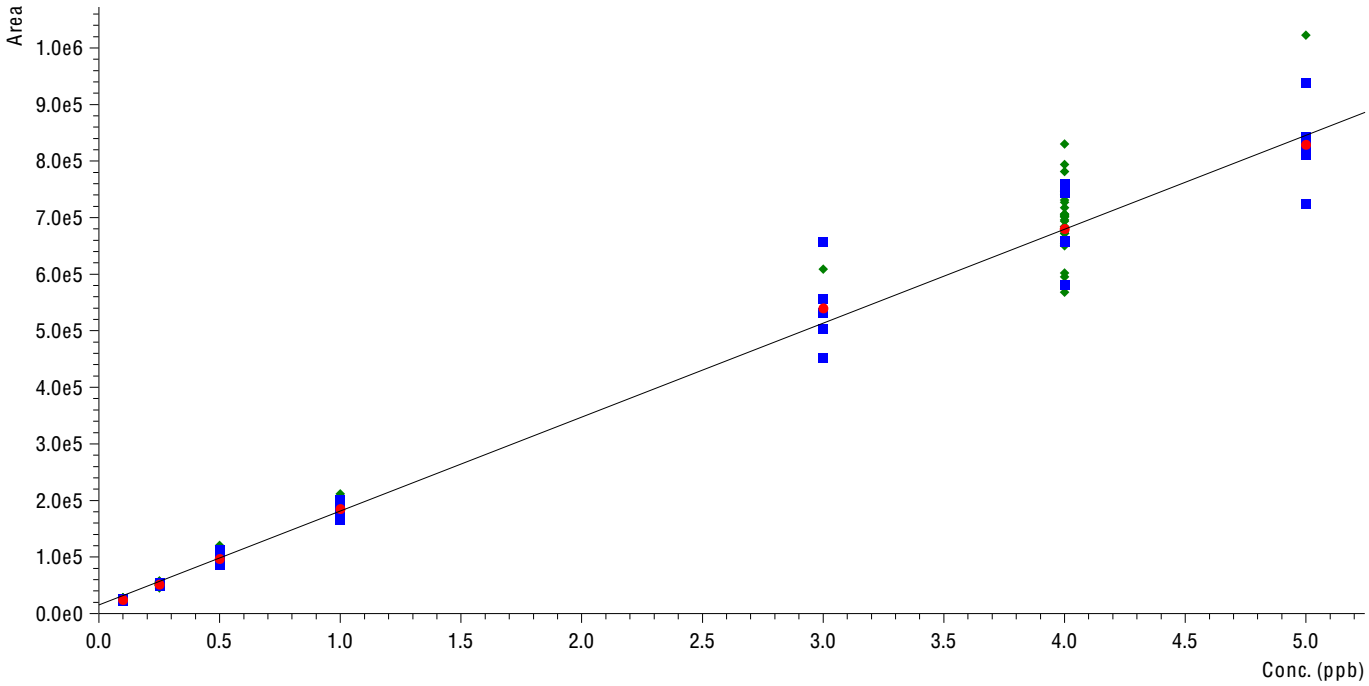


Insight Report

Printed at 3/30/2021 4:45:43 PM

Compound: BP3 - Benzofenona-3

Curve Fit: Linear | Weighting: None | Zero: Not Forced
Quantitative Method: External Standard
Q 229.10>151.15
R^2 = 0.9983743 R = 0.9991868
y = 166031.5x + 15343.45



Sample Name	Sample ID	Found RT	Area	Conc.	S/N
Pd0	_1_H2OSal	----	----	----	----
Pd1	_1_H2OSal	0.749	12654	-0.02	11.89
Pd2	_1_H2OSal	0.749	17193	0.01	16.39
Pd3	_1_H2OSal	0.747	22039	0.04	19.13
Pd4	_1_H2OSal	0.748	46286	0.19	33.17
Pd5	_1_H2OSal	0.748	123221	0.65	90.15
Pd6	_1_H2OSal	0.749	162408	0.89	124.02
Pd7	_1_H2OSal	0.747	195708	1.09	168.31
Pd0	_2_H2OSal	0.752	8229	-0.04	7.61
Pd1	_2_H2OSal	0.747	12133	-0.02	9.99
Pd2	_2_H2OSal	0.750	17375	0.01	15.26
Pd3	_2_H2OSal	0.747	26782	0.07	22.72
Pd4	_2_H2OSal	0.746	51041	0.22	39.04
Pd5	_2_H2OSal	0.747	133176	0.71	118.91
Pd6	_2_H2OSal	0.747	159914	0.87	147.49
Pd7	_2_H2OSal	0.748	196059	1.09	172.19
Pd0	_3_H2OSal	0.748	7619	-0.05	6.80
Pd1	_3_H2OSal	0.747	12741	-0.02	10.56
Pd2	_3_H2OSal	0.744	16119	0.00	15.64
Pd3	_3_H2OSal	0.746	24130	0.05	26.86
Pd4	_3_H2OSal	0.747	42789	0.17	44.41
Pd5	_3_H2OSal	0.747	122274	0.64	96.16
Pd6	_3_H2OSal	0.746	149093	0.81	140.50
Pd7	_3_H2OSal	0.747	193579	1.07	175.75
Pd0	_4_H2OSal	0.748	8242	-0.04	8.11
Pd1	_4_H2OSal	0.746	12380	-0.02	10.77
Pd2	_4_H2OSal	0.747	18114	0.02	15.64
Pd3	_4_H2OSal	0.746	23436	0.05	26.86
Pd4	_4_H2OSal	0.746	44495	0.18	38.43
Pd5	_4_H2OSal	0.747	104876	0.54	102.99
Pd6	_4_H2OSal	0.746	152989	0.83	129.30

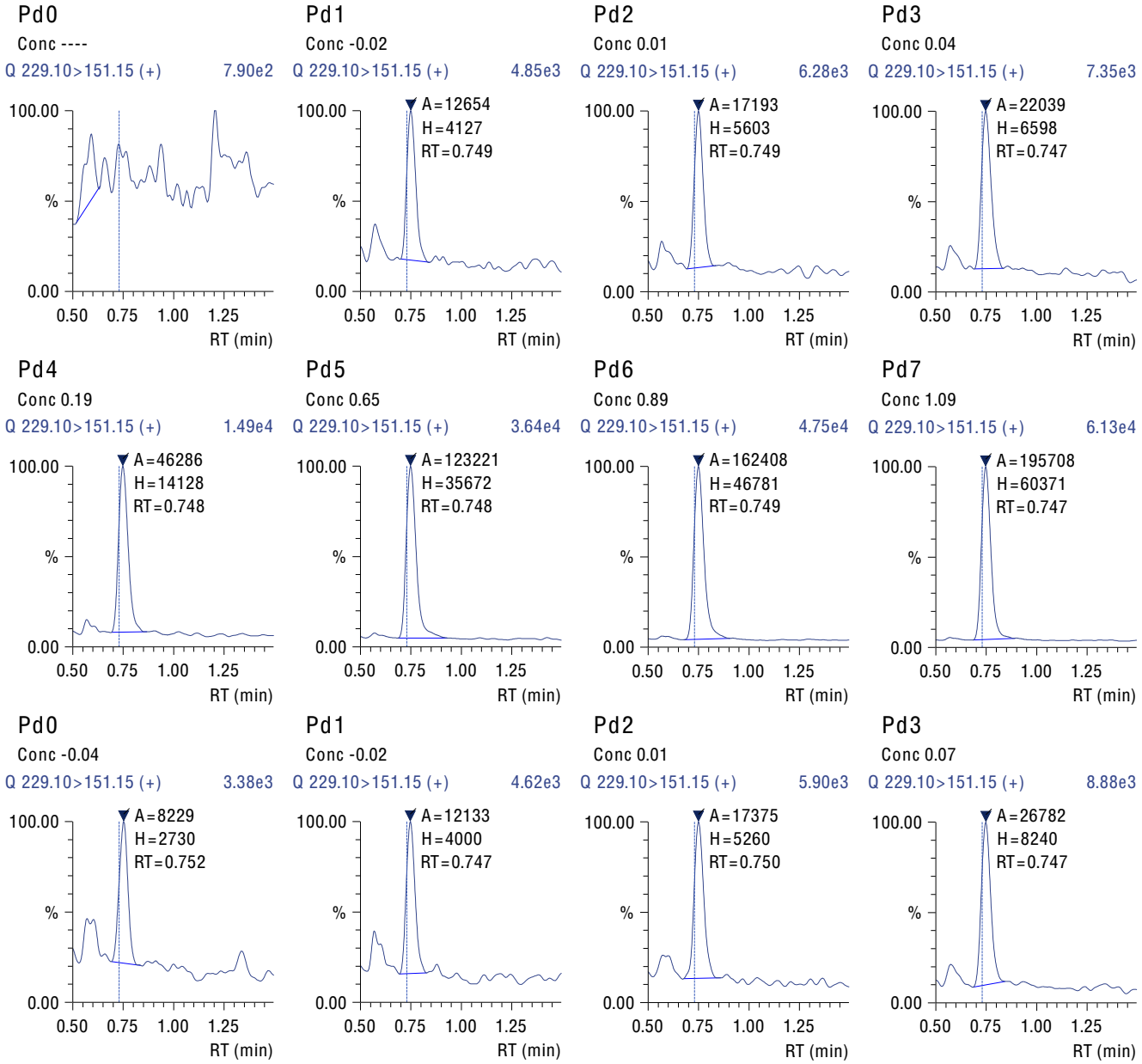
Insight Report

Printed at 3/30/2021 4:45:43 PM

Compound: BP3 - Benzofenona-3 (continued)

(Table continued from previous page)

Sample Name	Sample ID	Found RT	Area	Conc.	S/N
Pd7	_4_H2OSal	0.747	185623	1.03	182.96
Pd0	_1_H2OSal	----	----	----	----
Pd1	_1_H2OSal	0.745	11688	-0.02	10.47
Pd2	_1_H2OSal	0.746	17240	0.01	18.12
Pd3	_1_H2OSal	0.745	22762	0.04	18.68
Pd4	_1_H2OSal	0.747	46201	0.19	32.39
Pd5	_1_H2OSal	0.747	116740	0.61	90.50
Pd6	_1_H2OSal	0.746	154312	0.84	121.05
Pd7	_1_H2OSal	0.745	187232	1.04	141.35

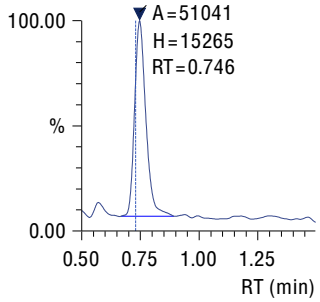


Insight Report

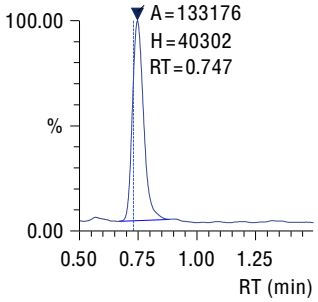
Printed at 3/30/2021 4:45:43 PM

Compound: BP3 - Benzofenona-3 (continued)

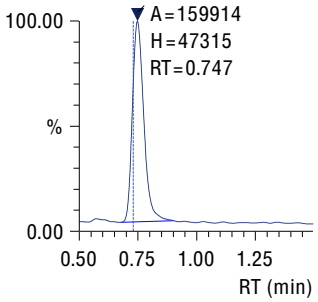
Pd4
Conc 0.22
Q 229.10>151.15 (+) 1.59e4



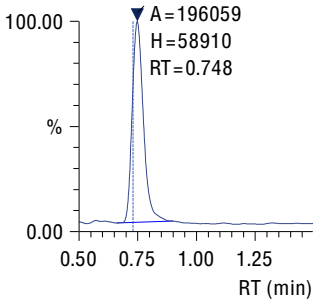
Pd5
Conc 0.71
Q 229.10>151.15 (+) 4.12e4



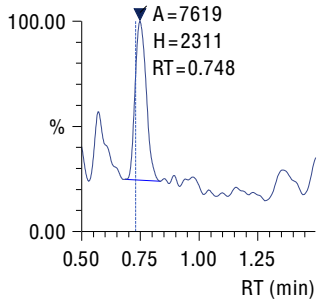
Pd6
Conc 0.87
Q 229.10>151.15 (+) 4.81e4



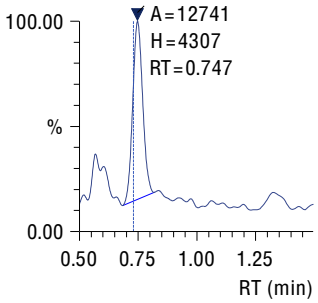
Pd7
Conc 1.09
Q 229.10>151.15 (+) 5.98e4



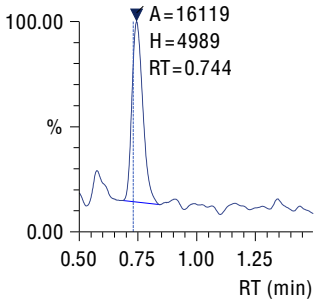
Pd0
Conc -0.05
Q 229.10>151.15 (+) 2.97e3



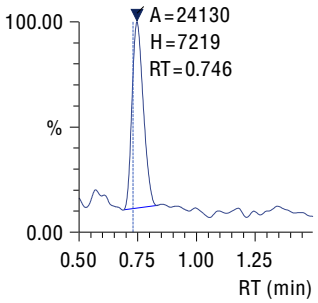
Pd1
Conc -0.02
Q 229.10>151.15 (+) 4.93e3



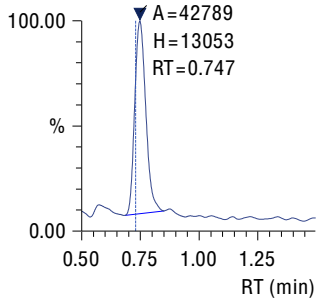
Pd2
Conc 0.00
Q 229.10>151.15 (+) 5.64e3



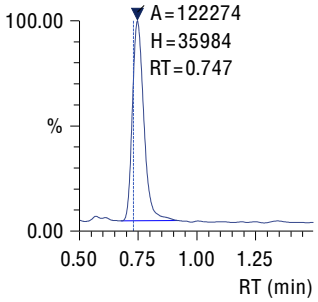
Pd3
Conc 0.05
Q 229.10>151.15 (+) 7.92e3



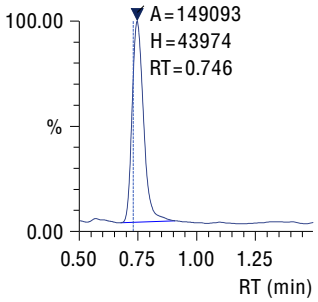
Pd4
Conc 0.17
Q 229.10>151.15 (+) 1.38e4



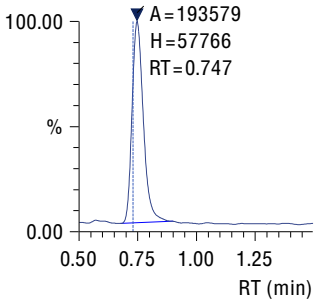
Pd5
Conc 0.64
Q 229.10>151.15 (+) 3.67e4



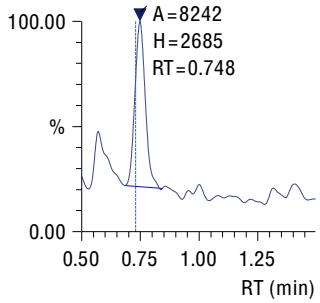
Pd6
Conc 0.81
Q 229.10>151.15 (+) 4.47e4



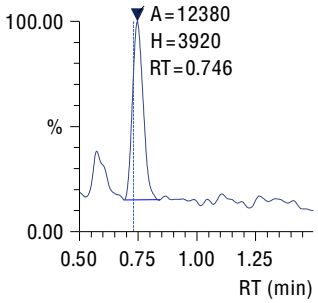
Pd7
Conc 1.07
Q 229.10>151.15 (+) 5.86e4



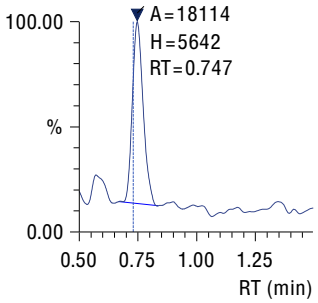
Pd0
Conc -0.04
Q 229.10>151.15 (+) 3.31e3



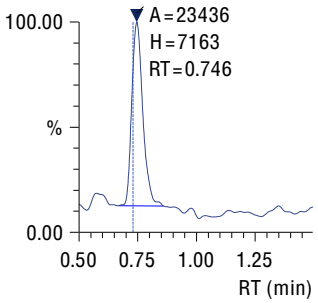
Pd1
Conc -0.02
Q 229.10>151.15 (+) 4.48e3



Pd2
Conc 0.02
Q 229.10>151.15 (+) 6.33e3



Pd3
Conc 0.05
Q 229.10>151.15 (+) 7.95e3

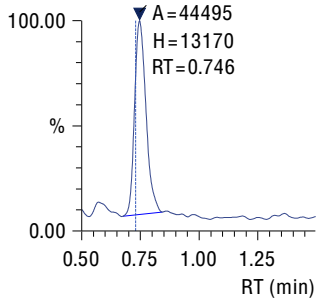


Insight Report

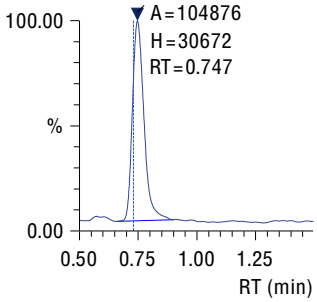
Printed at 3/30/2021 4:45:43 PM

Compound: BP3 - Benzofenona-3 (continued)

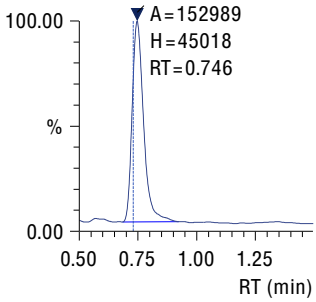
Pd4
Conc 0.18
Q 229.10>151.15 (+) 1.39e4



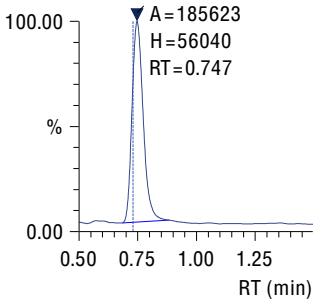
Pd5
Conc 0.54
Q 229.10>151.15 (+) 3.13e4



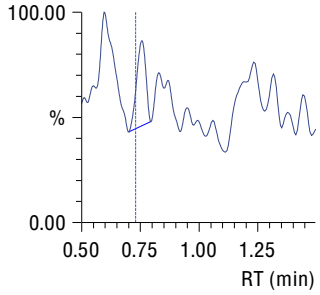
Pd6
Conc 0.83
Q 229.10>151.15 (+) 4.57e4



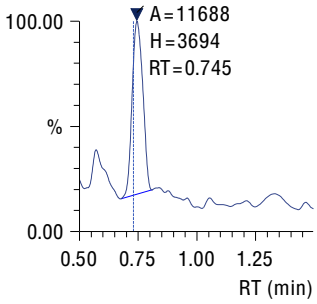
Pd7
Conc 1.03
Q 229.10>151.15 (+) 5.70e4



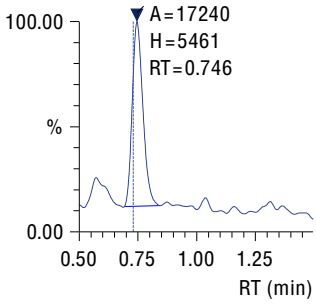
Pd0
Conc ----
Q 229.10>151.15 (+) 7.36e2



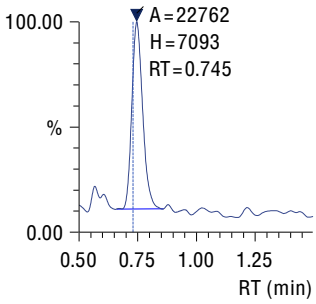
Pd1
Conc -0.02
Q 229.10>151.15 (+) 4.36e3



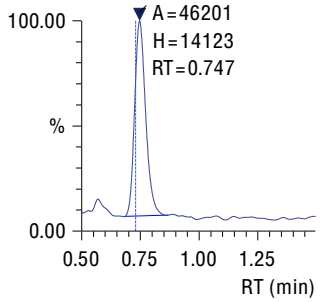
Pd2
Conc 0.01
Q 229.10>151.15 (+) 6.04e3



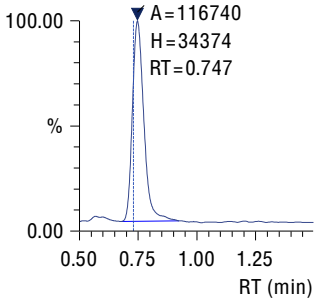
Pd3
Conc 0.04
Q 229.10>151.15 (+) 7.74e3



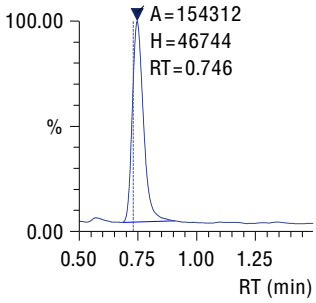
Pd4
Conc 0.19
Q 229.10>151.15 (+) 1.48e4



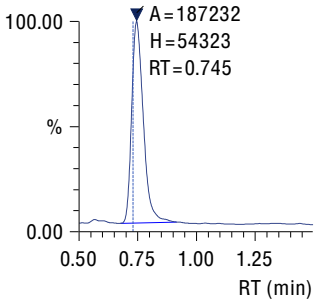
Pd5
Conc 0.61
Q 229.10>151.15 (+) 3.50e4



Pd6
Conc 0.84
Q 229.10>151.15 (+) 4.75e4



Pd7
Conc 1.04
Q 229.10>151.15 (+) 5.51e4

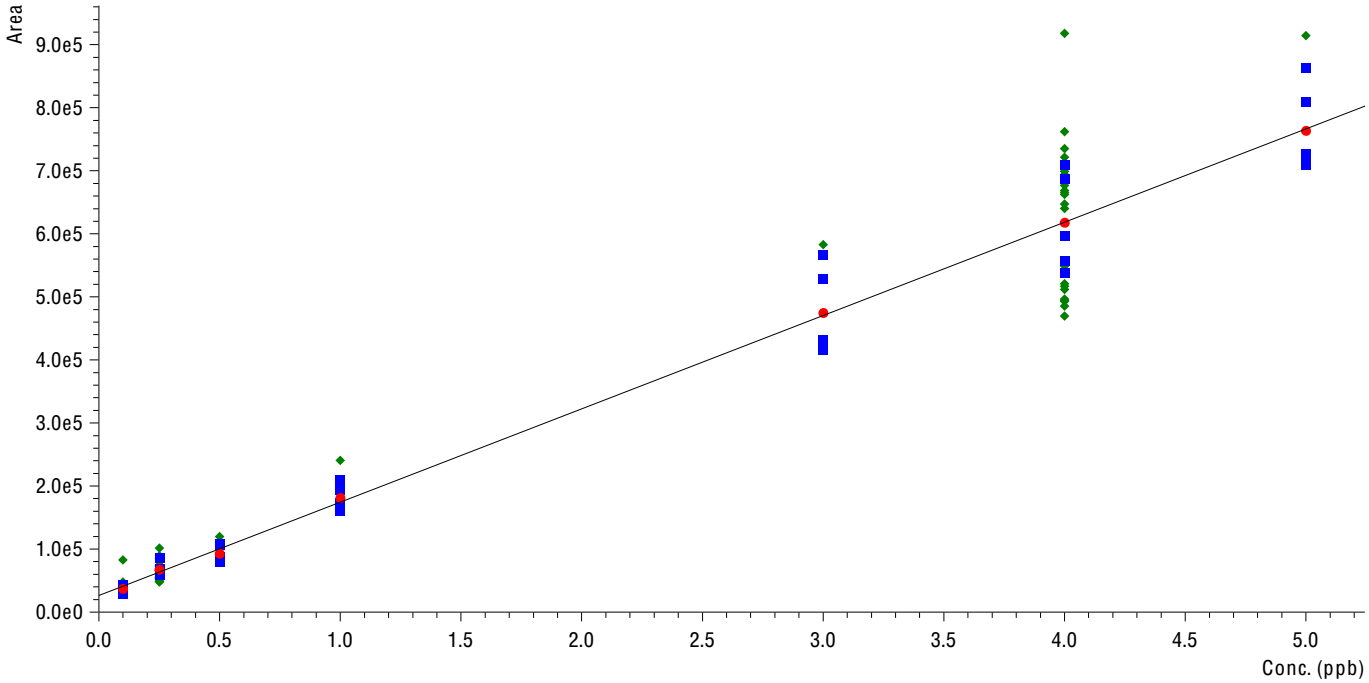


Insight Report

Printed at 3/30/2021 4:45:43 PM

Compound: OMC - Octinoxato

Curve Fit: Linear | Weighting: None | Zero: Not Forced
Quantitative Method: External Standard
Q 291.20>161.15
R^2 = 0.9996864 R = 0.9998432
y = 147964.1x + 26538.75



Sample Name	Sample ID	Found RT	Area	Conc.	S/N
Pd0	_1_H2OSal	2.084	898942	5.90	287.84
Pd1	_1_H2OSal	2.069	74208	0.32	24.23
Pd2	_1_H2OSal	2.068	815919	5.33	139.81
Pd3	_1_H2OSal	2.065	58472	0.22	18.50
Pd4	_1_H2OSal	2.064	76832	0.34	24.44
Pd5	_1_H2OSal	2.063	79519	0.36	16.57
Pd6	_1_H2OSal	2.062	105890	0.54	30.76
Pd7	_1_H2OSal	2.063	112332	0.58	38.12
Pd0	_2_H2OSal	2.059	70883	0.30	30.59
Pd1	_2_H2OSal	2.049	79778	0.36	23.78
Pd2	_2_H2OSal	2.058	58074	0.21	19.49
Pd3	_2_H2OSal	2.060	64211	0.25	24.15
Pd4	_2_H2OSal	2.059	68486	0.28	25.04
Pd5	_2_H2OSal	2.057	83805	0.39	21.53
Pd6	_2_H2OSal	2.055	85426	0.40	27.68
Pd7	_2_H2OSal	2.060	78715	0.35	25.48
Pd0	_3_H2OSal	2.058	74040	0.32	22.62
Pd1	_3_H2OSal	2.056	79560	0.36	24.14
Pd2	_3_H2OSal	2.053	60075	0.23	20.28
Pd3	_3_H2OSal	2.057	54298	0.19	14.86
Pd4	_3_H2OSal	2.058	61819	0.24	15.53
Pd5	_3_H2OSal	2.059	79082	0.36	31.02
Pd6	_3_H2OSal	2.056	75813	0.33	22.29
Pd7	_3_H2OSal	2.058	77159	0.34	29.00
Pd0	_4_H2OSal	2.056	66191	0.27	16.26
Pd1	_4_H2OSal	2.054	64369	0.26	23.94
Pd2	_4_H2OSal	2.053	67885	0.28	26.03
Pd3	_4_H2OSal	2.057	62328	0.24	17.77
Pd4	_4_H2OSal	2.056	69344	0.29	19.00
Pd5	_4_H2OSal	2.055	68400	0.28	27.98
Pd6	_4_H2OSal	2.053	78143	0.35	25.88
Pd7	_4_H2OSal	2.057	78969	0.35	21.24
Pd0	_1_H2OSal	2.065	907525	5.95	364.65
Pd1	_1_H2OSal	2.058	59436	0.22	17.64

Insight Report

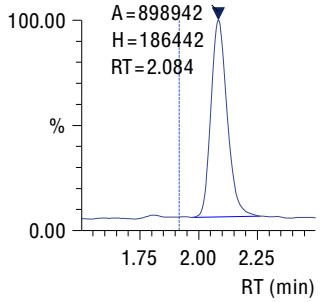
Printed at 3/30/2021 4:45:43 PM

Compound: OMC - Octinoxato (continued)

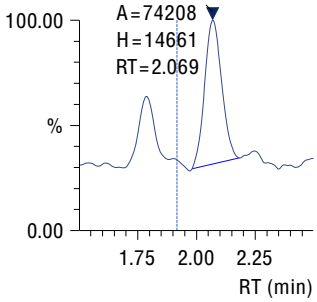
(Table continued from previous page)

Sample Name	Sample ID	Found RT	Area	Conc.	S/N
Pd2	_1_H2OSal	2.054	789168	5.15	163.40
Pd3	_1_H2OSal	2.055	60215	0.23	20.55
Pd4	_1_H2OSal	2.057	70593	0.30	23.29
Pd5	_1_H2OSal	2.053	79750	0.36	17.52
Pd6	_1_H2OSal	2.053	110621	0.57	31.83
Pd7	_1_H2OSal	2.058	100165	0.50	30.19

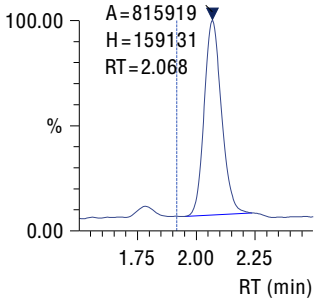
Pd0
Conc 5.90
Q 291.20>161.15 (+) 1.94e5



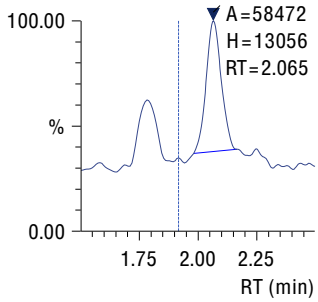
Pd1
Conc 0.32
Q 291.20>161.15 (+) 2.08e4



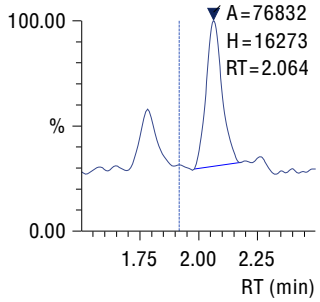
Pd2
Conc 5.33
Q 291.20>161.15 (+) 1.67e5



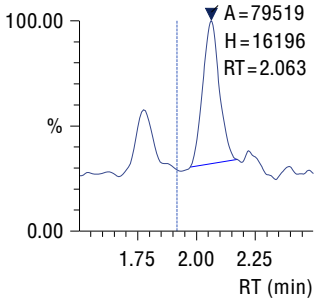
Pd3
Conc 0.22
Q 291.20>161.15 (+) 2.04e4



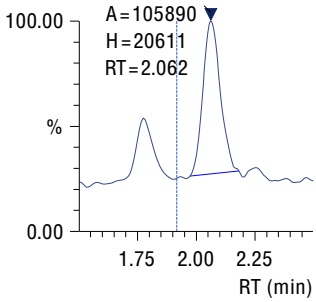
Pd4
Conc 0.34
Q 291.20>161.15 (+) 2.28e4



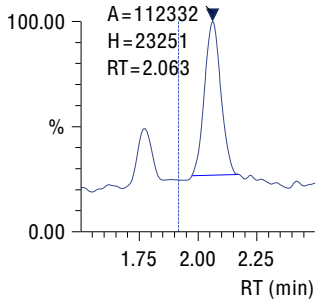
Pd5
Conc 0.36
Q 291.20>161.15 (+) 2.31e4



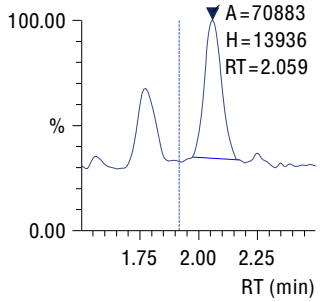
Pd6
Conc 0.54
Q 291.20>161.15 (+) 2.76e4



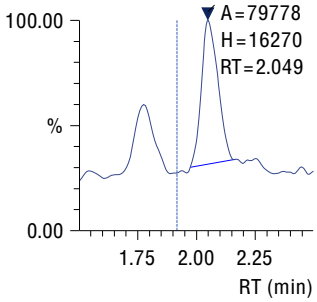
Pd7
Conc 0.58
Q 291.20>161.15 (+) 3.09e4



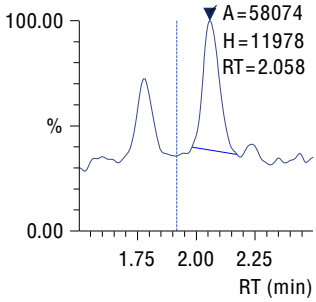
Pd0
Conc 0.30
Q 291.20>161.15 (+) 2.06e4



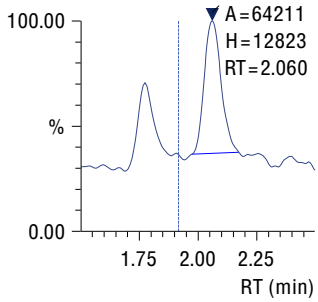
Pd1
Conc 0.36
Q 291.20>161.15 (+) 2.31e4



Pd2
Conc 0.21
Q 291.20>161.15 (+) 1.89e4



Pd3
Conc 0.25
Q 291.20>161.15 (+) 1.98e4

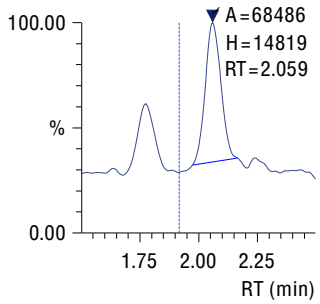


Insight Report

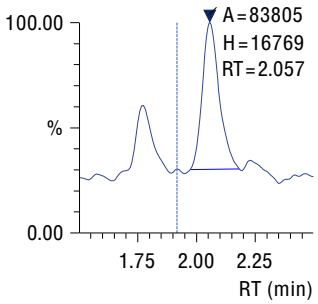
Printed at 3/30/2021 4:45:43 PM

Compound: OMC - Octinoxato (continued)

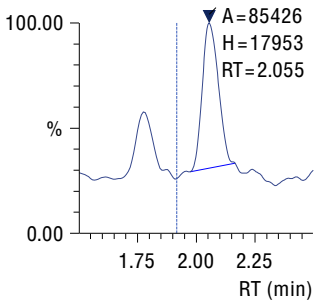
Pd4
Conc 0.28
Q 291.20>161.15 (+) 2.17e4



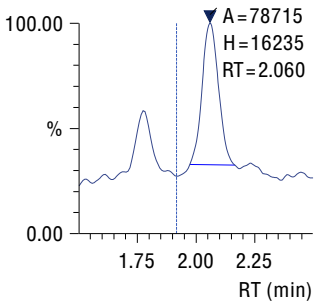
Pd5
Conc 0.39
Q 291.20>161.15 (+) 2.34e4



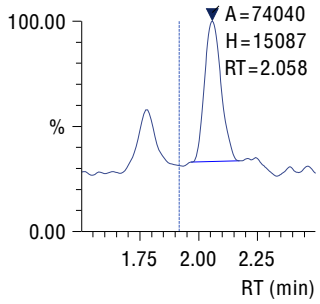
Pd6
Conc 0.40
Q 291.20>161.15 (+) 2.52e4



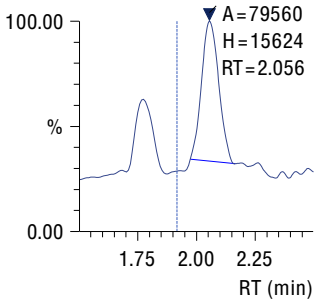
Pd7
Conc 0.35
Q 291.20>161.15 (+) 2.34e4



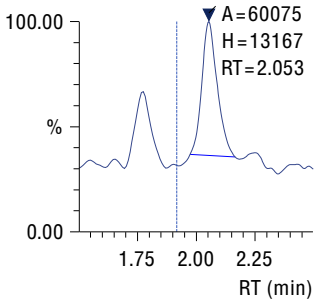
Pd0
Conc 0.32
Q 291.20>161.15 (+) 2.20e4



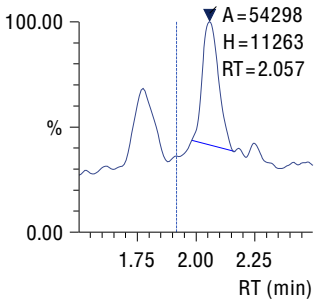
Pd1
Conc 0.36
Q 291.20>161.15 (+) 2.28e4



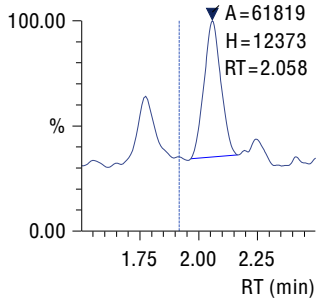
Pd2
Conc 0.23
Q 291.20>161.15 (+) 2.01e4



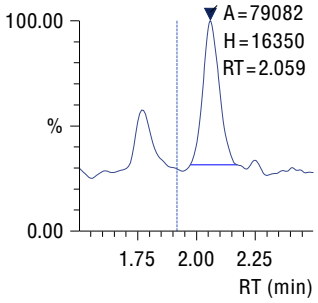
Pd3
Conc 0.19
Q 291.20>161.15 (+) 1.87e4



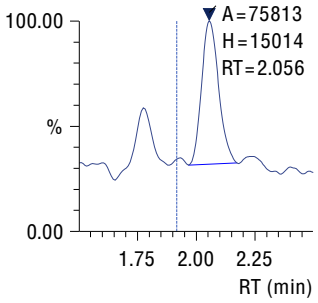
Pd4
Conc 0.24
Q 291.20>161.15 (+) 1.85e4



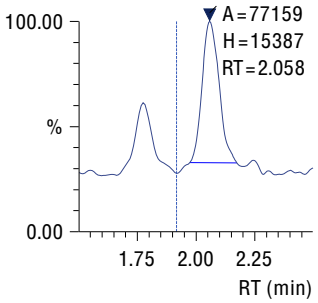
Pd5
Conc 0.36
Q 291.20>161.15 (+) 2.32e4



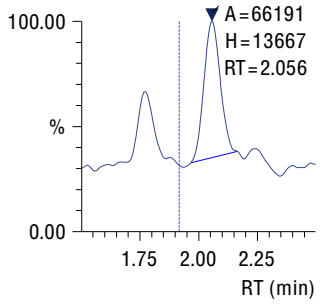
Pd6
Conc 0.33
Q 291.20>161.15 (+) 2.14e4



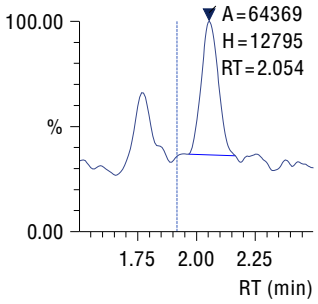
Pd7
Conc 0.34
Q 291.20>161.15 (+) 2.22e4



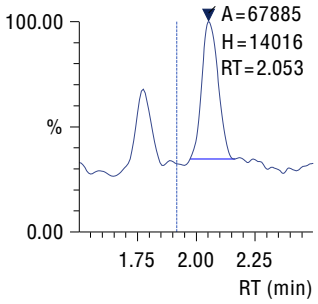
Pd0
Conc 0.27
Q 291.20>161.15 (+) 2.05e4



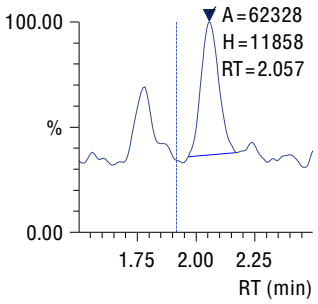
Pd1
Conc 0.26
Q 291.20>161.15 (+) 1.95e4



Pd2
Conc 0.28
Q 291.20>161.15 (+) 2.09e4



Pd3
Conc 0.24
Q 291.20>161.15 (+) 1.82e4

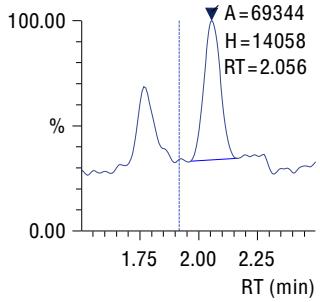


Insight Report

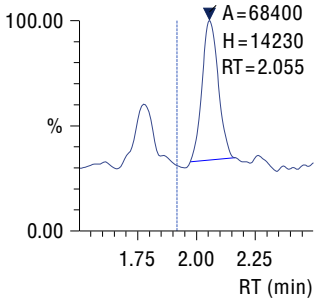
Printed at 3/30/2021 4:45:43 PM

Compound: OMC - Octinoxato (continued)

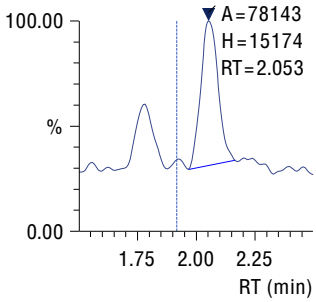
Pd4
Conc 0.29
Q 291.20>161.15 (+) 2.06e4



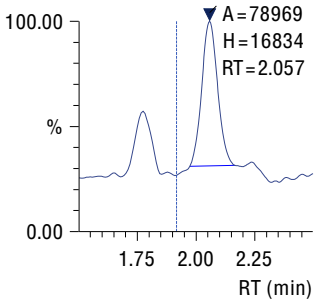
Pd5
Conc 0.28
Q 291.20>161.15 (+) 2.08e4



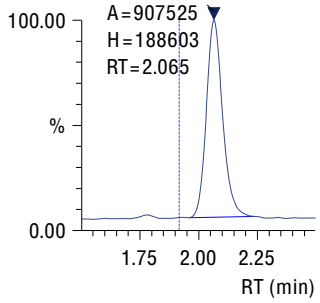
Pd6
Conc 0.35
Q 291.20>161.15 (+) 2.14e4



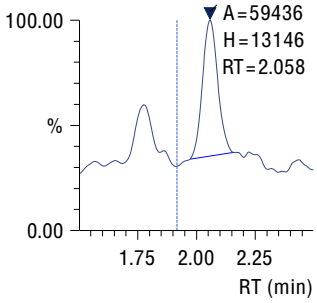
Pd7
Conc 0.35
Q 291.20>161.15 (+) 2.38e4



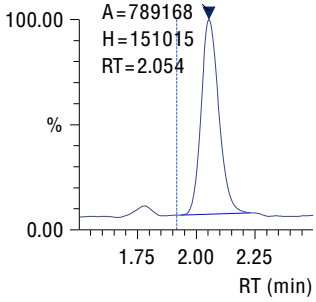
Pd0
Conc 5.95
Q 291.20>161.15 (+) 1.96e5



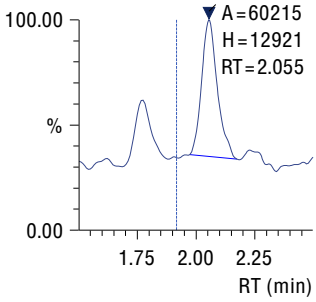
Pd1
Conc 0.22
Q 291.20>161.15 (+) 1.98e4



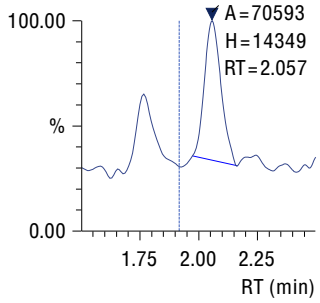
Pd2
Conc 5.15
Q 291.20>161.15 (+) 1.58e5



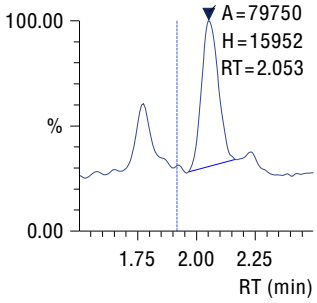
Pd3
Conc 0.23
Q 291.20>161.15 (+) 1.93e4



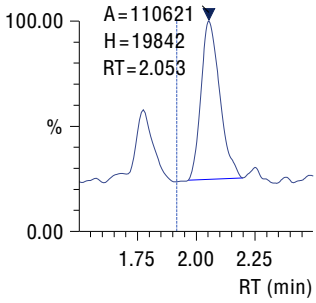
Pd4
Conc 0.30
Q 291.20>161.15 (+) 2.10e4



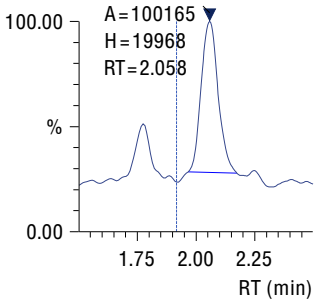
Pd5
Conc 0.36
Q 291.20>161.15 (+) 2.24e4



Pd6
Conc 0.57
Q 291.20>161.15 (+) 2.56e4



Pd7
Conc 0.50
Q 291.20>161.15 (+) 2.70e4

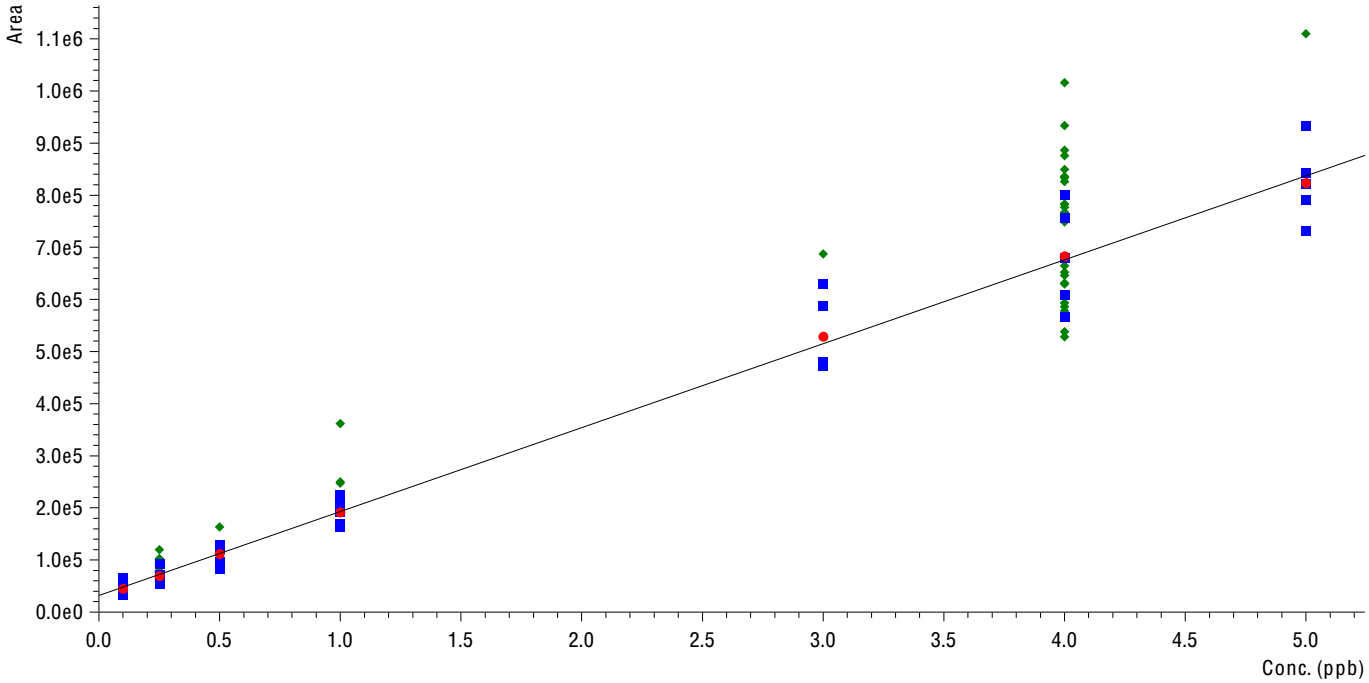


Insight Report

Printed at 3/30/2021 4:45:43 PM

Compound: BMDM - Avobenzona

Curve Fit: Linear | Weighting: None | Zero: Not Forced
Quantitative Method: External Standard
Q 311.20>161.20
R^2 = 0.9992920 R = 0.9996459
y = 161058.5x + 31730.33



Sample Name	Sample ID	Found RT	Area	Conc.	S/N
Pd0	_1_H2OSal	2.086	119531	0.55	104.55
Pd1	_1_H2OSal	2.075	3703	-0.17	3.98
Pd2	_1_H2OSal	2.067	126526	0.59	58.79
Pd3	_1_H2OSal	2.055	13152	-0.12	9.16
Pd4	_1_H2OSal	2.066	22013	-0.06	15.92
Pd5	_1_H2OSal	2.061	48027	0.10	22.00
Pd6	_1_H2OSal	2.060	65929	0.21	45.93
Pd7	_1_H2OSal	2.061	78386	0.29	41.19
Pd0	_2_H2OSal	2.041	5624	-0.16	4.36
Pd1	_2_H2OSal	2.065	5755	-0.16	4.82
Pd2	_2_H2OSal	2.063	12254	-0.12	7.94
Pd3	_2_H2OSal	2.057	13364	-0.11	10.66
Pd4	_2_H2OSal	2.059	19140	-0.08	14.53
Pd5	_2_H2OSal	2.052	51463	0.12	28.04
Pd6	_2_H2OSal	2.053	55533	0.15	32.24
Pd7	_2_H2OSal	2.057	80151	0.30	50.07
Pd0	_3_H2OSal	----	----	----	----
Pd1	_3_H2OSal	2.063	6888	-0.15	6.28
Pd2	_3_H2OSal	2.060	8859	-0.14	9.86
Pd3	_3_H2OSal	2.057	12734	-0.12	11.62
Pd4	_3_H2OSal	2.049	21276	-0.06	13.95
Pd5	_3_H2OSal	2.060	45055	0.08	29.46
Pd6	_3_H2OSal	2.055	53711	0.14	34.18
Pd7	_3_H2OSal	2.060	73162	0.26	40.89
Pd0	_4_H2OSal	2.066	6836	-0.15	3.66
Pd1	_4_H2OSal	2.054	7827	-0.15	5.29
Pd2	_4_H2OSal	2.067	10296	-0.13	7.62
Pd3	_4_H2OSal	2.047	11811	-0.12	7.89
Pd4	_4_H2OSal	2.053	19775	-0.07	11.58
Pd5	_4_H2OSal	2.052	45553	0.09	25.94
Pd6	_4_H2OSal	2.049	55945	0.15	41.66
Pd7	_4_H2OSal	2.052	69605	0.24	47.90
Pd0	_1_H2OSal	2.067	125956	0.59	103.82
Pd1	_1_H2OSal	2.049	9864	-0.14	5.50

Insight Report

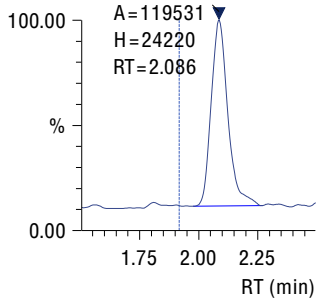
Printed at 3/30/2021 4:45:43 PM

Compound: BMDM - Avobenzona (continued)

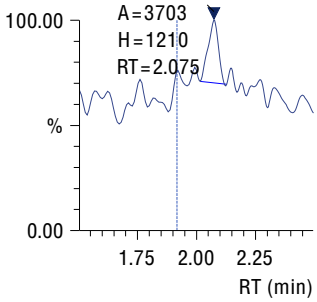
(Table continued from previous page)

Sample Name	Sample ID	Found RT	Area	Conc.	S/N
Pd2	_1_H2OSal	2.056	119775	0.55	65.09
Pd3	_1_H2OSal	2.049	10822	-0.13	10.00
Pd4	_1_H2OSal	2.060	19077	-0.08	13.54
Pd5	_1_H2OSal	2.046	45102	0.08	23.03
Pd6	_1_H2OSal	2.051	61170	0.18	40.12
Pd7	_1_H2OSal	2.053	76260	0.28	45.06

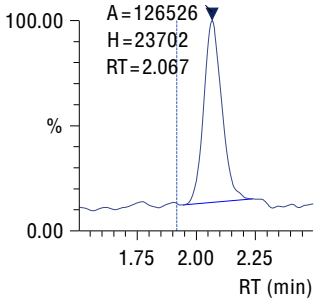
Pd0
Conc 0.55
Q 311.20>161.20 (+) 2.66e4



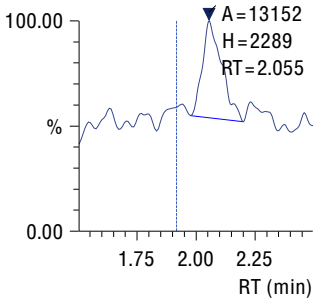
Pd1
Conc -0.17
Q 311.20>161.20 (+) 3.95e3



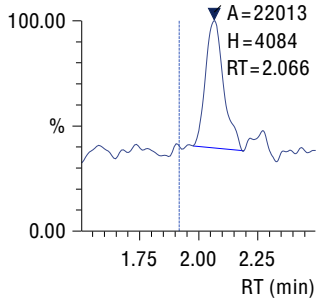
Pd2
Conc 0.59
Q 311.20>161.20 (+) 2.66e4



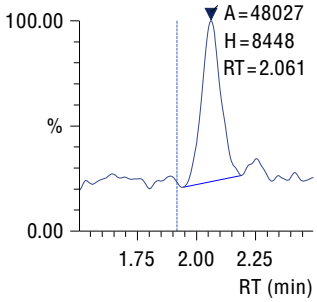
Pd3
Conc -0.12
Q 311.20>161.20 (+) 4.82e3



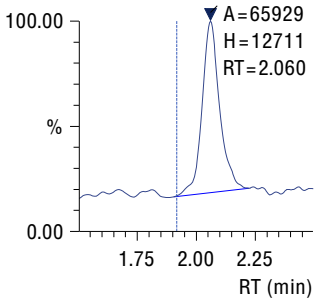
Pd4
Conc -0.06
Q 311.20>161.20 (+) 6.56e3



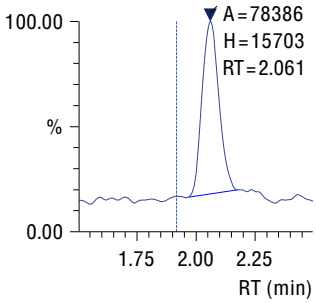
Pd5
Conc 0.10
Q 311.20>161.20 (+) 1.07e4



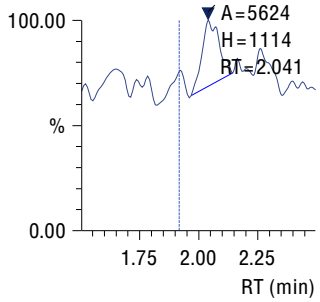
Pd6
Conc 0.21
Q 311.20>161.20 (+) 1.51e4



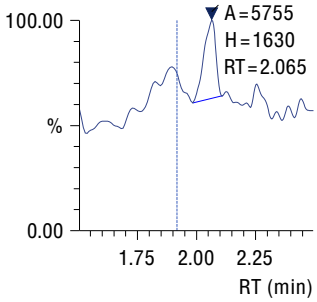
Pd7
Conc 0.29
Q 311.20>161.20 (+) 1.86e4



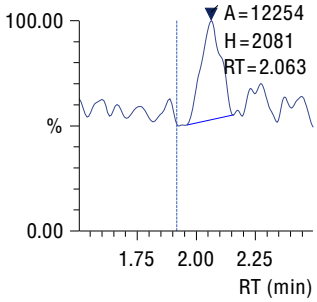
Pd0
Conc -0.16
Q 311.20>161.20 (+) 3.45e3



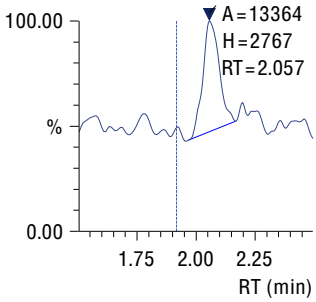
Pd1
Conc -0.16
Q 311.20>161.20 (+) 4.27e3



Pd2
Conc -0.12
Q 311.20>161.20 (+) 4.29e3



Pd3
Conc -0.11
Q 311.20>161.20 (+) 5.10e3

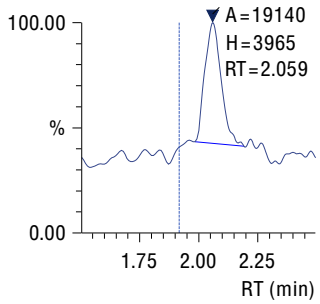


Insight Report

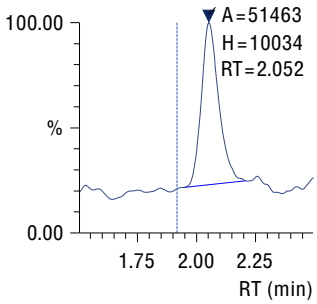
Printed at 3/30/2021 4:45:43 PM

Compound: BMDM - Avobenzona (continued)

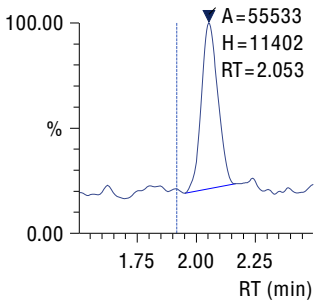
Pd4
Conc -0.08
Q 311.20>161.20 (+) 6.71e3



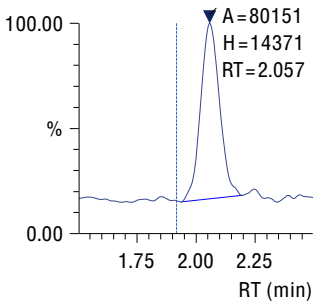
Pd5
Conc 0.12
Q 311.20>161.20 (+) 1.26e4



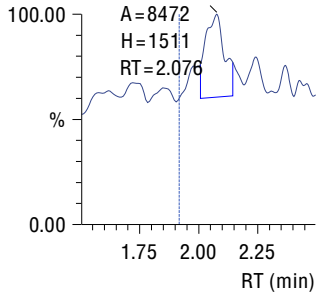
Pd6
Conc 0.15
Q 311.20>161.20 (+) 1.40e4



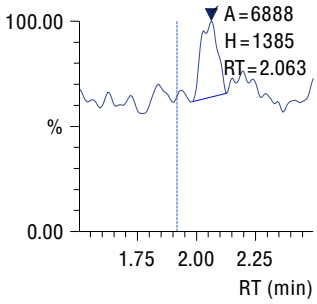
Pd7
Conc 0.30
Q 311.20>161.20 (+) 1.67e4



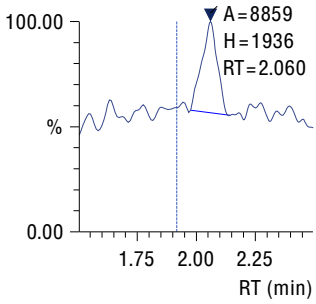
Pd0
Conc ----
Q 311.20>161.20 (+) 3.72e3



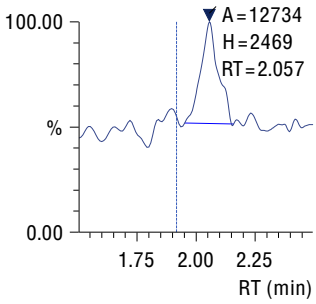
Pd1
Conc -0.15
Q 311.20>161.20 (+) 3.73e3



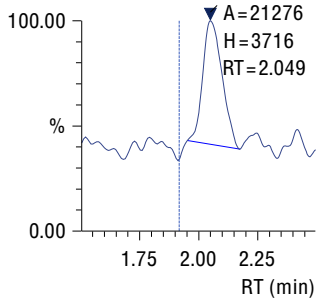
Pd2
Conc -0.14
Q 311.20>161.20 (+) 4.33e3



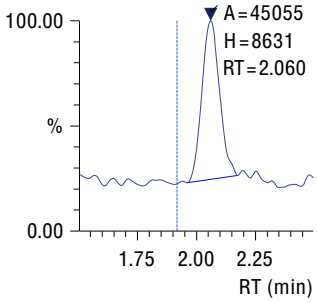
Pd3
Conc -0.12
Q 311.20>161.20 (+) 4.96e3



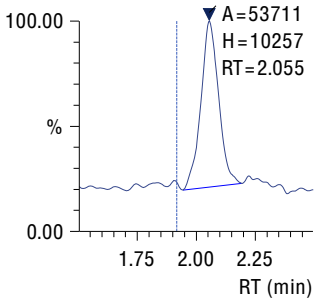
Pd4
Conc -0.06
Q 311.20>161.20 (+) 6.15e3



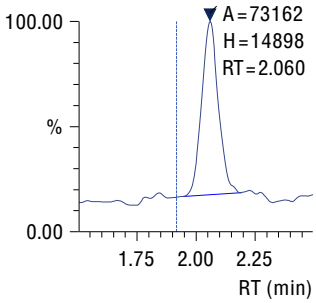
Pd5
Conc 0.08
Q 311.20>161.20 (+) 1.11e4



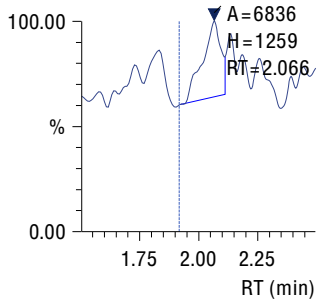
Pd6
Conc 0.14
Q 311.20>161.20 (+) 1.26e4



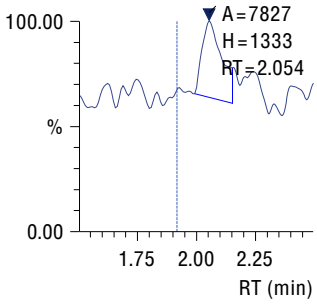
Pd7
Conc 0.26
Q 311.20>161.20 (+) 1.76e4



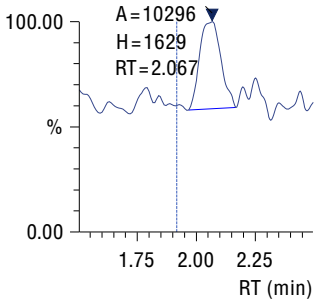
Pd0
Conc -0.15
Q 311.20>161.20 (+) 3.41e3



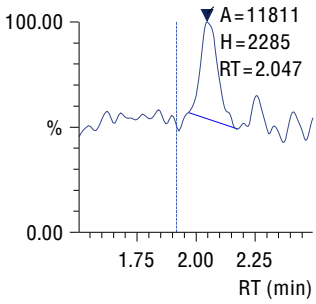
Pd1
Conc -0.15
Q 311.20>161.20 (+) 3.58e3



Pd2
Conc -0.13
Q 311.20>161.20 (+) 3.83e3



Pd3
Conc -0.12
Q 311.20>161.20 (+) 4.82e3

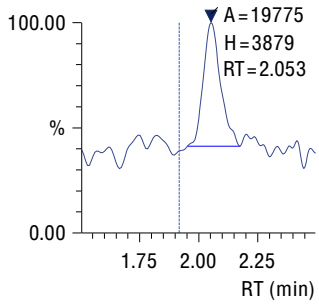


Insight Report

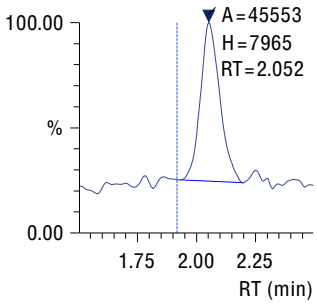
Printed at 3/30/2021 4:45:43 PM

Compound: BMDM - Avobenzona (continued)

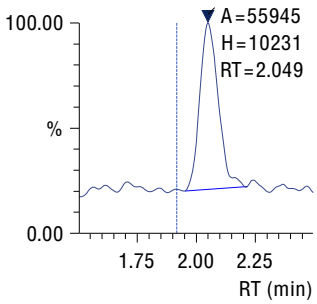
Pd4
Conc -0.07
Q 311.20>161.20 (+) 6.41e3



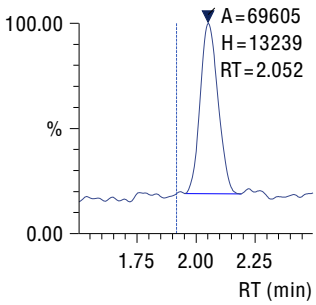
Pd5
Conc 0.09
Q 311.20>161.20 (+) 1.03e4



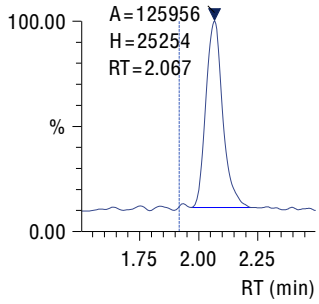
Pd6
Conc 0.15
Q 311.20>161.20 (+) 1.26e4



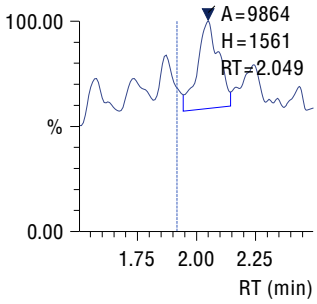
Pd7
Conc 0.24
Q 311.20>161.20 (+) 1.59e4



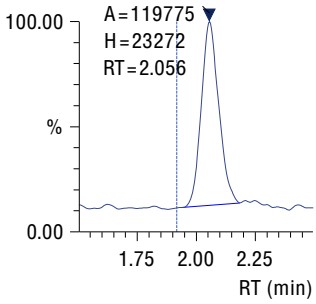
Pd0
Conc 0.59
Q 311.20>161.20 (+) 2.77e4



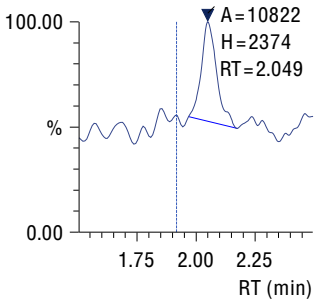
Pd1
Conc -0.14
Q 311.20>161.20 (+) 3.65e3



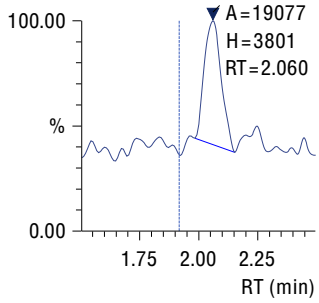
Pd2
Conc 0.55
Q 311.20>161.20 (+) 2.58e4



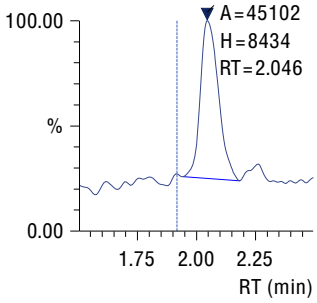
Pd3
Conc -0.13
Q 311.20>161.20 (+) 4.88e3



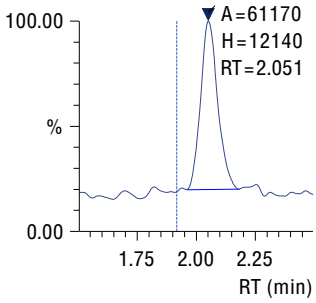
Pd4
Conc -0.08
Q 311.20>161.20 (+) 6.27e3



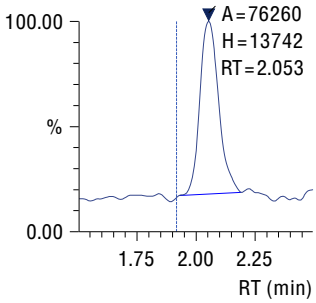
Pd5
Conc 0.08
Q 311.20>161.20 (+) 1.09e4



Pd6
Conc 0.18
Q 311.20>161.20 (+) 1.47e4



Pd7
Conc 0.28
Q 311.20>161.20 (+) 1.63e4

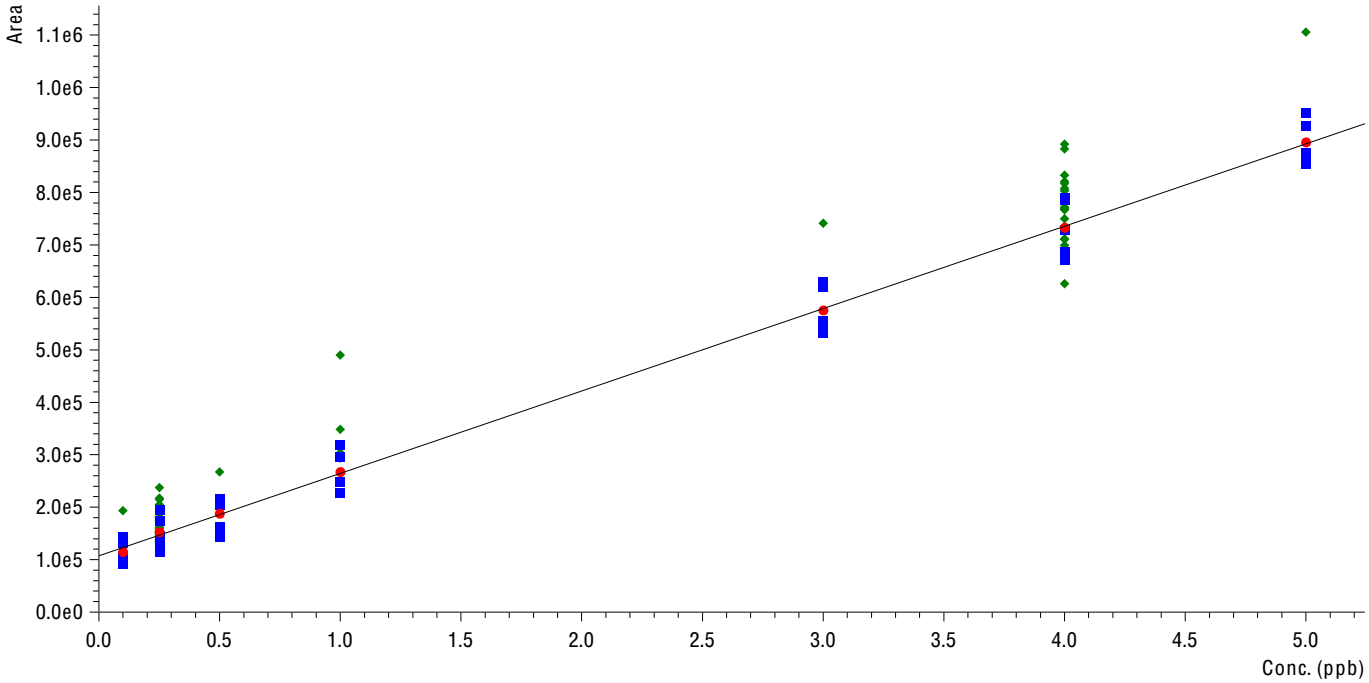


Insight Report

Printed at 3/30/2021 4:45:43 PM

Compound: OCT aduto - Octocrileno

Curve Fit: Linear | Weighting: None | Zero: Not Forced
Quantitative Method: External Standard
Q 379.25>250.20
R^2 = 0.9997386 R = 0.9998693
y = 157080.7x + 107405.4



Sample Name	Sample ID	Found RT	Area	Conc.	S/N
Pd0	_1_H2OSal	----	----	----	----
Pd1	_1_H2OSal	1.503	24575	-0.53	4.70
Pd2	_1_H2OSal	1.497	33308	-0.47	5.44
Pd3	_1_H2OSal	1.506	29675	-0.49	5.15
Pd4	_1_H2OSal	1.497	35881	-0.46	6.76
Pd5	_1_H2OSal	1.490	53912	-0.34	10.49
Pd6	_1_H2OSal	1.490	63364	-0.28	11.27
Pd7	_1_H2OSal	1.494	77930	-0.19	15.42
Pd0	_2_H2OSal	1.491	25741	-0.52	4.98
Pd1	_2_H2OSal	1.489	26992	-0.51	5.29
Pd2	_2_H2OSal	1.493	31757	-0.48	6.59
Pd3	_2_H2OSal	1.489	27142	-0.51	5.75
Pd4	_2_H2OSal	1.491	35256	-0.46	6.96
Pd5	_2_H2OSal	1.490	59520	-0.30	12.64
Pd6	_2_H2OSal	1.491	79438	-0.18	15.47
Pd7	_2_H2OSal	1.493	82309	-0.16	14.48
Pd0	_3_H2OSal	1.491	26975	-0.51	4.53
Pd1	_3_H2OSal	1.486	25785	-0.52	5.52
Pd2	_3_H2OSal	1.489	32919	-0.47	5.48
Pd3	_3_H2OSal	1.487	34944	-0.46	6.98
Pd4	_3_H2OSal	1.486	35690	-0.46	7.39
Pd5	_3_H2OSal	1.492	58101	-0.31	10.62
Pd6	_3_H2OSal	1.490	60196	-0.30	13.17
Pd7	_3_H2OSal	1.491	71680	-0.23	13.23
Pd0	_4_H2OSal	1.488	25296	-0.52	4.71
Pd1	_4_H2OSal	1.490	26374	-0.52	5.32
Pd2	_4_H2OSal	1.488	25028	-0.52	6.06
Pd3	_4_H2OSal	1.489	32711	-0.48	5.69
Pd4	_4_H2OSal	1.491	30881	-0.49	7.06
Pd5	_4_H2OSal	1.489	48151	-0.38	9.49
Pd6	_4_H2OSal	1.490	63482	-0.28	12.15
Pd7	_4_H2OSal	1.488	70118	-0.24	13.57
Pd0	_1_H2OSal	----	----	----	----
Pd1	_1_H2OSal	1.488	25139	-0.52	5.84

Insight Report

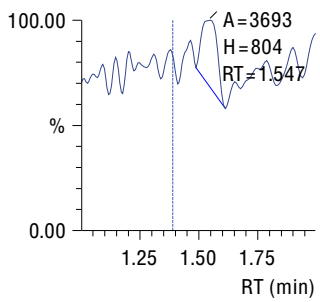
Printed at 3/30/2021 4:45:43 PM

Compound: OCT aduto - Octocrileno (continued)

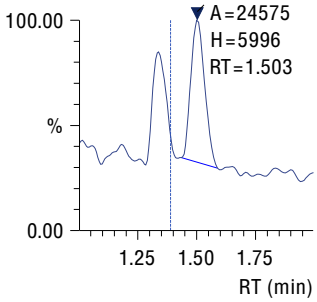
(Table continued from previous page)

Sample Name	Sample ID	Found RT	Area	Conc.	S/N
Pd2	_1_H2OSal	1.490	30123	-0.49	6.58
Pd3	_1_H2OSal	1.485	28874	-0.50	6.06
Pd4	_1_H2OSal	1.486	28714	-0.50	6.92
Pd5	_1_H2OSal	1.490	50137	-0.36	9.68
Pd6	_1_H2OSal	1.490	58765	-0.31	12.04
Pd7	_1_H2OSal	1.489	71205	-0.23	14.85

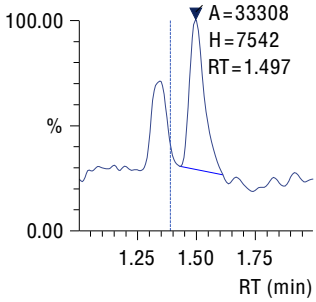
Pd0
Conc ----
Q 379.25>250.20 (+) 2.45e3



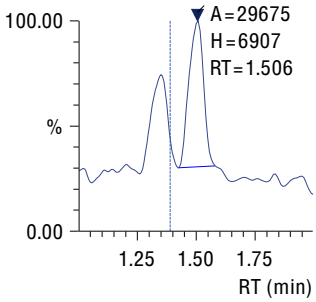
Pd1
Conc -0.53
Q 379.25>250.20 (+) 8.62e3



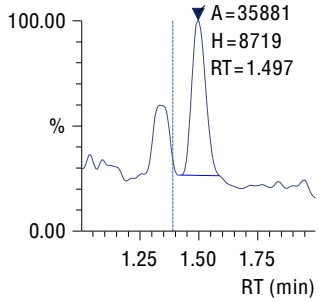
Pd2
Conc -0.47
Q 379.25>250.20 (+) 1.03e4



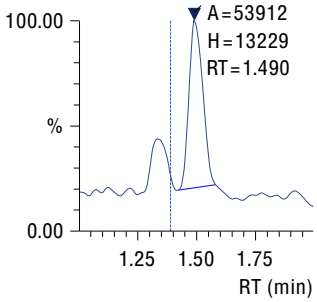
Pd3
Conc -0.49
Q 379.25>250.20 (+) 9.66e3



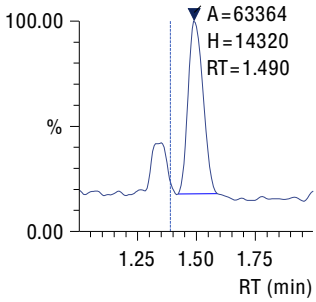
Pd4
Conc -0.46
Q 379.25>250.20 (+) 1.15e4



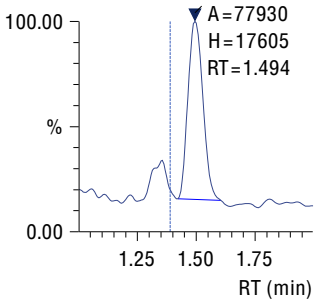
Pd5
Conc -0.34
Q 379.25>250.20 (+) 1.62e4



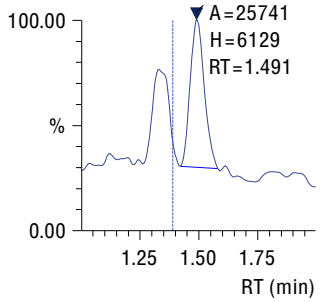
Pd6
Conc -0.28
Q 379.25>250.20 (+) 1.69e4



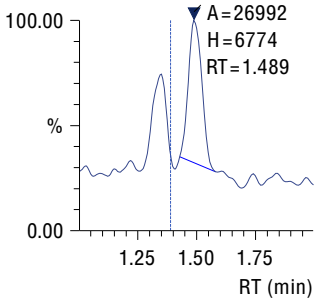
Pd7
Conc -0.19
Q 379.25>250.20 (+) 2.02e4



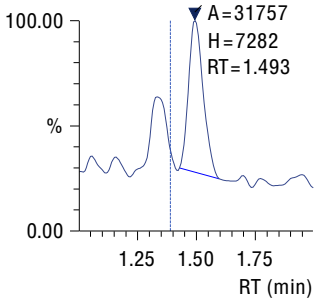
Pd0
Conc -0.52
Q 379.25>250.20 (+) 8.51e3



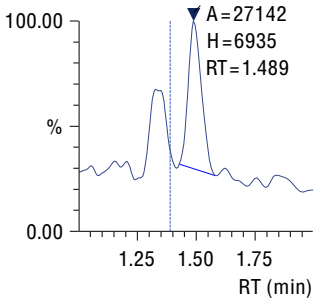
Pd1
Conc -0.51
Q 379.25>250.20 (+) 9.72e3



Pd2
Conc -0.48
Q 379.25>250.20 (+) 9.81e3



Pd3
Conc -0.51
Q 379.25>250.20 (+) 9.58e3

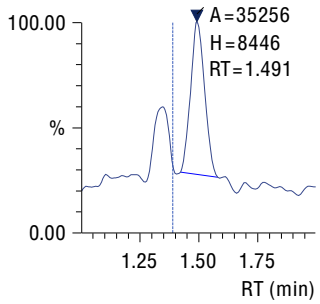


Insight Report

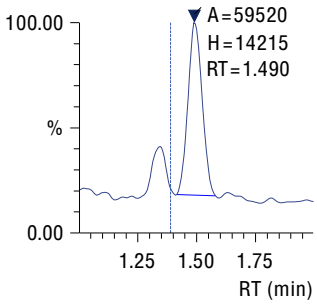
Printed at 3/30/2021 4:45:43 PM

Compound: OCT aduto - Octocrileno (continued)

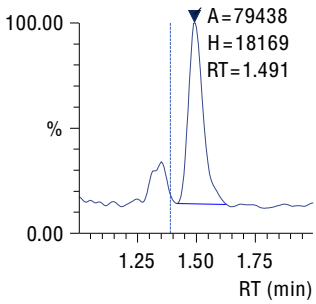
Pd4
Conc -0.46
Q 379.25>250.20 (+) 1.14e4



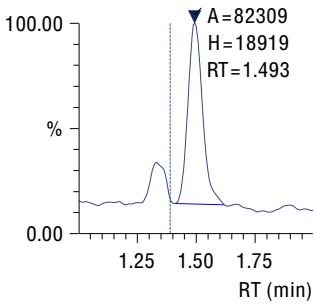
Pd5
Conc -0.30
Q 379.25>250.20 (+) 1.68e4



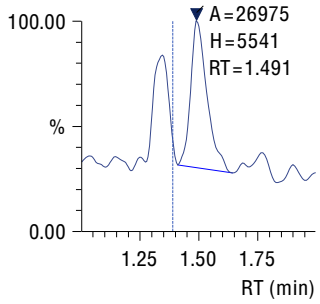
Pd6
Conc -0.18
Q 379.25>250.20 (+) 2.05e4



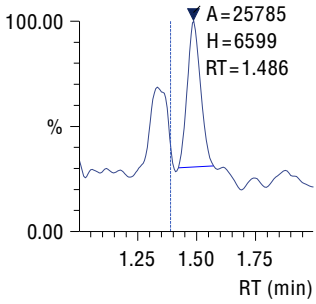
Pd7
Conc -0.16
Q 379.25>250.20 (+) 2.14e4



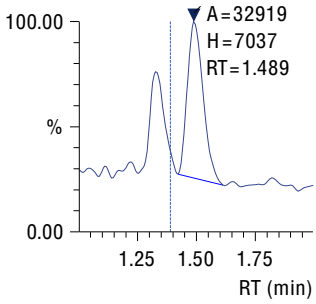
Pd0
Conc -0.51
Q 379.25>250.20 (+) 7.72e3



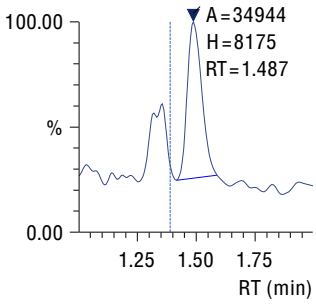
Pd1
Conc -0.52
Q 379.25>250.20 (+) 9.24e3



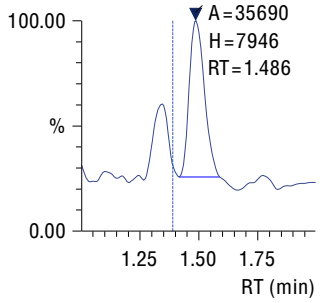
Pd2
Conc -0.47
Q 379.25>250.20 (+) 9.18e3



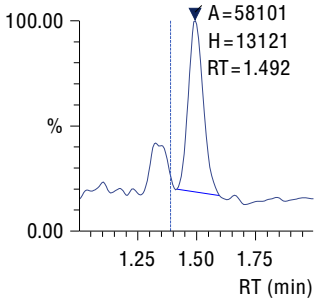
Pd3
Conc -0.46
Q 379.25>250.20 (+) 1.07e4



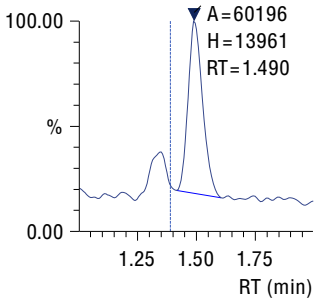
Pd4
Conc -0.46
Q 379.25>250.20 (+) 1.04e4



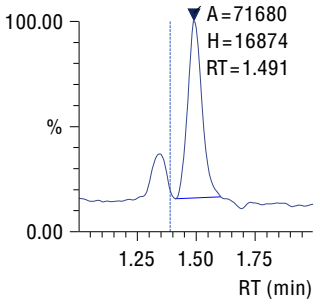
Pd5
Conc -0.31
Q 379.25>250.20 (+) 1.57e4



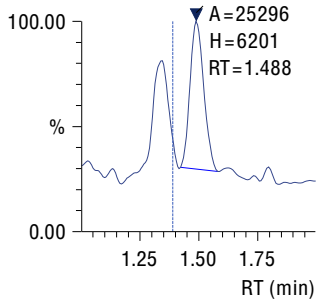
Pd6
Conc -0.30
Q 379.25>250.20 (+) 1.66e4



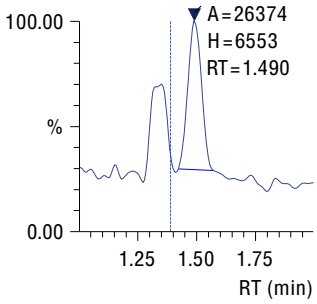
Pd7
Conc -0.23
Q 379.25>250.20 (+) 1.95e4



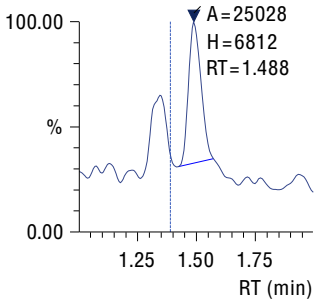
Pd0
Conc -0.52
Q 379.25>250.20 (+) 8.57e3



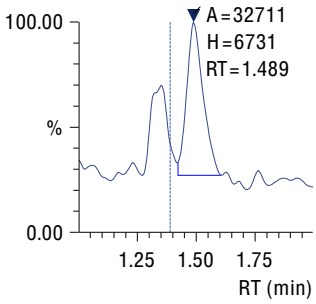
Pd1
Conc -0.52
Q 379.25>250.20 (+) 9.03e3



Pd2
Conc -0.52
Q 379.25>250.20 (+) 9.83e3



Pd3
Conc -0.48
Q 379.25>250.20 (+) 8.96e3

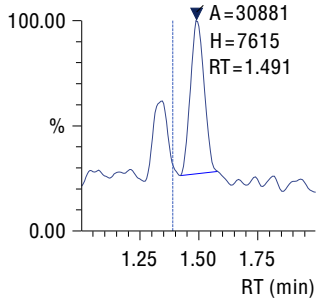


Insight Report

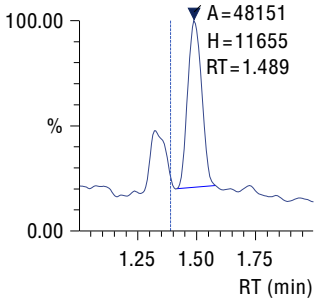
Printed at 3/30/2021 4:45:43 PM

Compound: OCT aduto - Octocrileno (continued)

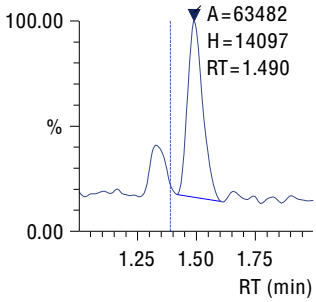
Pd4
Conc -0.49
Q 379.25>250.20 (+) 1.02e4



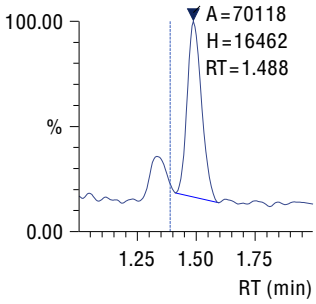
Pd5
Conc -0.38
Q 379.25>250.20 (+) 1.43e4



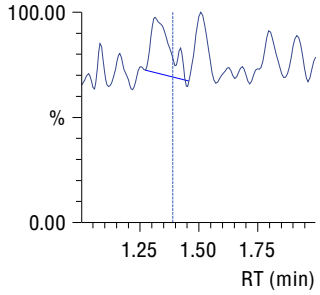
Pd6
Conc -0.28
Q 379.25>250.20 (+) 1.63e4



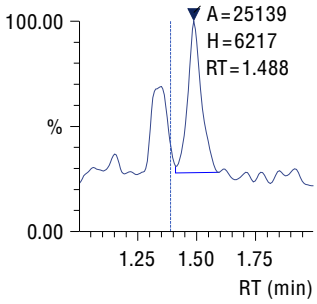
Pd7
Conc -0.24
Q 379.25>250.20 (+) 1.91e4



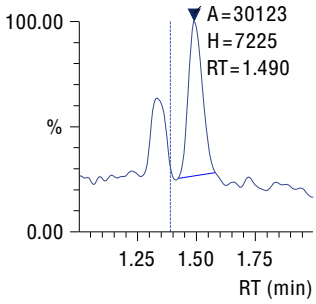
Pd0
Conc ----
Q 379.25>250.20 (+) 2.27e3



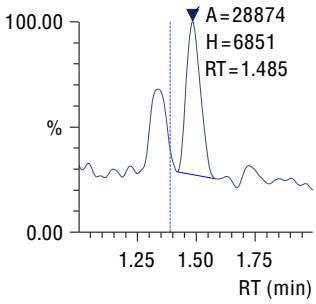
Pd1
Conc -0.52
Q 379.25>250.20 (+) 8.38e3



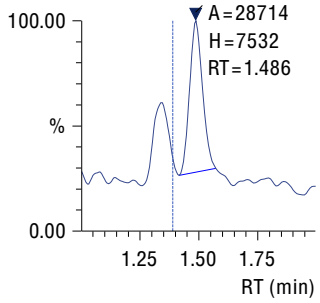
Pd2
Conc -0.49
Q 379.25>250.20 (+) 9.56e3



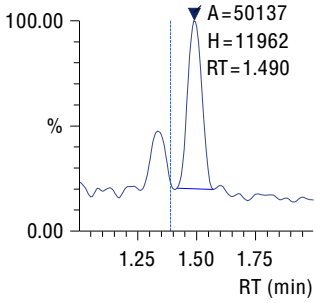
Pd3
Conc -0.50
Q 379.25>250.20 (+) 9.16e3



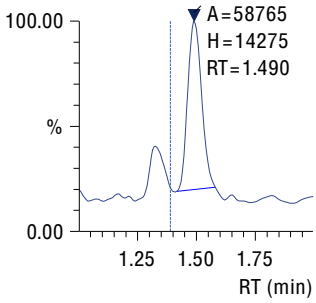
Pd4
Conc -0.50
Q 379.25>250.20 (+) 1.02e4



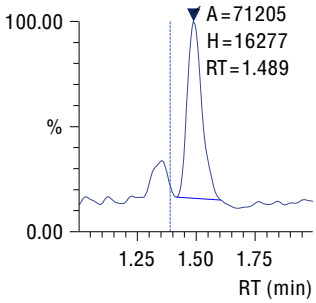
Pd5
Conc -0.36
Q 379.25>250.20 (+) 1.45e4



Pd6
Conc -0.31
Q 379.25>250.20 (+) 1.73e4



Pd7
Conc -0.23
Q 379.25>250.20 (+) 1.88e4



Insight Report

Printed at 3/31/2021 10:50:01 AM

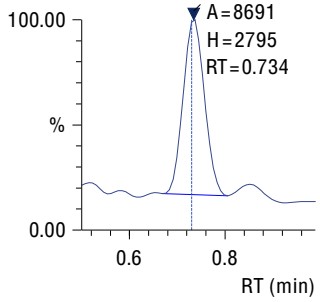
LOQ_LOD

Sample ID: _0_2uL
Date Acquired: 12/29/2020 11:00:12 PM
Acquired by: System Administrator
Method File: C:\LabSolutions\Data\Project1\FiltrosUV_Joyce\2020_12_28_Curva_Repe_Rec\2020_12_28_FiltrosUV_LCMS_Final.lcm
Data File: LOQ_LOD__0_2uL_2020_12_28_FiltrosUV_LCMS_Final_001
Vial: 18 | Inj. Volume: 0.2000uL | Tray: 2

Name	Sample Name	Sample ID	Found RT	Area	Conc.	S/N
BP3 - Benzofenona-3	LOQ_LOD	_0_2uL	0.734	8691	-0.04	23.61
OMC - Octinoxato	LOQ_LOD	_0_2uL	1.948	7258	-0.13	4.64
BMDM - Avobenzona	LOQ_LOD	_0_2uL	1.960	4876	-0.17	9.18
OCT aduto - Octocrileno	LOQ_LOD	_0_2uL	1.415	16894	-0.58	19.67

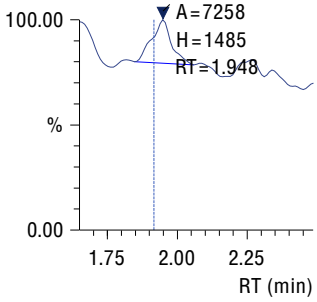
BP3 - Benzofenona-3

Conc -0.04
Q 229.10>151.15 (+) 3.26e3



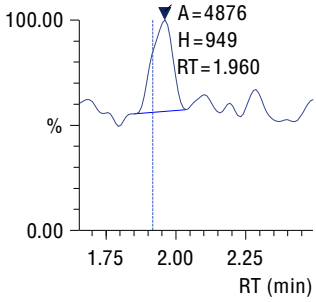
OMC - Octinoxato

Conc -0.13
Q 291.20>161.15 (+) 6.99e3



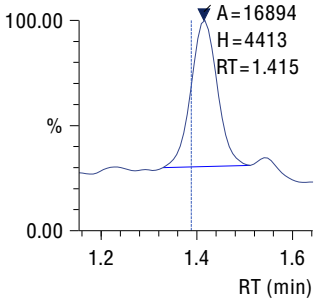
BMDM - Avobenzona

Conc -0.17
Q 311.20>161.20 (+) 2.12e3



OCT aduto - Octocrileno

Conc -0.58
Q 379.25>250.20 (+) 6.17e3



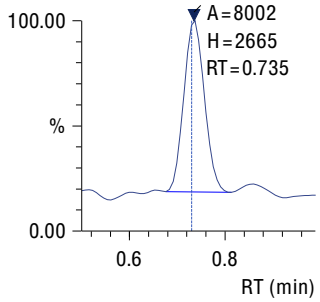
LOQ_LOD

Sample ID: _0_2uL
Date Acquired: 12/29/2020 10:54:40 PM
Acquired by: System Administrator
Method File: C:\LabSolutions\Data\Project1\FiltrosUV_Joyce\2020_12_28_Curva_Repe_Rec\2020_12_28_FiltrosUV_LCMS_Final.lcm
Data File: LOQ_LOD__0_2uL_2020_12_28_FiltrosUV_LCMS_Final_020
Vial: 18 | Inj. Volume: 0.2000uL | Tray: 2

Name	Sample Name	Sample ID	Found RT	Area	Conc.	S/N
BP3 - Benzofenona-3	LOQ_LOD	_0_2uL	0.735	8002	-0.04	33.53
OMC - Octinoxato	LOQ_LOD	_0_2uL	1.943	5524	-0.14	5.23
BMDM - Avobenzona	LOQ_LOD	_0_2uL	1.945	6565	-0.16	11.24
OCT aduto - Octocrileno	LOQ_LOD	_0_2uL	1.419	16701	-0.58	29.47

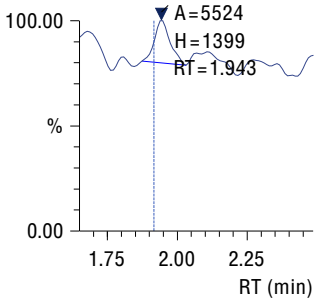
BP3 - Benzofenona-3

Conc -0.04
Q 229.10>151.15 (+) 3.18e3



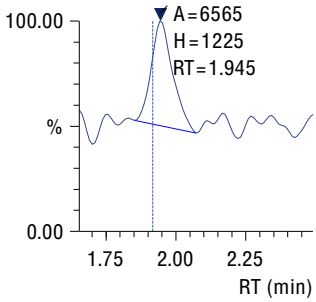
OMC - Octinoxato

Conc -0.14
Q 291.20>161.15 (+) 6.76e3



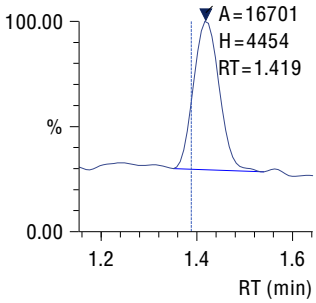
BMDM - Avobenzona

Conc -0.16
Q 311.20>161.20 (+) 2.39e3



OCT aduto - Octocrileno

Conc -0.58
Q 379.25>250.20 (+) 6.13e3

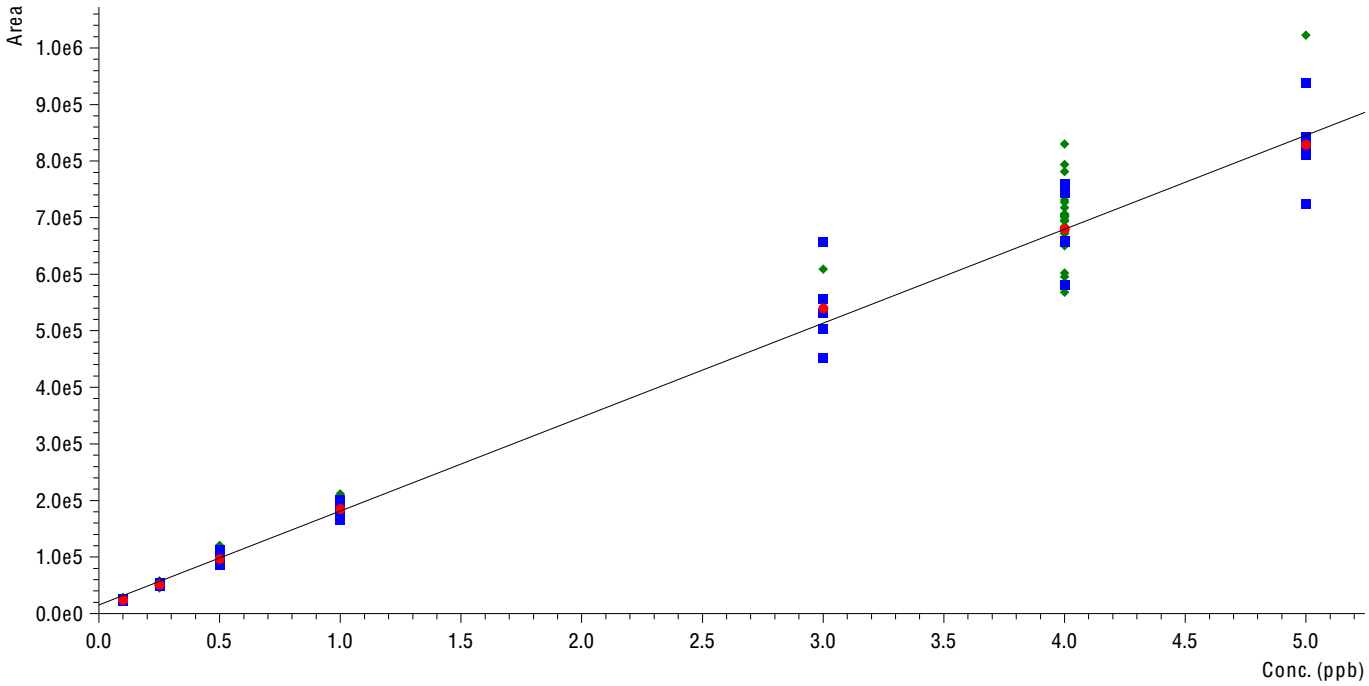


Insight Report

Printed at 3/30/2021 4:47:21 PM

Compound: BP3 - Benzofenona-3

Curve Fit: Linear | Weighting: None | Zero: Not Forced
Quantitative Method: External Standard
Q 229.10>151.15
R^2 = 0.9983743 R = 0.9991868
y = 166031.5x + 15343.45



Sample Name	Sample ID	Found RT	Area	Conc.	S/N
Prec_A	_1	0.722	52768	0.23	80.85
Prec_A	_2	0.723	53136	0.23	82.94
Prec_A	_3	0.722	53615	0.23	68.38
Prec_A	_4	0.723	50556	0.21	64.56
Prec_A	_5	0.723	49685	0.21	69.12
Prec_A	_6	0.724	54488	0.24	83.82
Prec_A	_7	0.723	51842	0.22	67.53
Prec_A	_8	0.724	52719	0.23	71.66
Prec_A	_9	0.724	48944	0.20	61.34
Prec_A	_10	0.721	55577	0.24	84.26
Prec_B	_1	0.724	793837	4.69	796.98
Prec_B	_2	0.724	693924	4.09	714.35
Prec_B	_3	0.723	740173	4.37	708.47
Prec_B	_4	0.723	706412	4.16	731.20
Prec_B	_5	0.723	696206	4.10	726.61
Prec_B	_6	0.723	717372	4.23	757.52
Prec_B	_7	0.723	653602	3.84	832.45
Prec_B	_8	0.723	727030	4.29	800.42
Prec_B	_9	0.724	702038	4.14	970.30
Prec_B	_10	0.723	684343	4.03	758.88
Prec_A	_1	0.727	50462	0.21	38.08
Prec_A	_2	0.726	45308	0.18	34.25
Prec_A	_3	0.726	56041	0.25	42.88
Prec_A	_4	0.726	51740	0.22	48.29
Prec_A	_5	0.726	49482	0.21	31.87
Prec_A	_6	0.726	57906	0.26	41.12
Prec_A	_7	0.725	49362	0.20	36.49
Prec_A	_8	0.725	52103	0.22	36.34
Prec_A	_9	0.726	54757	0.24	37.22
Prec_A	_10	0.726	51712	0.22	42.92
Prec_B	_1	0.726	703209	4.14	790.86

Insight Report

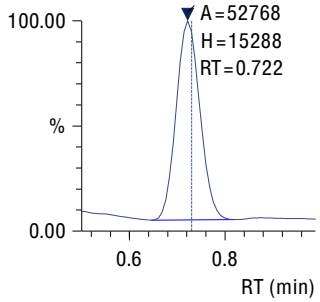
Printed at 3/30/2021 4:47:21 PM

Compound: BP3 - Benzofenona-3 (continued)

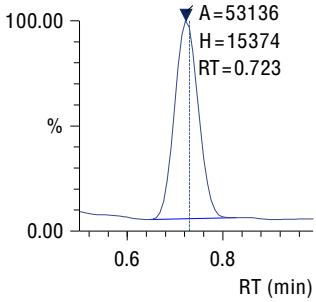
(Table continued from previous page)

Sample Name	Sample ID	Found RT	Area	Conc.	S/N
Prec_B	_2	0.726	705960	4.16	503.17
Prec_B	_3	0.726	676063	3.98	543.60
Prec_B	_4	0.725	567984	3.33	473.35
Prec_B	_5	0.726	672104	3.96	547.84
Prec_B	_6	0.725	649952	3.82	573.87
Prec_B	_7	0.725	746793	4.41	656.03
Prec_B	_8	0.726	672346	3.96	531.36
Prec_B	_9	0.726	601886	3.53	504.31
Prec_B	_10	0.725	684291	4.03	568.16

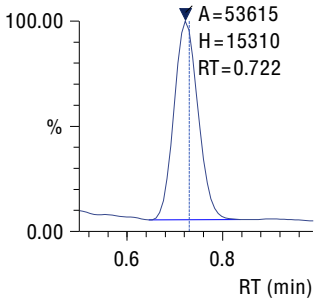
Prec_A
Conc 0.23
Q 229.10>151.15 (+) 1.57e4



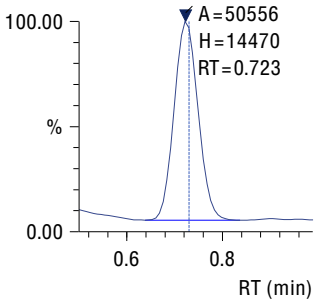
Prec_A
Conc 0.23
Q 229.10>151.15 (+) 1.59e4



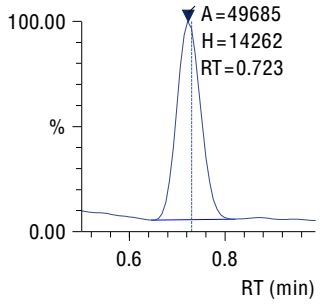
Prec_A
Conc 0.23
Q 229.10>151.15 (+) 1.57e4



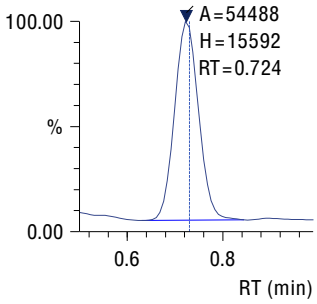
Prec_A
Conc 0.21
Q 229.10>151.15 (+) 1.49e4



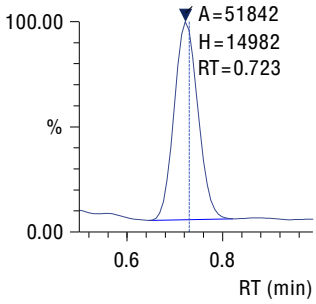
Prec_A
Conc 0.21
Q 229.10>151.15 (+) 1.47e4



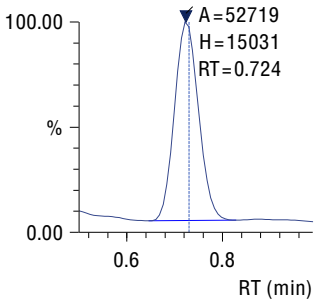
Prec_A
Conc 0.24
Q 229.10>151.15 (+) 1.60e4



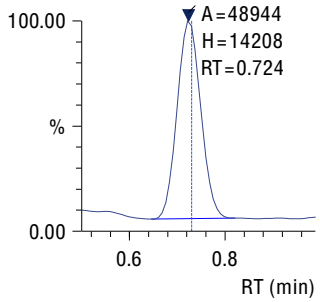
Prec_A
Conc 0.22
Q 229.10>151.15 (+) 1.54e4



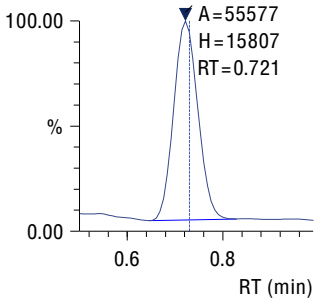
Prec_A
Conc 0.23
Q 229.10>151.15 (+) 1.55e4



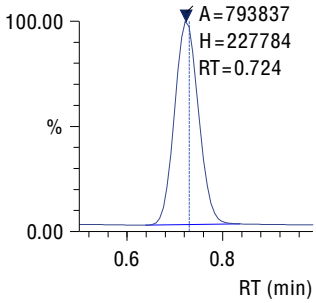
Prec_A
Conc 0.20
Q 229.10>151.15 (+) 1.47e4



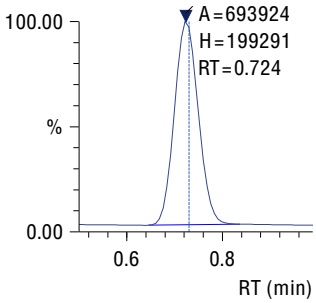
Prec_A
Conc 0.24
Q 229.10>151.15 (+) 1.62e4



Prec_B
Conc 4.69
Q 229.10>151.15 (+) 2.29e5



Prec_B
Conc 4.09
Q 229.10>151.15 (+) 2.00e5

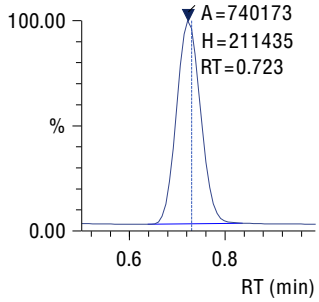


Insight Report

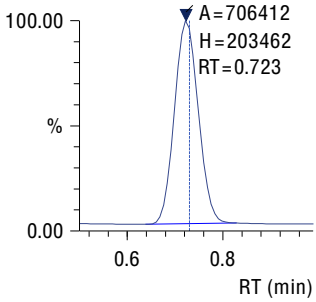
Printed at 3/30/2021 4:47:21 PM

Compound: BP3 - Benzofenona-3 (continued)

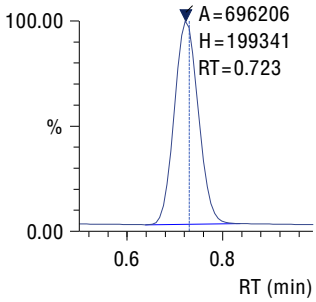
Prec_B
Conc 4.37
Q 229.10>151.15 (+) 2.12e5



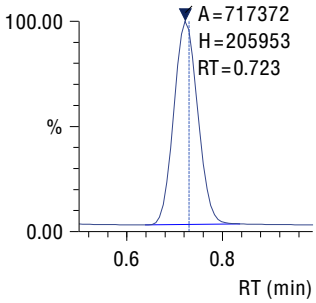
Prec_B
Conc 4.16
Q 229.10>151.15 (+) 2.05e5



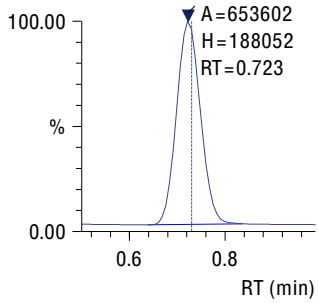
Prec_B
Conc 4.10
Q 229.10>151.15 (+) 2.00e5



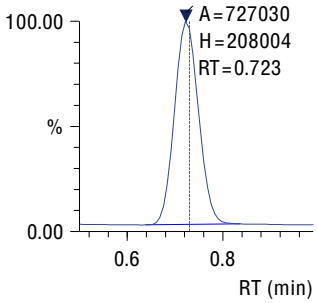
Prec_B
Conc 4.23
Q 229.10>151.15 (+) 2.07e5



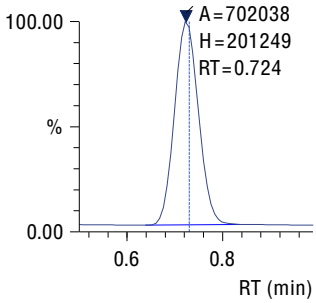
Prec_B
Conc 3.84
Q 229.10>151.15 (+) 1.89e5



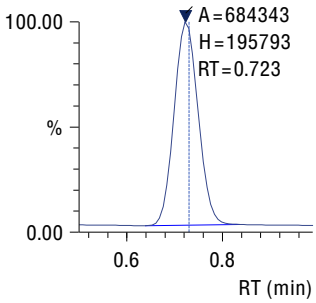
Prec_B
Conc 4.29
Q 229.10>151.15 (+) 2.09e5



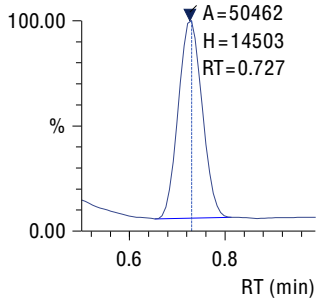
Prec_B
Conc 4.14
Q 229.10>151.15 (+) 2.02e5



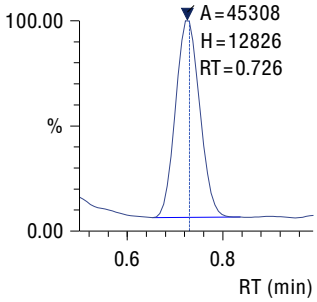
Prec_B
Conc 4.03
Q 229.10>151.15 (+) 1.97e5



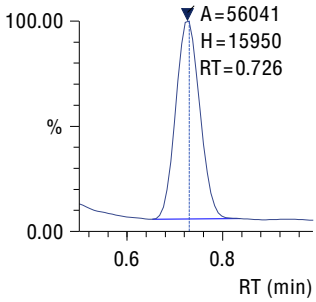
Prec_A
Conc 0.21
Q 229.10>151.15 (+) 1.50e4



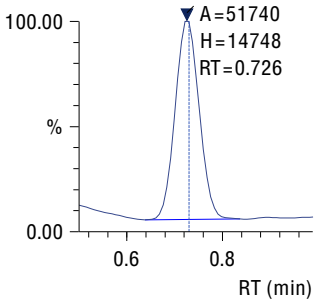
Prec_A
Conc 0.18
Q 229.10>151.15 (+) 1.33e4



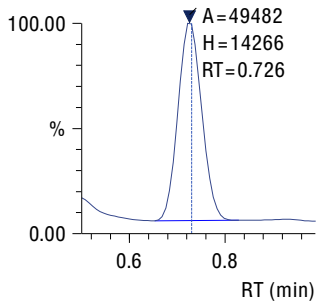
Prec_A
Conc 0.25
Q 229.10>151.15 (+) 1.65e4



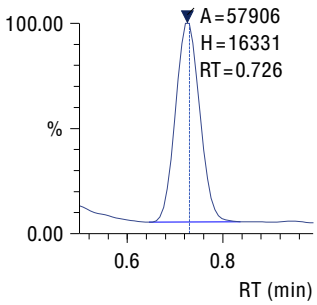
Prec_A
Conc 0.22
Q 229.10>151.15 (+) 1.52e4



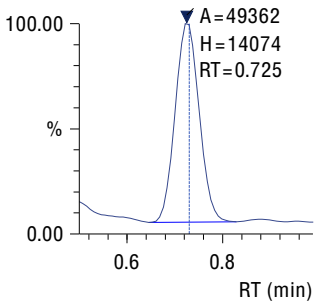
Prec_A
Conc 0.21
Q 229.10>151.15 (+) 1.48e4



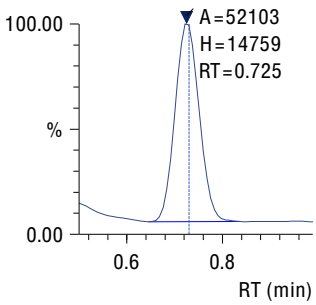
Prec_A
Conc 0.26
Q 229.10>151.15 (+) 1.68e4



Prec_A
Conc 0.20
Q 229.10>151.15 (+) 1.45e4



Prec_A
Conc 0.22
Q 229.10>151.15 (+) 1.52e4

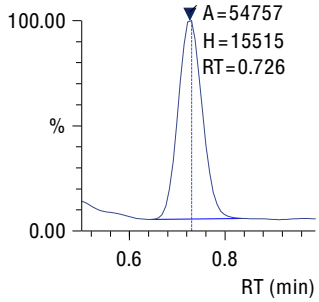


Insight Report

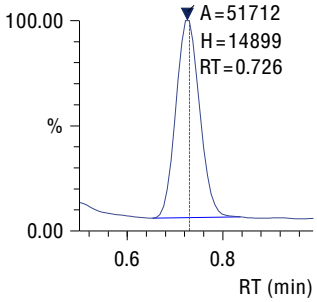
Printed at 3/30/2021 4:47:21 PM

Compound: BP3 - Benzofenona-3 (continued)

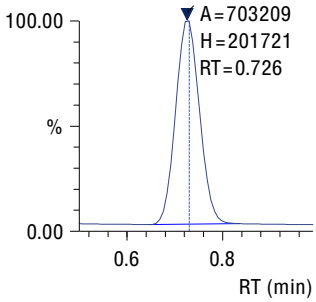
Prec_A
Conc 0.24
Q 229.10>151.15 (+) 1.60e4



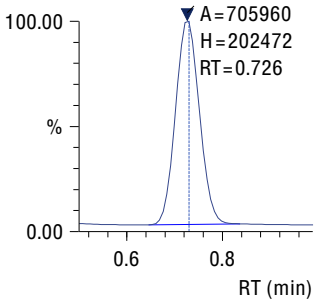
Prec_A
Conc 0.22
Q 229.10>151.15 (+) 1.54e4



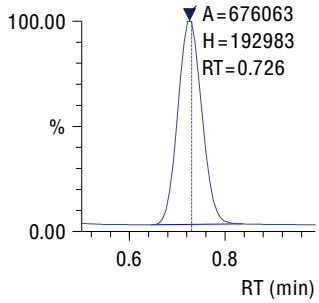
Prec_B
Conc 4.14
Q 229.10>151.15 (+) 2.03e5



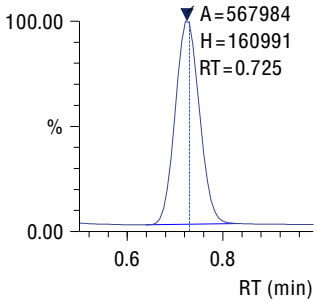
Prec_B
Conc 4.16
Q 229.10>151.15 (+) 2.03e5



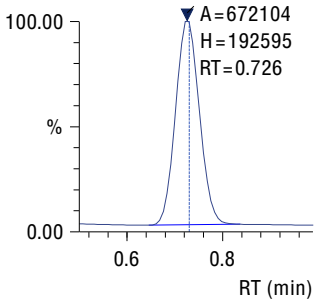
Prec_B
Conc 3.98
Q 229.10>151.15 (+) 1.94e5



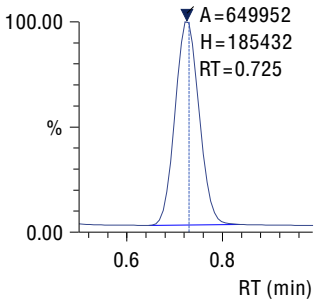
Prec_B
Conc 3.33
Q 229.10>151.15 (+) 1.62e5



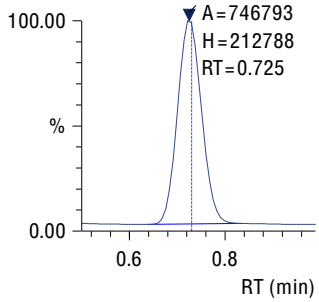
Prec_B
Conc 3.96
Q 229.10>151.15 (+) 1.93e5



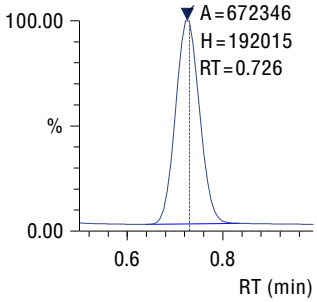
Prec_B
Conc 3.82
Q 229.10>151.15 (+) 1.86e5



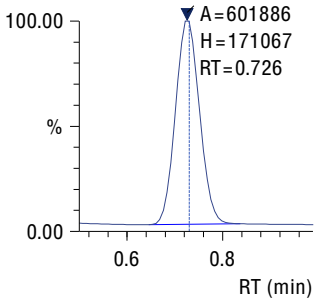
Prec_B
Conc 4.41
Q 229.10>151.15 (+) 2.14e5



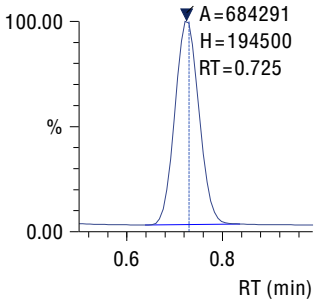
Prec_B
Conc 3.96
Q 229.10>151.15 (+) 1.93e5



Prec_B
Conc 3.53
Q 229.10>151.15 (+) 1.72e5



Prec_B
Conc 4.03
Q 229.10>151.15 (+) 1.95e5

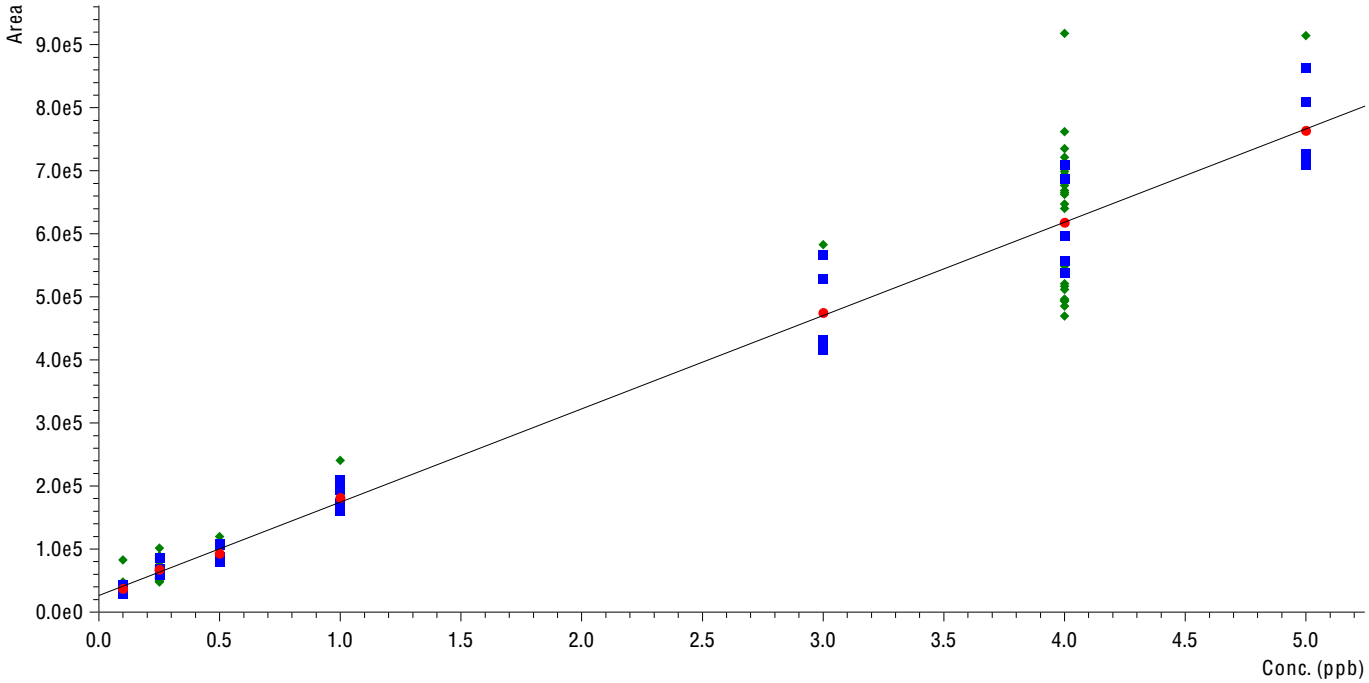


Insight Report

Printed at 3/30/2021 4:47:21 PM

Compound: OMC - Octinoxato

Curve Fit: Linear | Weighting: None | Zero: Not Forced
Quantitative Method: External Standard
Q 291.20>161.15
R^2 = 0.9996864 R = 0.9998432
y = 147964.1x + 26538.75



Sample Name	Sample ID	Found RT	Area	Conc.	S/N
Prec_A	_1	1.915	66165	0.27	34.91
Prec_A	_2	1.919	73976	0.32	30.37
Prec_A	_3	1.919	69549	0.29	28.74
Prec_A	_4	1.920	72202	0.31	33.02
Prec_A	_5	1.920	84242	0.39	41.08
Prec_A	_6	1.917	79425	0.36	47.50
Prec_A	_7	1.921	73286	0.32	34.22
Prec_A	_8	1.922	89328	0.42	40.77
Prec_A	_9	1.920	101465	0.51	56.59
Prec_A	_10	1.919	85981	0.40	40.55
Prec_B	_1	1.921	685307	4.45	304.99
Prec_B	_2	1.922	665902	4.32	351.35
Prec_B	_3	1.921	689747	4.48	318.13
Prec_B	_4	1.920	735089	4.79	329.44
Prec_B	_5	1.921	647513	4.20	382.73
Prec_B	_6	1.920	917769	6.02	438.53
Prec_B	_7	1.920	640427	4.15	285.26
Prec_B	_8	1.921	713318	4.64	337.20
Prec_B	_9	1.923	662581	4.30	283.61
Prec_B	_10	1.922	668770	4.34	283.85
Prec_A	_1	1.929	48821	0.15	21.97
Prec_A	_2	1.932	53098	0.18	33.07
Prec_A	_3	1.930	47641	0.14	23.04
Prec_A	_4	1.930	65766	0.27	27.33
Prec_A	_5	1.928	55299	0.19	29.60
Prec_A	_6	1.929	52569	0.18	19.34
Prec_A	_7	1.931	55440	0.20	22.80
Prec_A	_8	1.931	50997	0.17	30.35
Prec_A	_9	1.931	65905	0.27	45.76
Prec_A	_10	1.931	55876	0.20	30.62
Prec_B	_1	1.929	520969	3.34	187.21
Prec_B	_2	1.932	548941	3.53	237.85
Prec_B	_3	1.930	496565	3.18	259.49
Prec_B	_4	1.930	469430	2.99	192.96

Insight Report

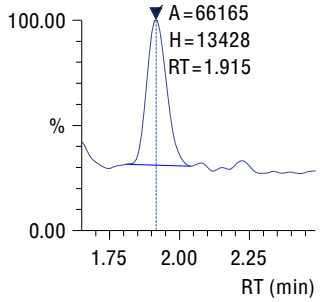
Printed at 3/30/2021 4:47:21 PM

Compound: OMC - Octinoxato (continued)

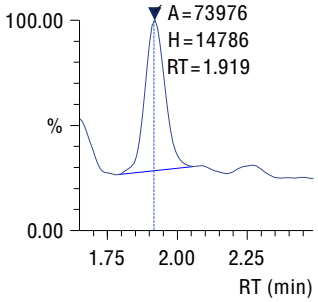
(Table continued from previous page)

Sample Name	Sample ID	Found RT	Area	Conc.	S/N
Prec_B	_5	1.930	511876	3.28	252.62
Prec_B	_6	1.929	516978	3.31	196.64
Prec_B	_7	1.927	552561	3.56	300.09
Prec_B	_8	1.932	494791	3.16	159.69
Prec_B	_9	1.932	485338	3.10	213.21
Prec_B	_10	1.931	492942	3.15	187.80

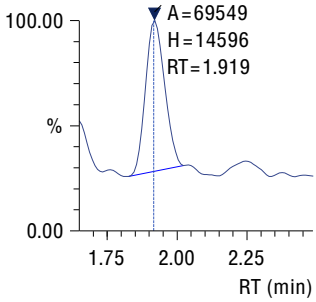
Prec_A
Conc 0.27
Q 291.20>161.15 (+) 1.89e4



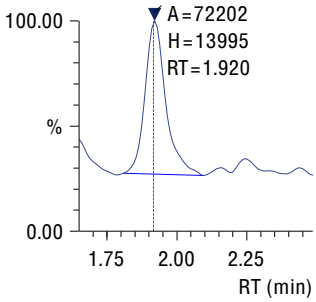
Prec_A
Conc 0.32
Q 291.20>161.15 (+) 2.01e4



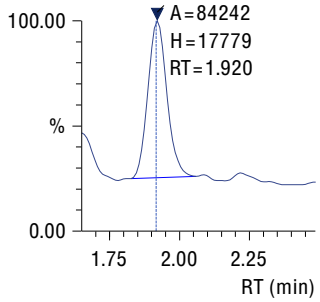
Prec_A
Conc 0.29
Q 291.20>161.15 (+) 1.98e4



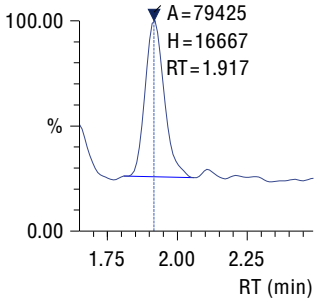
Prec_A
Conc 0.31
Q 291.20>161.15 (+) 1.86e4



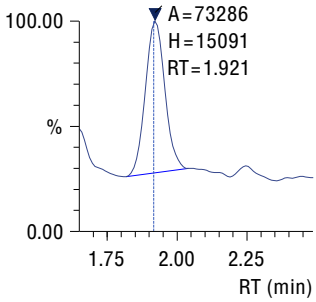
Prec_A
Conc 0.39
Q 291.20>161.15 (+) 2.31e4



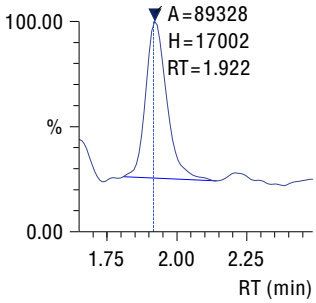
Prec_A
Conc 0.36
Q 291.20>161.15 (+) 2.18e4



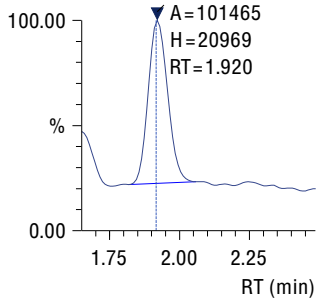
Prec_A
Conc 0.32
Q 291.20>161.15 (+) 2.03e4



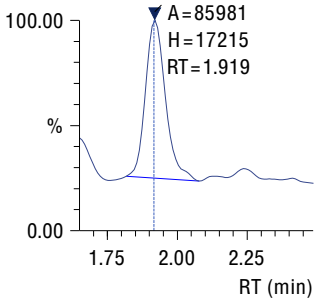
Prec_A
Conc 0.42
Q 291.20>161.15 (+) 2.22e4



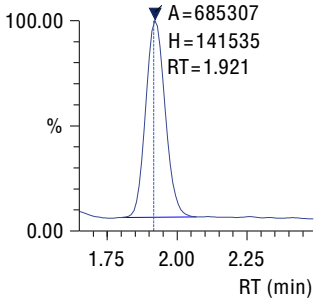
Prec_A
Conc 0.51
Q 291.20>161.15 (+) 2.63e4



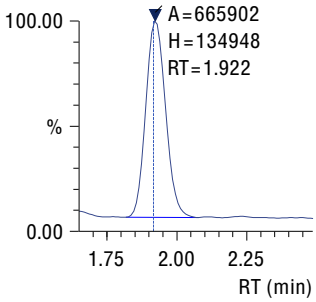
Prec_A
Conc 0.40
Q 291.20>161.15 (+) 2.23e4



Prec_B
Conc 4.45
Q 291.20>161.15 (+) 1.47e5



Prec_B
Conc 4.32
Q 291.20>161.15 (+) 1.40e5

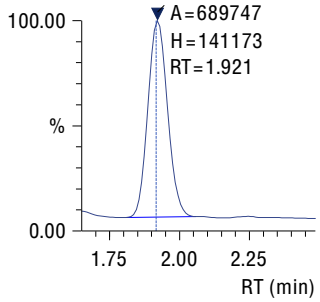


Insight Report

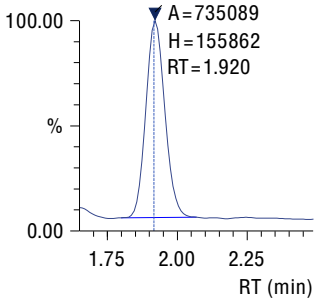
Printed at 3/30/2021 4:47:21 PM

Compound: OMC - Octinoxato (continued)

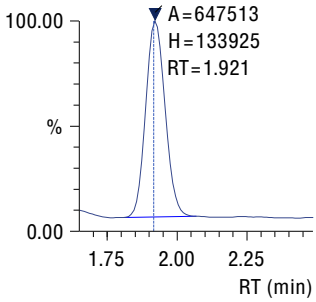
Prec_B
Conc 4.48
Q 291.20>161.15 (+) 1.47e5



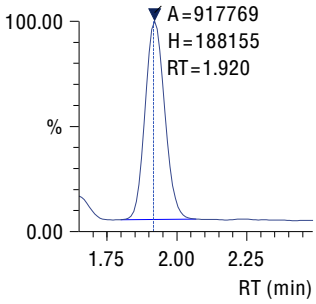
Prec_B
Conc 4.79
Q 291.20>161.15 (+) 1.62e5



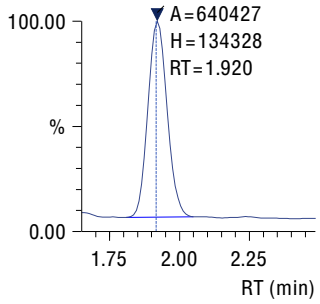
Prec_B
Conc 4.20
Q 291.20>161.15 (+) 1.39e5



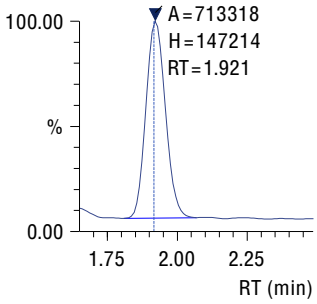
Prec_B
Conc 6.02
Q 291.20>161.15 (+) 1.94e5



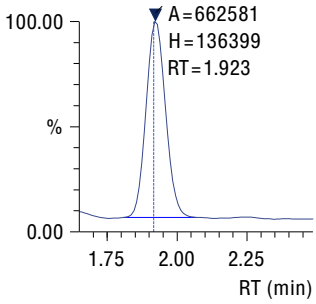
Prec_B
Conc 4.15
Q 291.20>161.15 (+) 1.40e5



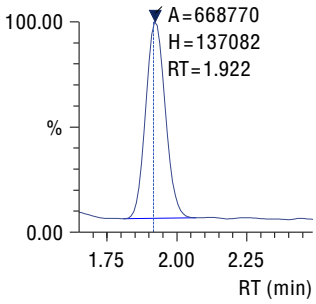
Prec_B
Conc 4.64
Q 291.20>161.15 (+) 1.53e5



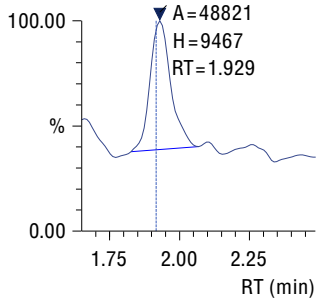
Prec_B
Conc 4.30
Q 291.20>161.15 (+) 1.42e5



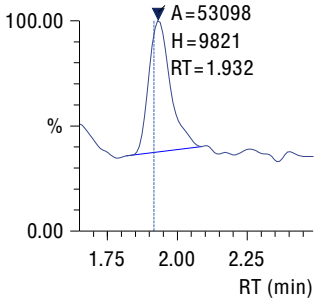
Prec_B
Conc 4.34
Q 291.20>161.15 (+) 1.42e5



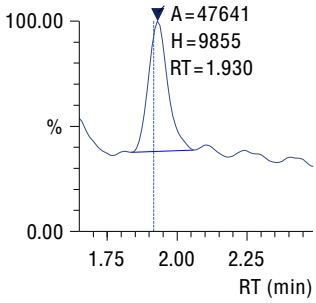
Prec_A
Conc 0.15
Q 291.20>161.15 (+) 1.50e4



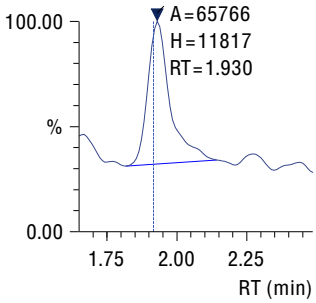
Prec_A
Conc 0.18
Q 291.20>161.15 (+) 1.53e4



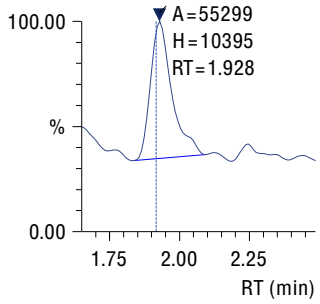
Prec_A
Conc 0.14
Q 291.20>161.15 (+) 1.54e4



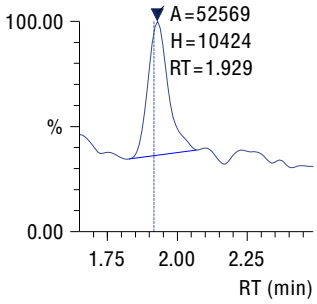
Prec_A
Conc 0.27
Q 291.20>161.15 (+) 1.69e4



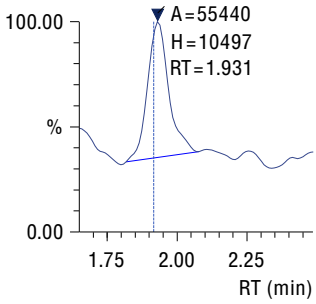
Prec_A
Conc 0.19
Q 291.20>161.15 (+) 1.55e4



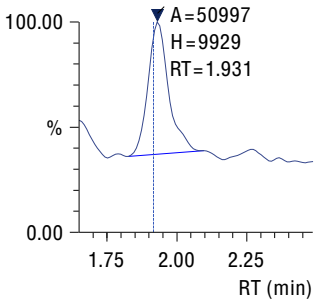
Prec_A
Conc 0.18
Q 291.20>161.15 (+) 1.59e4



Prec_A
Conc 0.20
Q 291.20>161.15 (+) 1.58e4



Prec_A
Conc 0.17
Q 291.20>161.15 (+) 1.53e4

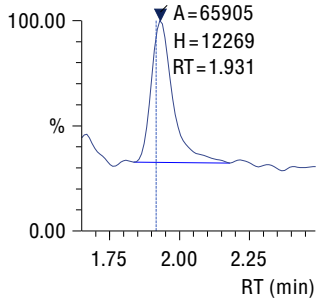


Insight Report

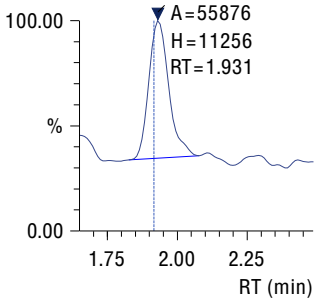
Printed at 3/30/2021 4:47:21 PM

Compound: OMC - Octinoxato (continued)

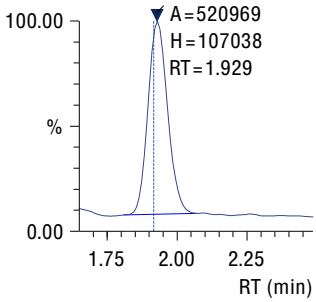
Prec_A
Conc 0.27
Q 291.20>161.15 (+) 1.77e4



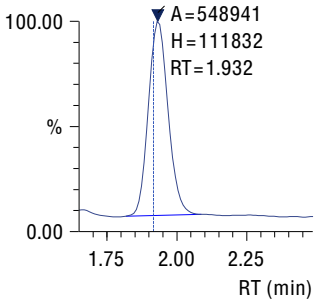
Prec_A
Conc 0.20
Q 291.20>161.15 (+) 1.67e4



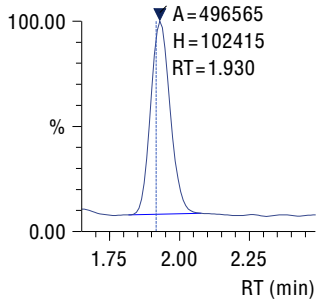
Prec_B
Conc 3.34
Q 291.20>161.15 (+) 1.13e5



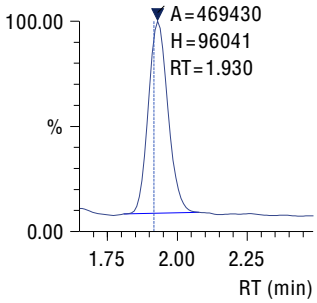
Prec_B
Conc 3.53
Q 291.20>161.15 (+) 1.18e5



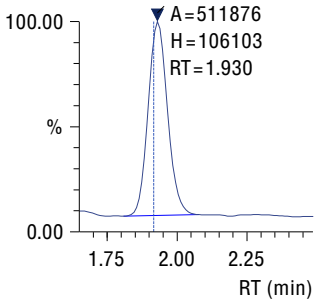
Prec_B
Conc 3.18
Q 291.20>161.15 (+) 1.08e5



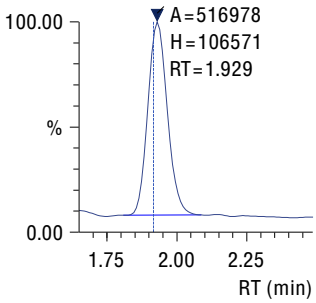
Prec_B
Conc 2.99
Q 291.20>161.15 (+) 1.02e5



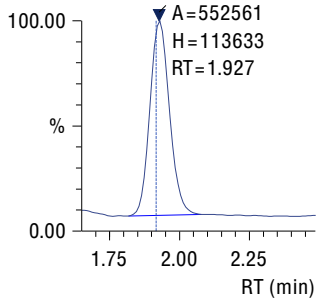
Prec_B
Conc 3.28
Q 291.20>161.15 (+) 1.12e5



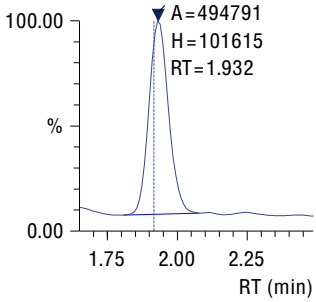
Prec_B
Conc 3.31
Q 291.20>161.15 (+) 1.13e5



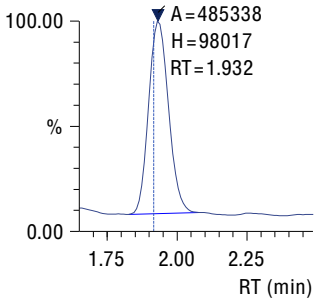
Prec_B
Conc 3.56
Q 291.20>161.15 (+) 1.19e5



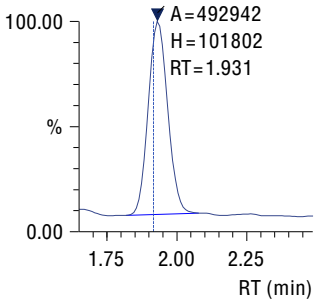
Prec_B
Conc 3.16
Q 291.20>161.15 (+) 1.07e5



Prec_B
Conc 3.10
Q 291.20>161.15 (+) 1.04e5



Prec_B
Conc 3.15
Q 291.20>161.15 (+) 1.08e5

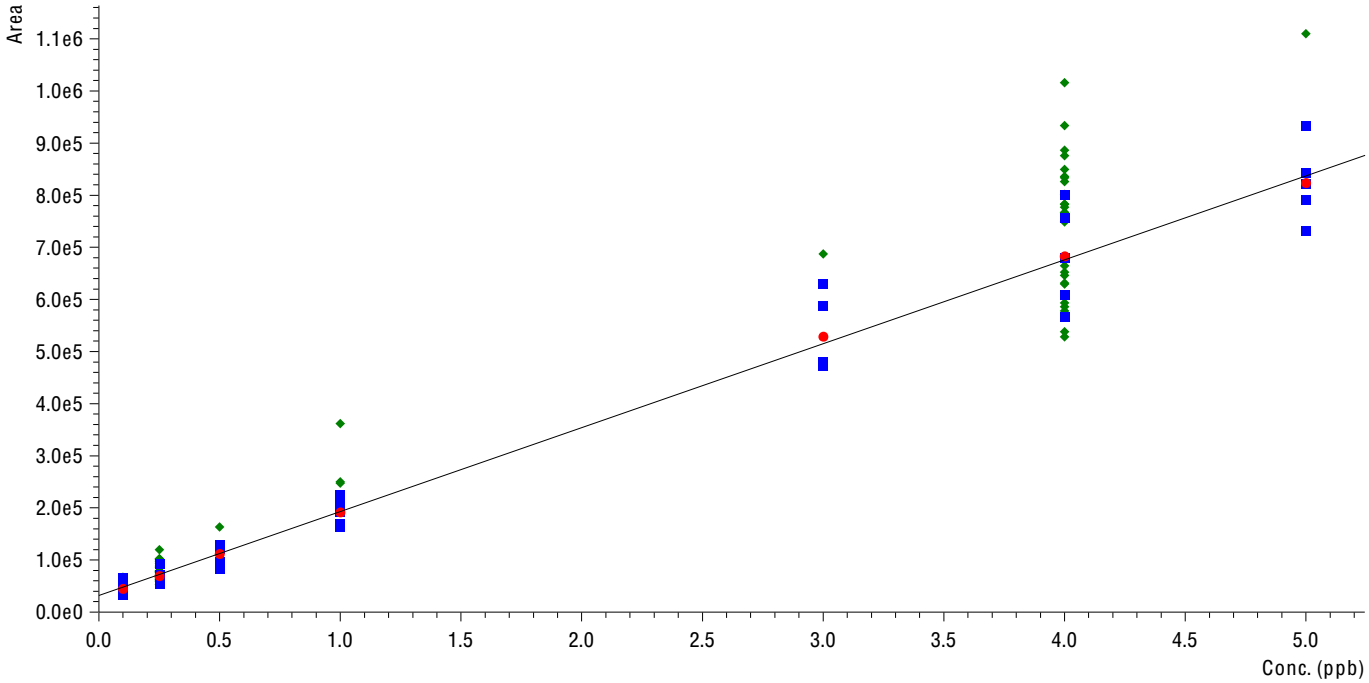


Insight Report

Printed at 3/30/2021 4:47:21 PM

Compound: BMDM - Avobenzona

Curve Fit: Linear | Weighting: None | Zero: Not Forced
Quantitative Method: External Standard
Q 311.20>161.20
R^2 = 0.9992920 R = 0.9996459
y = 161058.5x + 31730.33



Sample Name	Sample ID	Found RT	Area	Conc.	S/N
Prec_A	_1	1.925	78717	0.29	104.15
Prec_A	_2	1.928	78584	0.29	90.60
Prec_A	_3	1.927	94094	0.39	103.01
Prec_A	_4	1.927	72793	0.25	84.69
Prec_A	_5	1.926	102110	0.44	156.37
Prec_A	_6	1.925	119474	0.54	101.37
Prec_A	_7	1.928	96987	0.41	186.11
Prec_A	_8	1.929	78957	0.29	107.37
Prec_A	_9	1.928	102280	0.44	94.13
Prec_A	_10	1.926	86208	0.34	95.25
Prec_B	_1	1.928	876154	5.24	269.72
Prec_B	_2	1.929	776996	4.63	194.87
Prec_B	_3	1.928	849745	5.08	185.51
Prec_B	_4	1.927	833497	4.98	290.58
Prec_B	_5	1.928	766017	4.56	242.35
Prec_B	_6	1.927	1015859	6.11	186.15
Prec_B	_7	1.926	748518	4.45	233.19
Prec_B	_8	1.928	826183	4.93	195.70
Prec_B	_9	1.930	801608	4.78	203.93
Prec_B	_10	1.928	782271	4.66	279.10
Prec_A	_1	1.937	53556	0.14	82.07
Prec_A	_2	1.937	66537	0.22	96.11
Prec_A	_3	1.940	60232	0.18	74.51
Prec_A	_4	1.937	64832	0.21	124.35
Prec_A	_5	1.939	76710	0.28	106.54
Prec_A	_6	1.939	63146	0.20	91.45
Prec_A	_7	1.935	58879	0.17	92.95
Prec_A	_8	1.935	100098	0.42	132.29
Prec_A	_9	1.937	62443	0.19	76.45
Prec_A	_10	1.939	76507	0.28	73.36
Prec_B	_1	1.937	629827	3.71	286.40
Prec_B	_2	1.939	664598	3.93	418.72
Prec_B	_3	1.938	577979	3.39	233.41
Prec_B	_4	1.936	528414	3.08	198.64

Insight Report

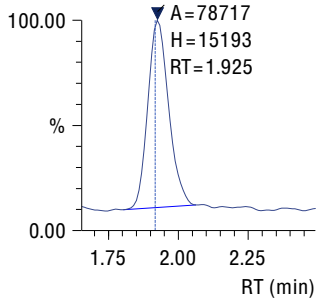
Printed at 3/30/2021 4:47:21 PM

Compound: BMDM - Avobenzona (continued)

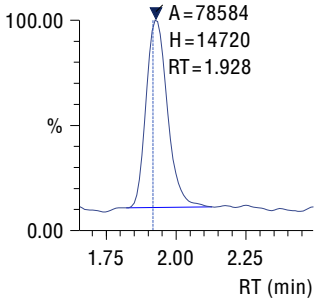
(Table continued from previous page)

Sample Name	Sample ID	Found RT	Area	Conc.	S/N
Prec_B	_5	1.937	593107	3.49	217.57
Prec_B	_6	1.937	586133	3.44	182.22
Prec_B	_7	1.934	645912	3.81	221.84
Prec_B	_8	1.939	652565	3.85	247.05
Prec_B	_9	1.939	538094	3.14	202.61
Prec_B	_10	1.937	631240	3.72	378.12

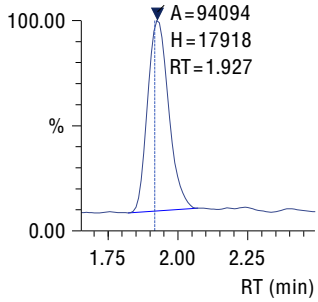
Prec_A
Conc 0.29
Q 311.20>161.20 (+) 1.66e4



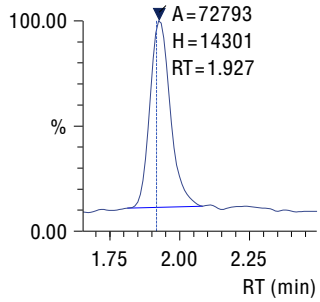
Prec_A
Conc 0.29
Q 311.20>161.20 (+) 1.60e4



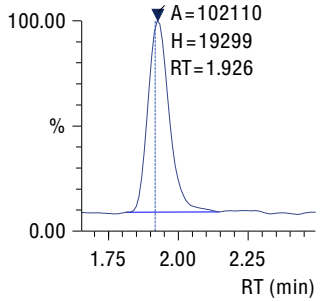
Prec_A
Conc 0.39
Q 311.20>161.20 (+) 1.92e4



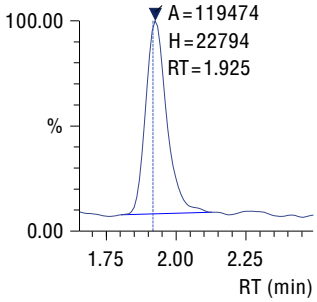
Prec_A
Conc 0.25
Q 311.20>161.20 (+) 1.57e4



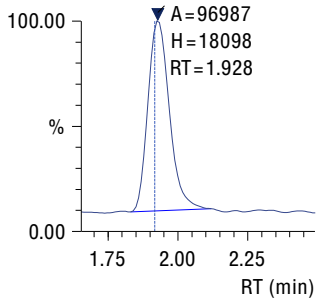
Prec_A
Conc 0.44
Q 311.20>161.20 (+) 2.06e4



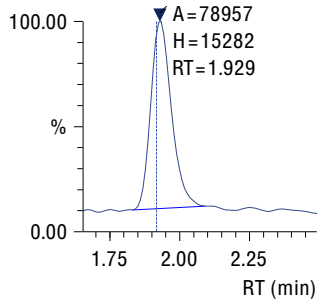
Prec_A
Conc 0.54
Q 311.20>161.20 (+) 2.41e4



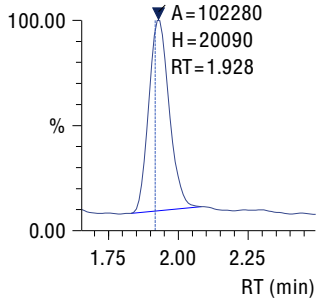
Prec_A
Conc 0.41
Q 311.20>161.20 (+) 1.95e4



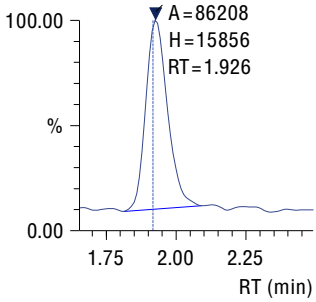
Prec_A
Conc 0.29
Q 311.20>161.20 (+) 1.67e4



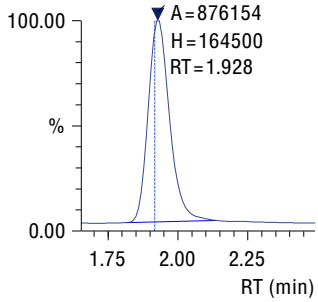
Prec_A
Conc 0.44
Q 311.20>161.20 (+) 2.15e4



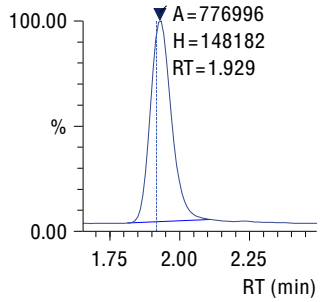
Prec_A
Conc 0.34
Q 311.20>161.20 (+) 1.72e4



Prec_B
Conc 5.24
Q 311.20>161.20 (+) 1.67e5



Prec_B
Conc 4.63
Q 311.20>161.20 (+) 1.51e5

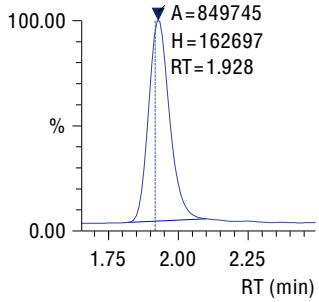


Insight Report

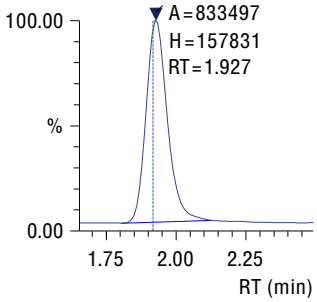
Printed at 3/30/2021 4:47:21 PM

Compound: BMDM - Avobenzona (continued)

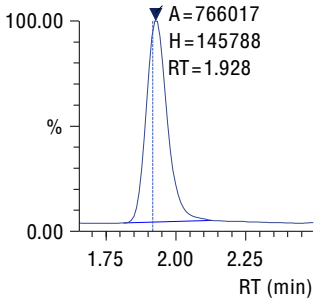
Prec_B
Conc 5.08
Q 311.20>161.20 (+) 1.66e5



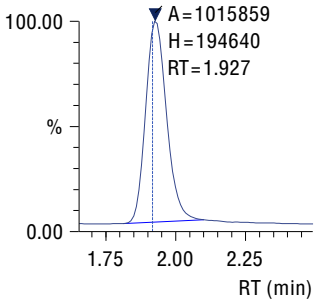
Prec_B
Conc 4.98
Q 311.20>161.20 (+) 1.60e5



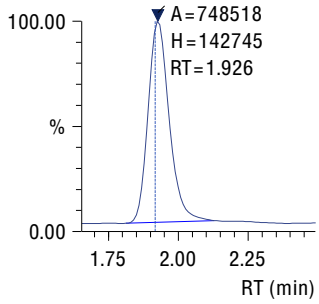
Prec_B
Conc 4.56
Q 311.20>161.20 (+) 1.48e5



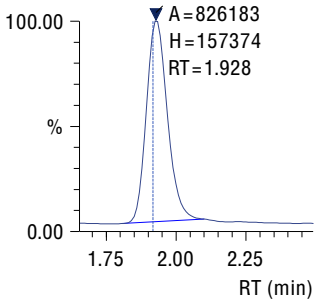
Prec_B
Conc 6.11
Q 311.20>161.20 (+) 1.98e5



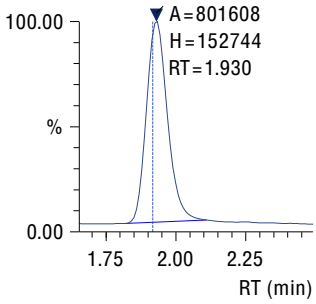
Prec_B
Conc 4.45
Q 311.20>161.20 (+) 1.45e5



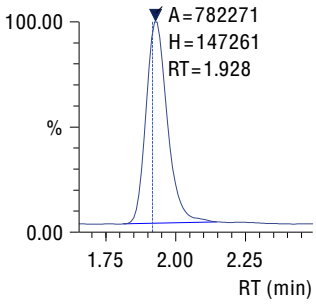
Prec_B
Conc 4.93
Q 311.20>161.20 (+) 1.60e5



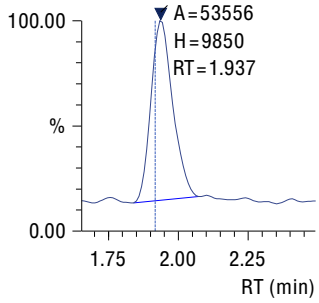
Prec_B
Conc 4.78
Q 311.20>161.20 (+) 1.55e5



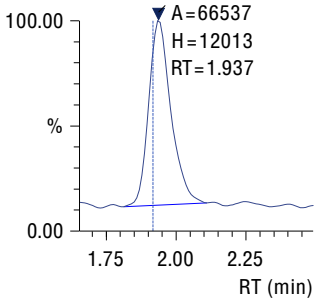
Prec_B
Conc 4.66
Q 311.20>161.20 (+) 1.49e5



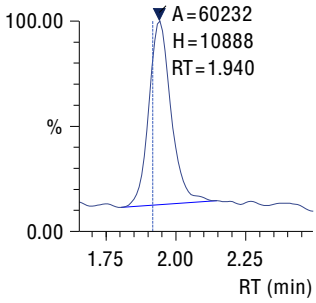
Prec_A
Conc 0.14
Q 311.20>161.20 (+) 1.12e4



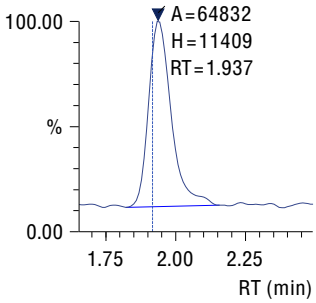
Prec_A
Conc 0.22
Q 311.20>161.20 (+) 1.33e4



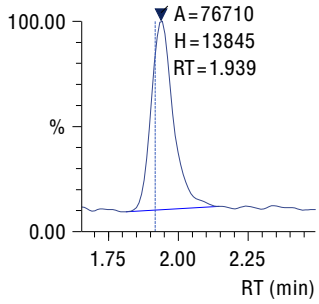
Prec_A
Conc 0.18
Q 311.20>161.20 (+) 1.21e4



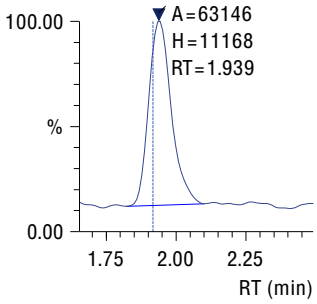
Prec_A
Conc 0.21
Q 311.20>161.20 (+) 1.26e4



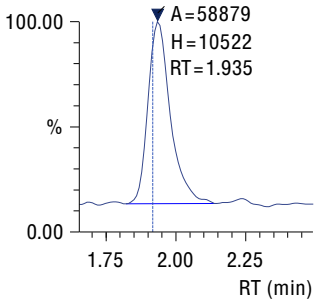
Prec_A
Conc 0.28
Q 311.20>161.20 (+) 1.50e4



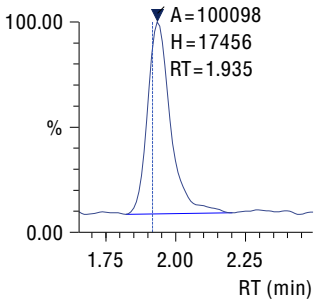
Prec_A
Conc 0.20
Q 311.20>161.20 (+) 1.24e4



Prec_A
Conc 0.17
Q 311.20>161.20 (+) 1.18e4



Prec_A
Conc 0.42
Q 311.20>161.20 (+) 1.86e4

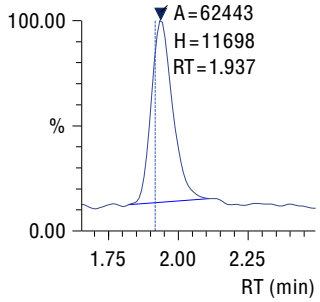


Insight Report

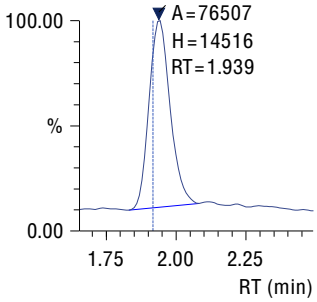
Printed at 3/30/2021 4:47:21 PM

Compound: BMDM - Avobenzona (continued)

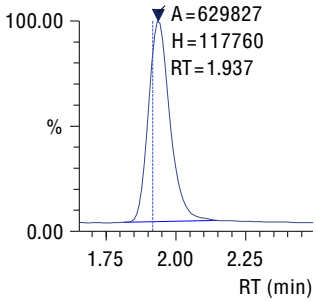
Prec_A
Conc 0.19
Q 311.20>161.20 (+) 1.31e4



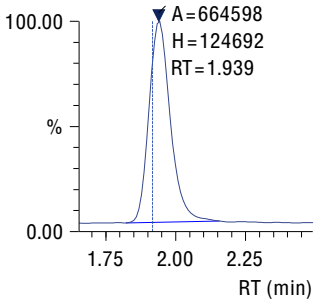
Prec_A
Conc 0.28
Q 311.20>161.20 (+) 1.59e4



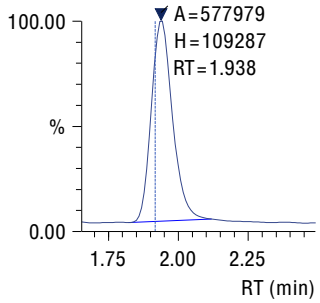
Prec_B
Conc 3.71
Q 311.20>161.20 (+) 1.20e5



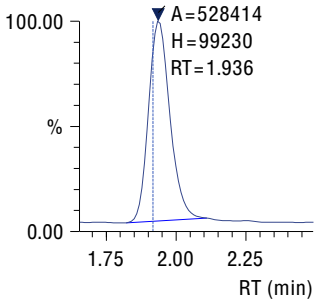
Prec_B
Conc 3.93
Q 311.20>161.20 (+) 1.27e5



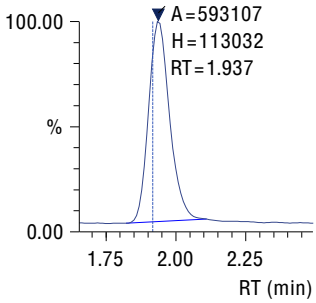
Prec_B
Conc 3.39
Q 311.20>161.20 (+) 1.12e5



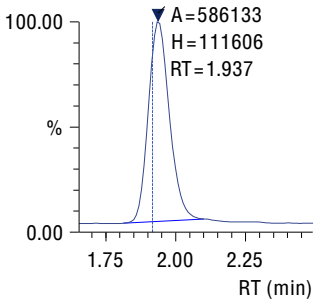
Prec_B
Conc 3.08
Q 311.20>161.20 (+) 1.01e5



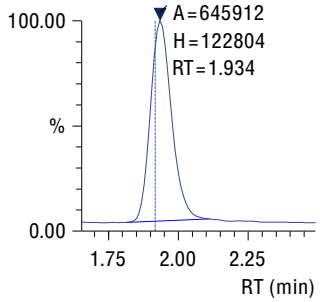
Prec_B
Conc 3.49
Q 311.20>161.20 (+) 1.15e5



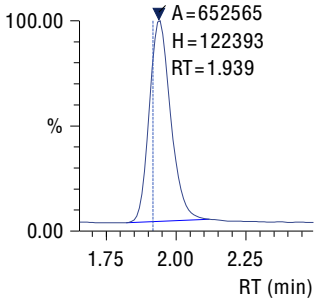
Prec_B
Conc 3.44
Q 311.20>161.20 (+) 1.14e5



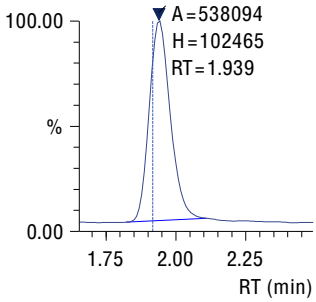
Prec_B
Conc 3.81
Q 311.20>161.20 (+) 1.25e5



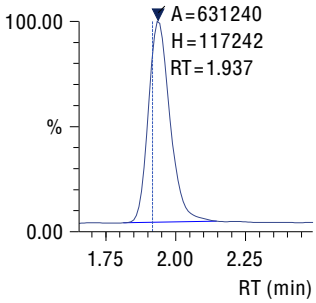
Prec_B
Conc 3.85
Q 311.20>161.20 (+) 1.25e5



Prec_B
Conc 3.14
Q 311.20>161.20 (+) 1.05e5



Prec_B
Conc 3.72
Q 311.20>161.20 (+) 1.19e5

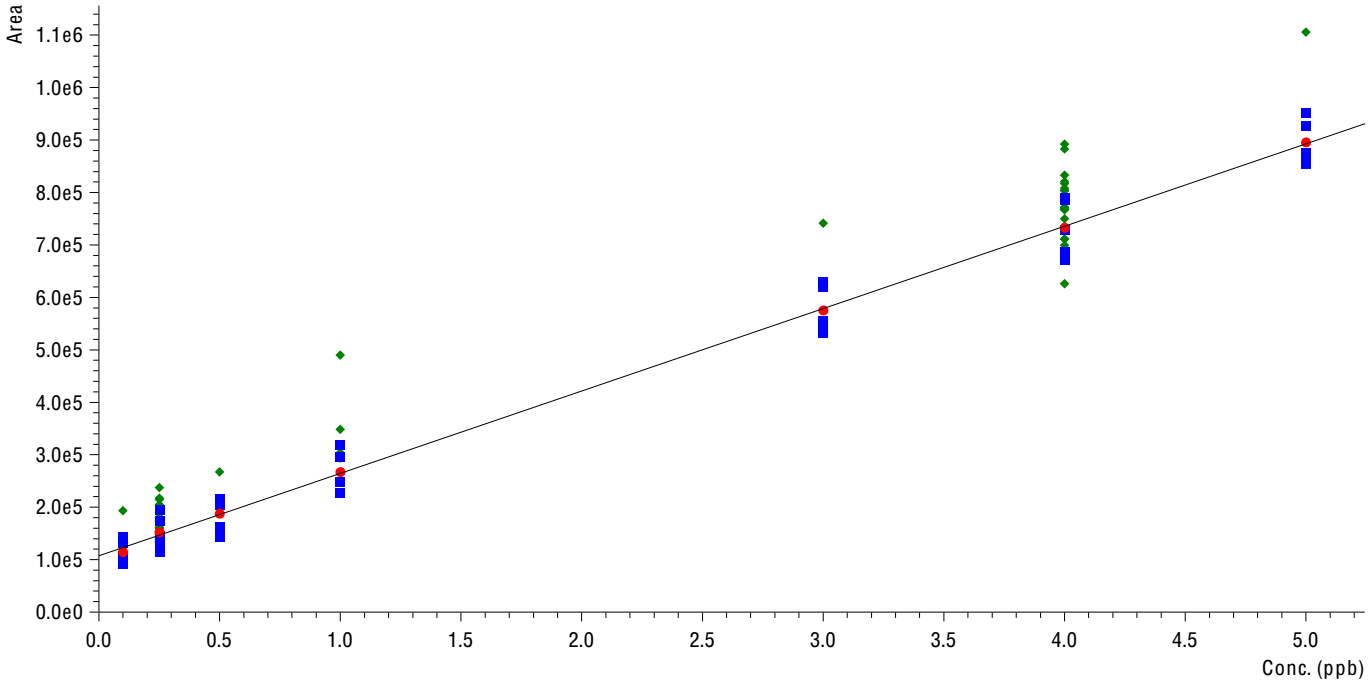


Insight Report

Printed at 3/30/2021 4:47:21 PM

Compound: OCT aduto - Octocrileno

Curve Fit: Linear | Weighting: None | Zero: Not Forced
Quantitative Method: External Standard
Q 379.25>250.20
R^2 = 0.9997386 R = 0.9998693
y = 157080.7x + 107405.4



Sample Name	Sample ID	Found RT	Area	Conc.	S/N
Prec_A	_1	1.393	153956	0.30	75.10
Prec_A	_2	1.396	160620	0.34	80.05
Prec_A	_3	1.395	174026	0.42	98.27
Prec_A	_4	1.394	154879	0.30	77.25
Prec_A	_5	1.394	214916	0.68	119.52
Prec_A	_6	1.395	237390	0.83	107.42
Prec_A	_7	1.396	205165	0.62	102.94
Prec_A	_8	1.398	158731	0.33	114.34
Prec_A	_9	1.397	181188	0.47	109.81
Prec_A	_10	1.394	173664	0.42	81.50
Prec_B	_1	1.397	770547	4.22	199.18
Prec_B	_2	1.398	766821	4.20	257.22
Prec_B	_3	1.395	808216	4.46	222.76
Prec_B	_4	1.395	750310	4.09	204.25
Prec_B	_5	1.397	732590	3.98	263.35
Prec_B	_6	1.395	892186	5.00	304.89
Prec_B	_7	1.394	772277	4.23	302.18
Prec_B	_8	1.395	803724	4.43	321.39
Prec_B	_9	1.396	768100	4.21	209.53
Prec_B	_10	1.397	769995	4.22	315.65
Prec_A	_1	1.402	133515	0.17	58.81
Prec_A	_2	1.404	147696	0.26	88.27
Prec_A	_3	1.406	138330	0.20	58.18
Prec_A	_4	1.403	142404	0.22	118.88
Prec_A	_5	1.402	138742	0.20	59.62
Prec_A	_6	1.403	134179	0.17	65.60
Prec_A	_7	1.401	132654	0.16	75.61
Prec_A	_8	1.402	179143	0.46	92.64
Prec_A	_9	1.405	144400	0.24	70.37
Prec_A	_10	1.404	161433	0.34	81.76
Prec_B	_1	1.403	684322	3.67	348.13
Prec_B	_2	1.404	725523	3.94	303.63
Prec_B	_3	1.404	684068	3.67	314.50
Prec_B	_4	1.402	626110	3.30	297.18

Insight Report

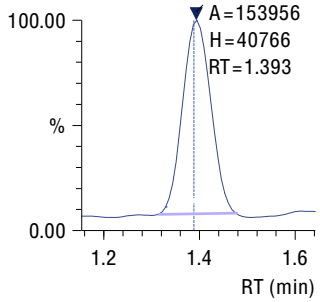
Printed at 3/30/2021 4:47:21 PM

Compound: OCT aduto - Octocrileno (continued)

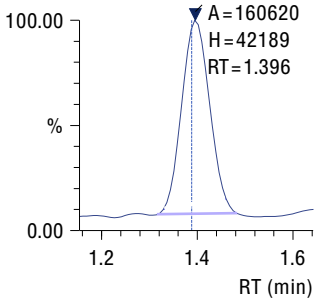
(Table continued from previous page)

Sample Name	Sample ID	Found RT	Area	Conc.	S/N
Prec_B	_5	1.403	710996	3.84	339.36
Prec_B	_6	1.402	734946	4.00	403.01
Prec_B	_7	1.401	735290	4.00	325.12
Prec_B	_8	1.405	783436	4.30	365.03
Prec_B	_9	1.405	699153	3.77	291.89
Prec_B	_10	1.404	711298	3.84	351.11

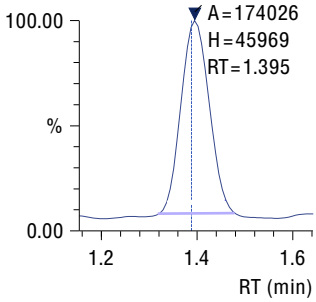
Prec_A
Conc 0.30
Q 379.25>250.20 (+) 4.63e4



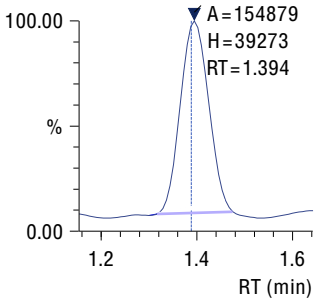
Prec_A
Conc 0.34
Q 379.25>250.20 (+) 4.69e4



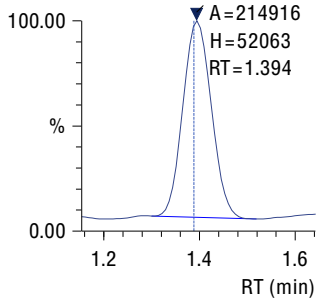
Prec_A
Conc 0.42
Q 379.25>250.20 (+) 5.19e4



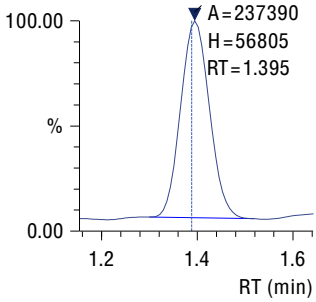
Prec_A
Conc 0.30
Q 379.25>250.20 (+) 4.31e4



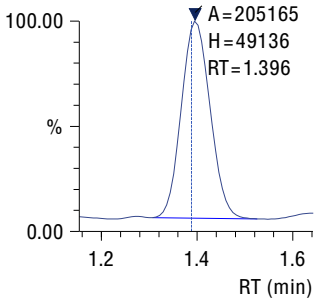
Prec_A
Conc 0.68
Q 379.25>250.20 (+) 5.41e4



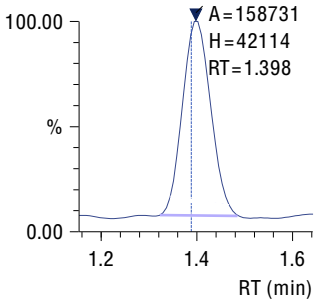
Prec_A
Conc 0.83
Q 379.25>250.20 (+) 5.89e4



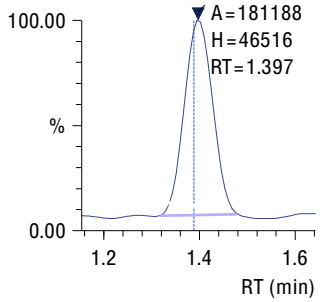
Prec_A
Conc 0.62
Q 379.25>250.20 (+) 5.09e4



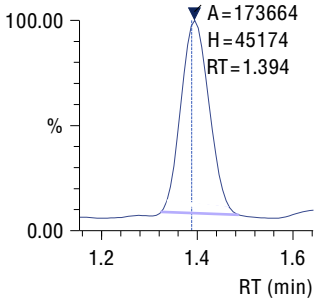
Prec_A
Conc 0.33
Q 379.25>250.20 (+) 4.79e4



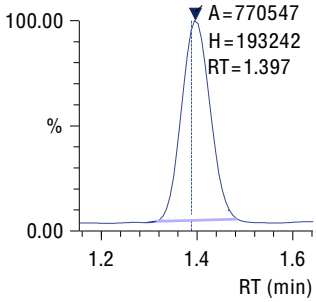
Prec_A
Conc 0.47
Q 379.25>250.20 (+) 5.12e4



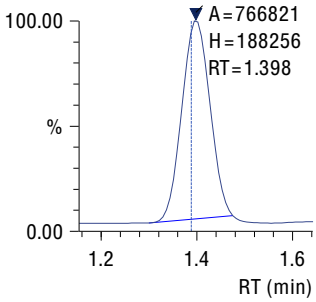
Prec_A
Conc 0.42
Q 379.25>250.20 (+) 5.03e4



Prec_B
Conc 4.22
Q 379.25>250.20 (+) 2.03e5



Prec_B
Conc 4.20
Q 379.25>250.20 (+) 1.94e5

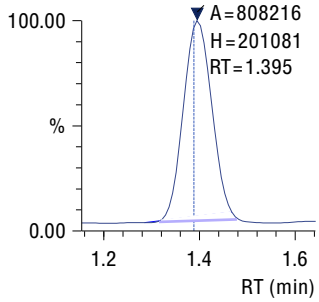


Insight Report

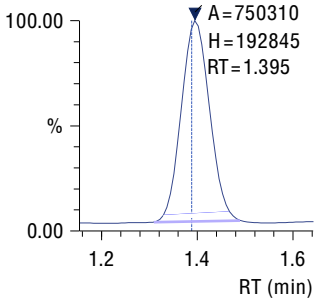
Printed at 3/30/2021 4:47:21 PM

Compound: OCT aduto - Octocrileno (continued)

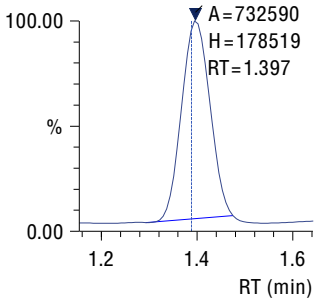
Prec_B
Conc 4.46
Q 379.25>250.20 (+) 2.10e5



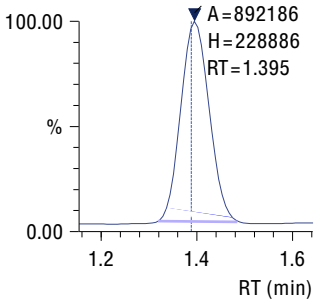
Prec_B
Conc 4.09
Q 379.25>250.20 (+) 2.04e5



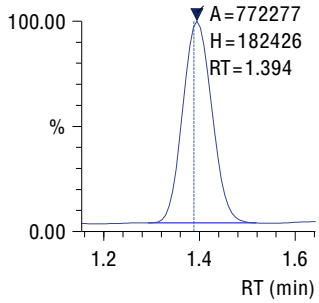
Prec_B
Conc 3.98
Q 379.25>250.20 (+) 1.84e5



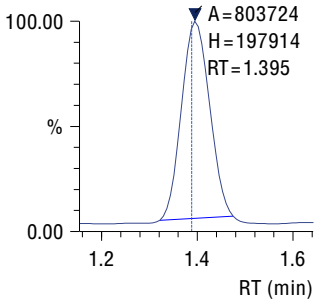
Prec_B
Conc 5.00
Q 379.25>250.20 (+) 2.45e5



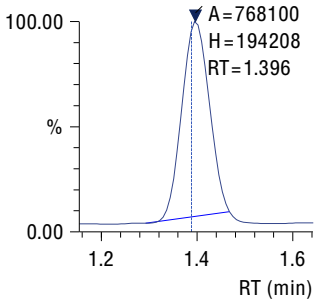
Prec_B
Conc 4.23
Q 379.25>250.20 (+) 1.85e5



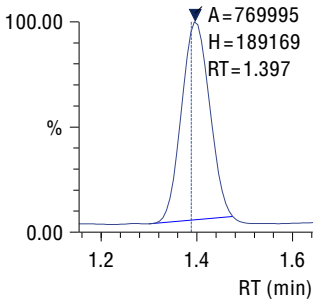
Prec_B
Conc 4.43
Q 379.25>250.20 (+) 2.05e5



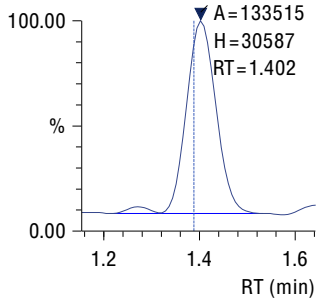
Prec_B
Conc 4.21
Q 379.25>250.20 (+) 2.04e5



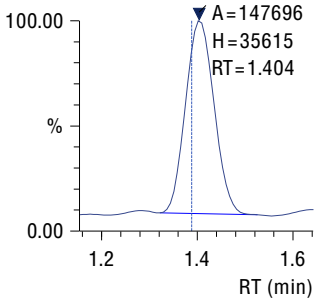
Prec_B
Conc 4.22
Q 379.25>250.20 (+) 1.95e5



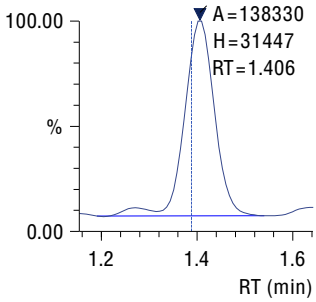
Prec_A
Conc 0.17
Q 379.25>250.20 (+) 3.24e4



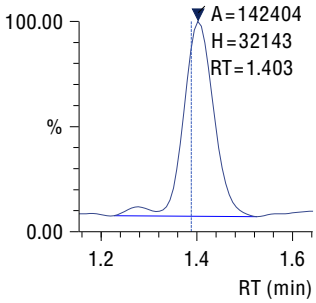
Prec_A
Conc 0.26
Q 379.25>250.20 (+) 3.77e4



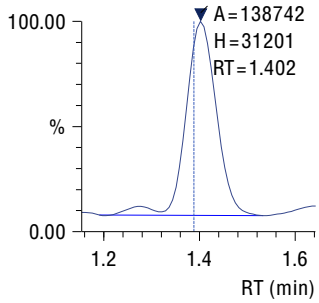
Prec_A
Conc 0.20
Q 379.25>250.20 (+) 3.30e4



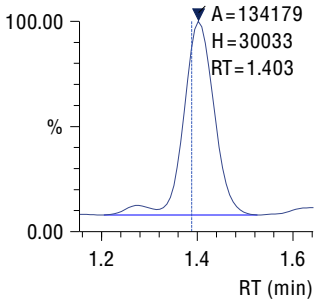
Prec_A
Conc 0.22
Q 379.25>250.20 (+) 3.37e4



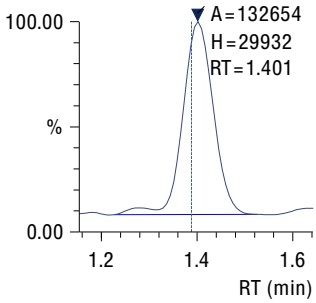
Prec_A
Conc 0.20
Q 379.25>250.20 (+) 3.28e4



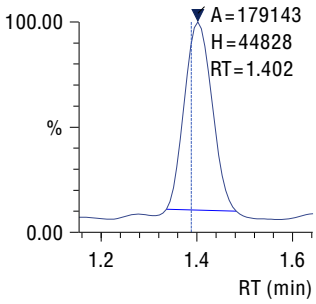
Prec_A
Conc 0.17
Q 379.25>250.20 (+) 3.17e4



Prec_A
Conc 0.16
Q 379.25>250.20 (+) 3.17e4



Prec_A
Conc 0.46
Q 379.25>250.20 (+) 4.86e4

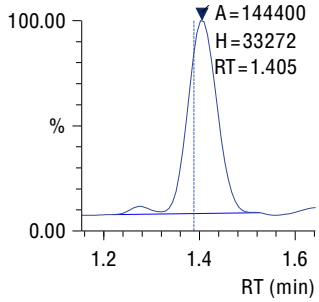


Insight Report

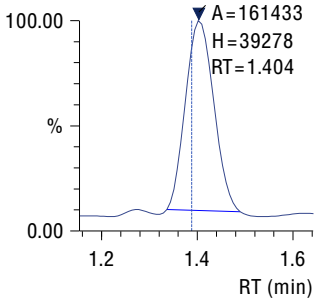
Printed at 3/30/2021 4:47:21 PM

Compound: OCT aduto - Octocrileno (continued)

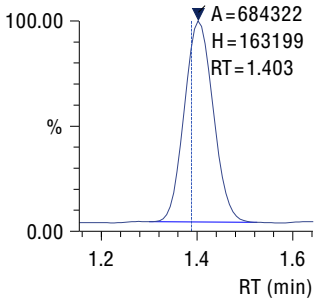
Prec_A
Conc 0.24
Q 379.25>250.20 (+) 3.52e4



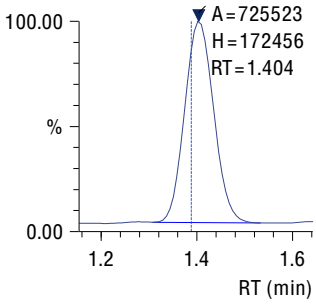
Prec_A
Conc 0.34
Q 379.25>250.20 (+) 4.23e4



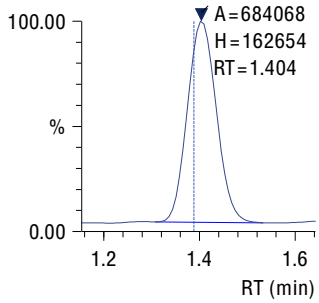
Prec_B
Conc 3.67
Q 379.25>250.20 (+) 1.66e5



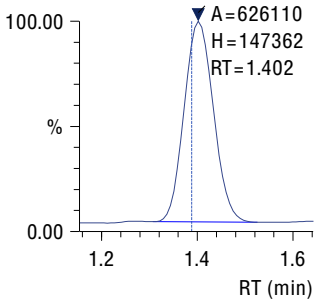
Prec_B
Conc 3.94
Q 379.25>250.20 (+) 1.75e5



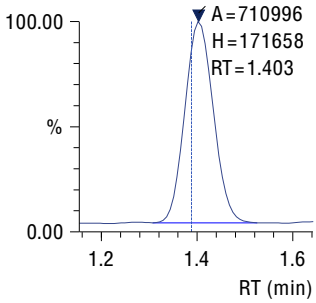
Prec_B
Conc 3.67
Q 379.25>250.20 (+) 1.65e5



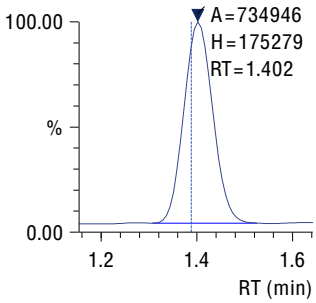
Prec_B
Conc 3.30
Q 379.25>250.20 (+) 1.50e5



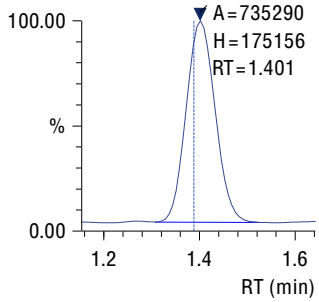
Prec_B
Conc 3.84
Q 379.25>250.20 (+) 1.74e5



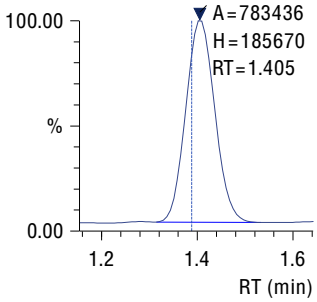
Prec_B
Conc 4.00
Q 379.25>250.20 (+) 1.78e5



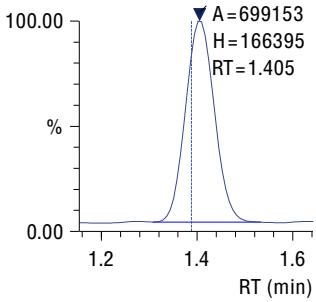
Prec_B
Conc 4.00
Q 379.25>250.20 (+) 1.78e5



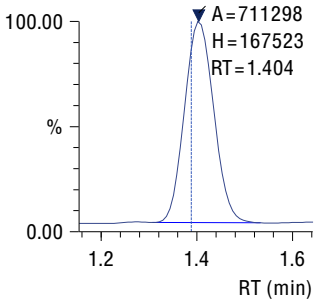
Prec_B
Conc 4.30
Q 379.25>250.20 (+) 1.88e5



Prec_B
Conc 3.77
Q 379.25>250.20 (+) 1.69e5



Prec_B
Conc 3.84
Q 379.25>250.20 (+) 1.70e5

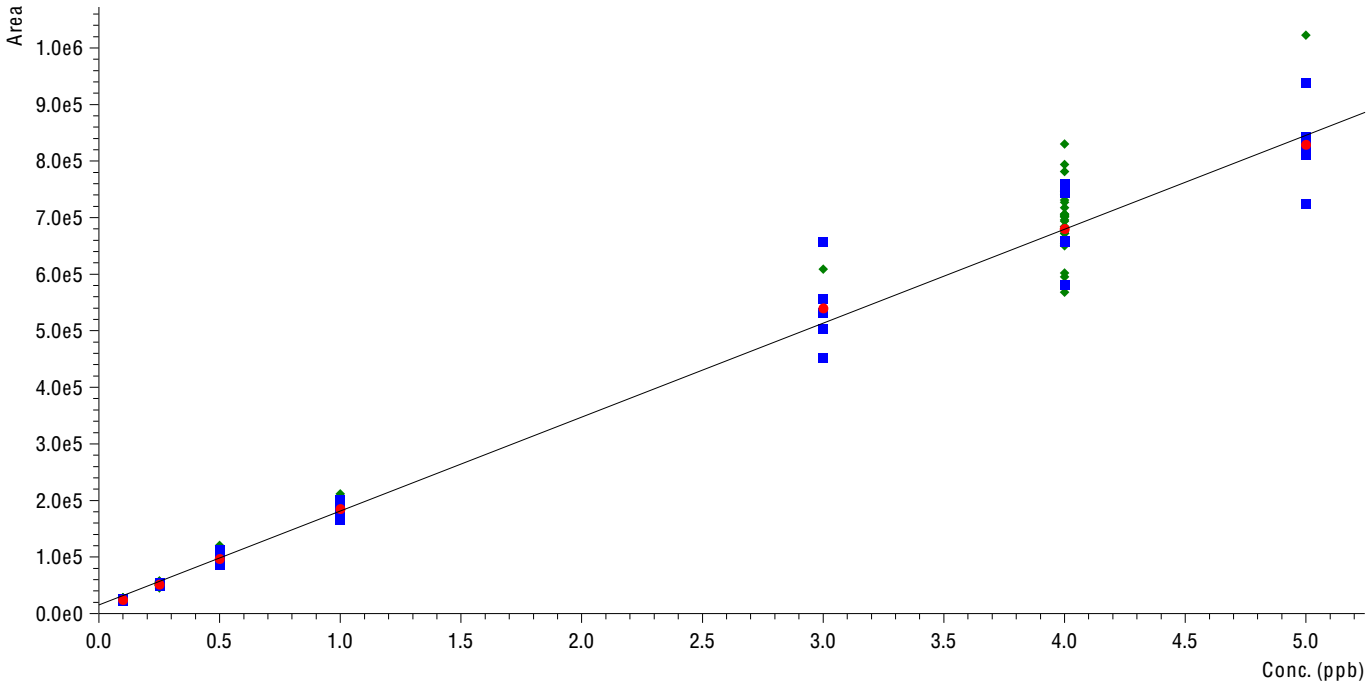


Insight Report

Printed at 3/30/2021 4:49:02 PM

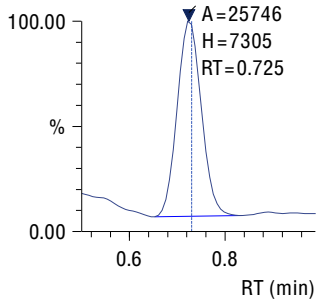
Compound: BP3 - Benzofenona-3

Curve Fit: Linear | Weighting: None | Zero: Not Forced
Quantitative Method: External Standard
Q 229.10>151.15
R^2 = 0.9983743 R = 0.9991868
y = 166031.5x + 15343.45

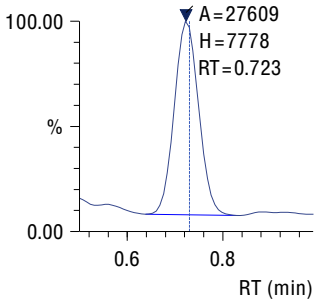


Sample Name	Sample ID	Found RT	Area	Conc.	S/N
Rec_A	_1	0.725	25746	0.06	26.56
Rec_A	_2	0.723	27609	0.07	39.39
Rec_A	_3	0.722	27700	0.07	31.86
Rec_A	_4	0.723	28494	0.08	31.74
Rec_B	_1	0.724	176397	0.97	196.56
Rec_B	_2	0.723	182531	1.01	295.28
Rec_B	_3	0.723	181107	1.00	299.94
Rec_B	_4	0.723	188315	1.04	253.29
Rec_C	_1	0.723	701210	4.13	985.43
Rec_C	_2	0.723	595430	3.49	667.02
Rec_C	_3	0.723	730979	4.31	841.96
Rec_C	_4	0.723	781355	4.61	848.23

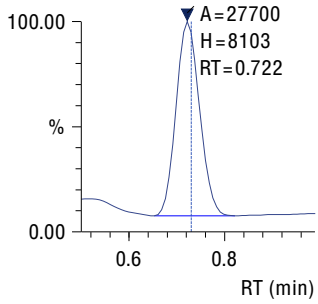
Rec_A
Conc 0.06
Q 229.10>151.15 (+) 7.65e3



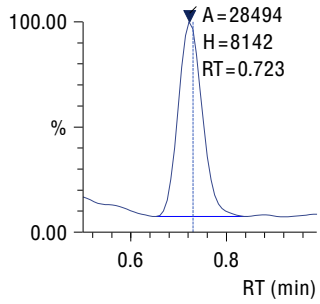
Rec_A
Conc 0.07
Q 229.10>151.15 (+) 8.21e3



Rec_A
Conc 0.07
Q 229.10>151.15 (+) 8.51e3



Rec_A
Conc 0.08
Q 229.10>151.15 (+) 8.54e3

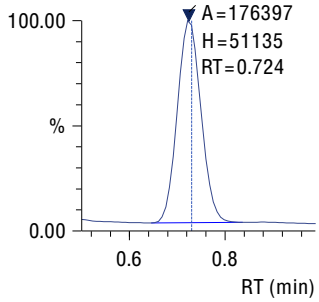


Insight Report

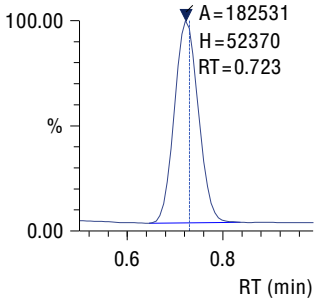
Printed at 3/30/2021 4:49:02 PM

Compound: BP3 - Benzofenona-3 (continued)

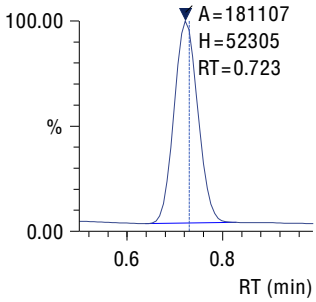
Rec_B
Conc 0.97
Q 229.10>151.15 (+) 5.17e4



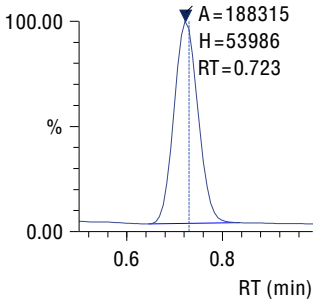
Rec_B
Conc 1.01
Q 229.10>151.15 (+) 5.29e4



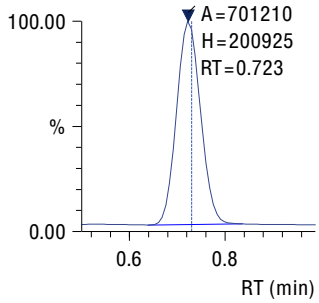
Rec_B
Conc 1.00
Q 229.10>151.15 (+) 5.28e4



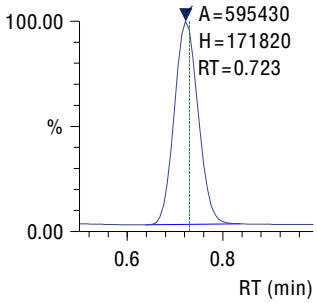
Rec_B
Conc 1.04
Q 229.10>151.15 (+) 5.45e4



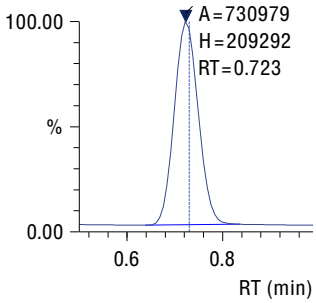
Rec_C
Conc 4.13
Q 229.10>151.15 (+) 2.02e5



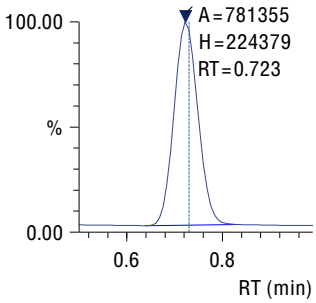
Rec_C
Conc 3.49
Q 229.10>151.15 (+) 1.73e5



Rec_C
Conc 4.31
Q 229.10>151.15 (+) 2.10e5



Rec_C
Conc 4.61
Q 229.10>151.15 (+) 2.25e5

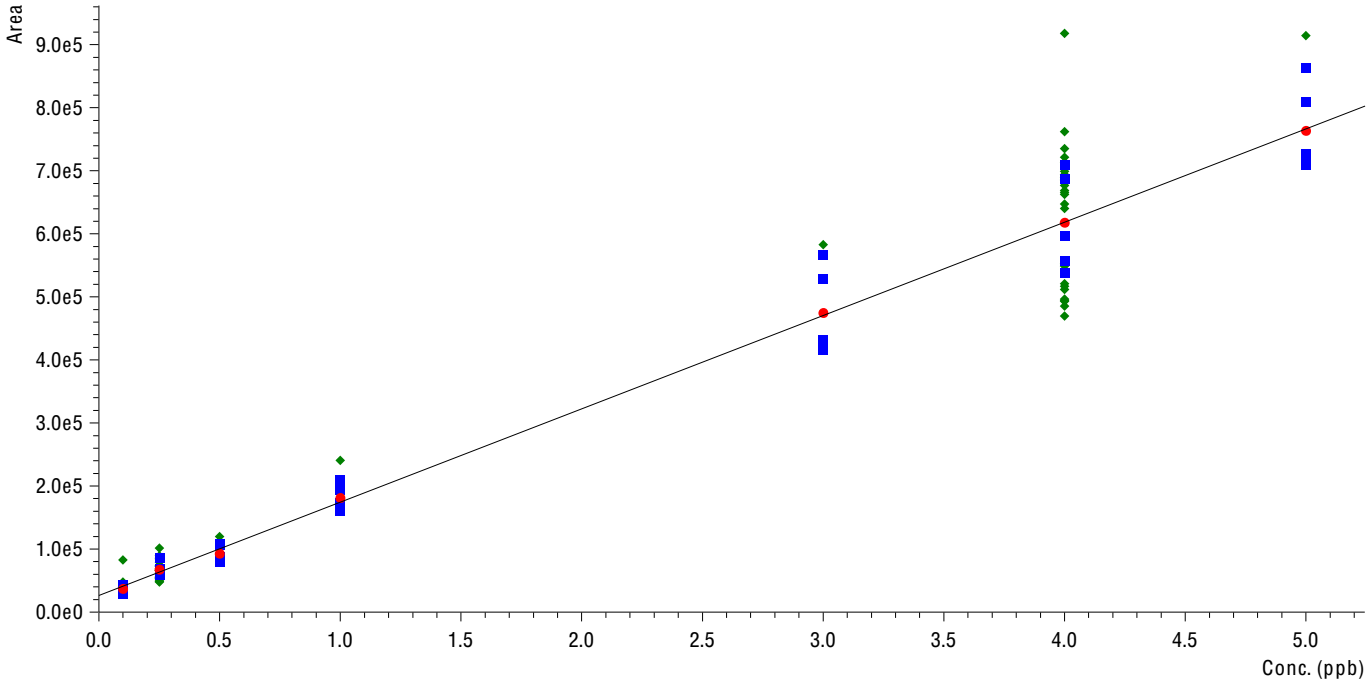


Insight Report

Printed at 3/30/2021 4:49:02 PM

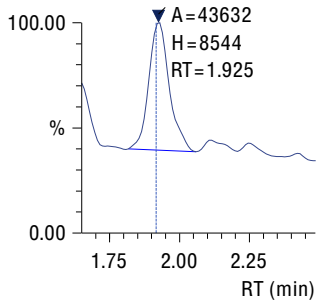
Compound: OMC - Octinoxato

Curve Fit: Linear | Weighting: None | Zero: Not Forced
Quantitative Method: External Standard
Q 291.20>161.15
R^2 = 0.9996864 R = 0.9998432
y = 147964.1x + 26538.75

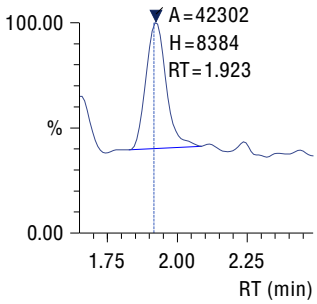


Sample Name	Sample ID	Found RT	Area	Conc.	S/N
Rec_A	_1	1.925	43632	0.12	20.22
Rec_A	_2	1.923	42302	0.11	27.56
Rec_A	_3	1.920	82510	0.38	49.42
Rec_A	_4	1.921	43765	0.12	17.48
Rec_B	_1	1.925	168327	0.96	99.75
Rec_B	_2	1.920	240516	1.45	157.93
Rec_B	_3	1.921	188638	1.10	114.28
Rec_B	_4	1.921	195974	1.15	151.30
Rec_C	_1	1.922	698972	4.54	347.75
Rec_C	_2	1.920	694331	4.51	330.16
Rec_C	_3	1.921	676598	4.39	337.48
Rec_C	_4	1.922	762131	4.97	346.17

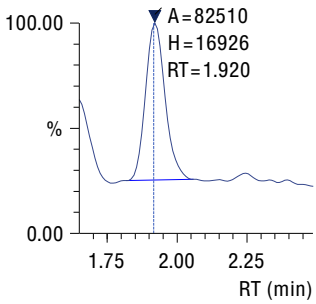
Rec_A
Conc 0.12
Q 291.20>161.15 (+) 1.37e4



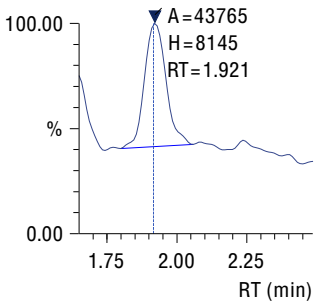
Rec_A
Conc 0.11
Q 291.20>161.15 (+) 1.36e4



Rec_A
Conc 0.38
Q 291.20>161.15 (+) 2.20e4

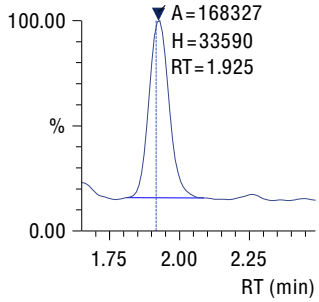


Rec_A
Conc 0.12
Q 291.20>161.15 (+) 1.35e4

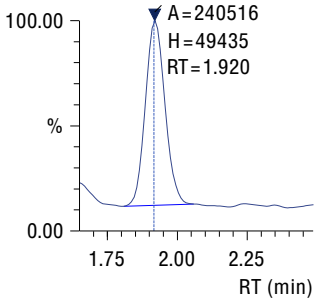


Compound: OMC - Octinoxato (continued)

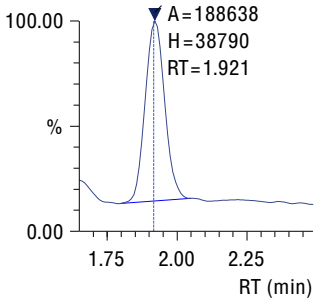
Rec_B
Conc 0.96
Q 291.20>161.15 (+) 3.87e4



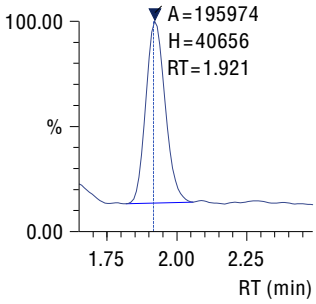
Rec_B
Conc 1.45
Q 291.20>161.15 (+) 5.47e4



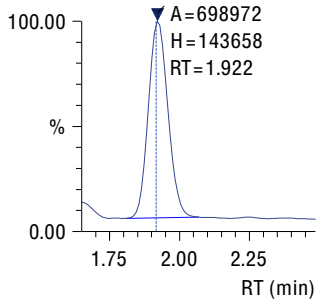
Rec_B
Conc 1.10
Q 291.20>161.15 (+) 4.40e4



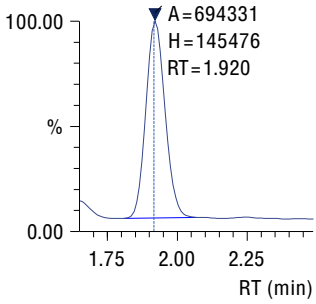
Rec_B
Conc 1.15
Q 291.20>161.15 (+) 4.57e4



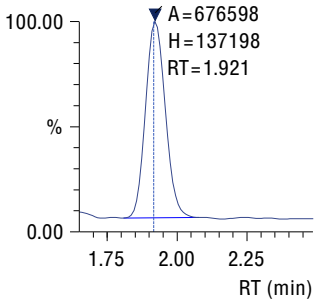
Rec_C
Conc 4.54
Q 291.20>161.15 (+) 1.49e5



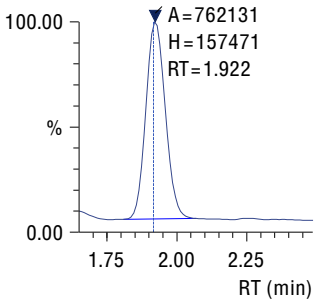
Rec_C
Conc 4.51
Q 291.20>161.15 (+) 1.51e5



Rec_C
Conc 4.39
Q 291.20>161.15 (+) 1.43e5



Rec_C
Conc 4.97
Q 291.20>161.15 (+) 1.63e5

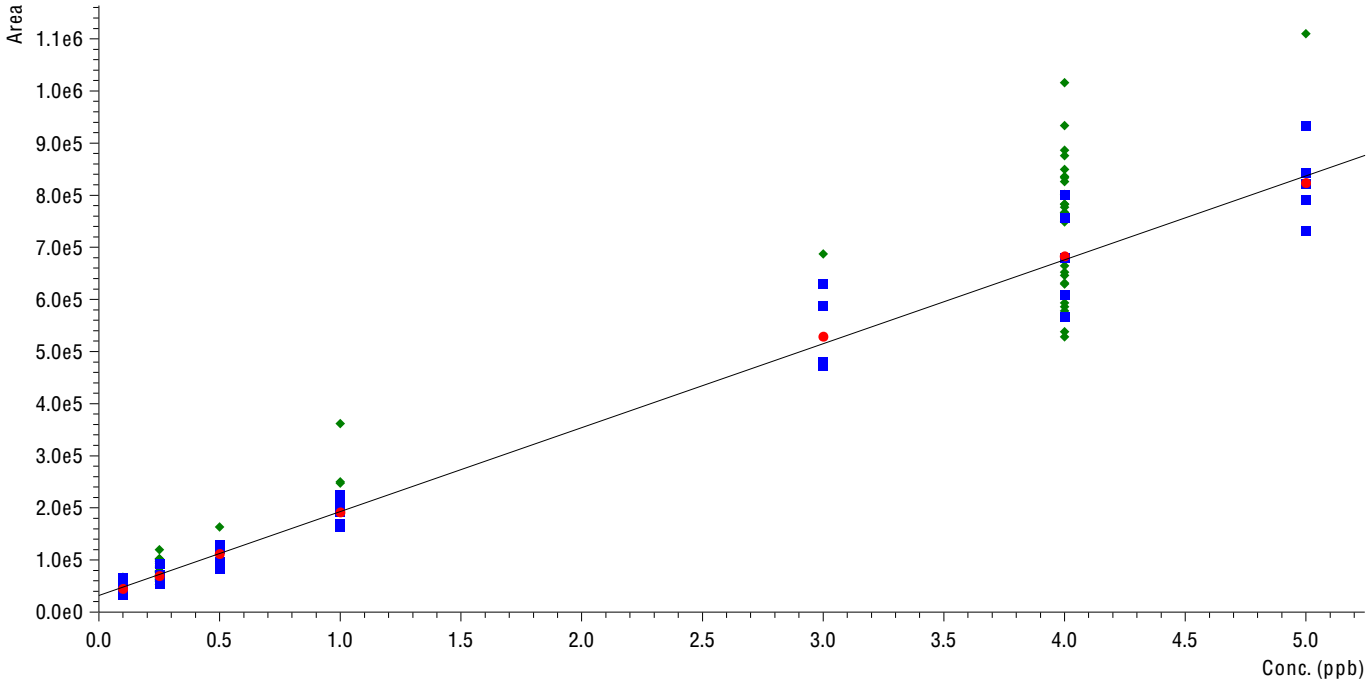


Insight Report

Printed at 3/30/2021 4:49:02 PM

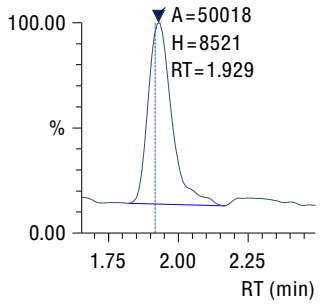
Compound: BMDM - Avobenzona

Curve Fit: Linear | Weighting: None | Zero: Not Forced
Quantitative Method: External Standard
Q 311.20>161.20
R^2 = 0.9992920 R = 0.9996459
y = 161058.5x + 31730.33

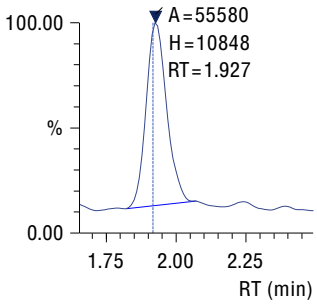


Sample Name	Sample ID	Found RT	Area	Conc.	S/N
Rec_A	_1	1.929	50018	0.11	69.52
Rec_A	_2	1.927	55580	0.15	68.22
Rec_A	_3	1.926	56914	0.16	51.38
Rec_A	_4	1.927	54662	0.14	95.27
Rec_B	_1	1.931	213307	1.13	267.47
Rec_B	_2	1.926	247286	1.34	184.97
Rec_B	_3	1.927	219275	1.16	195.87
Rec_B	_4	1.930	361874	2.05	210.36
Rec_C	_1	1.929	783183	4.67	224.88
Rec_C	_2	1.927	767108	4.57	235.87
Rec_C	_3	1.928	835704	4.99	249.35
Rec_C	_4	1.929	933879	5.60	342.20

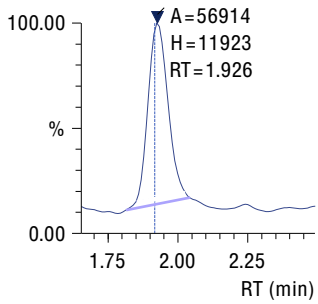
Rec_A
Conc 0.11
Q 311.20>161.20 (+) 9.60e3



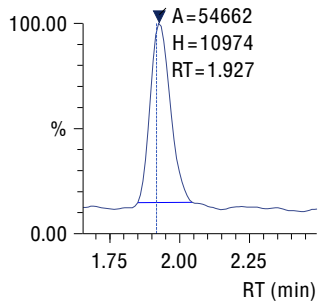
Rec_A
Conc 0.15
Q 311.20>161.20 (+) 1.21e4



Rec_A
Conc 0.16
Q 311.20>161.20 (+) 1.39e4



Rec_A
Conc 0.14
Q 311.20>161.20 (+) 1.25e4

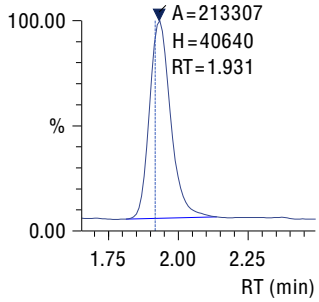


Insight Report

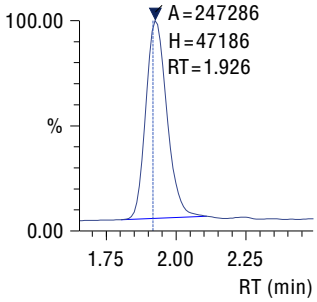
Printed at 3/30/2021 4:49:02 PM

Compound: BMDM - Avobenzona (continued)

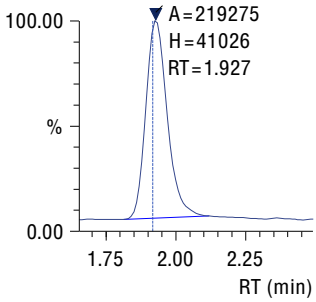
Rec_B
Conc 1.13
Q 311.20>161.20 (+) 4.20e4



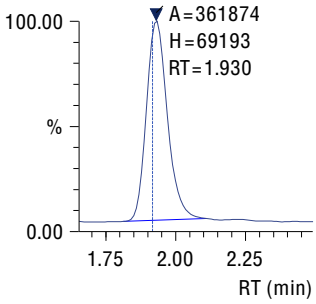
Rec_B
Conc 1.34
Q 311.20>161.20 (+) 4.88e4



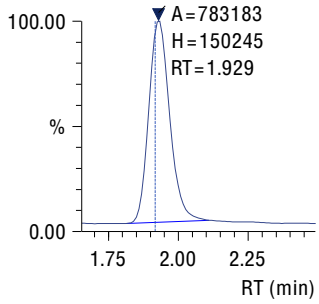
Rec_B
Conc 1.16
Q 311.20>161.20 (+) 4.25e4



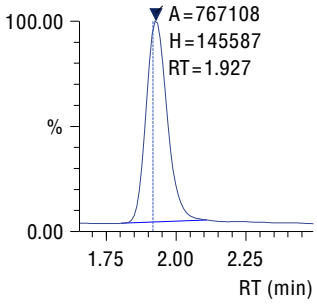
Rec_B
Conc 2.05
Q 311.20>161.20 (+) 7.10e4



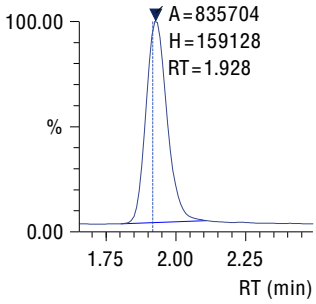
Rec_C
Conc 4.67
Q 311.20>161.20 (+) 1.53e5



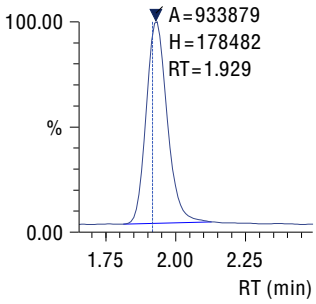
Rec_C
Conc 4.57
Q 311.20>161.20 (+) 1.48e5



Rec_C
Conc 4.99
Q 311.20>161.20 (+) 1.62e5



Rec_C
Conc 5.60
Q 311.20>161.20 (+) 1.81e5

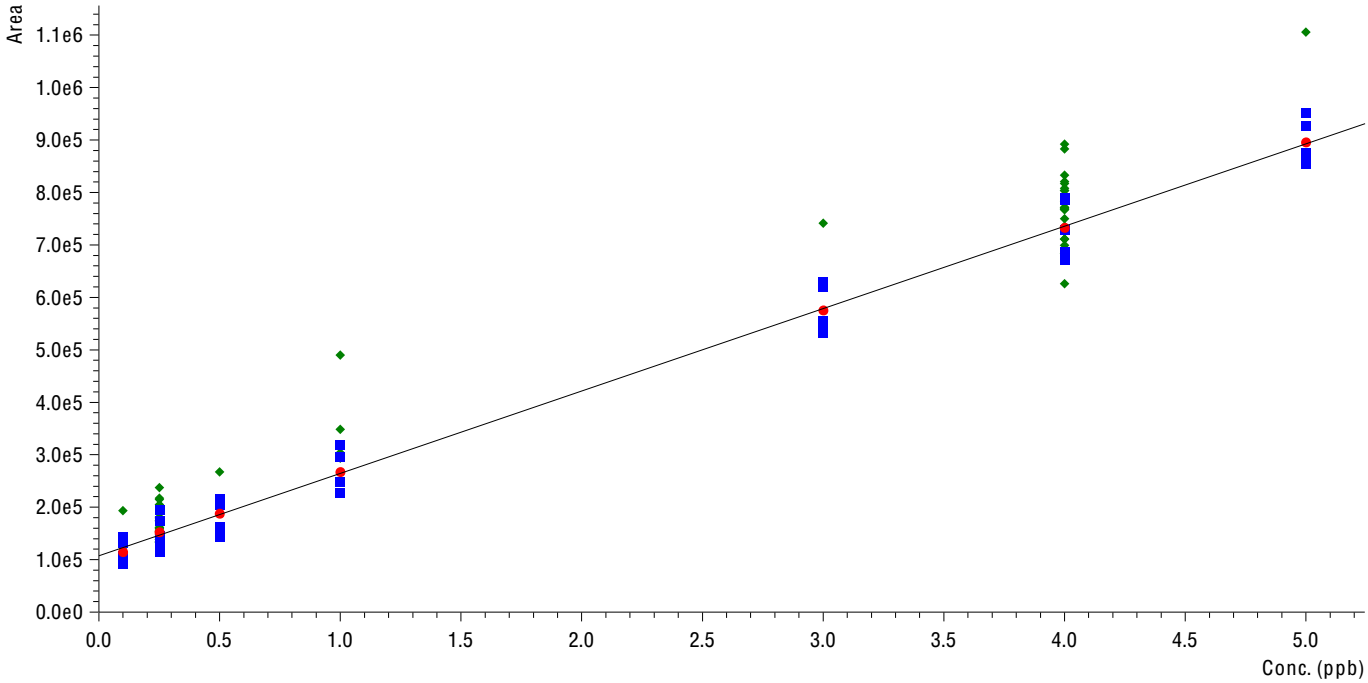


Insight Report

Printed at 3/30/2021 4:49:02 PM

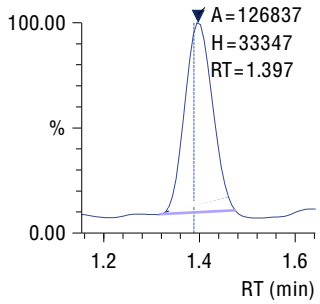
Compound: OCT aduto - Octocrileno

Curve Fit: Linear | Weighting: None | Zero: Not Forced
Quantitative Method: External Standard
Q 379.25>250.20
R^2 = 0.9997386 R = 0.9998693
y = 157080.7x + 107405.4

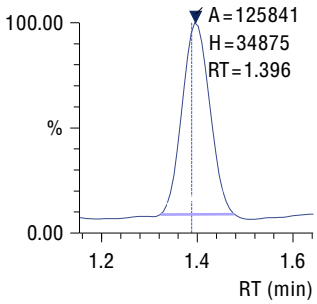


Sample Name	Sample ID	Found RT	Area	Conc.	S/N
Rec_A	_1	1.397	126837	0.12	63.70
Rec_A	_2	1.396	125841	0.12	76.41
Rec_A	_3	1.396	128468	0.13	60.02
Rec_A	_4	1.396	123236	0.10	51.79
Rec_B	_1	1.400	293349	1.18	113.00
Rec_B	_2	1.395	304019	1.25	151.10
Rec_B	_3	1.396	296628	1.20	145.49
Rec_B	_4	1.398	490108	2.44	233.01
Rec_C	_1	1.397	820785	4.54	431.88
Rec_C	_2	1.396	832925	4.62	571.37
Rec_C	_3	1.395	817028	4.52	335.25
Rec_C	_4	1.397	803926	4.43	275.53

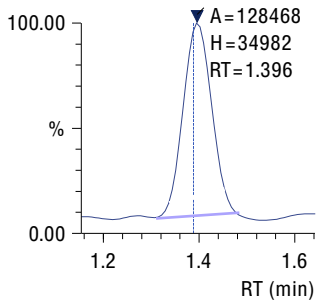
Rec_A
Conc 0.12
Q 379.25>250.20 (+) 3.76e4



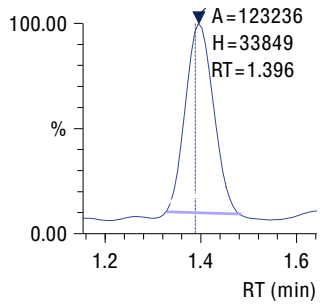
Rec_A
Conc 0.12
Q 379.25>250.20 (+) 4.08e4



Rec_A
Conc 0.13
Q 379.25>250.20 (+) 4.14e4



Rec_A
Conc 0.10
Q 379.25>250.20 (+) 4.03e4

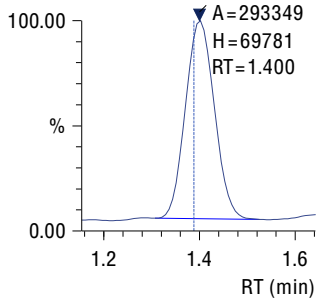


Insight Report

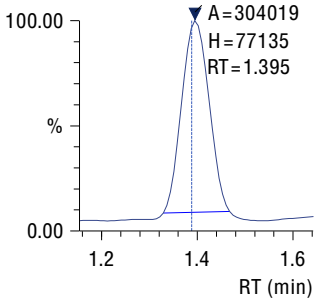
Printed at 3/30/2021 4:49:02 PM

Compound: OCT aduto - Octocrileno (continued)

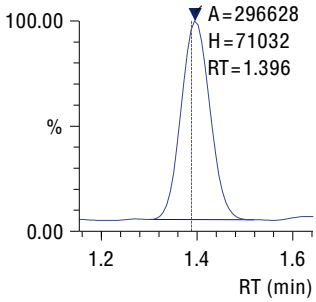
Rec_B
Conc 1.18
Q 379.25>250.20 (+) 7.19e4



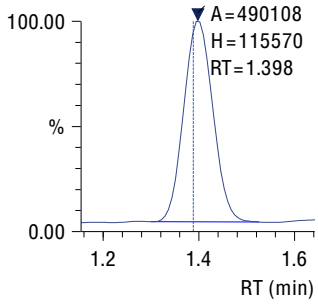
Rec_B
Conc 1.25
Q 379.25>250.20 (+) 8.22e4



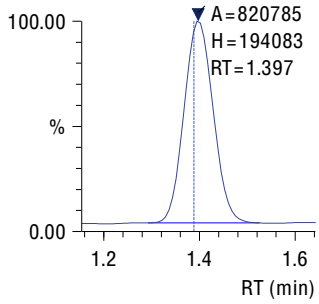
Rec_B
Conc 1.20
Q 379.25>250.20 (+) 7.30e4



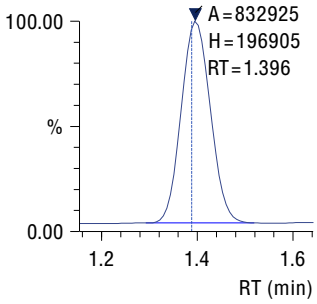
Rec_B
Conc 2.44
Q 379.25>250.20 (+) 1.18e5



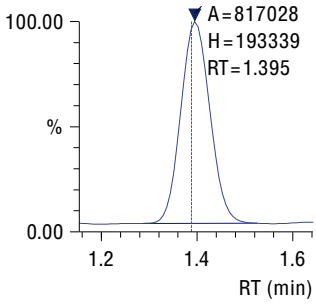
Rec_C
Conc 4.54
Q 379.25>250.20 (+) 1.96e5



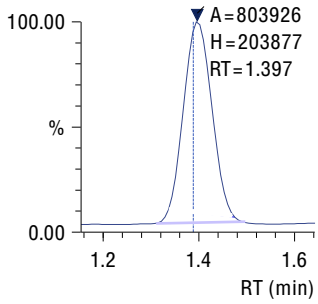
Rec_C
Conc 4.62
Q 379.25>250.20 (+) 1.99e5



Rec_C
Conc 4.52
Q 379.25>250.20 (+) 1.96e5



Rec_C
Conc 4.43
Q 379.25>250.20 (+) 2.18e5



Insight Report

Printed at 3/31/2021 8:30:48 PM

Teste de Robustez - Redução de fluxo de 0,1 mL min-1

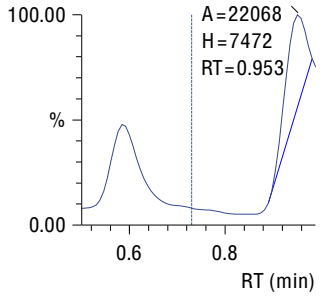
Sample ID: _Rob10
Date Acquired: 12/29/2020 11:11:43 PM
Acquired by: System Administrator

Data File: P2__Rob10_2020_12_29_FiltrosUV_LCMS_Rob10_003
Vial: 19 | Inj. Volume: 1.0000uL | Tray: 2

Name	Sample Name	Sample ID	Found RT	Area	Conc.	S/N
BP3 - Benzofenona-3	P2	_Rob10	----	----	----	----
OMC - Octinoxato	P2	_Rob10	----	----	----	----
BMDM - Avobenzona	P2	_Rob10	----	----	----	----
OCT aduto - Octocrileno	P2	_Rob10	----	----	----	----

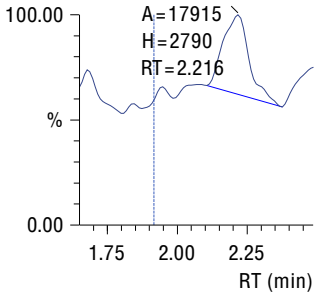
BP3 - Benzofenona-3

Conc ----
Q 229.10>151.15 (+) 1.70e4



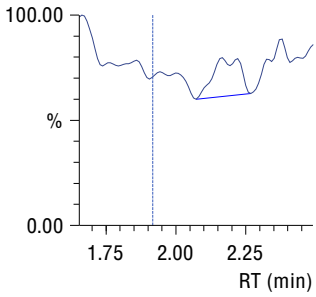
OMC - Octinoxato

Conc ----
Q 291.20>161.15 (+) 7.17e3



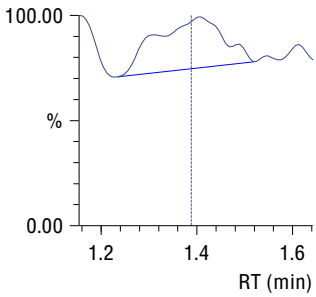
BMDM - Avobenzona

Conc ----
Q 311.20>161.20 (+) 1.57e3



OCT aduto - Octocrileno

Conc ----
Q 379.25>250.20 (+) 1.88e3



Insight Report

Printed at 3/31/2021 8:30:48 PM

Teste de Robustez - Redução de fluxo de 0,1 mL min-1

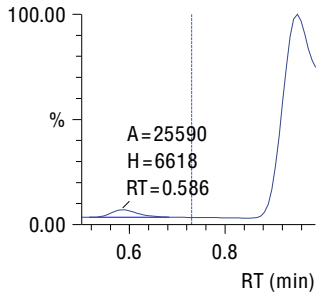
Sample ID: _Rob10
Date Acquired: 12/29/2020 11:17:14 PM
Acquired by: System Administrator

Data File: P6__Rob10_2020_12_29_FiltrosUV_LCMS_Rob10_004
Vial: 23 | Inj. Volume: 1.0000uL | Tray: 2

Name	Sample Name	Sample ID	Found RT	Area	Conc.	S/N
BP3 - Benzofenona-3	P6	_Rob10	----	----	----	----
OMC - Octinoxato	P6	_Rob10	2.204	17160	-0.06	3.84
BMDM - Avobenzona	P6	_Rob10	----	----	----	----
OCT aduto - Octocrileno	P6	_Rob10	----	----	----	----

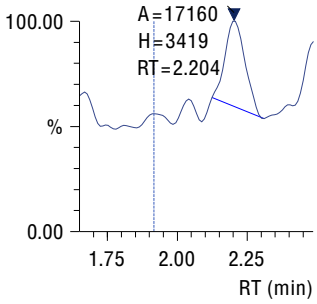
BP3 - Benzofenona-3

Conc ----
Q 229.10>151.15 (+) 1.81e5



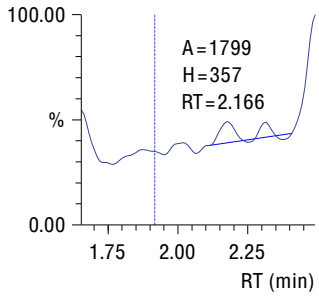
OMC - Octinoxato

Conc -0.06
Q 291.20>161.15 (+) 8.20e3



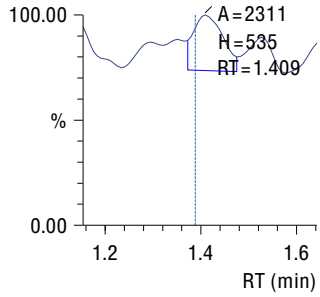
BMDM - Avobenzona

Conc ----
Q 311.20>161.20 (+) 3.64e3



OCT aduto - Octocrileno

Conc ----
Q 379.25>250.20 (+) 1.97e3



Insight Report

Printed at 3/31/2021 8:30:48 PM

Teste de Robustez - Redução 2% de solvente orgânico

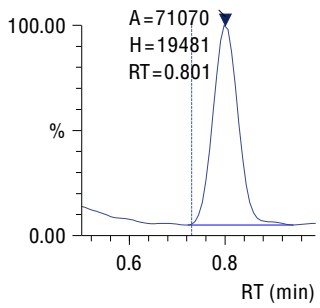
Sample ID: _Rob11
Date Acquired: 12/29/2020 11:29:44 PM
Acquired by: System Administrator

Data File: P2__Rob11_2020_12_29_FiltrosUV_LCMS_Rob11_006
Vial: 19 | Inj. Volume: 1.0000uL | Tray: 2

Name	Sample Name	Sample ID	Found RT	Area	Conc.	S/N
BP3 - Benzofenona-3	P2	_Rob11	0.801	71070	0.34	34.78
OMC - Octinoxato	P2	_Rob11	2.085	26510	0.00	1.08
BMDM - Avobenzona	P2	_Rob11	----	----	----	----
OCT aduto - Octocrileno	P2	_Rob11	1.542	5875	-0.65	4.86

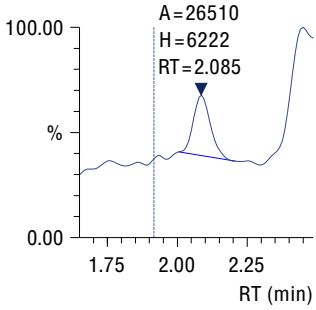
BP3 - Benzofenona-3

Conc 0.34
Q 229.10>151.15 (+) 1.99e4



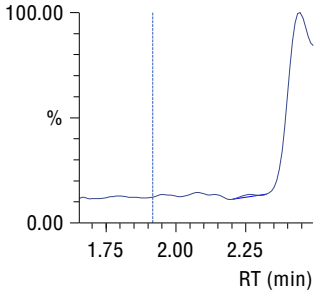
OMC - Octinoxato

Conc 0.00
Q 291.20>161.15 (+) 2.10e4



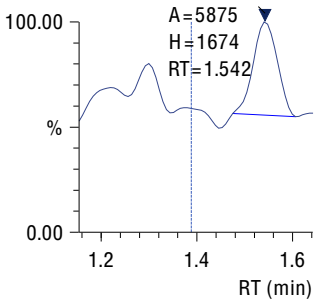
BMDM - Avobenzona

Conc ----
Q 311.20>161.20 (+) 1.17e4



OCT aduto - Octocrileno

Conc -0.65
Q 379.25>250.20 (+) 3.66e3



Insight Report

Printed at 3/31/2021 8:30:48 PM

Teste de Robustez - Redução 2% de solvente orgânico

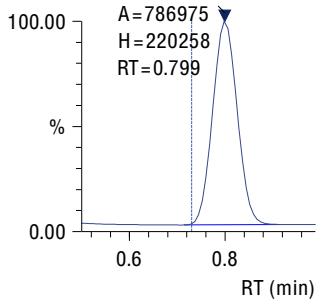
Sample ID: _Rob11
Date Acquired: 12/29/2020 11:35:16 PM
Acquired by: System Administrator

Data File: P6__Rob11_2020_12_29_FiltrosUV_LCMS_Rob11_007
Vial: 23 | Inj. Volume: 1.0000uL | Tray: 2

Name	Sample Name	Sample ID	Found RT	Area	Conc.	S/N
BP3 - Benzofenona-3	P6	_Rob11	0.799	786975	4.65	436.97
OMC - Octinoxato	P6	_Rob11	----	----	----	----
BMDM - Avobenzona	P6	_Rob11	----	----	----	----
OCT aduto - Octocrileno	P6	_Rob11	----	----	----	----

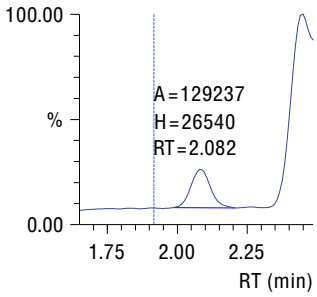
BP3 - Benzofenona-3

Conc 4.65
Q 229.10>151.15 (+) 2.21e5



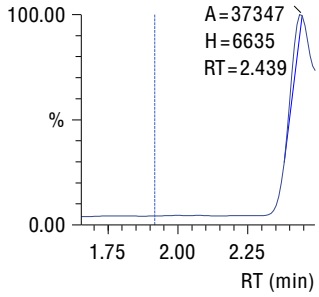
OMC - Octinoxato

Conc ----
Q 291.20>161.15 (+) 1.42e5



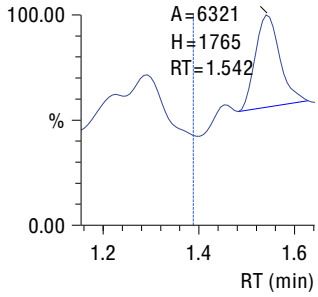
BMDM - Avobenzona

Conc ----
Q 311.20>161.20 (+) 1.01e5



OCT aduto - Octocrileno

Conc ----
Q 379.25>250.20 (+) 3.90e3



Insight Report

Printed at 3/31/2021 8:30:48 PM

Teste de Robustez - Sem alterações

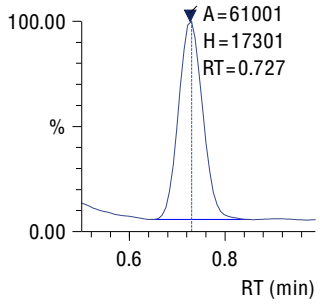
Sample ID: _Rob9
Date Acquired: 12/30/2020 12:26:52 AM
Acquired by: System Administrator

Data File: P2__Rob9_2020_12_29_FiltrosUV_LCMS_Rob9_015
Vial: 19 | Inj. Volume: 1.0000uL | Tray: 2

Name	Sample Name	Sample ID	Found RT	Area	Conc.	S/N
BP3 - Benzofenona-3	P2	_Rob9	0.727	61001	0.27	39.81
OMC - Octinoxato	P2	_Rob9	1.937	56857	0.20	26.00
BMDM - Avobenzona	P2	_Rob9	1.945	73345	0.26	92.95
OCT aduto - Octocrileno	P2	_Rob9	1.411	158977	0.33	88.02

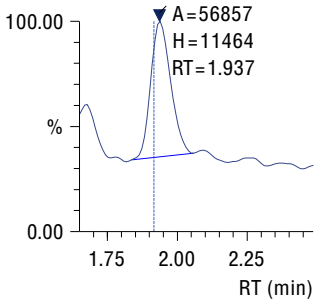
BP3 - Benzofenona-3

Conc 0.27
Q 229.10>151.15 (+) 1.78e4



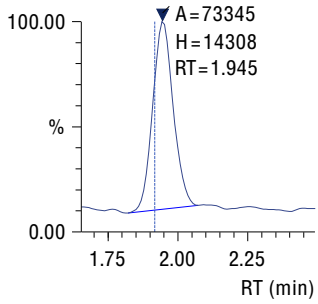
OMC - Octinoxato

Conc 0.20
Q 291.20>161.15 (+) 1.73e4



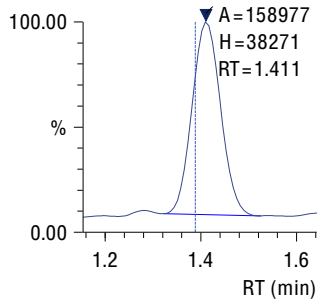
BMDM - Avobenzona

Conc 0.26
Q 311.20>161.20 (+) 1.56e4



OCT aduto - Octocrileno

Conc 0.33
Q 379.25>250.20 (+) 4.05e4



Insight Report

Printed at 3/31/2021 8:30:48 PM

Teste de Robustez - Sem alterações

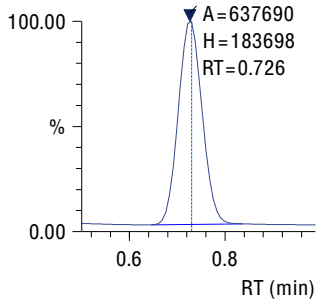
Sample ID: _Rob9
Date Acquired: 12/30/2020 12:32:22 AM
Acquired by: System Administrator

Data File: P6__Rob9_2020_12_29_FiltrosUV_LCMS_Rob9_016
Vial: 23 | Inj. Volume: 1.0000uL | Tray: 2

Name	Sample Name	Sample ID	Found RT	Area	Conc.	S/N
BP3 - Benzofenona-3	P6	_Rob9	0.726	637690	3.75	504.46
OMC - Octinoxato	P6	_Rob9	1.935	582710	3.76	454.49
BMDM - Avobenzona	P6	_Rob9	1.943	607739	3.58	227.00
OCT aduto - Octocrileno	P6	_Rob9	1.409	732861	3.98	376.14

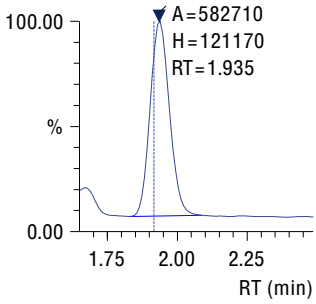
BP3 - Benzofenona-3

Conc 3.75
Q 229.10>151.15 (+) 1.85e5



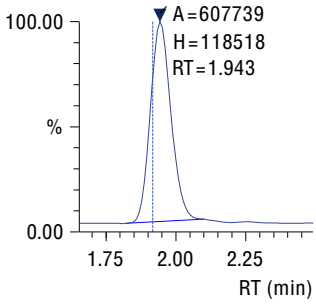
OMC - Octinoxato

Conc 3.76
Q 291.20>161.15 (+) 1.27e5



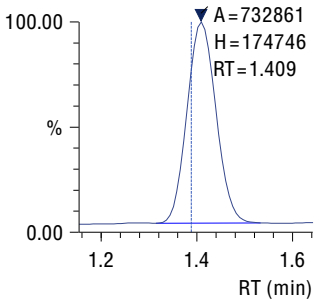
BMDM - Avobenzona

Conc 3.58
Q 311.20>161.20 (+) 1.21e5



OCT aduto - Octocrileno

Conc 3.98
Q 379.25>250.20 (+) 1.77e5



Insight Report

Printed at 3/31/2021 8:30:48 PM

Teste de Robustez - Redução de 2o na temperatura do forno de coluna

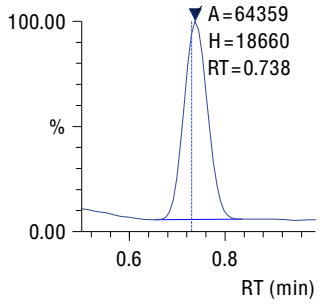
Sample ID: _Rob13
Date Acquired: 12/30/2020 1:05:07 AM
Acquired by: System Administrator

Data File: P2__Rob13_2020_12_29_FiltrosUV_LCMS_Rob13_021
Vial: 19 | Inj. Volume: 1.0000uL | Tray: 2

Name	Sample Name	Sample ID	Found RT	Area	Conc.	S/N
BP3 - Benzofenona-3	P2	_Rob13	0.738	64359	0.30	54.29
OMC - Octinoxato	P2	_Rob13	1.996	64227	0.25	32.49
BMDM - Avobenzona	P2	_Rob13	2.008	80681	0.30	169.98
OCT aduto - Octocrileno	P2	_Rob13	1.440	181638	0.47	86.48

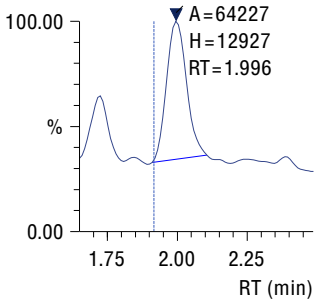
BP3 - Benzofenona-3

Conc 0.30
Q 229.10>151.15 (+) 1.92e4



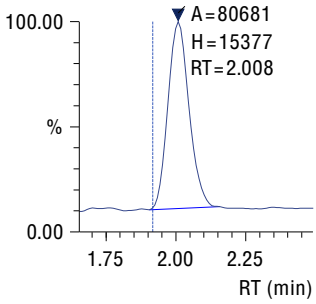
OMC - Octinoxato

Conc 0.25
Q 291.20>161.15 (+) 1.91e4



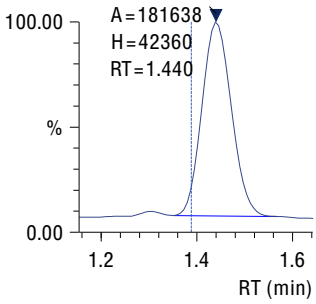
BMDM - Avobenzona

Conc 0.30
Q 311.20>161.20 (+) 1.68e4



OCT aduto - Octocrileno

Conc 0.47
Q 379.25>250.20 (+) 4.46e4



Insight Report

Printed at 3/31/2021 8:30:48 PM

Teste de Robustez - Redução de 2o na temperatura do forno de coluna

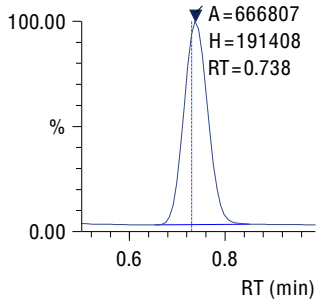
Sample ID: _Rob13
Date Acquired: 12/30/2020 1:10:36 AM
Acquired by: System Administrator

Data File: P6__Rob13_2020_12_29_FiltrosUV_LCMS_Rob13_022
Vial: 23 | Inj. Volume: 1.0000uL | Tray: 2

Name	Sample Name	Sample ID	Found RT	Area	Conc.	S/N
BP3 - Benzofenona-3	P6	_Rob13	0.738	666807	3.92	622.28
OMC - Octinoxato	P6	_Rob13	1.997	622126	4.03	234.82
BMDM - Avobenzona	P6	_Rob13	2.008	632470	3.73	228.54
OCT aduto - Octocrileno	P6	_Rob13	1.441	768634	4.21	342.88

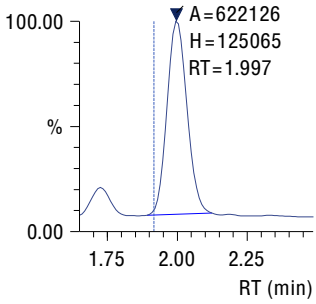
BP3 - Benzofenona-3

Conc 3.92
Q 229.10>151.15 (+) 1.92e5



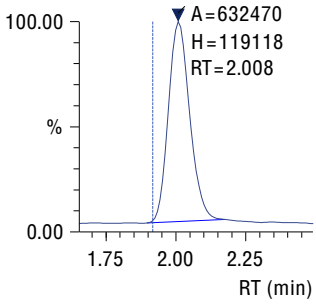
OMC - Octinoxato

Conc 4.03
Q 291.20>161.15 (+) 1.32e5



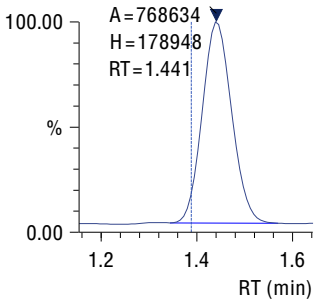
BMDM - Avobenzona

Conc 3.73
Q 311.20>161.20 (+) 1.22e5



OCT aduto - Octocrileno

Conc 4.21
Q 379.25>250.20 (+) 1.82e5



Insight Report

Printed at 3/31/2021 8:30:48 PM

Teste de Robustez - Sem alterações

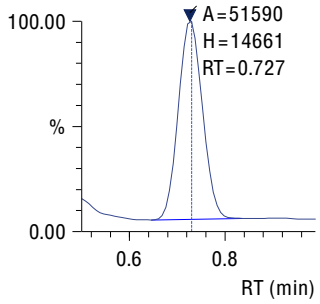
Sample ID: _Rob1
Date Acquired: 12/30/2020 1:41:06 AM
Acquired by: System Administrator

Data File: P2__Rob1_2020_12_29_FiltrosUV_LCMS_Rob1_027
Vial: 19 | Inj. Volume: 1.0000uL | Tray: 2

Name	Sample Name	Sample ID	Found RT	Area	Conc.	S/N
BP3 - Benzofenona-3	P2	_Rob1	0.727	51590	0.22	35.41
OMC - Octinoxato	P2	_Rob1	1.936	64792	0.26	28.79
BMDM - Avobenzona	P2	_Rob1	1.941	84779	0.33	123.76
OCT aduto - Octocrileno	P2	_Rob1	1.408	191987	0.54	110.66

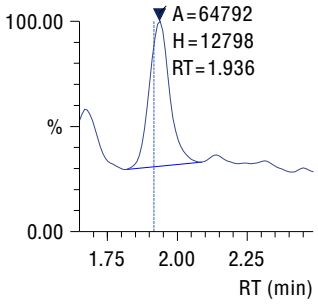
BP3 - Benzofenona-3

Conc 0.22
Q 229.10>151.15 (+) 1.51e4



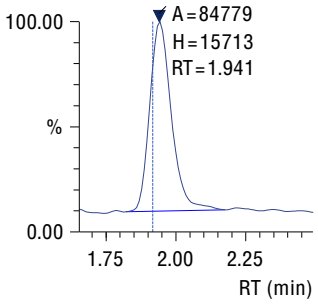
OMC - Octinoxato

Conc 0.26
Q 291.20>161.15 (+) 1.80e4



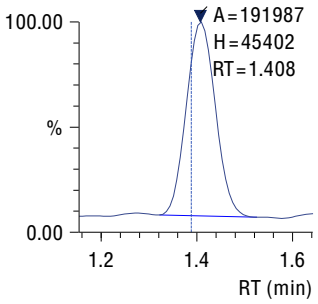
BMDM - Avobenzona

Conc 0.33
Q 311.20>161.20 (+) 1.69e4



OCT aduto - Octocrileno

Conc 0.54
Q 379.25>250.20 (+) 4.78e4



Insight Report

Printed at 3/31/2021 8:30:48 PM

Teste de Robustez - Sem alterações

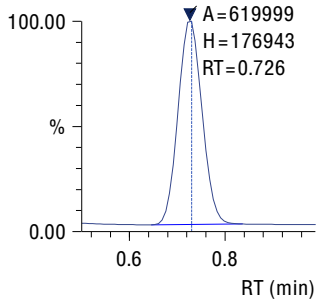
Sample ID: _Rob1
Date Acquired: 12/30/2020 1:46:34 AM
Acquired by: System Administrator

Data File: P6__Rob1_2020_12_29_FiltrosUV_LCMS_Rob1_028
Vial: 23 | Inj. Volume: 1.0000uL | Tray: 2

Name	Sample Name	Sample ID	Found RT	Area	Conc.	S/N
BP3 - Benzofenona-3	P6	_Rob1	0.726	619999	3.64	481.79
OMC - Octinoxato	P6	_Rob1	1.931	584365	3.77	251.08
BMDM - Avobenzona	P6	_Rob1	1.938	605093	3.56	250.30
OCT aduto - Octocrileno	P6	_Rob1	1.406	738479	4.02	401.24

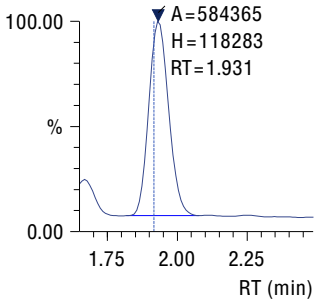
BP3 - Benzofenona-3

Conc 3.64
Q 229.10>151.15 (+) 1.78e5



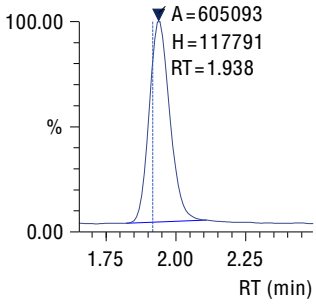
OMC - Octinoxato

Conc 3.77
Q 291.20>161.15 (+) 1.24e5



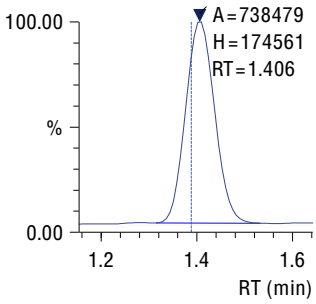
BMDM - Avobenzona

Conc 3.56
Q 311.20>161.20 (+) 1.20e5



OCT aduto - Octocrileno

Conc 4.02
Q 379.25>250.20 (+) 1.77e5



Insight Report

Printed at 3/31/2021 8:30:48 PM

Teste de Robustez - Aumento de 2o na temperatura do forno de coluna

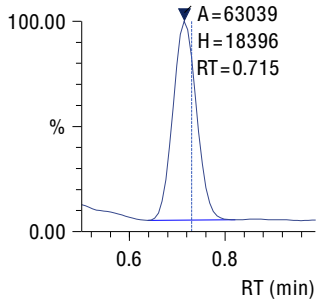
Sample ID: _Rob5
Date Acquired: 12/30/2020 2:16:55 AM
Acquired by: System Administrator

Data File: P2__Rob5_2020_12_29_FiltrosUV_LCMS_Rob5_033
Vial: 19 | Inj. Volume: 1.0000uL | Tray: 2

Name	Sample Name	Sample ID	Found RT	Area	Conc.	S/N
BP3 - Benzofenona-3	P2	_Rob5	0.715	63039	0.29	41.32
OMC - Octinoxato	P2	_Rob5	1.874	55253	0.19	34.91
BMDM - Avobenzona	P2	_Rob5	1.878	80232	0.30	92.60
OCT aduto - Octocrileno	P2	_Rob5	1.376	172846	0.42	86.76

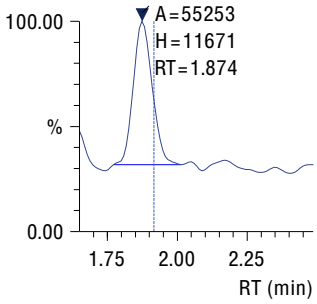
BP3 - Benzofenona-3

Conc 0.29
Q 229.10>151.15 (+) 1.89e4



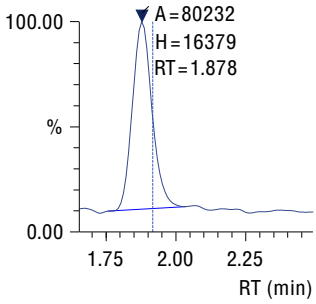
OMC - Octinoxato

Conc 0.19
Q 291.20>161.15 (+) 1.66e4



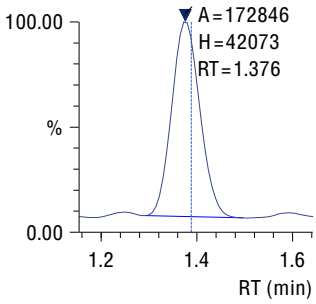
BMDM - Avobenzona

Conc 0.30
Q 311.20>161.20 (+) 1.78e4



OCT aduto - Octocrileno

Conc 0.42
Q 379.25>250.20 (+) 4.41e4



Insight Report

Printed at 3/31/2021 8:30:48 PM

Teste de Robustez - Aumento de 2o na temperatura do forno de coluna

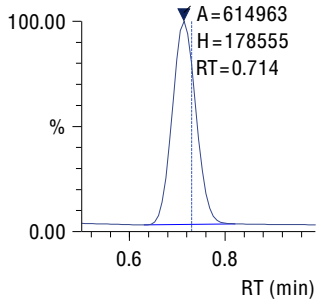
Sample ID: _Rob5
Date Acquired: 12/30/2020 2:22:22 AM
Acquired by: System Administrator

Data File: P6__Rob5_2020_12_29_FiltrosUV_LCMS_Rob5_034
Vial: 23 | Inj. Volume: 1.0000uL | Tray: 2

Name	Sample Name	Sample ID	Found RT	Area	Conc.	S/N
BP3 - Benzofenona-3	P6	_Rob5	0.714	614963	3.61	503.52
OMC - Octinoxato	P6	_Rob5	1.868	532635	3.42	304.44
BMDM - Avobenzona	P6	_Rob5	1.872	651717	3.85	262.59
OCT aduto - Octocrileno	P6	_Rob5	1.372	716437	3.88	416.11

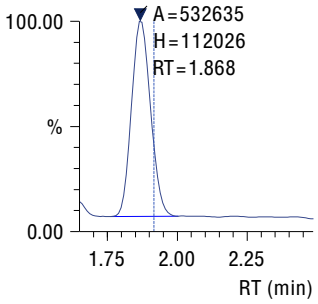
BP3 - Benzofenona-3

Conc 3.61
Q 229.10>151.15 (+) 1.79e5



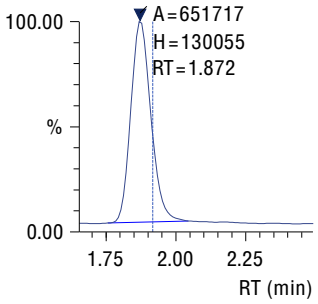
OMC - Octinoxato

Conc 3.42
Q 291.20>161.15 (+) 1.17e5



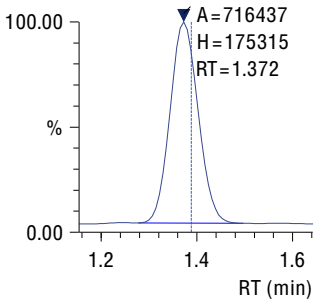
BMDM - Avobenzona

Conc 3.85
Q 311.20>161.20 (+) 1.32e5



OCT aduto - Octocrileno

Conc 3.88
Q 379.25>250.20 (+) 1.78e5



Insight Report

Printed at 3/31/2021 8:30:48 PM

Teste de Robustez - Aumento de fluxo em 0,1 mL min-1

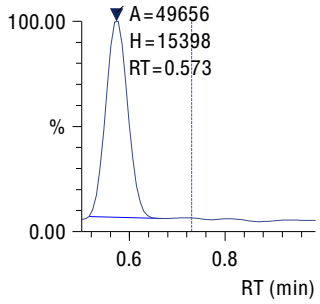
Sample ID: _Rob2
Date Acquired: 12/30/2020 2:54:10 AM
Acquired by: System Administrator

Data File: P2__Rob2_2020_12_29_FiltrosUV_LCMS_Rob2_039
Vial: 19 | Inj. Volume: 1.0000uL | Tray: 2

Name	Sample Name	Sample ID	Found RT	Area	Conc.	S/N
BP3 - Benzofenona-3	P2	_Rob2	0.573	49656	0.21	156.31
OMC - Octinoxato	P2	_Rob2	----	----	----	----
BMDM - Avobenzona	P2	_Rob2	----	----	----	----
OCT aduto - Octocrileno	P2	_Rob2	----	----	----	----

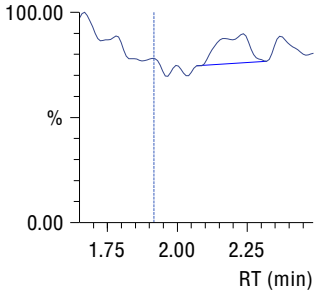
BP3 - Benzofenona-3

Conc 0.21
Q 229.10>151.15 (+) 1.61e4



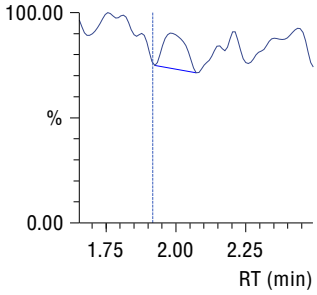
OMC - Octinoxato

Conc ----
Q 291.20>161.15 (+) 4.94e3



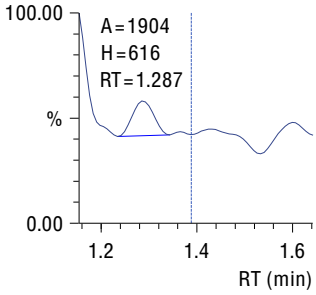
BMDM - Avobenzona

Conc ----
Q 311.20>161.20 (+) 1.48e3



OCT aduto - Octocrileno

Conc ----
Q 379.25>250.20 (+) 3.63e3



Insight Report

Printed at 3/31/2021 8:30:48 PM

Teste de Robustez - Aumento de fluxo em 0,1 mL min-1

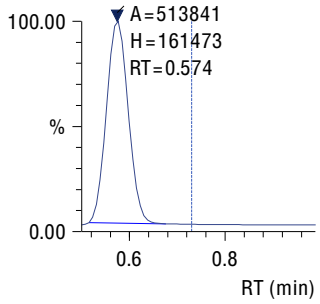
Sample ID: _Rob2
Date Acquired: 12/30/2020 2:59:34 AM
Acquired by: System Administrator

Data File: P6__Rob2_2020_12_29_FiltrosUV_LCMS_Rob2_040
Vial: 23 | Inj. Volume: 1.0000uL | Tray: 2

Name	Sample Name	Sample ID	Found RT	Area	Conc.	S/N
BP3 - Benzofenona-3	P6	_Rob2	0.574	513841	3.00	681.60
OMC - Octinoxato	P6	_Rob2	----	----	----	----
BMDM - Avobenzona	P6	_Rob2	----	----	----	----
OCT aduto - Octocrileno	P6	_Rob2	----	----	----	----

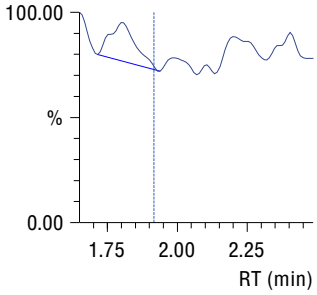
BP3 - Benzofenona-3

Conc 3.00
Q 229.10>151.15 (+) 1.63e5



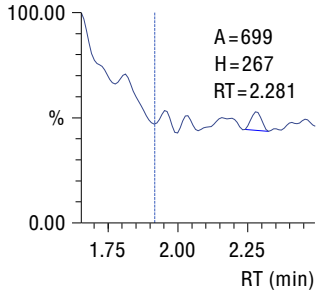
OMC - Octinoxato

Conc ----
Q 291.20>161.15 (+) 5.14e3



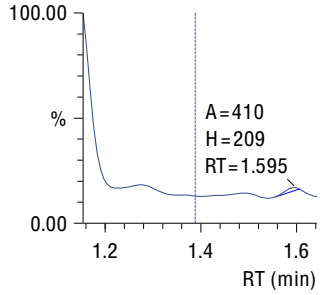
BMDM - Avobenzona

Conc ----
Q 311.20>161.20 (+) 2.99e3



OCT aduto - Octocrileno

Conc ----
Q 379.25>250.20 (+) 1.33e4



Insight Report

Printed at 3/31/2021 8:30:48 PM

Teste de Robustez - Aumento de 2% de solvente orgânico

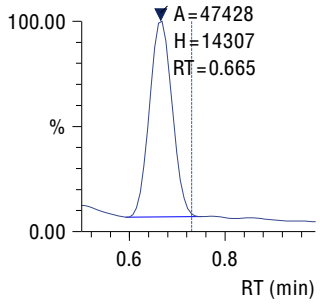
Sample ID: _Rob3
Date Acquired: 12/30/2020 3:10:33 AM
Acquired by: System Administrator

Data File: P2__Rob3_2020_12_29_FiltrosUV_LCMS_Rob3_042
Vial: 19 | Inj. Volume: 1.0000uL | Tray: 2

Name	Sample Name	Sample ID	Found RT	Area	Conc.	S/N
BP3 - Benzofenona-3	P2	_Rob3	0.665	47428	0.19	42.22
OMC - Octinoxato	P2	_Rob3	----	----	----	----
BMDM - Avobenzona	P2	_Rob3	----	----	----	----
OCT aduto - Octocrileno	P2	_Rob3	----	----	----	----

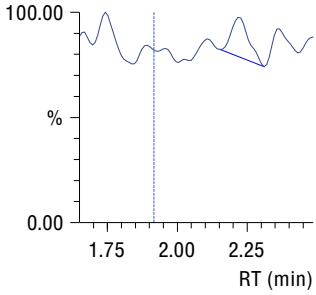
BP3 - Benzofenona-3

Conc 0.19
Q 229.10>151.15 (+) 1.49e4



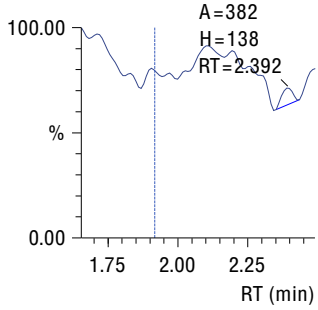
OMC - Octinoxato

Conc ----
Q 291.20>161.15 (+) 3.92e3



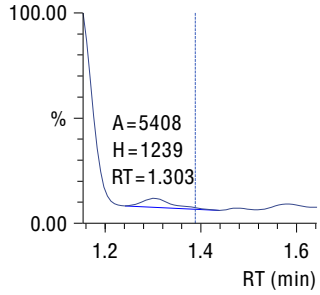
BMDM - Avobenzona

Conc ----
Q 311.20>161.20 (+) 1.69e3



OCT aduto - Octocrileno

Conc ----
Q 379.25>250.20 (+) 2.86e4



Insight Report

Printed at 3/31/2021 8:30:48 PM

Teste de Robustez - Aumento de 2% de solvente orgânico

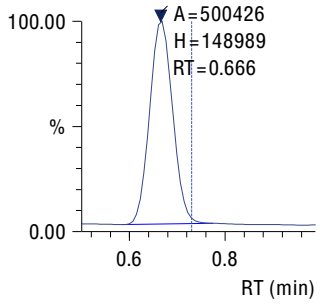
Sample ID: _Rob3
Date Acquired: 12/30/2020 3:15:57 AM
Acquired by: System Administrator

Data File: P6__Rob3_2020_12_29_FiltrosUV_LCMS_Rob3_043
Vial: 23 | Inj. Volume: 1.0000uL | Tray: 2

Name	Sample Name	Sample ID	Found RT	Area	Conc.	S/N
BP3 - Benzofenona-3	P6	_Rob3	0.666	500426	2.92	439.88
OMC - Octinoxato	P6	_Rob3	----	----	----	----
BMDM - Avobenzona	P6	_Rob3	----	----	----	----
OCT aduto - Octocrileno	P6	_Rob3	----	----	----	----

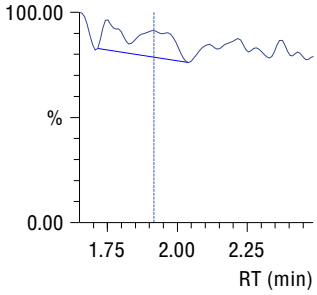
BP3 - Benzofenona-3

Conc 2.92
Q 229.10>151.15 (+) 1.50e5



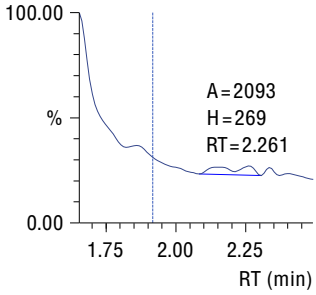
OMC - Octinoxato

Conc ----
Q 291.20>161.15 (+) 4.07e3



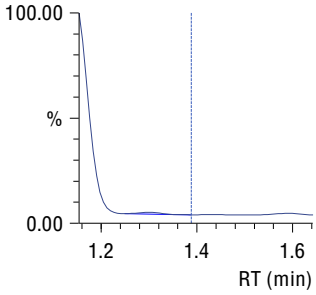
BMDM - Avobenzona

Conc ----
Q 311.20>161.20 (+) 6.05e3



OCT aduto - Octocrileno

Conc ----
Q 379.25>250.20 (+) 1.21e5



SIGMA-ALDRICH®

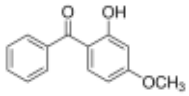
sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA
Website: www.sigmaaldrich.com
Email USA: techserv@sial.com
Outside USA: eurtechserv@sial.com

Certificate of Analysis

Product Name:
2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone - 98%

Product Number:	**H36206**
Batch Number:	**WXBC4678V**
Brand:	ALDRICH
CAS Number:	131-57-7
Formula:	C14H12O3
Formula Weight:	228.24 g/mol
Quality Release Date:	23 MAR 2017



Test	Specification	Result
Appearance (Colour)	Faint Yellow to Yellow and Faint Green to Green	Faint Yellow
Appearance (Form)	Powder	Powder
Purity (GC)	≥ 97.5 %	99.9 %
Solubility (Colour)	Colorless to Yellow and Colorless to Green and Colorless to Green-Yellow	Green-Yellow
Solubility (Turbidity) 50MG/ML, 95%ETHANOL	Clear	Clear
Carbon	71.8 - 75.5 %	73.0 %
Infrared spectrum	Conforms to Structure	Conforms

Steven Chen, Manager
Quality Control
Wuxi, China CN

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

SIGMA-ALDRICH®

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103 USA
Email USA: techserv@sial.com Outside USA: eurtechserv@sial.com

Certificate of Analysis

Product Name:	2-ETHYLHEXYL 4-METHOXYCINNAMATE analytical standard
Product Number:	55529
Batch Number:	BCBW2758
Brand:	Sigma-Aldrich
CAS Number:	5466-77-3
Formula:	$C_{18}H_{26}O_3$
Formula Weight:	290.40
Expiration Date:	NOV 2020
Quality Release Date:	14 DEC 2017

TEST	SPECIFICATION	RESULT
APPEARANCE (COLOR)	COLORLESS TO FAINT YELLOW	COLORLESS
APPEARANCE (FORM)	LIQUID OR VISCOUS LIQUID	VISCOUS LIQUID
PURITY (GC AREA %)	≥ 98.0 %	98.6 %
REFRACTIVE INDEX N20/D	1.545 - 1.547	1.545
PROTON NMR SPECTRUM	CONFORMS TO STRUCTURE	CONFORMS

Dr. Claudia Geitner
Manager Quality Control
Buchs, Switzerland

Sigma-Aldrich warrants that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

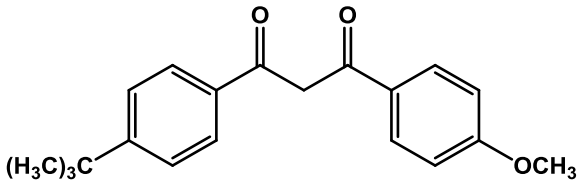
Certificate of Analysis

ISO GUIDE 34
ANAB Cert# AR-1470

ISO/IEC 17025
ANAB Cert# AT-1467

AVOBENZONE

CERTIFIED REFERENCE MATERIAL



CERTIFIED PURITY: 98.5%, U_{crm} = ±0.7% k = 2
(Mass Balance/as is basis)

NOMINAL PACKAGE SIZE: 1g

CATALOG #: PHR1073 **LOT #:** LRAB3693

CERTIFICATE VERSION: LRAB3693.1 **ISSUE DATE:** 25 May 2017

Note: Certificates may be updated due to Pharmacopeial Lot changes or the availability of new data. Check our website at: www.sigma-aldrich.com *for the most current version.*

CRM EXPIRATION: 31 December 2021 (Proper Storage and Handling Required).

RECEIPT DATE: _____
Note: this space is provided for convenience only and its use is not required.

STORAGE: Store at Room Temperature, keep container tightly closed. Attachment of a 20 mm aluminum crimp seal recommended for unused portions.

CHEMICAL FORMULA: $C_{20}H_{22}O_3$ **MW:** 310.39

PHYSICAL DESCRIPTION: White powder in amber vial **CAS #:** 70356-09-1

HAZARDS: Read Safety Data Sheet before using. All chemical reference materials should be considered potentially hazardous and should be used only by qualified laboratory personnel.

SIGMA-ALDRICH

INSTRUCTIONS FOR USE: Do not dry, use on the as is basis. The internal pressure of the container may be slightly different from the atmospheric pressure at the user's location. Open slowly and carefully to avoid dispersion of the material. This material is intended for R&D and Analytical use only. Not for drug, household or other uses.

TRACEABILITY ASSAY

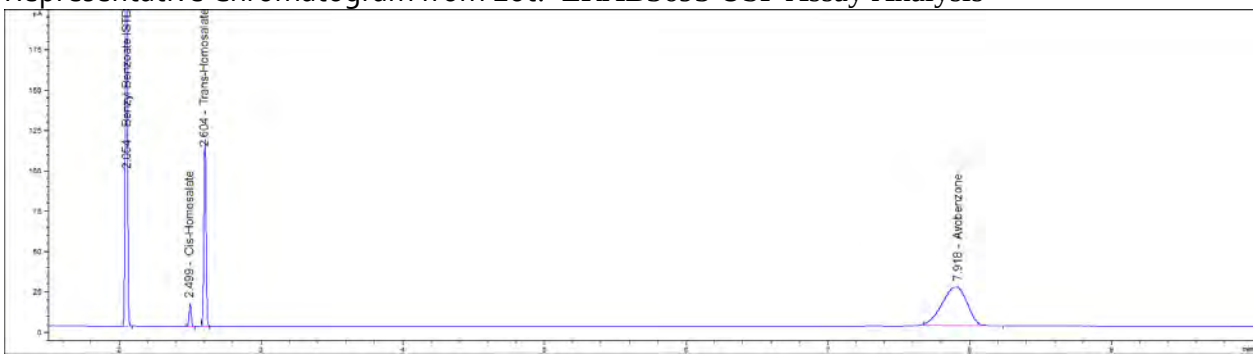
Comparative assay demonstrates direct traceability to Pharmacopeial Standards

ASSAY vs. USP REFERENCE STANDARD (as is basis)

ASSAY VALUE	vs. USP LOT
98.1%	**R038Y0** Labeled Content = 0.995mg/mg

METHOD: GC (ref.: Adapted from Avobenzone, Current Compendial Monographs)
Column: SPB-1, 30m × 0.32mm × 0.25µm
Carrier Gas: H_2
Flow: 1.5mL/min
Temperature Program: 200°C for 1min, 10°C/min to 300°C, hold 3min
Injection: 1µl/250°C
Split Ratio: 50:1
Detector: FID/310°C
Internal Standard: Benzyl Benzoate

Representative Chromatogram from Lot: LRAB3693 USP Assay Analysis



PURITY DETERMINATION BY MASS BALANCE

CHROMATOGRAPHIC IMPURITY ANALYSIS
METHOD: GC (ref.: Adapted from Avobenzone, Current Compendial Monographs)

SIGMA-ALDRICH

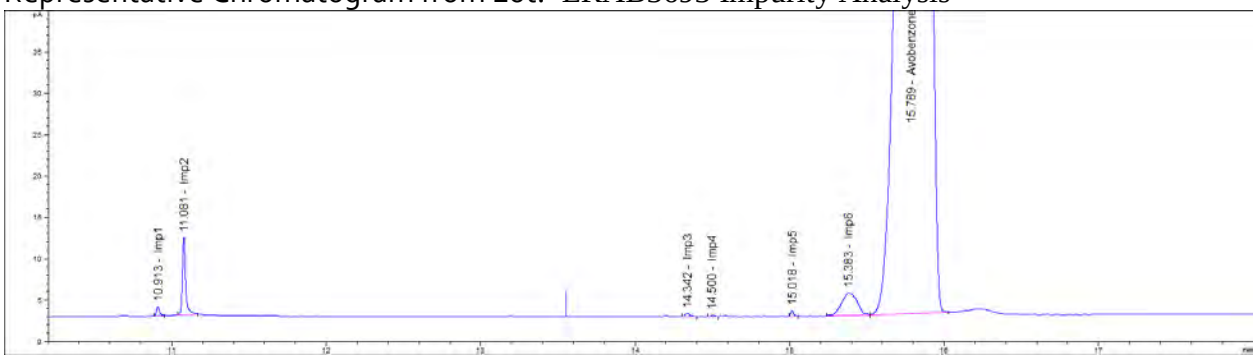
Column: SPB-1, 30m × 0.32mm × 0.25µm
Carrier Gas: H_2
Flow: 1.5mL/min
Temperature Program: 60°C for 1min, 15°C/min to 300°C, hold 8 min
Injection: 1µl/250°C
Split Ratio: 50:1
Detector: FID/310°C

Impurities Detected:

Impurity 1:	0.045%	Impurity 2:	0.43%
Impurity 3:	0.03%	Impurity 4:	0.007%
Impurity 5:	0.036%	Impurity 6:	0.83%

Total Impurities: **1.38%**

Representative Chromatogram from Lot: LRAB3693 Impurity Analysis



RESIDUAL SOLVENTS

Method: GC-MS Headspace (ref.: Adapted from Residual Solvents USP <467>)
Column: SPB-624
Carrier gas: He
Flow: 1.2 mL/min
Split Ratio: 1:5
Injection/Temperature: 1 mL/250 °C
Temperature Program: 40 °C for 8 min, 8 °C/min to 200 °C, hold 8 min

Solvents Detected: None

LOSS ON DRYING/VOLATILES

Method: Under vacuum, 70º (ref.: Current Compendial Monographs)
Mean of three measurements, Loss = **0.038%**

RESIDUE ANALYSIS

Method: Sulfated Ash (ref.: Current Compendial Monographs)
Sample Size: ~ 100 mg
Mean of three measurements, Residue = **0.04%**

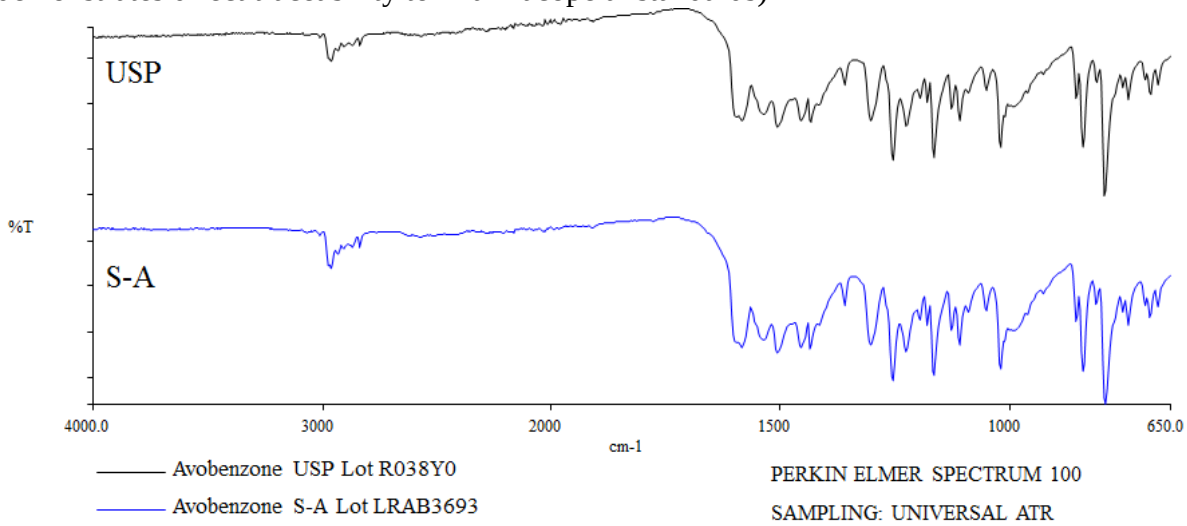
SIGMA-ALDRICH

CERTIFIED PURITY BY MASS BALANCE [100% - Impurities (normalized)]

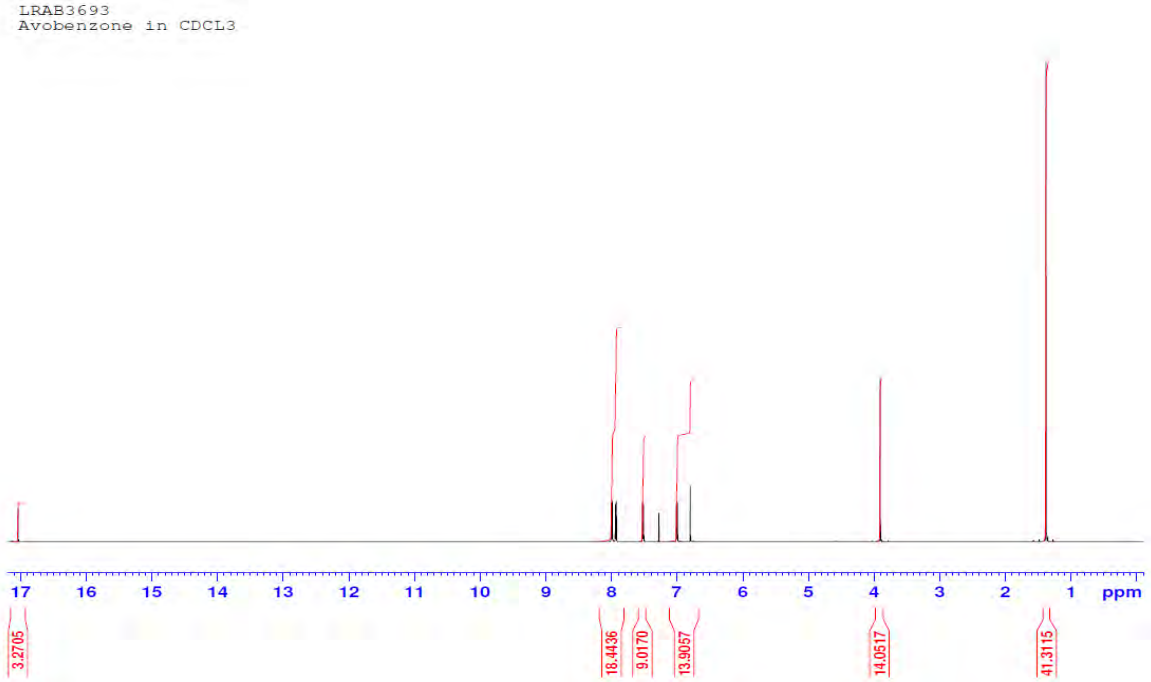
98.5% U_{crm} = ±0.7%, k = 2
(as is basis)

IDENTIFICATION TESTS

INFRARED SPECTROPHOTOMETRY (Comparative identification analysis demonstrates direct traceability to Pharmacopeial standards)



^{1}H NMR (Data provided by an external laboratory; not in scope of accreditation)



Consistent with structure

SIGMA-ALDRICH

HOMOGENEITY ASSESSMENT

Homogeneity was assessed in accordance with ISO Guide 35. Completed units were sampled using a random stratified sampling protocol. The results of chemical analysis were then compared by Single Factor Analysis of Variance (ANOVA). The uncertainty due to homogeneity was derived from the ANOVA. Heterogeneity was not detected under the conditions of the ANOVA.

Analytical Method: GC Sample size: ~50 mg

UNCERTAINTY STATEMENT

Uncertainty values in this document are expressed as Expanded Uncertainty (U_{crm}) corresponding to the 95% confidence interval. U_{crm} is derived from the combined standard uncertainty multiplied by the coverage factor k, which is obtained from a *t*-distribution and degrees of freedom. The components of combined standard uncertainty include the uncertainties due to characterization, homogeneity, long term stability, and short term stability (transport). The components due to stability are generally considered to be negligible unless otherwise indicated by stability studies.

STABILITY ASSESSMENT

Significance of the stability assessment will be demonstrated if the analytical result of the study and the range of values represented by the Expanded Uncertainty do not overlap the result of the original assay and the range of its values represented by the Expanded Uncertainty. The method employed will usually be the same method used to characterize the assay value in the initial evaluation.

Long Term Stability Evaluation - An assessment, or re-test, versus a Compendial Reference Standard may be scheduled, within the 3 year anniversary date of a release of a Secondary Standard. The re-test interval will be determined on a case-by-case basis.

Short Term Stability Study - It is useful to assess stability under reasonably anticipated, short term transport conditions by simulating exposure of the product to humidity and temperature stress. This type of study is conducted under controlled conditions of elevated temperature and humidity.

QC Supervisor QA Supervisor

APPENDIX

Original Release Date: 25 May 2017

Manufactured and certified by Sigma-Aldrich RTC, Inc.
2931 Soldier Springs Rd, Laramie WY, USA 82070
(Phone): 1-307-742-5452 (Fax): 1-855-831-9212
email: RTCTechGroup@sial.com

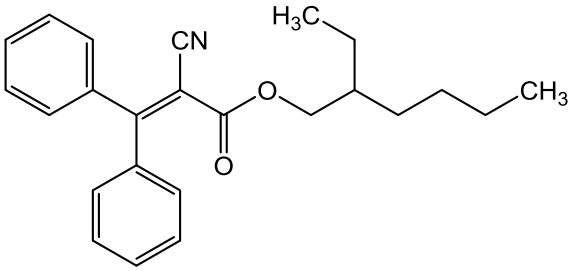
Certificate of Analysis

ISO GUIDE 34
ANAB Cert# AR-1470

ISO/IEC 17025
ANAB Cert# AT-1467

OCTOCRYLENE

CERTIFIED REFERENCE MATERIAL



CERTIFIED PURITY: 99.5 %, U_{crm} = ±0.4% k = 2
(Mass Balance/as is basis)

NOMINAL PACKAGE SIZE: 1 g

CATALOG #: PHR1083 **LOT #:** LRAB3748

CERTIFICATE VERSION: LRAB3748.1 **ISSUE DATE:** 05 March 2018

Note: Certificates may be updated due to Pharmacopeial Lot changes or the availability of new data. Check our website at: www.sigma-aldrich.com *for the most current version.*

CRM EXPIRATION: 31 December 2022 (Proper Storage and Handling Required).

RECEIPT DATE: _____
Note: this space is provided for convenience only and its use is not required.

STORAGE: Store at Room Temperature. Transfer unused portion to a tightly closed container.

CHEMICAL FORMULA: $C_{24}H_{27}NO_2$ **MW:** 361.48

PHYSICAL DESCRIPTION: Yellow liquid in amber ampule **CAS #:** 6197-30-4

HAZARDS: Read Safety Data Sheet before using. All chemical reference materials should be considered potentially hazardous and should be used only by qualified laboratory personnel.

SIGMA-ALDRICH

INSTRUCTIONS FOR USE: Do not dry, use on the as is basis. The internal pressure of the container may be slightly different from the atmospheric pressure at the user's location. Open slowly and carefully to avoid dispersion of the material. This material is intended for Laboratory Use only. Not for drug, household or other uses.

TRACEABILITY ASSAY

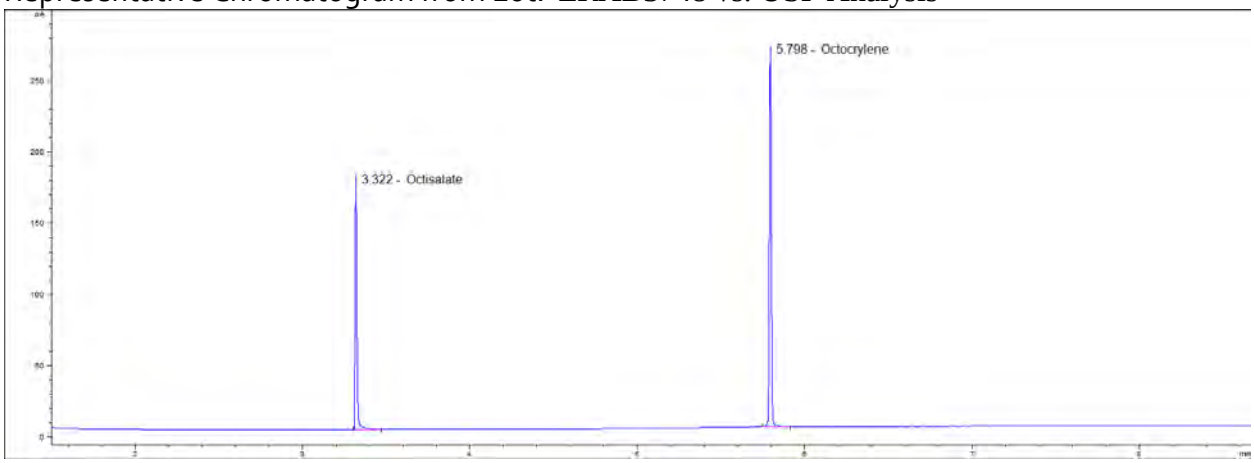
Comparative assay demonstrates direct traceability to Pharmacopeial Standards

ASSAY vs. USP REFERENCE STANDARD (as is basis)

ASSAY VALUE	vs. USP LOT
98.7 %	**I0L471** Labeled Content = 0.989 mg/mg

METHOD: GC (ref.: Adapted from Octocrylene; Current Compendial Monographs)
Column: DB-1, 30 m x 0.32 mm x 0.25 µm
Carrier Gas: H_2
Flow: 2 mL/min
Temperature Program: 160 °C for 1 min, 30 °C /min to 300 °C, hold 3 min
Injection: 1 µL/250 °C
Split Ratio: 1:50
Detector: FID/310 °C
Internal Standard: Octisalate

Representative Chromatogram from Lot: LRAB3748 vs. USP Analysis



SIGMA-ALDRICH

PURITY DETERMINATION BY MASS BALANCE

CHROMATOGRAPHIC IMPURITY ANALYSIS

METHOD: GC (ref.: Adapted from Octocrylene; Current Compendial Monographs)

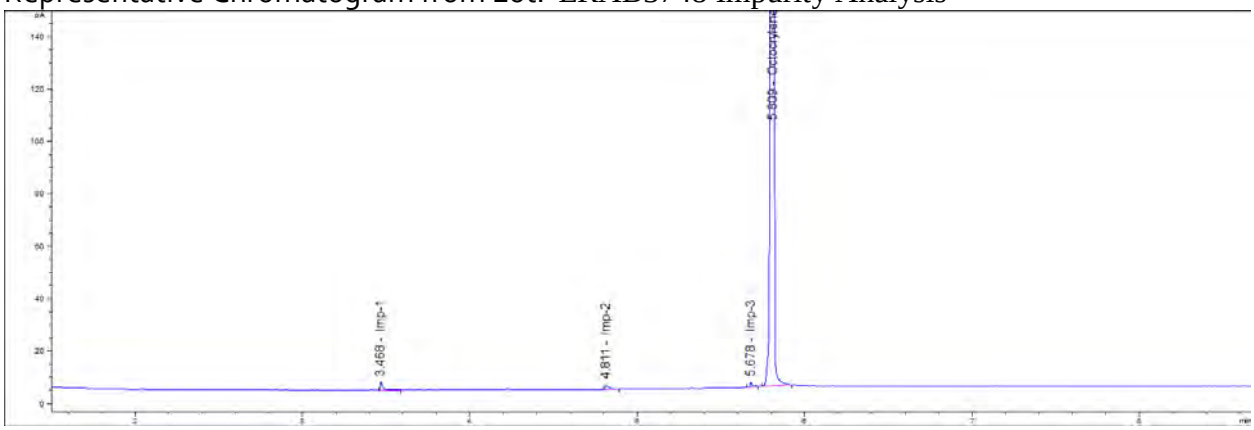
See Assay

Impurities Detected:

Impurity 1:	0.185 %	Impurity 2:	0.140 %
Impurity 3	0.089 %		

Total Impurities: **0.41 %**

Representative Chromatogram from Lot: LRAB3748 Impurity Analysis



RESIDUAL SOLVENTS

Method: GC-MS Headspace (ref.: Adapted from Residual Solvents <467>)
Column: SPB-624, 30m x 0.25mm, 1.4 µM
Carrier gas: He
Flow: 1.2 mL/min
Split Ratio: 1:5
Injection/Temperature: 1 mL/220 °C
Temperature Program: 40 °C for 5 min, 8 °C/min to 200 °C, hold 5 min

Solvents Detected: None

WATER DETERMINATION

Method: Karl Fisher titration (ref.: Current Compendial Monographs)
Mean of three measurements, Water Content = **0.083 %**

SIGMA-ALDRICH

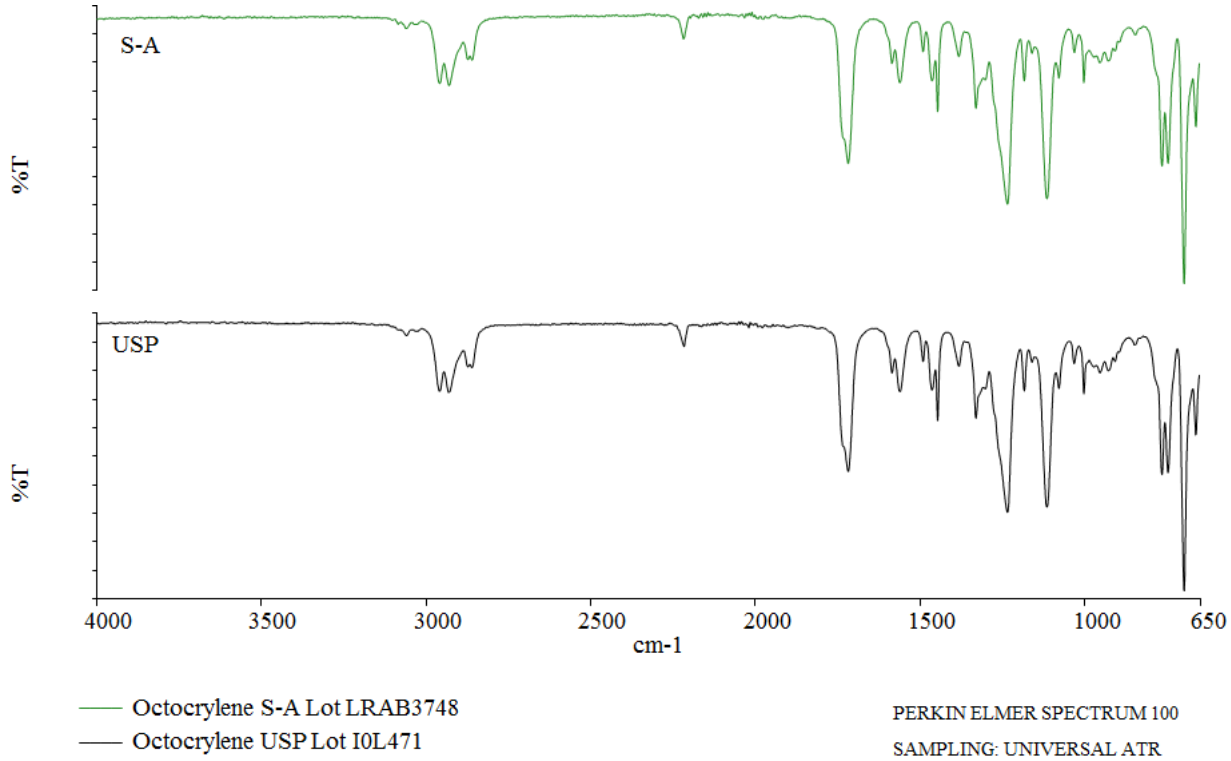
RESIDUE ANALYSIS
Method: Sulfated Ash (ref.: Current Compendial Monographs)
Sample Size: ~ 0.1 g
Mean of three measurements, Residue = **0.0053 %**

CERTIFIED PURITY BY MASS BALANCE [100% - Impurities (normalized)]

99.5 % U_{crm} = ±0.4%, k = 2

IDENTIFICATION TESTS

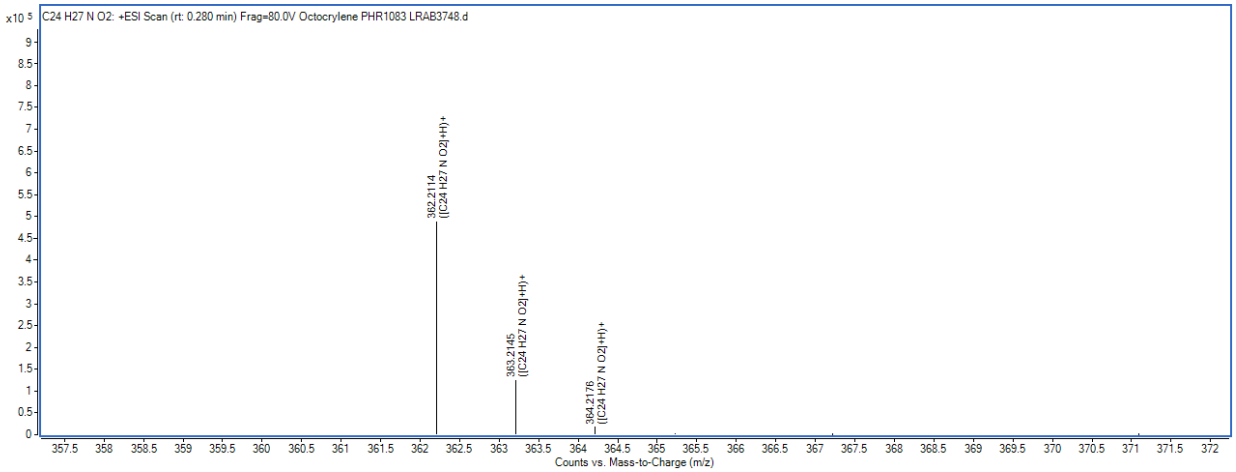
INFRARED SPECTROPHOTOMETRY (Comparative identification analysis demonstrates direct traceability to Pharmacopeial standards)



SIGMA-ALDRICH

MASS SPECTRUM

Method: HR-QTOF; 4.0 kV ESI+; temperature: 325 °C



Theoretical value: 362.2120 m/z

The signal of the MS spectrum is consistent with the theoretical value and its interpretation is consistent with the structural formula.

REFRACTIVE INDEX

Specification: Between 1.561 and 1.571
Mettler Toledo RA-510M Refractoanalyzer
Temperature: 20°C
Mean of three measurements = **1.567**

SPECIFIC GRAVITY

Specification: Between 1.045 and 1.055
Anton Paar DMA38 Density Meter
Temperature: 25°C
Mean of three measurements = **1.052**

<u>HOMOGENEITY ASSESSMENT</u>

Homogeneity was assessed in accordance with ISO Guide 35. Completed units were sampled using a random stratified sampling protocol. The results of chemical analysis were then compared by Single Factor Analysis of Variance (ANOVA). The uncertainty due to homogeneity was derived from the ANOVA. Heterogeneity was not detected under the conditions of the ANOVA.

Analytical Method: GC Sample size: ~ 25 mg

SIGMA-ALDRICH

UNCERTAINTY STATEMENT

Uncertainty values in this document are expressed as Expanded Uncertainty (U_{crm}) corresponding to the 95% confidence interval. U_{crm} is derived from the combined standard uncertainty multiplied by the coverage factor k, which is obtained from a *t*-distribution and degrees of freedom. The components of combined standard uncertainty include the uncertainties due to characterization, homogeneity, long term stability, and short term stability (transport). The components due to stability are generally considered to be negligible unless otherwise indicated by stability studies.

STABILITY ASSESSMENT

Significance of the stability assessment will be demonstrated if the analytical result of the study and the range of values represented by the Expanded Uncertainty do not overlap the result of the original assay and the range of its values represented by the Expanded Uncertainty. The method employed will usually be the same method used to characterize the assay value in the initial evaluation.

Long Term Stability Evaluation - An assessment, or re-test, versus a Compendial Reference Standard may be scheduled, within the 3 year anniversary date of a release of a Secondary Standard. The re-test interval will be determined on a case-by-case basis.

Short Term Stability Study - It is useful to assess stability under reasonably anticipated, short term transport conditions by simulating exposure of the product to humidity and temperature stress. This type of study is conducted under controlled conditions of elevated temperature and humidity.

QC Manager

QA Supervisor

APPENDIX

Original Release Date: 05 March 2018

Manufactured and certified by Sigma-Aldrich RTC, Inc.
2931 Soldier Springs Rd, Laramie WY, USA 82070
(Phone): 1-307-742-5452 (Fax): 1-855-831-9212
email: RTCTechGroup@sial.com

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Diretoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Ensino
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 – Cidade Universitária CEP: 05508-000
Fone/Fax(0XX11) 3133-8908
SÃO PAULO – São Paulo – Brasil
http://www.ipen.br

O IPEN é uma Autarquia vinculada à Secretaria de Desenvolvimento, associada à Universidade de São Paulo e gerida técnica e administrativamente pela Comissão Nacional de Energia Nuclear, órgão do Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações.