



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA E FÍSICO-QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ROUSE DA SILVA COSTA

**VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO PARA ANÁLISE DE BISFENOL A E FTALATOS
EM ÁGUA POTÁVEL USANDO A CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA
EFICIÊNCIA COM DETECÇÃO POR ARRANJO DE DIODOS (HPLC-DAD)**

FORTALEZA

2021

ROUSE DA SILVA COSTA

VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO PARA ANÁLISE DE BISFENOL A E FTALATOS EM
ÁGUA POTÁVEL USANDO A CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA
COM DETECÇÃO POR ARRANJO DE DIODOS (HPLC-DAD)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Química. Área de concentração: Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo Ferreira do Nascimento.

FORTALEZA

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C875v Costa, Rouse da Silva.

Validação de um método para análise de bisfenol A e ftalatos em água potável usando a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (HPLC-DAD) / Rouse da Silva Costa. – 2021.

63 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2021.

Orientação: Prof. Dr. Ronaldo Ferreira do Nascimento.

1. Cromatografia líquida. 2. Validação de método. 3. Bisfenol A. 4. Ftalatos. I. Título.

CDD 540

ROUSE DA SILVA COSTA

VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO PARA ANÁLISE DE BISFENOL A E FTALATOS EM
ÁGUA POTÁVEL USANDO A CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA
COM DETECÇÃO POR ARRANJO DE DIODOS (HPLC-DAD)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Química. Área de concentração: Química Analítica.

Aprovada em 22/01/2021.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ronaldo Ferreira do Nascimento (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Helena Becker
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Jhonyson Arruda Carvalho Guedes
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Tatiana Sainara Maia Fernandes
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado força e sabedoria para chegar até aqui.

A minha mãe Terezinha por ter me incentivado e tornado possível ir além em meus objetivos, aos meus irmãos David e Diego por todo o carinho e suporte. Ao meu sobrinho Davi por toda a alegria e amor que trouxe a vida de todos da família e a minha cunhada Gardenia pelas críticas construtivas que me impulsionaram a continuar em busca de conhecimento.

A minha tia Léa e a minha prima Roberta pelo suporte em momentos difíceis. A Letícia pelos momentos de alegria contagiante.

Ao prof. Ronaldo pela orientação, suporte e por ter confiado em mim em busca desse sonho, gratidão por tudo.

A profa. Helena, a Tatiana e ao Jhonyson por aceitarem prontamente o convite para a composição da banca para contribuírem com o meu trabalho.

Tatiana, Juliene e Jhonyson por todo o suporte tornando possível a execução do meu trabalho e pelos momentos de companheirismo e amizade. Ao Wagner pelas instruções e discussões sobre o trabalho e todo o suporte. Sem a participação de vocês esse trabalho não seria possível.

A profa. Helena por sempre ter me incentivado a continuar, serei eternamente grata.

Ao prof. Guilherme por ter viabilizado a execução de parte do trabalho no Laboratório Multiusuário de Química e Produtos Naturais na Embrapa Agroindústria Tropical. Ao Oiram pela assistência prestada.

Aos meus parceiros de UFC ao longo de todos os anos por toda a contribuição na minha formação pessoal e acadêmica Furtado, Giselle, Carla, Socorro, Thiago Coutinho, Pablo, Vitor, Mário, Thiago Vasconcelos, Mayza, Joaquim e a todos os outros que fizeram e fazem parte do LAT, em especial aos amigos Jhonyson, Tamyris, Edmilson, Juliene, Tatiana, Amanda, Thalita, Allan, Silmara, Gadelha, Jefferson, Wildson e Victor.

A Amanda, Juliene, Tatiana e Edmilson por todos os momentos “fitness” às sextas feiras. Ao Tiago Nogueira pelas conversas e sugestões. Ao Hélio pelas contribuições no meu trabalho. Aos meus companheiros de turma de mestrado. Ao Marcelo, Vanda, Ivanildo e Fran.

Jack (Felipe), Denison, Felipe, Gabi, Dudu, Karla, Karlinda e Diegão amigos que posso contar e que podem contar comigo apesar da minha ausência.

Aos meus padrinhos, Iêda e Paulo Moraes e a filha deles, Patrícia que foram muito importantes na minha formação acadêmica.

A todos que contribuíram de forma direta e indireta para a minha formação acadêmica e pessoal serei eternamente grata!

Saibam que todos vocês são especiais para mim, embora eu não seja a melhor pessoa em demonstrações de afeto!

RESUMO

O plástico tem uma ampla aplicação prática, devido ao baixo custo e à sua versatilidade. O custo reduzido comparado a outros materiais torna os produtos plásticos mais acessíveis à população. Em sua composição tem substâncias, conhecidas como aditivos, que conferem propriedades desejáveis ao material plástico, entre esses aditivos estão o bisfenol A (BPA) e os ftalatos (EFs) que são contaminantes desreguladores endócrinos que ganharam destaque devido ao seu potencial risco à saúde humana. Tendo em vista que esses contaminantes, BPA e EFs, estão presentes nas embalagens plásticas, precisam ser monitorados, o presente trabalho desenvolveu e validou um método para análise desses contaminantes em água engarrafada. O método se mostrou seletivo para os analitos estudados. Os dados obtidos são homocedásticos sendo a regressão linear simples adequada para obtenção das equações da reta. A maioria dos coeficientes lineares é não significativo para a equação da reta dos analitos tanto no solvente quanto na matriz. Ocorreu efeito matriz somente para o DBP. Os limites de detecção para o BPA, BBP e DBP obtidos foram 3,96; 6,41 e 12,63 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Os limites de quantificação obtidos foram 13,08; 21,16 e 41,68 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Limites esses satisfatórios quando comparados a literatura. A precisão e exatidão do método foram satisfatórias.

Palavras-chave: cromatografia líquida; validação de método; bisfenol A; ftalatos.

ABSTRACT

Plastic has a wide practical application, due to its low cost and versatility. The reduced cost compared to other materials makes plastic products more accessible to the population. In its composition there are substances, known as additives, that give desirable properties to the plastic material, among these additives are bisphenol A (BPA) and phthalates (PEs) which are endocrine disrupting contaminants that have gained prominence due to their potential risk to human health. Bearing in mind that these contaminants, BPA and EFs, are present in plastic packaging, need to be monitored, the present work has developed and validated a method for analyzing these contaminants in bottled water. The method proved to be selective for the studied analytes. The data obtained are homocedastic and the simple linear regression is adequate to obtain the equations of the line. Most linear coefficients are not significant for the equation of the analyte line both in the solvent and in the matrix. There was a matrix effect only for DBP. The detection limits for BPA, BBP and DBP obtained were 3.96; 6.41 12.63 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively. The quantification limits obtained were 13.08; 21.16 and 41.68 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively. These are satisfactory limits when compared to the literature. The precision and accuracy of the method were satisfactory.

Keywords: liquid chromatography; method validation; bisphenol A; phthalates.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	- Cromatógrafo líquido <i>Shimadzu</i>	25
Figura 2	- Nomograma para cromatografia em fase reversa.....	26
Figura 3	- Cromatograma utilizando MeOH/H ₂ O como fase móvel.....	36
Figura 4	- Cromatograma utilizando ACN/H ₂ O como fase móvel.....	37
Figura 5	- Cromatograma do método otimizado utilizando ACN/H ₂ O como fase móvel.....	38
Figura 6	- Espectros de absorvância dos compostos.....	39
Figura 7	- Cromatograma obtido utilizando a solução preparada em ACN....	39
Figura 8	- Cromatograma obtido utilizando a solução preparada na matriz...	40
Figura 9	- Curvas no solvente e na matriz para o BPA.....	45
Figura 10	- Curvas no solvente e na matriz para o BBP.....	46
Figura 11	- Curvas no solvente e na matriz para o DBP.....	46
Figura 12	- Cromatograma da amostra utilizando ACN/H ₂ O como fase móvel.....	50
Figura 13	- Cromatograma da amostra com a adição dos analitos na menor concentração estudada utilizando ACN/H ₂ O como fase móvel.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Características físicas e químicas dos compostos estudados.....	14
Tabela 2	- Valores estabelecidos do BPA e PEs e suas respectivas agências reguladoras.....	15
Tabela 3	- Exemplos de injeção direta (ID) de amostras usando HPLC.....	18
Tabela 4	- Programação de eluição da fase móvel (MeOH/H ₂ O) no teste cromatográfico.....	26
Tabela 5	- Programação de eluição da fase móvel (ACN/H ₂ O) no teste cromatográfico.....	27
Tabela 6	- Programação de eluição da fase móvel (ACN/H ₂ O) no método cromatográfico.....	27
Tabela 7	- Amostras adquiridas.....	35
Tabela 8	- Teste de homocedasticidade para os analitos no solvente.....	41
Tabela 9	- Teste de homocedasticidade para os analitos na matriz.....	41
Tabela 10	- Equações da reta para analito em ACN.....	41
Tabela 11	- Equações da reta para analito na matriz.....	42
Tabela 12	- Teste de linearidade das curvas analíticas preparadas no solvente e na matriz.....	42
Tabela 13	- Resultados do teste estatístico de significância dos parâmetros das curvas de calibração preparada no solvente.....	44
Tabela 14	- Resultados do teste estatístico de significância dos parâmetros das curvas de calibração preparada na matriz.....	44
Tabela 15	- Valores de recuperação obtidos para cada composto estudado..	45
Tabela 16	- Valores de LD's e LQ's obtidos para cada composto estudado....	47
Tabela 17	- Valores de recuperação obtidos para cada composto estudado..	47
Tabela 18	- Valores de repetitividade obtidos para cada composto estudado	48
Tabela 19	- Valores de CV's obtidos para cada composto estudado.....	49
Tabela 20	- Resultados das análises das amostras.....	50
Tabela 21	- Comparação de métodos instrumentais usados para análises de BPA, BBP e DBP através de HPLC que analisaram amostras de água engarrafada.....	52

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	Bisfenol A e EFs	12
1.2	Embalagem PET	15
1.3	Injeção direta (ID) de amostras	16
1.4	Motivação para realização do trabalho de pesquisa	21
2	OBJETIVOS	23
2.1	Objetivo Geral	23
2.2	Objetivos Específicos	23
3	MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1	Materiais utilizados	24
3.2	Preparo das soluções estoque	24
3.3	Desenvolvimento do método cromatográfico	25
3.3.1	<i>Equipamento utilizado</i>	25
3.3.2	<i>Otimização das condições cromatográficas</i>	25
3.3.2.1	<i>Testes</i>	25
3.3.2.2	<i>Aperfeiçoamento do método</i>	27
3.3.3	<i>Preparo da amostra para os estudos de validação</i>	27
3.3.4	<i>Curvas analíticas</i>	28
3.3.4.1	<i>Solvente</i>	28
3.3.4.2	<i>Matriz</i>	28
3.3.5	<i>Validação do método</i>	28
3.3.5.1	<i>Seletividade</i>	28
3.3.5.2	<i>Linearidade/Faixa de Trabalho</i>	29
3.3.5.2.1	<i>Efeito matriz</i>	32
3.3.5.3	<i>Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)</i>	33
3.3.5.4	<i>Exatidão</i>	33
3.3.5.5	<i>Precisão</i>	34
3.3.6	<i>Aplicação do método em amostras reais</i>	35
4	RESULTADOS	36
4.1	Aperfeiçoamento das condições cromatográficas	36
4.1.1	<i>Testes</i>	36

4.1.2	Método aperfeiçoado	37
4.2	Validação do método	38
4.2.1	Seletividade	38
4.2.2	Linearidade	40
4.2.2.1	<i>Teste de validação da análise de regressão linear</i>	42
4.2.2.2	<i>Teste de significância dos parâmetros de calibração</i>	43
4.2.2.3	<i>Efeito matriz</i>	45
4.2.3	Limite de Detecção (LD) e limite de Quantificação (LQ)	47
4.2.4	Exatidão	47
4.2.5	Precisão	48
4.2.6	Aplicação do método em amostras reais e comparação com dados da literatura	49
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	53
	REFERÊNCIAS	54

1 INTRODUÇÃO

No início do século XX, os plásticos começaram a ter uma ampla aplicação prática, devido ao baixo custo e à sua versatilidade. O custo reduzido comparado a outros materiais torna os produtos plásticos mais acessíveis à população. Eles estão cada vez mais presentes em nossas vidas, podendo ser encontrados em inúmeros materiais, como por exemplo, brinquedos, utensílios domésticos, materiais de construção, lentes de contato, embalagens de alimentos, etc (LETCHER, 2020).

A versatilidade do plástico é viabilizada pela inserção de substâncias, conhecidas como aditivos, que conferem propriedades desejáveis ao material, tais como flexibilidade, cor, resistência a impactos, etc. Os principais aditivos utilizados são plastificantes, estabilizantes, pigmentos, lubrificantes, corantes e outros (FRED-AHMADU et al., 2020).

Atualmente, a busca por uma melhor qualidade de vida tem aumentado, sendo que entre os hábitos adotados está a alimentação saudável. Uma grande aliada à manutenção dessa rotina são as embalagens plásticas, trazendo benefícios como a praticidade e aumento da vida útil dos alimentos (LANDIM et al., 2016). No entanto, apesar das vantagens da utilização de embalagens plásticas, elas representam um risco à saúde humana, pois, também são uma fonte de contaminação química dos produtos alimentícios. O risco é definido pela extensão da migração dessas substâncias para os produtos alimentícios e também pela toxicidade específica dessas substâncias que compõe as embalagens (HAHLADAKIS et al., 2018).

Alguns desses contaminantes são tidos como poluentes orgânicos emergentes (POE) ou contaminantes emergentes, fazendo referência a qualquer composto químico, de ocorrência natural ou antrópica, que não é monitorado ou não dispõe de legislação estabelecida, no entanto tem capacidade, comprovada ou discutível, de afetar o ambiente e os seres vivos (UNITED STATES GEOLOGICAL SURVEY - USGS, 2017).

Existe um grande interesse científico em um grupo de contaminantes emergentes, presentes no meio ambiente que afetam especificamente o sistema endócrino de espécies animais, diante disso são denominados desreguladores endócrinos (DE). Podendo também ser reportados na literatura como interferentes endócrinos, disruptores endócrinos ou *Endocrine Disrupting Chemicals* - EDCs (BILA;

DEZOTTI, 2007; PONTELLI; NUNES; OLIVEIRA, 2016).

Dentre os contaminantes desreguladores endócrinos, ganharam destaque os aditivos presentes nos plásticos, principalmente, bisfenol A (BPA) e os ésteres de ftalatos (EFs). Reconhecendo o potencial risco à saúde humana o BPA e os EFs, foram denominados como poluentes prioritários tanto pela União Europeia (EU), quanto pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) (SOUZA et al., 2012; WANG et al., 2017).

Sendo assim dando ênfase a esses contaminantes, BPA e EFs, presentes nas embalagens plásticas, a água, recurso natural indispensável, e quando envasada, de acordo com a (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA), 2019), classificada como produto alimentício, vem sendo amplamente estudada (AZZOUZ; BALLESTEROS, 2014; CINCOTTA et al., 2018; FABREGAT-CABELLO et al., 2016; JARDIM et al., 2012; LOCATELLI et al., 2016; PÉREZ et al., 2016; SODRÉ et al., 2010; WEE et al., 2019; ZAKI; SHOEIB, 2018). Para ser comercializada, a água pode ser envasada em embalagens plásticas, como polietileno tereftalato (PET), polipropileno (PP) e policarbonato (PC) (ROWELL; KUIPER; PREUD'HOMME, 2016).

Em decorrência da grande produção e utilização de materiais plásticos em diversos setores, a água potável também pode ser contaminada pelos resíduos gerados por esses materiais, através do solo ou de efluentes, visto que os tratamentos de água e esgoto convencionais não são adequados para a eliminação total desses contaminantes (LANDIM et al., 2016; PONTELLI; NUNES; OLIVEIRA, 2016; SILVA; COLLINS, 2011).

Este trabalho visa desenvolver e validar uma metodologia analítica para ser utilizada na determinação de bisfenol A (BPA), butil benzil ftalato (BBP) e dibutil ftalato (DBP) em águas engarrafadas, usando cromatografia líquida de alta eficiência com arranjo de diodos (HPLC-DAD) através de injeção direta (ID) utilizando uma coluna C18 e um único comprimento de onda.

1.1 Bisfenol A e EFs

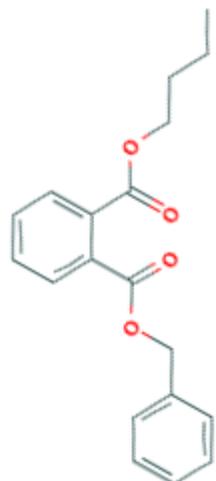
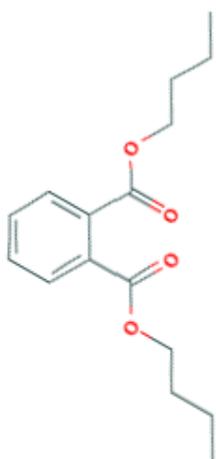
O BPA é um composto químico usado principalmente como monômero na preparação de resinas epóxis e resinas de polissulfona, plásticos de policarbonato e como antioxidante ou estabilizador em cloreto de polivinila (PVC) (SHAO et al., 2007; XIAO et al., 2020). Bem como os EFs são um grupo de compostos químicos derivados

do ácido ftálico, amplamente utilizados para aumentar a flexibilidade em materiais plásticos, por isso são conhecidos como plastificantes (GOMES et al., 2020; HEUDORF; MERSCH-SUNDERMANN; ANGERER, 2007).

Ainda são necessárias pesquisas mais detalhadas sobre os efeitos tóxicos do BPA e dos EFs, para que se tenham informações irrefutáveis a respeito desses efeitos, diante disso alguns desses compostos são classificados como possível carcinogênico e outros como não carcinogênico para humanos (IARC, 2019). Em 2014, Geueke, expôs que a correlação entre a presença de BPA e as doenças vem crescendo incessantemente. Entre os problemas relatados estão diabetes, doenças cardiovasculares, alteração do fígado, abortos espontâneos, partos prematuros, hiperatividade e obesidade. Além disso, outro estudo concebido por Stringer e colaboradores (1997), reportaram os efeitos tóxicos crônicos dos EFs, afetando principalmente os órgãos reprodutivos, fígado e rins, podendo reduzir o tamanho dos testículos e a produção de espermatozoides.

Por conta dos danos causados aos organismos terrestres e marinhos, o BPA e os ftalatos: butil benzil ftalato (BBP) e dibutil ftalato (DBP), ocupam um lugar de destaque na lista de poluentes prioritários da EU (EU, 2007; EU, 2004; LI; DUAN, 2011; STAPLES et al., 1997). A Tabela 1 contém algumas propriedades físicas e químicas dos compostos de interesse.

Tabela 1 - Características físicas e químicas dos compostos estudados.

Composto (Acrônimo)	BPA	BBP	DBP
Estrutura Química			
Massa Molar (g.mol ⁻¹)	228,291	312,365	278,348
Solubilidade em H ₂ O à 25°C (g.L ⁻¹)	0,30	0,00269	0,013
Ponto de Fusão (°C)	156,0	-35,0	-35,0
Ponto de Ebulição (°C)	220,0	370,0	340,0
Constante de Acidez (pK _a)	9,60	-	-
Coefficiente de Partição Octanol/Água (log K _{ow})	3,32	4,73	4,50
Número CAS*	80-05-7	85-68-7	84-74-2

Fonte: PubChem (2020). * CAS: Serviço de Resumos de Química (*Chemical Abstract Service*). BPA: bisfenol A. BBP: butil benzil ftalato. DBP: dibutil ftalato.

A Tabela 2 mostra os valores de Limite de Migração Específica (LME) em alimentos, bem como a Dose de Referência (RfD) para os analitos em estudo. O LME, estabelecido pela EU (2011), e o RfD especificado pela EPA (1987, 1988, 1989) visam

garantir a saúde humana. Embora o BPA, BBP e DBP, apresentem efeitos nocivos à saúde de organismos, não existe regulamentação específica para valores de concentração máxima admissível para a presença deles na água potável para consumo humano no Brasil e nos Estados Unidos (BRASIL, 2017; EPA, 2012). Os valores de LME no Brasil são iguais aos reportados pela EU (BRASIL, 2019; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

Tabela 2 - Valores estabelecidos do BPA e EFs e suas respectivas agências reguladoras.

Composto	LMEs (mg.kg ⁻¹)	RfD (mg.kg ⁻¹ por dia)
BPA	0,60	0,05
BBP	30,00	0,20
DBP	0,30	0,10

Fonte: EU (2011), EPA (1987, 1988, 1989). LME: Limite de Migração Específica. RfD: Dose de Referência..

1.2 Embalagem PET

As embalagens plásticas são amplamente utilizadas em todo o mundo (ORSET; BARRET; LEMAIRE, 2017). De acordo com Robertson (2013), a embalagem está no centro da indústria de alimentos devido à sua versatilidade e também ao aumento da vida útil do produto, sendo que a crescente demanda por produtos industrializados faz com que as embalagens plásticas sejam amplamente escolhidas.

O PET é um dos poliésteres mais importantes utilizado em embalagens plásticas. Ele é produzido pela reação de etilenoglicol (EG) com ácido tereftálico (ATF), onde normalmente, um éster dimetílico de ATF é usado para garantir uma reação mais controlável. O PET saturado linear é duro, semicristalino e transparente. É estável em uma ampla faixa de temperatura (-60 a 200 °C), com alta temperatura de fusão cristalina (T_m) de 267 °C e temperatura de transição vítrea relativamente baixa (T_g), variando de 67 a 80 °C. O PET possui excelente resistência química, resistência à tração e é leve. Em seu estado vítreo, o PET é dúctil, resistente e rígido,

tornando-o um polímero preferencial para embalagens que necessitam de rigidez (PIRINGER; BANER, 2000).

As propriedades elásticas do PET podem ser modificadas por meio de moldagem e extrusão (BHUNIA et al., 2013; SINGH; WANI; LANGOWSKI, 2017). As propriedades de barreira do PET são boas em relação a gases, aromas e gorduras, mas tem pouca resistência ao vapor de água (PIRINGER; BANER, 2000). PET também pode ser usado como um componente de bandejas de alumínio, uma vez que pode suportar altos campos eletromagnéticos durante o aquecimento por microondas (MW) (BHUNIA et al., 2013).

O PET é o material de embalagem preferido na indústria de água engarrafada (GAMBINO et al., 2020). O PET ganhou popularidade como o material de embalagem para água devido às suas propriedades físicas e químicas, como resistência, transparência, leveza e facilidade de reciclagem (AL-SALEH; SHINWARI; ALSABBAHEEN, 2011; AMIRIDOU; VOUTSA, 2011). Assim, estas combinações quase únicas de propriedades torna o PET um material muito desejável para embalagens de alimentos e bebidas, especialmente garrafas de água a um preço muito econômico (ORSET; BARRET; LEMAIRE, 2017).

1.3 Injeção direta (ID) de amostras

Little e Fallick (1975) relataram uma das primeiras publicações demonstrando a possibilidade de analisar amostras de água de rio por LC-UV/Vis sem a necessidade de uma pré-concentração e/ou etapa de limpeza. Os autores apontaram que volumes de amostra entre 500 a 2000 μL eram suficientes para serem bombeados através da coluna e realizar a detecção de poluentes orgânicos. Vários pesquisadores começaram a examinar profundamente essa opção atraente e, conseqüentemente, foram capazes de produzir uma série de relatórios utilizando esta abordagem de ID para análise de uma variedade de compostos químicos em diferentes matrizes (BAYEN et al., 2014; BUSETTI et al., 2012; OSTERTAG et al., 2020; PIRVU et al., 2020).

Borrull et al. (2019) testou quatro grandes volumes de injeção (LVI – *large volum injection*) (200, 400, 600 e 800 μL) para a análise de 20 contaminantes emergentes de interesse na água de rio, e constatou que as respostas aumentaram

proporcionalmente com o volume de amostra injetado, exceto para os primeiros analitos de eluição. Para minimizar o efeito dos componentes da matriz na supressão do sinal e também para economizar tempo de análise, os autores optaram pelo volume de 400 μL .

Normalmente, a LVI envolve a injeção direta de volumes de amostra que variam de 100-5000 μL em HPLC (CHIAIA; BANTA-GREEN; FIELD, 2008). A LVI é definida como um volume de amostra injetado que é $\geq 10\%$ do volume vazio da coluna analítica (BAYEN et al., 2014). A LVI possui aplicações típicas em uma gama de matrizes ambientais, por exemplo, água potável, água subterrânea e água superficial, incluindo água do mar e águas residuais (BUSETTI et al., 2012).

A LVI requer apenas um pré-tratamento mínimo da amostra, como centrifugação ou filtração, reduzindo os custos quando comparados aos associados aos materiais de extração, solventes de extração e mão de obra. Além disso, como as amostras são injetadas diretamente na coluna analítica, o risco de perda do analito é reduzido (BACKE; FIELD, 2012). No entanto, como a LVI envolve uma limpeza mínima da amostra, ela é considerada como uma técnica de análise "mais suja", que pode causar entupimento do instrumento, redução da vida útil da coluna e efeitos da matriz (BUSETTI et al., 2012).

Também são reportados na literatura outros volumes de ID, como 80 μL (ANUMOL et al., 2015), 70 μL (HAO et al., 2011), 50 μL (KOWAL et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2015; RIPOLLÉS et al., 2012), 20 μL (OSTERTAG et al., 2020; PIRVU et al., 2020) e 10 μL (PEREIRA et al., 2010; RADU et al., 2016). Ripollés et al. (2012) verificou que um volume de injeção maior que 50 μL resultou em picos largos ao analisar resíduos de etilenotiourea (ETU) e propilenotiourea (PTU) em água. Picos extensamente largos podem acabar causando separação, detecção e quantificação inferior, resultando em uma limitação do método (OGISO; SUZUKI; TAGUCHI, 2008). Bayen et al. (2014) mostrou que a ID de um pequeno volume de amostra (20 μL) é um método confiável para detectar antibióticos em água doce. Uma das consequências na redução do volume na ID é o aumento do limite de detecção (LD) (FUJIOKA et al., 2016). Na Tabela 3 são apresentados alguns exemplos de trabalhos utilizando ID em HPLC de diferentes tipos de amostras e analitos.

Tabela 3 – Exemplos de injeção direta (ID) de amostras usando HPLC.

Analito	Amostra	Tratamento	Volume de injeção	Coluna de separação	Detector	Limite de detecção (LD) ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Referência
8 ácidos orgânicos (oxálico, tartárico, fórmico, málico, láctico, acético, cítrico, succínico e gálico)	Vinho de mesa (tinto e branco) e vinho rosé	Filtração em membrana Acrodisc® CR PTFE de 0,45 μm	10 μL	Atlantis dC18	DAD	1,0 x 10 ³ – 4,6 x 10 ³	Pereira et al. (2010)
2 furanos (hidroximetilfurfural e furfural)						271 e 229	
22 compostos fenólicos (ex.: Vanilina)						71 - 487	
Antibióticos: sulfadiazina, sulfametazina, sulfamerazina, sulfametoxazol cloranfenicol, lincomicina e tilosina	Água doce	Filtração em seringa de PTFE de 0,20 μm	20 μL	Poroshell 120 SB-C18/pré-filtro de porosidade 2 μm por 2,1 mm.	MS/MS	0,37 x 10 ⁻³ - 226 x 10 ⁻³	Bayen et al. (2014)
Antibióticos: amoxicilina, metronidazol, sulfametoxazol, ofloxacina, sulfadiazina e sulfamerazina	Águas residuais	Centrifugação a 4000 rpm por 10 min, filtração em seringa de nylon de 0,22 μm	200 μL	RP-18/coluna de guarda também RP-18	DAD	1,3; 0,4; 2,1; 1,1; 1,4; 0,05	Vosough et al. (2015)
BPA	Águas minerais naturais comerciais em garrafas de plástico	Filtração em seringa de PTFE de 0,45 μm	10 μL	Kromasil 100 C18	DAD	80	Radu et al. (2016)

Dipirona e Cafeína	Comprimidos	Filtração em membrana microporosa de 0,22 µm	20 µL	Acclaim® C18	DAD	428 86	Vieira et al. (2017)
9 ácidos perfluoroalquílicos (PFAAs)	Água potável, subterrânea, de rio, de lago e residual	ultracentrifugação a 30.000 x g	100 µL	Waters ACQUITY UPLC BEH C18/coluna de guarda (Waters, Milford, MA, EUA)	MS/MS	$1,4 \times 10^{-5} - 44 \times 10^{-5}$	Ciofi et al. (2018)
Corantes sintéticos: azul brilhante amarelo crepúsculo tartrazina	Água superficial e residual	Filtração em Chromafil XTRA PTFE de 0,45 µm	20 µL	Acclaim Surfactant Plus	DAD	0,3 1,65 1,74	Pirvu et al. (2020)
Proteínas: α-lactalbumina, β-lactoglobulina, albumina sérica, lactoferrina e lactoperoxidase	Soro de leite	Centrifugação a 15.000 x g por 10 min (temperatura ambiente)	20 µL	BioResolve RP mAb 450A Polyphenyl (Waters Corp., EUA), pré-coluna de material idêntico (Waters Corp., EUA)	DAD	$3,0 \times 10^3 - 8,0 \times 10^3$	Ostertag et al. (2020)

Fonte: Autora (2021). MTBE: éter metil-terc-butílico; PTFE: Politetrafluoretileno; ECD: detector eletroquímico; MS/MS: detector de massas do tipo triplo quadrupolo; DAD: detector de arranjo de diodos.

O método de ID oferece algumas vantagens para a análise de contaminantes em águas, onde ele é relativamente mais barato, mais rápido, requer um tamanho de amostra menor e é menos sensível à contaminação cruzada do equipamento (BAYEN et al., 2014). A ID é especialmente promissora, visto que o enriquecimento dos analitos muitas vezes limita a diversidade de analitos incluídos em um método (REEMTSMA; ALDER; BANASIAK, 2013).

No caso da ID apenas alguns microlitros de amostra são necessários para a análise, em comparação com um litro normalmente necessário para SPE (BAYEN et al., 2014). A ID é a melhor escolha para evitar qualquer contaminação da amostra devido à sua manipulação e tratamento, bem como para garantir um alto rendimento analítico. No entanto, esta abordagem pode sofrer uma sensibilidade mais baixa, em comparação com métodos baseados na extração em fase sólida (SPE) (CIOFI et al., 2018). Além disso, quando a ID é utilizada, o efeito matriz (EM) pode afetar significativamente a precisão e/ou a sensibilidade do método, devido à ausência de etapas de extração e limpeza. Aplicações da ID têm sido relatadas na literatura para a determinação de diferentes classes de orgânicos em diferentes tipos de amostras, e principalmente em água (CIOFI et al., 2018).

Vosough et al. (2015) demonstraram que a ID em HPLC-DAD pode ser usada de forma promissora como estratégia analítica verde para detecção e quantificação de antibióticos em amostras de águas residuais, evitando instrumentações de alto custo mais complicadas. Radu et al. (2016) demonstrou que o BPA pode ser analisado em águas minerais naturais comerciais em garrafas de plástico através de ID da amostra (10 µL). Os métodos reportados na literatura indicam que a ID da amostra apresenta vantagens em relação a outros métodos, por serem simples e rápidos, tornando-os menos onerosos, tanto econômica quanto ambientalmente, por consumir menos insumos químicos e gerar menos resíduos. Pirvu et al. (2020) demonstrou que a faixa visível está livre da maioria das interferências de compostos orgânicos presentes nos resíduos e em águas superficiais, onde a filtração simples de amostras ambientais, seguida por análise de HPLC-DAD por ID permitiu uma redução significativa no tempo de análise e um aumento na exatidão e precisão do método.

1.4 Motivação para realização do trabalho de pesquisa

O BPA e os EFs são amplamente utilizados em embalagens para aumentar a maleabilidade e trabalhabilidade do plástico, mas apresentam tendência a migrar ou dissociar-se dos plásticos. Pesquisadores já deram o alarme ao terem encontrado seus vestígios em amostras de água de garrafas plásticas deixadas em altas temperaturas externas por muito tempo (NOTARDONATO et al., 2019). Outra forma de aumentar a taxa e a extensão da migração dos componentes dos plásticos é através do aquecimento de alimentos em recipientes plásticos em fornos de micro-ondas (SHARMA; CHAUHAN, 2019).

O mercado global de engarrafamento de água cresce anualmente. Em 2018, a classificação do consumo dos dez principais países era China, Estados Unidos, México, Indonésia, Brasil, Índia, Tailândia, Alemanha, Itália e França, respectivamente (IBWA, 2019).

O BPA tem sido frequentemente detectado água engarrafada em materiais plásticos de PC (LIAN et al., 2020; WANG et al., 2020). Dado o potencial estrogênico do BPA, grande atenção foi dada à investigação da concentração de BPA em águas engarrafadas em todo o mundo. Mesmo o BPA não sendo usado na fabricação de PET, ele tem sido detectado na água em garrafas PET (CHAILURKIT; SRIJARUSKUL; ONGPHIPHADHANAKUL, 2017), apesar das concentrações de BPA na água engarrafada em PC serem muito mais altas do que na água engarrafada em PET (WANG et al., 2020).

Na França, Colin et al. (2014) não detectaram BPA em águas engarrafadas em PET, mas das 29 marcas de águas engarrafadas em PC, todas apresentaram contaminação com BPA, com maior nível observado em garrafas recém-fabricadas. Na China, Wang et al. (2020) relataram BPA em águas engarrafadas em PET em todas as onze marcas analisadas.

Embora o BPA não seja usado na fabricação de PET, deve-se considerar o uso de PET reciclado (R-PET) como uma possível fonte de BPA proveniente de contaminação cruzada, não apenas durante o processo de reciclagem, mas também durante a fabricação de PET virgem (DREOLIN et al., 2019). BPA lixiviável de embalagens de polímero devido à sua moderada solubilidade em água (120 - 300 mg/L: pH = 7,0 a 25 ° C) e baixo log K_{ow} (3,32) em água (BORRIRUKWISITSAK;

KEENAN; GAUCHOTTE-LINDSAY, 2012; FIKAROVÁ et al., 2019). Guart et al. (2011) não detectaram BPA em garrafas PET cortadas em pedaços, mas por outro lado, detectaram BPA em tampas de polietileno de alta densidade (PEAD) em concentrações de 0,145 µg/dm². Bach e colaboradores (2012), também indicaram que as tampas dos recipientes, em água engarrafada PET, podem ser uma fonte de BPA.

A fabricação de garrafas de bebidas usa amplamente EFs (LI et al., 2019) e, como não são quimicamente ligados aos polímeros, também podem contaminar bebidas engarrafadas. Este processo pode ocorrer por meio da produção, embalagem e armazenamento (linhas de engarrafamento, centros de refino de água, etc.) (MANZO et al., 2019; PACYGA; SATHYANARAYANA; STRAKOVSKY, 2019). De acordo com Bach et al. (2014), a poluição ambiental, como fonte dos EFs, não pode ser excluída. A presença de EFs na água engarrafada em PET pode estar associada aos EFs presentes na fonte de água (água subterrânea ou água potável) usada para encher as garrafas (JEDDI et al., 2015). O tipo de fechamento ('tampa') nas garrafas pode ser uma fonte mais importante de ftalatos do que o material da garrafa (vidro ou PET) (SILANO et al., 2019). As tampas das garrafas plásticas são feitas de polietileno de alta e baixa densidade (PEAD e PEBD) e poliestireno (PE) (GUART et al., 2011). O adesivo usado para colar os rótulos dos frascos pode, portanto, ser considerado uma das fontes de ftalatos em amostras de água (CINCOTTA et al., 2018). Aznar et al. (2011) identificaram DBP em adesivo à base de acetato de vinila etileno (EVA).

Exemplos de concentrações significantes de BPA (5,7 µg/L) (KARAYAKA et al., 2019), BBP (12,11 µg/L) (SURHIO et al., 2017) e DBP (82,8 µg/L) (SALAZAR-BELTRÁN et al., 2017) em águas engarrafadas foram relatadas na literatura entre 2017 e 2019. Para garantir a segurança do consumidor, é importante verificar a possível migração destes compostos das garrafas para a água. Os riscos potenciais à saúde devido à exposição ao BPA, BBP e DBP através do consumo de garrafas de água tornaram-se uma questão importante, visto que eles podem causar efeitos adversos na saúde humana. Notou-se a necessidade do desenvolvimento de um método simples e relativamente barato para a determinação simultânea do BPA, BBP e DBP em água engarrafadas, visto que ainda não existe a determinação simultânea destes compostos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver e validar um método para determinação qualitativa e quantitativa de BPA, BBP e DBP em águas purificadas adicionadas de sais comercializadas na Região Metropolitana de Fortaleza-CE, empregando cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (HPLC-DAD).

2.2 Objetivos Específicos

- Estabelecer as condições cromatográficas para análise dos 3 analitos (BPA, BBP e DBP) por HPLC-DAD;
- Desenvolver e validar um método analítico seguindo as diretrizes do INMETRO para determinar os 3 analitos em amostras de águas purificadas adicionadas de sais;
- Avaliar a influência do efeito matriz das amostras de águas purificadas adicionadas de sais nos 3 analitos estudados;
- Validar as curvas analíticas através de testes estatísticos;
- Aplicar o método desenvolvido em amostras de águas purificadas adicionadas de sais comercializadas na Região Metropolitana de Fortaleza-CE.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Análise de Traços (LAT) da Universidade Federal do Ceará (UFC) e no Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais (LMQPN) da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Agroindústria Tropical).

3.1 Materiais utilizados

- ✓ Água ultrapura, purificada por sistema *Milli-Q® Academic* (Millipore, Darmstadt, Alemanha);
- ✓ Acetonitrila grau HPLC (*TEDIA®*, Rio de Janeiro, Brasil);
- ✓ Metanol grau HPLC (*TEDIA®*, Rio de Janeiro, Brasil);
- ✓ Vials com tampas de 2 mL (Analítica, São Paulo, Brasil);
- ✓ Pipetas Pasteur de vidro;
- ✓ Padrão analítico BPA (*Sigma-Aldrich*, Darmstadt, Alemanha);
- ✓ Padrão analítico BBP PESTANAL® (*Sigma-Aldrich*, Darmstadt, Alemanha);
- ✓ Padrão analítico DBP PESTANAL® (*Sigma-Aldrich*, Darmstadt, Alemanha);
- ✓ Microseringa de vidro 50µL (Hamilton, Reno, EUA);
- ✓ Frascos de vidro âmbar de 5 e 10 mL;
- ✓ Balões volumétricos de 5 e 10 mL;
- ✓ Membrana filtrante de politetrafluoretileno (PTFE) hidrofílica com diâmetro 47 mm e tamanho de poro 0,45 µm.

3.2 Preparo das soluções estoque

Foram preparadas 10 mL de soluções estoque de aproximadamente 1000 mg L⁻¹ individuais dos EFs e do BPA em metanol grau HPLC a partir de seus respectivos padrões analíticos. A partir destas soluções individuais foram preparadas 5 mL das soluções de trabalho.

3.3 Desenvolvimento do método cromatográfico

3.3.1 Equipamento utilizado

A identificação e quantificação do BPA e dos EFs foram realizadas utilizando cromatógrafo líquido *Shimadzu* (modelo 20A Prominence), tal qual exibido na Figura 1, com detector com arranjo de diodos (DAD) (modelo SPD-M20A), duas bombas (modelo LC-20AT), forno (modelo CTO-20A), desgaseificador (modelo DDU-20A3). A alça de amostragem (*loop*) deste equipamento apresenta um volume fixo de 20 μL . Foi utilizada uma coluna de fase reversa octadecilsilano (C18 ou ODS) da marca Rigol com tamanho de partícula de 5 μm , comprimento de 250 mm e diâmetro interno de 4,6 mm.

Figura 1 - Cromatógrafo líquido *Shimadzu*.



Fonte: Autora (2021).

3.3.2 Otimização das condições cromatográficas

3.3.2.1 Testes

Foram realizados alguns testes a fim de obtermos as melhores condições para análise cromatográfica do BPA e dos EFs. Entre estas condições, temos: modo

de eluição, comprimento de onda, solvente da fase móvel e suas proporções de composição.

Para a realização da escolha do solvente da fase móvel foram testados dois solventes, o metanol (MeOH) e a acetonitrila (ACN). Desta forma, foram analisadas a solução multielementar do BPA e dos EFs, afim de que fossem observadas a melhor separação, e as soluções individuais, para que fosse observada a ordem de eluição dos compostos e os seus respectivos tempos de retenção, nessa etapa a concentração das soluções testadas foi de $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ e o fluxo da fase móvel foi mantido 1 mL min^{-1} em todas as etapas.

Para a escolha do solvente e determinação da composição da fase móvel, foram realizados alguns testes com o MeOH e a água, onde o teste que apresentou melhor perfil cromatográfico foi empregando inicialmente a proporção 80% de MeOH e 20% de água, e mantida essa composição ao longo de 12 minutos, conforme está representado na Tabela 4. A solução multielementar de concentração $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ desse teste foi preparada em MeOH.

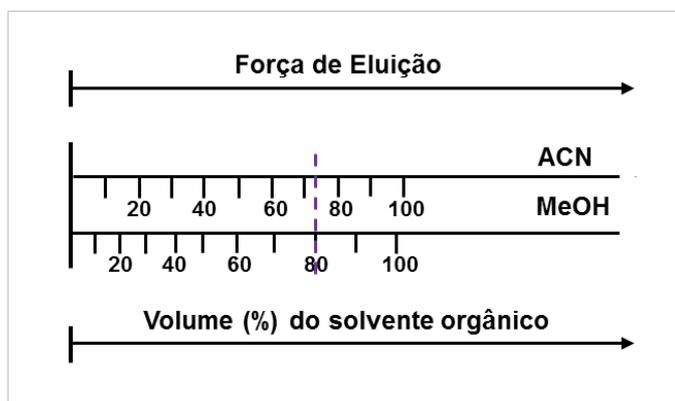
Tabela 4 - Programação de eluição da fase móvel (MeOH/H₂O) no teste cromatográfico.

Tempo (min)	Solvente A, MeOH (%)	Solvente B, H ₂ O (%)
0	80	20
12	80	20

Fonte: Autora (2021).

Para iniciarmos os testes com a ACN, consultamos o nomograma da Figura 2, para selecionarmos a força de eluição equivalente a composição da fase móvel 80:20.(v/v) MeOH/H₂O, e identificamos que para ACN/H₂O corresponde a proporção de aproximadamente 75:25 (v/v).

Figura 2 – Nomograma para cromatografia em fase reversa.



Fonte: Adaptado de MEYER (2010).

Portanto, o teste com ACN iniciou com a proporção 75:25.(v/v) ACN/H₂O, e foi mantida essa proporção até 12 minutos. Para a fase móvel ACN/H₂O o gradiente de eluição testado está representado conforme a Tabela 5. A solução multielementar de concentração 1000 µg L⁻¹ desse teste foi preparada em ACN.

Tabela 5 – Programação de eluição da fase móvel (ACN/H₂O) no teste cromatográfico.

Tempo (min)	Solvente A, ACN (%)	Solvente B, H₂O (%)
0	75	25
12	75	25

Fonte: Autora (2021).

A partir dos cromatogramas obtidos foram avaliados alguns comprimentos de onda (λ) e foi selecionado 198 nm que corresponde ao $\lambda_{\text{máx}}$ da banda de absorção característica dos analitos estudados. Foram testadas temperaturas do forno a 35 °C e à temperatura ambiente.

3.3.2.2 Aperfeiçoamento do método

Após os testes iniciais as condições estabelecidas para desenvolvimento e validação do método foram fluxo 1 mL.min⁻¹, temperatura do forno 35 °C, solventes da fase móvel ACN/H₂O, eluição isocrática e $\lambda = 198$ nm. A composição da fase móvel foi mantida em 70% ACN e 30% H₂O, como apresentado na Tabela 6.

Tabela 6 - Programação de eluição da fase móvel (ACN/H₂O) no método cromatográfico.

Tempo (min)	Solvente A, ACN (%)	Solvente B, H₂O (%)
0	70	30
12	70	30

Fonte: Autora (2021).

3.3.3 Preparo da amostra para os estudos de validação

As amostras foram obtidas no comércio de Fortaleza. Uma dessas amostras de água adicionada de sais foi selecionada para realização dos estudos de validação. A amostra foi filtrada utilizando filtro de PTFE 0,45 µm.

3.3.4 Curvas analíticas

As curvas analíticas foram construídas por meio de padronização externa no solvente ACN e por padronização externa com superposição de matriz (água adicionada (AA)). As curvas foram preparadas em 6 níveis de concentrações para o BPA foi de 20, 35, 50, 75, 100 e 150 $\mu\text{g L}^{-1}$ e para os EFs foram 50, 75, 100, 150, 200 e 300 $\mu\text{g L}^{-1}$.

3.3.4.1 Solvente

As soluções padrão para elaboração da curva analítica no solvente foram preparadas a partir das soluções estoque do BPA e dos EFs (item 3.2). A cada nível de concentração foram retiradas as alíquotas correspondentes, transferidas para balões volumétricos de 5 mL e aferidas com ACN. Foram preparadas 3 soluções individuais para cada nível de concentração e posteriormente injetadas nas condições estabelecidas no método aperfeiçoado no item 3.3.2.2.

3.3.4.2 Matriz

As soluções padrão da curva analítica na matriz foram preparadas a partir das soluções estoque do BPA e dos EFs (item 3.2). A cada nível de concentração foram retiradas as alíquotas correspondentes, transferidas para balões volumétricos de 5 mL e aferidas com água adicionada de sais. Foram preparadas 3 soluções independentes para cada nível de concentração e posteriormente injetadas nas condições estabelecidas no método aperfeiçoado no item 3.3.2.2.

3.3.5 Validação do método

3.3.5.1 Seletividade

A seletividade permite avaliar, de forma incontestável, os analitos de interesse na presença de outros compostos que podem interferir na sua determinação em uma amostra complexa. A seletividade garante que o pico de resposta seja

exclusivamente do analito de interesse, uma forma de obter é comparando o espectro do pico do analito obtido na matriz da amostra com o espectro do pico obtido da solução padrão em solvente, bem como a avaliação dos tempos de retenção obtidos na matriz e no solvente (RIBANI et al., 2004).

Os analitos BPA e EFs foram injetados na concentração de 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ tanto em ACN, quanto na presença da matriz (água adicionada de sais), obtendo os cromatogramas e os espectros para posterior comparação.

3.3.5.2 Linearidade/Faixa de Trabalho

Antes da verificação de linearidade devemos verificar se existem valores anômalos (em inglês, *outliers*) para cada nível de concentração que pode ser feita pelo teste de *Grubbs* aplicando a Equação 1 (INMETRO, 2020).

$$G_{\text{calculado}} = \frac{|Y_i - \bar{Y}|}{s} \quad (1)$$

onde:

Y_i = valor de sinal analítico (área ou altura) suspeito de ser anômalo;

\bar{Y} = média do sinal analítico da triplicata investigada;

s = desvio padrão do sinal analítico da triplicata investigada.

Considerando um nível de significância de 95%, temos duas hipóteses:

1) se $G_{\text{calculado}} > G_{\text{tabelado}}$, o valor suspeito não é significativo devendo ser excluído;

2) se $G_{\text{calculado}} < G_{\text{tabelado}}$, o valor suspeito é significativo devendo ser mantido.

G_{tabelado} : $G_{(\alpha, n)}$, onde, α é o nível de significância e n é o número de replicatas.

Após a verificação de outliers, deve ser verificada a existência da homocedasticidade dos dados, designando que a variância dos erros experimentais é constante. Constatada a existência da homocedasticidade, implica que o método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO) é adequado, pois existe uma relação linear entre as variáveis e o modelo de regressão linear simples pode ser usado para obter

a equação da reta. A homocedasticidade pode ser verificada utilizando o teste de Cochran, aplicando a Equação 2 (INMETRO, 2020).

$$C_{\text{calculado}} = \frac{S_{\text{máx}}^2}{\sum_{i=1}^p S_i^2} \quad (2)$$

onde:

$s_{\text{máx}}^2$ = maior valor de variância de sinal analítico (área ou altura);

$\sum s^2$ = média do sinal analítico da triplicata investigada;

s = desvio padrão do sinal analítico da triplicata investigada.

Considerando um nível de significância de 95%, temos duas hipóteses:

1) quando $C_{\text{calculado}} < C_{\text{tabelado}}$, aceita-se a homogeneidade das variâncias, tendo portanto respostas instrumentais homocedásticas e o MMQO é válido;

2) quando $C_{\text{calculado}} > C_{\text{tabelado}}$, rejeita-se a homogeneidade das variâncias, tendo portanto respostas instrumentais heterocedásticas e o MMQO não é válido.

C_{tabelado} : $C(n, p)$, n é o número de replicatas executadas e p é o número de níveis de concentrações.

O procedimento de averiguação da linearidade consiste na verificação de sinais (y) obtidos em várias injeções cromatográficas em diferentes concentrações (x). A medição da proporcionalidade dos dados obtidos é feita através do MMQO que encontra a reta que melhor representa o conjunto de dados (x, y) relativos ao experimento. A partir desse conjunto de dados obtemos a que é o coeficiente linear (ponto em que a reta intercepta o eixo y) e b que é o coeficiente angular (inclinação da reta), portanto essa reta pode ser representada conforme a Equação 3. A partir desse conjunto de dados também calculamos o coeficiente de correlação linear (r) que exprime a relação as variáveis x e y quanto mais próximo do valor 1 mais intensa é a correlação entre as variáveis (HARRIS, 2016). Segundo o INMETRO (2003) valores maiores que 0,90 são aceitáveis para o coeficiente de correlação. As curvas no solvente e na matriz foram preparadas em 6 níveis de concentrações nos intervalos descritos no item 3.3.4, em triplicata. A equação de regressão linear simples está descrita na Equação 3, e deve ser acompanhada da análise estatística, visando garantir a qualidade da linearidade e da curva de calibração.

$$y = a + bx \quad (3)$$

onde:

y = representa o sinal analítico, podendo ser trabalhado em altura ou área do pico cromatográfico;

x = concentração do analito;

a = coeficiente angular (refere-se a inclinação da reta);

b = coeficiente linear (refere-se ao intercepto no eixo y).

A faixa de trabalho é o intervalo entre a menor concentração quantificável, denominada Limite de Quantificação (LQ), e a maior concentração do analito na amostra para o qual o procedimento analítico tem precisão, exatidão e linearidade em níveis aceitáveis (ICH, 2005).

No teste *t* (*Student*) para os parâmetros de calibração, os valores de $t_{calculado}$ são comparados com o $t_{tabelado}$. De acordo com as Equações 4 e 5, obtemos os valores de $t_{calculado}$.

$$t_{calculado, a} = \frac{|a - 0|}{s_a} \quad (4)$$

$$t_{calculado, b} = \frac{|b - 1|}{s_b} \quad (5)$$

onde: a = coeficiente angular

b = coeficiente linear

s_a = desvio do coeficiente angular

s_b = desvio do coeficiente linear

Considerando um nível de significância de 95%, temos duas hipóteses:

1) quando $t_{calculado} < t_{tabelado}$, o parâmetro de calibração é insignificativo devendo ser excluído;

2) quando $t_{calculado} > t_{tabelado}$, o parâmetro de calibração é significativo devendo ser mantido na equação da reta.

E no teste F para análise de regressão linear, $F_{\text{calculado}}$ deve ser obtido utilizando a Equação 6.

$$F = \frac{S_{\text{máx}}^2}{S_{\text{mín}}^2} \quad (6)$$

onde: $S_{\text{máx}}$ = maior desvio padrão obtido a partir das réplicas;

$S_{\text{mín}}$ = menor desvio padrão obtido a partir das réplicas.

Considerando um nível de significância de 95%, temos duas hipóteses:

1) se $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$, a regressão linear é significativa, ou seja, existe relação linear entre os eixos x e y;

2) se $F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}}$, não existe relação linear entre os eixos x e y, mesmo com um bom valor de R^2 .

3.3.5.2.1 Efeito matriz

De acordo com o INMETRO (2020), como podemos obter uma matriz isenta do analito, não será necessário o teste F, realizaremos somente cálculos estatísticos para comparação das inclinações das curvas de calibração no solvente e na matriz, podemos avaliar a existência de efeito matriz (EM), com base na equação 7 (MARTINS, 2010).

$$EM (\%) = \frac{(b_m - b_s)}{b_s} \times 100 \quad (7)$$

Onde:

b_m = coeficiente angular da curva na matriz;

b_s = coeficiente angular da curva no solvente.

A existência do efeito matriz não é considerada para valores que estão contidos no intervalo de $-10\% < EM < 10\%$.

Caso haja efeito matriz a curva analítica deve ser preparada na matriz da amostra e outros parâmetros de validação também deverão ser avaliados na curva preparada na matriz, evitando assim resultados equivocados do método proposto.

3.3.5.3 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Limite de detecção é a menor quantidade de analito que pode ser detectada e pode ser estimado a partir da curva analítica, utilizando a Equação 8. Quando o branco não produz sinal, podemos utilizar o valor do desvio padrão do menor nível de concentração da curva.

$$LD = 3,3 \frac{s}{b} \quad (8)$$

onde: s = desvio padrão da resposta do branco nas 6 replicatas medidas;
b = coeficiente angular da curva analítica.

Limite de quantificação é a menor quantidade de analito que pode ser quantificada com precisão e exatidão satisfatórias e pode ser estimado a partir da curva analítica, utilizando a Equação 9 (INMETRO, 2020).

$$LQ = 10 \frac{s}{b} \quad (9)$$

onde: s = desvio padrão da resposta do branco nas 6 replicatas medidas;
b = coeficiente angular da curva analítica.

3.3.5.4 Exatidão

A exatidão revela o grau de concordância entre os resultados encontrados em um determinado experimento e um valor de referência tido com verdadeiro. Deve ser considerada dentro de certos limites a certo nível de confiança (RIBANI et al., 2004). Para avaliar a exatidão foram realizados ensaios de recuperação em três níveis de concentrações diferentes 20, 50 e 150 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o BPA e 50, 100 e 300 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o BBP e DBP com 6 replicatas independentes para cada concentração, o critério de aceitação está compreendido no intervalo de 80 a 110% (INMETRO, 2020). A recuperação é calculada a partir da Equação 10.

$$\text{Recuperação (\%)} = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100 \quad (10)$$

onde: C_1 = concentração do analito na amostra fortificada;

C_2 = concentração do analito na amostra não fortificada;

C_3 = concentração do analito adicionado à amostra fortificada.

3.3.5.5 Precisão

A precisão evidencia o grau de dispersão entre uma série de medidas obtidas a partir de soluções independentes para a mesma amostra. A repetitividade foi escolhida para avaliar a precisão. Medições consecutivas do mesmo método, sob as mesmas condições. A repetitividade é expressa pelo coeficiente de variação (CV), representado na Equação 11. Para avaliar a precisão foram realizadas análises em três níveis de concentrações diferentes 20, 50 e 150 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o BPA e 50, 100 e 300 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o BBP e DBP com 6 replicatas independentes para cada nível de concentração, o critério de aceitação é de até 11% para níveis de até 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ (INMETRO, 2020).

$$\text{CV (\%)} = \left(\frac{S}{\bar{C}} \right) \times 100 \quad (11)$$

onde: s = desvio padrão das concentrações das n replicatas medidas;

\bar{C} = concentração média das n replicatas medidas.

A precisão intermediária também foi realizada, nas condições de analistas e dias diferentes, mesmos equipamento e amostra. O desvio padrão da precisão intermediária é a dispersão mais confiável do método, podendo ser utilizado para o cálculo da incerteza de medição. Para avaliar se os diferentes analistas são considerados estatisticamente semelhantes, os resultados foram comparados utilizando a ANOVA (INMETRO, 2020).

3.3.6 Aplicação do método em amostras reais

As amostras foram obtidas no comércio de Fortaleza e foram filtradas utilizando filtros de PTFE 0,45 μm . Na tabela 7, temos os respectivos códigos adotados e as datas de validade de cada amostra.

Tabela 7 – Amostras adquiridas.

Amostra (códigos)	Data de Vencimento
AAY	19/10/2021
AAS ₁	15/10/2021
AAC	29/09/2021
AAI	13/05/2020
AAS ₂	18/04/2020

Fonte: Autora (2021).

4 RESULTADOS

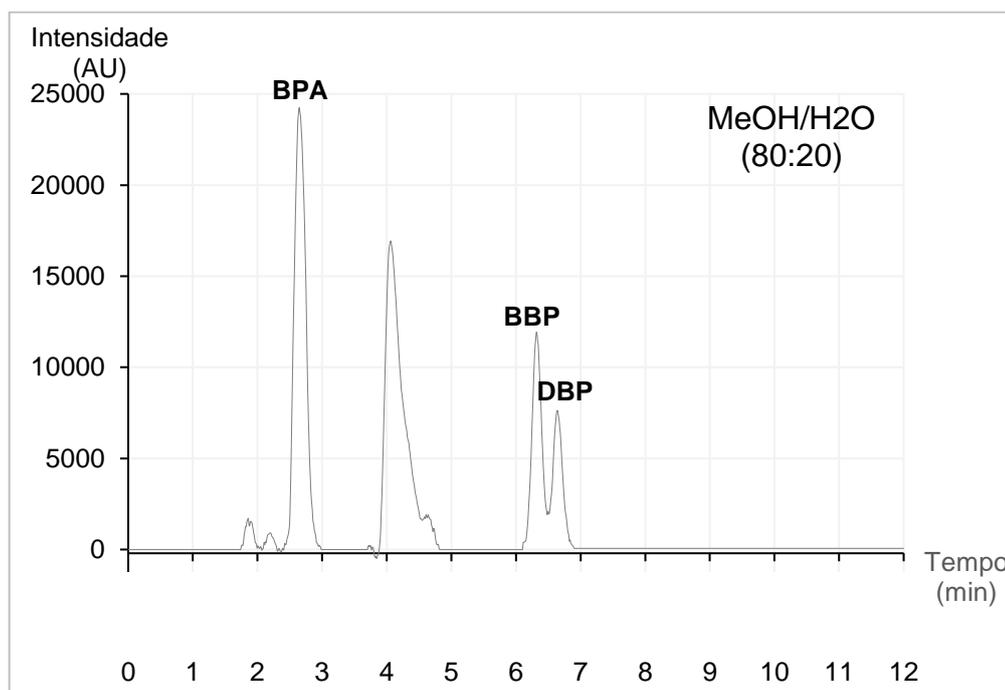
4.1 Aperfeiçoamento das condições cromatográficas

4.1.1 Testes

Nos testes preliminares ao realizar as injeções das soluções monoelementares, o tempo de retenção obtido para o BPA foi de 2.6 min, para o BBP 6.3 min e DBP 6.6 min, sendo assim obtivemos a seguinte ordem de eluição BPA, BBP e DBP. Quanto maior o coeficiente de partição, menor será a polaridade de um composto. Como em cromatografia de fase reversa a fase estacionária tem menor polaridade do que a fase móvel, podemos esperar que o DBP tenha a menor polaridade entre os compostos estudados, o que pode ser corroborado pelo alto valor do coeficiente de partição.

No teste utilizando a solução multielementar de $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ dos compostos estudados com a composição MeOH e água como fase móvel, o perfil cromatográfico não foi satisfatório apresentando coeluição dos compostos BBP e DBP, como mostrado na Figura 3.

Figura 3 - Cromatograma utilizando MeOH/H₂O como fase móvel.

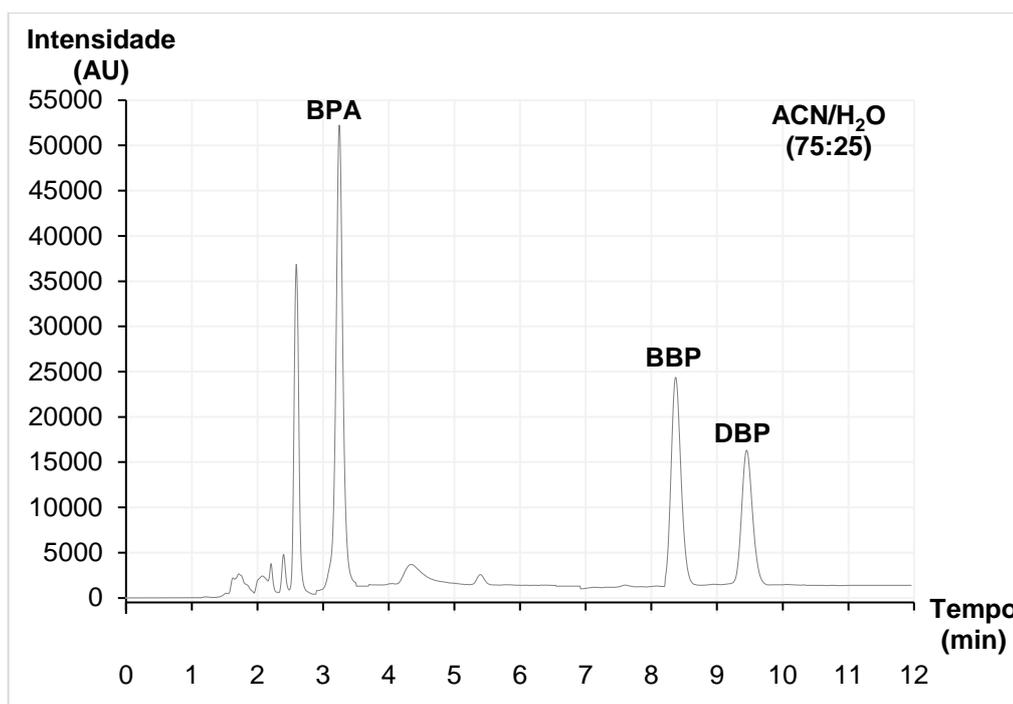


Fonte: Autora (2021).

Tanto no teste do MeOH quanto no teste da ACN como fase móvel, a solução injetada foi solubilizada no respectivo solvente testado como fase móvel, a fim de minimizar problemas de distorções no formato dos picos por conta de diferentes forças de eluição.

No teste utilizando a composição 75% ACN e 25% água como fase móvel, utilizando a solução multielementar de 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ dos compostos estudados preparada em ACN, apresentou um melhor perfil cromatográfico com uma boa resolução, não ocorrendo, portanto, coeluição de nenhum dos analitos estudados como podemos observar na Figura 4. No entanto, quando comparado com o resultado do teste anterior, o tempo de retenção foi maior para o BPA correspondendo a 3.2 min, BBP e DBP os tempos de retenção foram 8.5, 9.4 min, respectivamente.

Figura 4 - Cromatograma utilizando ACN/H₂O como fase móvel.



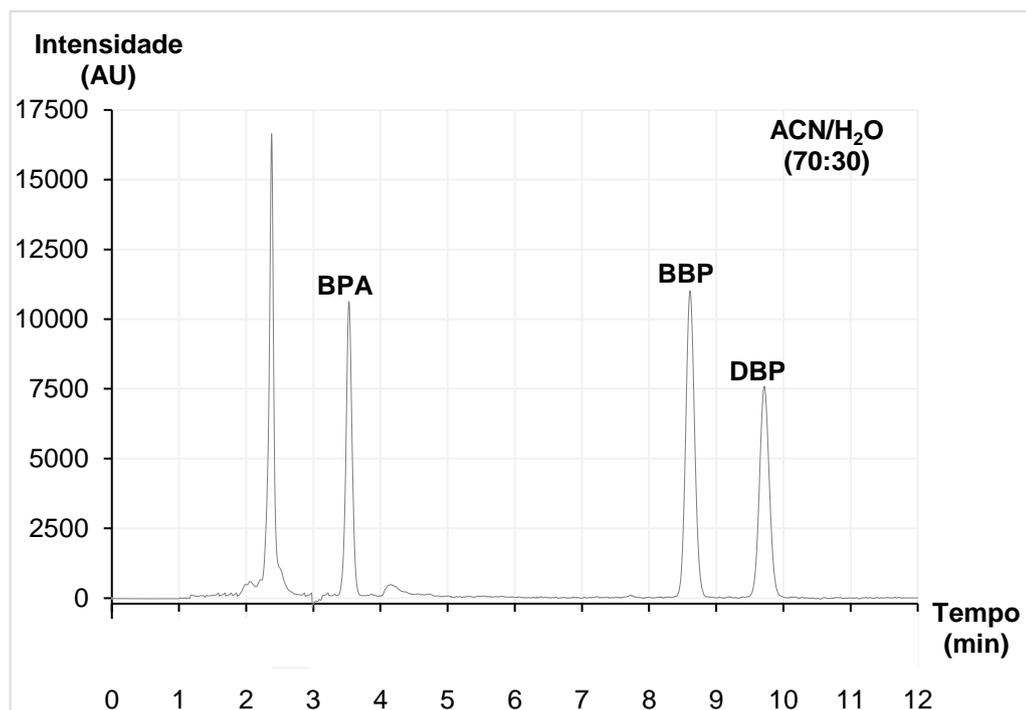
Fonte: Autora (2021).

4.1.2 Método aperfeiçoado

Como obtivemos boa resolução com a composição da fase móvel ACN/H₂O, otimizamos o método de forma que o tempo de análise fosse reduzido e a melhor condição de eluição isocrática 70% ACN e 30% H₂O foi obtida, utilizando a

solução de $200 \mu\text{g L}^{-1}$ de BPA e $400 \mu\text{g L}^{-1}$ de BBP e DBP dos compostos estudados preparada em ACN, onde obtivemos boa separação dos compostos BBP e DBP conforme mostrado na Figura 5. Os tempos de retenção obtidos foram para o BPA 3.5, BBP 8.8 e DBP 9.7 min. Sendo assim a condição de eluição isocrática utilizada para os parâmetros a seguir.

Figura 5 - Cromatograma do método otimizado utilizando ACN/H₂O como fase móvel.



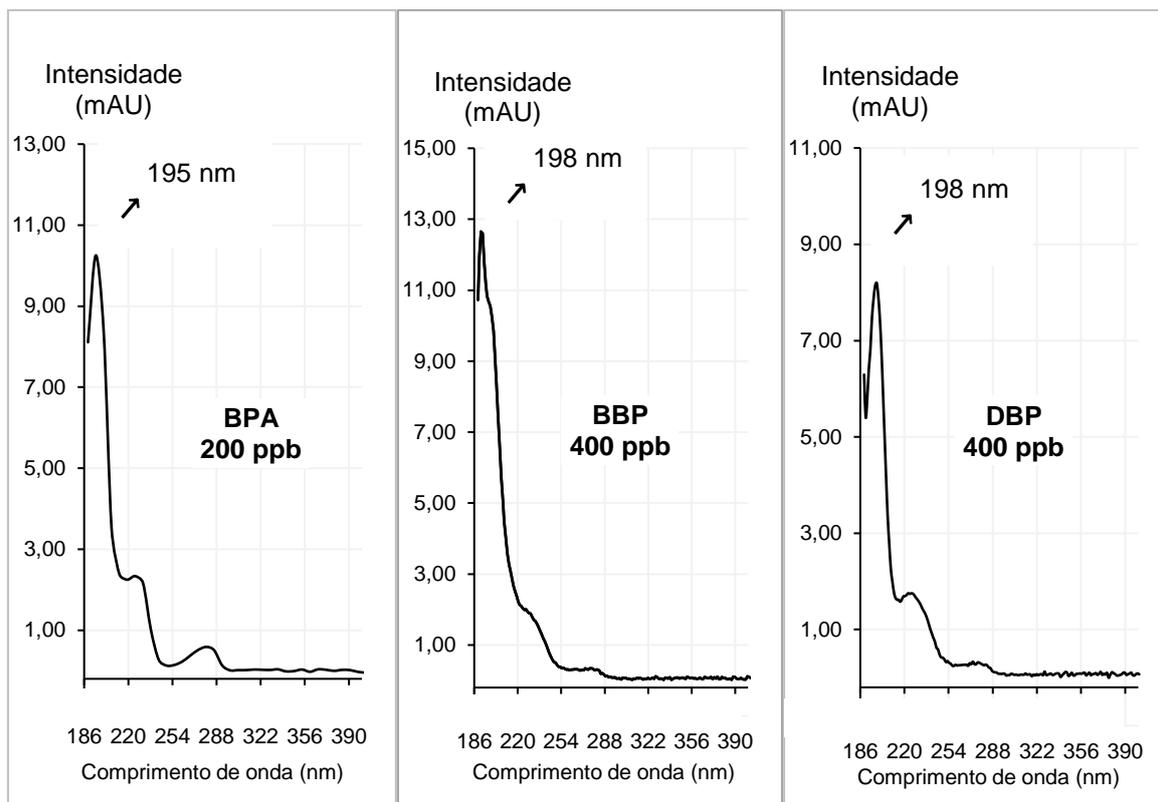
Fonte: Autora (2021).

4.2 Validação do método

4.2.1 Seletividade

O detector UV/Vis com arranjo de fotodiodos nos fornece o espectro de 190 a 800 nm. A partir da injeção da solução padrão de BPA, BBP e DBP em ACN e na matriz obtivemos o comprimento de onda de 198 nm, que foi a maior absorção apresentada para a maioria dos 3 analitos estudados, como podemos visualizar a partir da Figura 6, com espectros muito similares. Portanto, este foi o comprimento de onda utilizado nos experimentos deste trabalho.

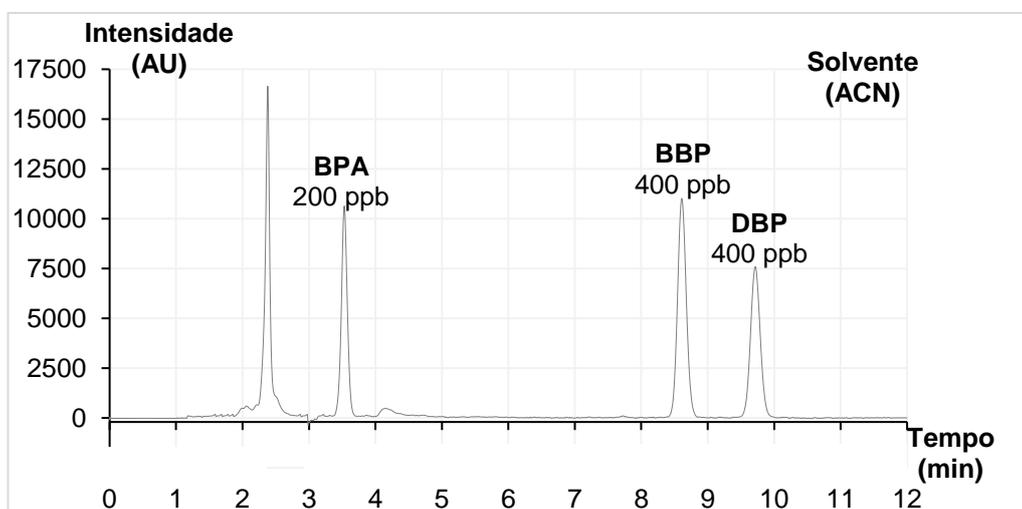
Figura 6 – Espectros de absorvância dos compostos.



Fonte: Autora (2021).

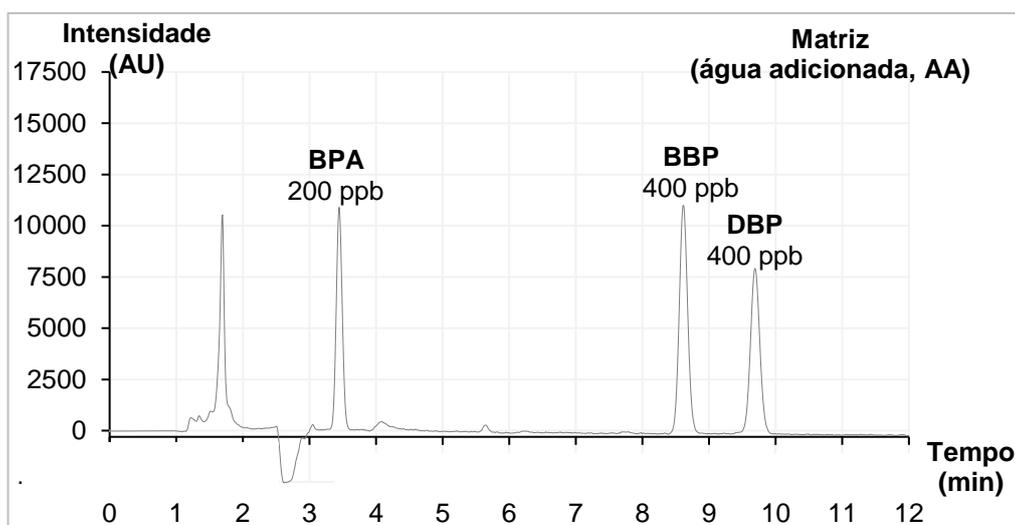
Os cromatogramas correspondentes aos espectros apresentados anteriormente, apresentaram grande similaridade com tempos de retenção equivalentes tanto no solvente quanto na matriz, como podemos observar nas Figuras 7 e 8.

Figura 7 - Cromatograma obtido utilizando a solução preparada em ACN.



Fonte: Autora (2021).

Figura 8 - Cromatograma obtido utilizando a solução preparada na matriz.



Fonte: Autora (2021).

Dada a grande semelhança dos espectros e dos cromatogramas obtidos o método demonstrou ser altamente seletivo para os compostos estudados.

4.2.2 Linearidade

Utilizando o teste de *Grubbs* para a verificação da presença de outliers nas replicatas, quando $G_{\text{calculado}} > G_{\text{tabelado}}$, temos a presença de outlier e esse valor identificado como anômalo, deverá ser eliminado dos cálculos nos parâmetros de validação. Na curva preparada no solvente ACN foi identificado a presença de 1 outlier em uma replicata na concentração de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de BPA. Na curva preparada na matriz foi identificado a presença de 1 outlier em uma replicata na concentração de $75 \mu\text{g L}^{-1}$ de BBP.

Utilizando o teste de *Cochran*, para verificar a hipótese de igualdade das variâncias, homocedasticidade. A partir das variâncias obtidas para cada nível de concentração, a maior variância obtida é comparada com todas as outras variâncias obtidas. Determinando $C_{\text{calculado}}$ e comparando C_{tabelado} , quando $C_{\text{tabelado}} > C_{\text{calculado}}$, temos que a variância dos erros experimentais é constante, sendo assim homocedásticos, portanto a aplicação do MMQO é válida para o conjunto de dados testado. Nas Tabelas 8 e 9, temos a análise de homocedasticidade para as curvas de cada analito no solvente e na matriz.

Tabela 8 – Teste de homocedasticidade para os analitos no solvente.

Solvente (ACN)		
Analito	Homocedasticidade	Resultado (teste de Cochran)
BPA	$C_{\text{tabelado}} > C_{\text{calculado}}$ 0,616 > 0,547	Respostas instrumentais homocedásticas – MMQO VÁLIDO
BBP	$C_{\text{tabelado}} > C_{\text{calculado}}$ 0,616 > 0,476	Respostas instrumentais homocedásticas – MMQO VÁLIDO
DBP	$C_{\text{tabelado}} > C_{\text{calculado}}$ 0,616 > 0,322	Respostas instrumentais homocedásticas – MMQO VÁLIDO

Fonte: Autora (2021).

Tabela 9 – Teste de homocedasticidade para os analitos na matriz.

Matriz (AA)		
Analito	Homocedasticidade	Resultado (teste de Cochran)
BPA	$C_{\text{tabelado}} > C_{\text{calculado}}$ 0,616 > 0,290	Respostas instrumentais homocedásticas – MMQO VÁLIDO
BBP	$C_{\text{tabelado}} > C_{\text{calculado}}$ 0,616 > 0,456	Respostas instrumentais homocedásticas – MMQO VÁLIDO
DBP	$C_{\text{tabelado}} > C_{\text{calculado}}$ 0,616 > 0,326	Respostas instrumentais homocedásticas – MMQO VÁLIDO

Fonte: Autora (2021).

As equações da reta obtidas pelo método das mínimos quadrados ordinários, para cada analito no solvente estão descritas na Tabela 10 e para cada analito na matriz estão representadas na Tabela 11.

Tabela 10 – Equações da reta para analito em ACN.

Solvente (ACN)			
Analito	Equação ($y = a + bx$)	r	Intervalo linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)
BPA	$y = -1200,30 + 360,05x$	0,9899	20 - 150
BBP	$y = 798,30 + 259,69x$	0,9978	50 - 300
DBP	$y = 2206,20 + 193,53x$	0,9789	50 - 300

Fonte: Autora (2021).

Tabela 11 - Equações da reta para analito na matriz.

Matriz (AA)			
Analito	Equação ($y = a + bx$)	r	Intervalo linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)
BPA	$y = 1207,32 + 339,38x$	0,9967	20 - 150
BBP	$y = 1114,67 + 241,07x$	0,9982	50 - 300
DBP	$y = 1239,77 + 171,75x$	0,9982	50 - 300

Fonte: Autora (2021).

Os coeficientes de correlação obtidos na matriz e no solvente estão todos acima de 0,90, e, portanto, condizentes com a recomendação do INMETRO. Ainda que altos valores de r sejam obtidos, existe a possibilidade que apresentem erros determinados, portanto, testes estatísticos são necessários para confirmação da relação linear entre x e y .

4.2.2.1 - Teste de validação da análise de regressão linear (significância da regressão)

A aplicação do teste F serve para verificar se o modelo linear simples é adequado. Na Tabela 12 são apresentados os resultados referentes ao teste F para os compostos no solvente e a matriz.

Tabela 12 - Teste de linearidade das curvas analíticas preparadas no solvente e na matriz.

Linearidade				
Analito	Curva no solvente	Teste F	Curva na matriz	Teste F
BPA	$F_{\text{calculado}} \geq F_{\text{tabelado}}$ $456,64 > 4,49$	significante	$F_{\text{calculado}} \geq F_{\text{tabelado}}$ $28,03 > 4,49$	significante
BBP	$F_{\text{calculado}} \geq F_{\text{tabelado}}$ $33,97 > 4,49$	significante	$F_{\text{calculado}} \geq F_{\text{tabelado}}$ $54293,01 > 4,49$	significante
DBP	$F_{\text{calculado}} \geq F_{\text{tabelado}}$ $37,38 > 4,49$	significante	$F_{\text{calculado}} \geq F_{\text{tabelado}}$ $6,51 > 4,49$	significante

Fonte: Autora (2021).

A regressão é significativa quando $F_{\text{calculado}}$ é maior do que o F_{tabelado} , indicando a existência de relação linear entre as variáveis x e y . Tanto no solvente

quanto na matriz, o teste F para todos compostos foram todos significativos demonstrando que o modelo linear simples é adequado.

4.2.2.2 - Teste de significância dos parâmetros de calibração

Nas tabelas 13 e 14 estão os resultados da análise estatística dos parâmetros das curvas no solvente e na matriz, respectivamente. Nas curvas no solvente todos os coeficientes lineares foram insignificantes. Nas curvas na matriz os coeficientes lineares foram insignificantes para o BBP e DBP e somente o BPA apresentou significância para os coeficientes linear e angular. Com 95% de significância, para o BPA em ACN e para o BBP em AA que tiveram uma replicata eliminada o valor de t_{tabelado} foi 2,101 e para os demais o valor de t_{tabelado} foi 2,093.

Tabela 13 - Resultados do teste estatístico de significância dos parâmetros das curvas de calibração preparada no solvente.

Solvente											
Composto	Coeficiente linear				Coeficiente angular				Curva analítica		
	a	S _a	t _{calc,a}	Teste t	b	S _b	t _{calc,b}	Teste t			
BPA	-1200,30	1037,18	-1,15	t _{cal} < t _{tab}	Insignificante	360,05	12,52	28,68	t _{cal} > t _{tab}	significante	y = 360,05x
BBP	798,30	759,55	1,05	t _{cal} < t _{tab}	Insignificante	259,69	4,38	59,10	t _{cal} > t _{tab}	significante	y = 259,69x
DBP	2206,20	1704,66	1,29	t _{cal} < t _{tab}	Insignificante	193,53	10,11	19,05	t _{cal} > t _{tab}	significante	y = 193,53x

Fonte: Autora (2021).

Tabela 14 - Resultados do teste estatístico de significância dos parâmetros das curvas de calibração preparada na matriz.

Matriz											
Composto	Coeficiente linear				Coeficiente angular				Curva analítica		
	a	S _a	t _{calc,a}	Teste t	b	S _b	t _{calc,b}	Teste t			
BPA	1207,32	513,85	2,35	t _{cal} > t _{tab}	Significante	339,38	6,12	55,26	t _{cal} > t _{tab}	significante	y = 1207,32 + 339,38x
BBP	1114,67	627,31	1,77	t _{cal} < t _{tab}	Insignificante	241,07	3,74	64,18	t _{cal} > t _{tab}	significante	y = 241,07x
DBP	1239,77	440,71	2,81	t _{cal} > t _{tab}	Significante	171,75	2,61	65,34	t _{cal} > t _{tab}	significante	y = 1239,77 + 171,75x

Fonte: Autora (2021).

4.2.2.3 Efeito matriz

Comparando das inclinações das curvas de calibração obtidos no solvente e na matriz, podemos avaliar a existência de efeito matriz, conforme apresentado na Tabela 15.

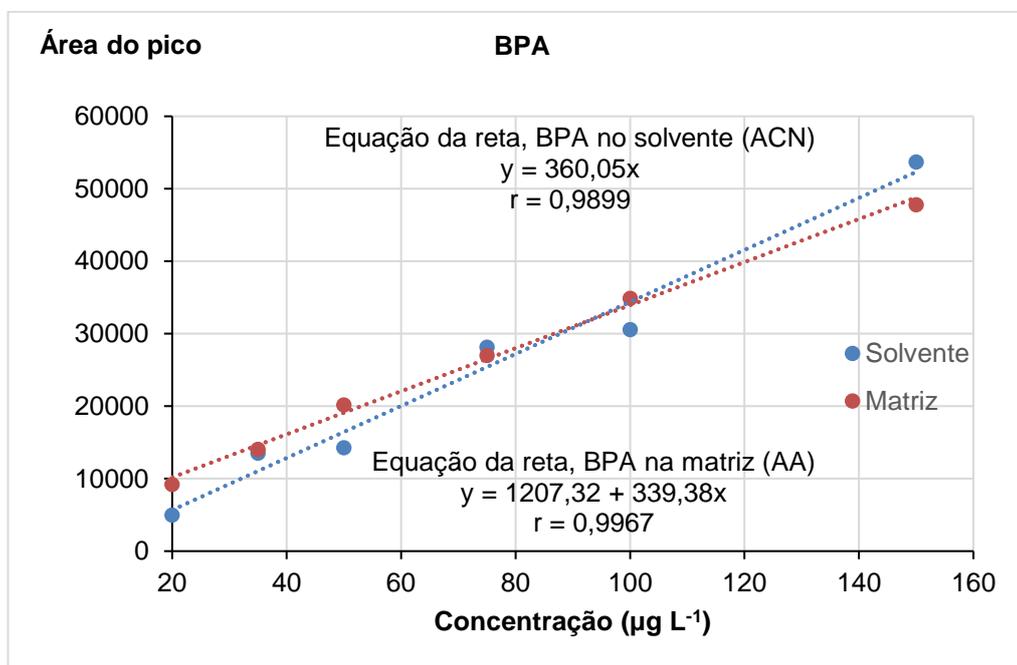
Para os analitos BPA e BBP não ocorrem efeito matriz. Para o DBP existe efeito matriz. Os parâmetros de validação posteriores foram preparados na matriz. Os resultados de efeito matriz para cada composto podem ser corroborados pelas Figuras 9, 10 e 11 e pela Tabela 15.

Tabela 15 – Valores de recuperação obtidos para cada composto estudado.

Efeito Matriz			
Analito	EM calculado	Intervalo	Conclusão
BPA	-5,74	-10 a 10	Não existe efeito matriz
BBP	-7,72		Não existe efeito matriz
DBP	-12,68		Existe efeito matriz

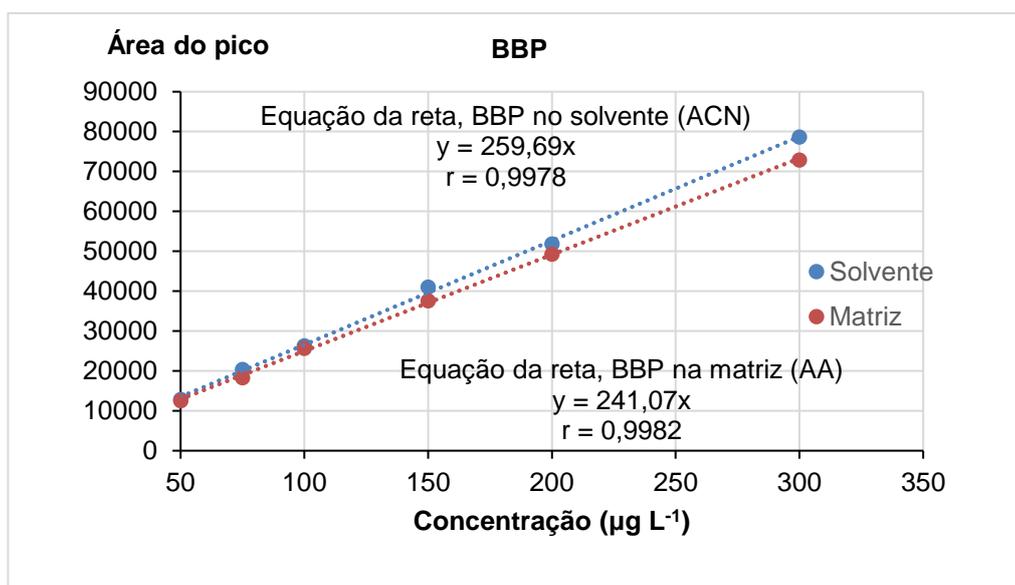
Fonte: Autora (2021).

Figura 9 – Curvas no solvente e na matriz para o BPA.



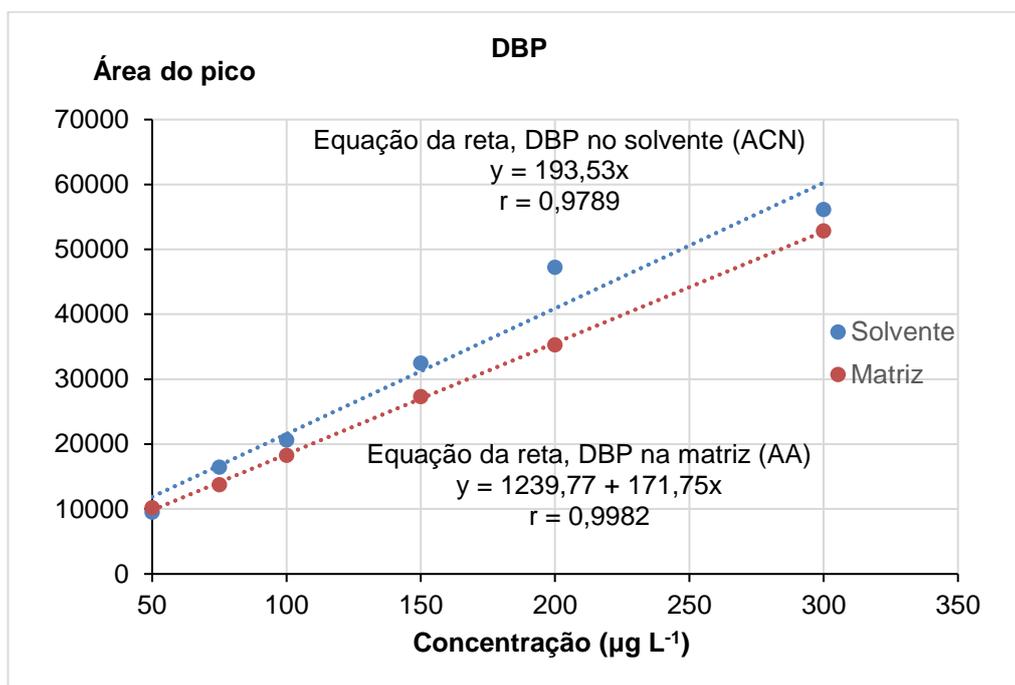
Fonte: Autora (2021).

Figura 10 – Curvas no solvente e na matriz para o BBP.



Fonte: Autora (2021).

Figura 11 - Curvas no solvente e na matriz para o DBP.



Fonte: Autora (2021).

4.2.3 Limite de Detecção (LD) e limite de Quantificação (LQ)

Os LD's e LQ's foram obtidos por estimativa a partir da curva analítica e calculados de acordo com o subitem 3.3.5.3. Como o branco não gerou sinal, foi adotado o valor de s , o valor do desvio padrão do menor nível de concentração. Na tabela 16 podemos observar os LD's e LQ's estimados.

Tabela 16 – Valores de LD's e LQ's obtidos para cada composto estudado.

Analito	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)
BPA	3,96	13,08
BBP	6,41	21,16
DBP	12,63	41,68

Fonte: Autora (2021).

4.2.4 Exatidão

Na tabela 17 podemos observar que de modo geral, os níveis de recuperação variaram de 98,57 a 106,91%, atendendo ao intervalo de aceitação do INMETRO que é de 80 a 110%. Para todos os analitos foram obtidos valores aceitáveis de recuperação em todos os níveis de concentração estudados, portanto o método tem exatidão aceitável.

Tabela 17 – Valores de recuperação obtidos para cada composto estudado.

Recuperação (%)			
BPA			
Nível de Fortificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)			Critério de Aceitação (%)
20	50	150	
102,93 \pm 3,04	101,64 \pm 1,29	100,59 \pm 4,18	80 -110
BBP			
Nível de Fortificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)			Critério de Aceitação (%)
50	100	300	
103,33 \pm 2,13	106,91 \pm 2,64	104,10 \pm 4,94	80 – 110
DBP			
Nível de Fortificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)			Critério de Aceitação (%)
50	100	300	
98,57 \pm 9,07	100,46 \pm 4,73	100,22 \pm 2,97	80 -110

Fonte: Autora (2021).

4.2.5 Precisão

A precisão do método foi avaliada por meio da repetitividade, bem como pela precisão intermediária. Na tabela 18 podemos observar os dados de repetitividade com medidas realizadas pelo mesmo analista, no mesmo dia, de forma consecutiva, em que o menor valor obtido de CV (1,29%) foi para o BPA na concentração de 50 $\mu\text{g L}^{-1}$. E o maior valor obtido de CV (9,07%) foi para o DBP no menor nível de concentração 50 $\mu\text{g L}^{-1}$. Para todos os analitos foram obtidos valores aceitáveis em todos os níveis de concentração, portanto o método possui precisão satisfatória.

Tabela 18 - Valores de repetitividade obtidos para cada composto estudado.

Repetitividade		
BPA		
Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Coefficiente de Variação (%)	Critério de Aceitação (%)
20	3,04	11,00
50	1,29	
150	4,18	
BBP		
Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Coefficiente de Variação (%)	Critério de Aceitação (%)
50	2,13	11,00
100	3,19	
300	5,20	
DBP		
Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Coefficiente de Variação (%)	Critério de Aceitação (%)
50	9,07	11,00
100	4,73	
300	2,97	

Fonte: Autora (2021).

A precisão intermediária foi avaliada mediante o coeficiente de variação (CV) calculado com base no desvio padrão combinado dos dois conjuntos de medidas obtidos por analistas diferentes em dias distintos. Na tabela 19 podemos observar os valores de CV obtidos utilizando a ANOVA. Podemos observar que todos os valores de $F_{\text{calculado}}$ foram menores que o valor de F_{tabelado} , expressando a proximidade entre

os resultados obtidos pelos analistas, sendo, portanto, rejeitada a hipótese do fator analista ser considerável.

Tabela 19 - Valores de CV's obtidos para cada composto estudado.

Precisão Intermediária			
BPA			
Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	F_{cal}	F_{tab}	Teste F
20	-0,0241	4,965	insignificante
50	-0,0003	4,965	insignificante
150	3,7787	4,965	insignificante
BBP			
Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	t_{cal}	t_{tab}	Teste t
50	-0,0251	4,965	insignificante
100	-0,0113	4,965	insignificante
300	0,9111	4,965	insignificante
DBP			
Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	t_{cal}	t_{tab}	Teste t
50	-0,0576	4,965	insignificante
100	-0,0077	4,965	insignificante
300	2,2859	4,965	insignificante

Fonte: Autora (2021).

4.2.6 Aplicação do método em amostras reais e comparação com dados da literatura

As amostras foram obtidas em bairros da periferia e do Centro de Fortaleza foram filtradas e analisadas utilizando o método desenvolvido. Todas as amostras analisadas encontram-se abaixo do limite de detecção, conforme demonstrado na tabela 20. Apesar do método desenvolvido nesse trabalho ter melhores LD e LQ do que outros métodos já desenvolvidos e reportados na literatura, conforme está descrito na tabela 21, não foi encontrado nenhum dos analitos estudados com valores acima do LD.

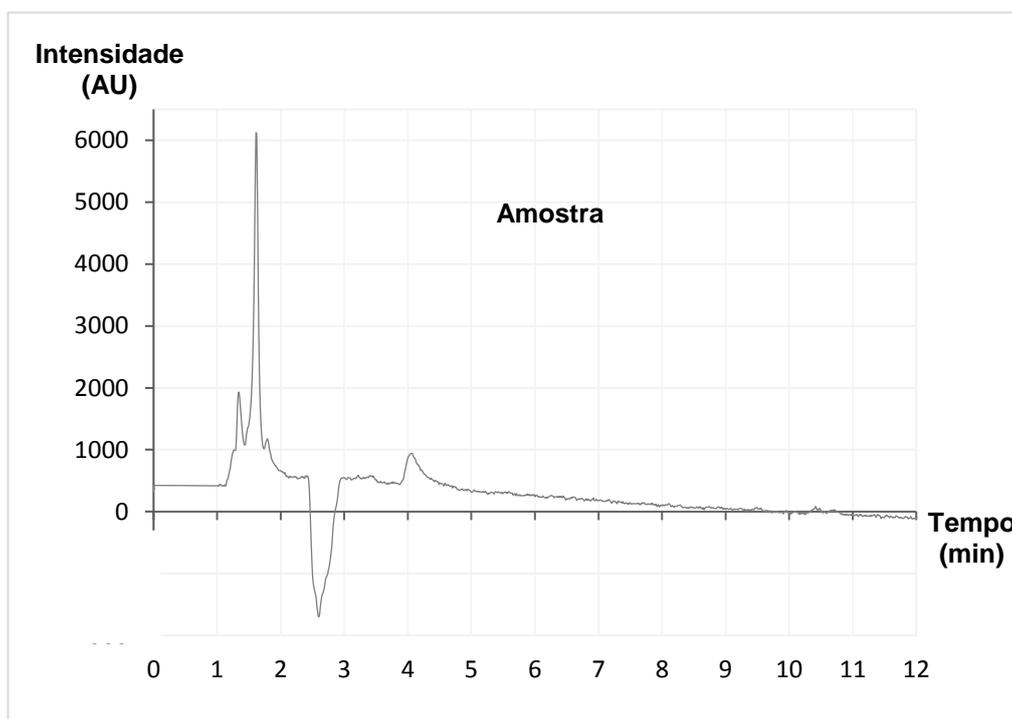
Tabela 20 – Resultados das análises das amostras.

Amostra \ Analito	AAY	AAS ₁	AAC	AAI	AAS ₂
	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)				
BPA	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
BBP	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
DBP	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD

Fonte: Autora (2021).

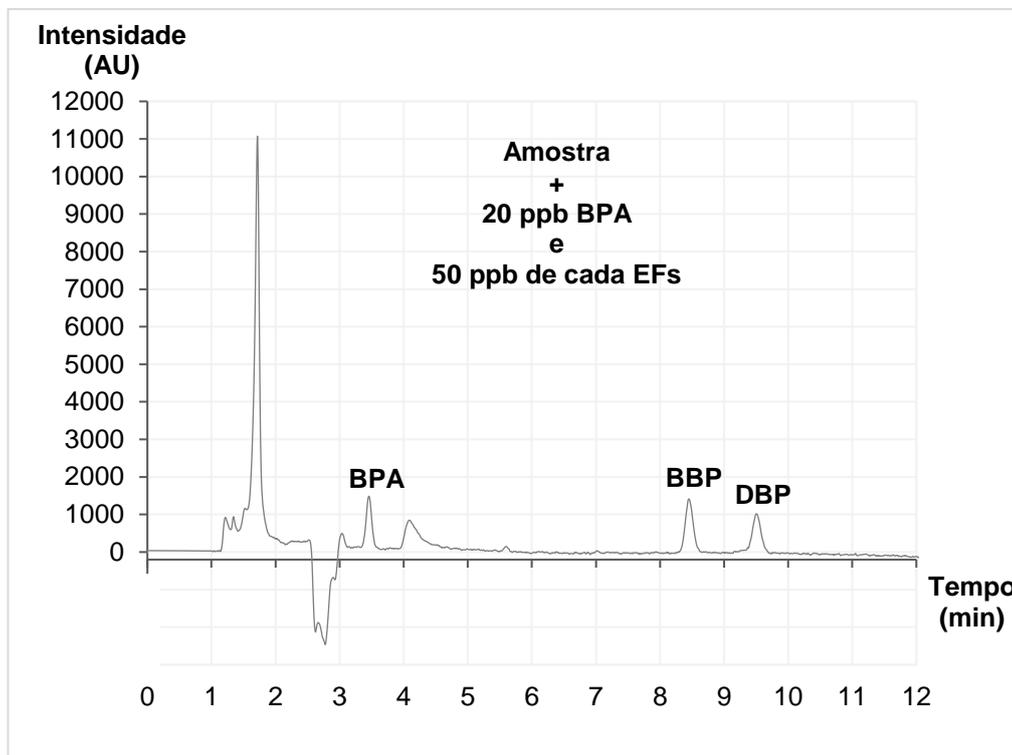
Na Figura 12 observamos o perfil cromatográfico apresentado para as amostras analisadas, onde fica evidenciado a ausência dos picos dos analitos estudados. Na Figura 13 observamos o perfil cromatográfico apresentado para as amostras analisadas com a adição da menor concentração utilizada na validação do método, $20 \mu\text{g L}^{-1}$ de BPA, $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de BBP e $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de DBP, onde fica evidenciado a presença dos picos dos analitos estudados.

Figura 12 - Cromatograma da amostra utilizando ACN/H₂O como fase móvel.



Fonte: Autora (2021).

Figura 13 - Cromatograma da amostra com a adição dos analitos na menor concentração estudada utilizando ACN/H₂O como fase móvel.



Fonte: Autora (2021).

A tabela 21 apresenta alguns artigos que analisaram um ou mais dos analitos estudados nesta dissertação. Deve ser ressaltado que os valores de LD e LQ dependem tanto das condições analíticas quanto da instrumentação utilizadas (LORENZ et al., 2014).

Tabela 21 – Comparação de métodos instrumentais usados para análises de BPA, BBP e DBP através de HPLC que analisaram amostras de água engarrafada.

Analito	Detector	Extração	LOD ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Referência
BPA; BBP; DBP	DAD	Nenhuma	4,30; 6,24; 14,98	14,19; 20,59; 49,45	Este estudo
BBP	VWD	IL-CIA-DLLME	1,36	NR	Zhang; Chen e Jiang (2011)
BBP; DBP	DAD	MSPE	0,14; 0,12	0,5; 0,4	Liu et al. (2015)
BPA	DAD	Nenhuma	80	150	Radu et al. (2016)
BBP; DBP	MS	cSPME	0,07; 0,12	0,22; 0,40	Cheng e Chang (2016)
DBP	UV/Vis	SPE	2,40	7,900	Salazar-Beltrán et al. (2017)
BPA	DAD	SPME	0,20	NR	Mohammadnezhad et al. (2017)
BBP; DBP	MS	MIP-SPE	0,16; 0,84	0,55; 2,81	Barciela-Alonso, Otero-Lavandeira e Bermejo-Barrera (2017)
BBP; DBP	MS/MS	NR	0,20; 0,20	0,64; 0,60	Surhio et al. (2017)
DBP	UV/Vis	MISPME	3,0	10,0	Soheilifar et al. (2018)
BBP; DBP	MS/MS	M- μ DSPE	NR	$6,0 \times 10^{-3}$; $11,0 \times 10^{-3}$	Santana-Mayor et al. (2018)
BPA	UV/Vis	SBSE	0,02	0,06	Gorji, Bahram e Biparva (2019)
BBP; DBP	UV/Vis	MSPE	$1,03 \times 10^{-2}$; $0,659 \times 10^{-3}$	$3,42 \times 10^{-2}$; $2,2 \times 10^{-2}$	Yin et al. (2019)
BPA	MS/MS	SPE	0,01	0,04	Alammari, Khan e Aqel (2020)
BBP; DBP	UV	DLLME	6,9; 7,2	23,0; 24,0	Ortega-Zamora et al. (2020)

Fonte: Autora (2021).

VWD: detector de comprimento de onda variável; DAD: detector com arranjo de diodos; UV/Vis: detector de comprimento de onda duplo ultravioleta/visível; MS: detector de massa; MS/MS: detector de massas do tipo triplo quadrupolo;

IL-CIA-DLLME: microextração líquido-líquido dispersiva baseada em agregação induzida por frio de um líquido iônico; MSPE: extração em fase sólida magnética; cSPME: microextração capilar em fase sólida; SPE: extração em fase sólida; SPME: microextração em fase sólida; MIP-SPE: extração em fase sólida baseada em polímero com impressão molecular; MISPME: microextração em fase sólida molecularmente impressa; M- μ DSPE: extração em fase sólida microdispersiva com base magnética; SBSE: extração sorptiva com barra de agitação; DLLME: microextração líquido-líquido dispersiva;

ND: não reportado.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nos testes iniciais, a ACN como fase móvel apresentou melhores condições de análise dos analitos. A otimização do método cromatográfico foi satisfatória, diante da boa separação dos compostos.

A seletividade do método foi comprovada por meio dos espectros e dos tempos de retenção no solvente e na matriz, pois através dessas informações os compostos estudados são eficientemente identificados.

Os coeficientes de correlação obtidos para todos os compostos foram aceitáveis. Por meio de testes estatísticos foram testadas a significância da regressão e os parâmetros a e b. Ocorreu efeito matriz para o DBP, portanto devemos utilizar soluções preparadas na matriz e conseqüentemente devemos utilizar as equações da reta obtidas para os compostos preparados na matriz.

O método foi desenvolvido com êxito, pois os parâmetros estudados foram todos aceitáveis. Comparado a literatura o método desenvolvido superou o desempenho de métodos já estabelecidos em outros trabalhos, pois obteve melhores LD e LQ. Os analitos não foram detectados nas amostras analisadas.

REFERÊNCIAS

- AL-SALEH, I.; SHINWARI, N.; ALSABBAHEEN, A. Phthalates residues in plastic bottled waters. **Journal of Toxicological Sciences**, Riyadh, v. 36, n. 4, p. 469–478, 1 ago. 2011.
- ALAMMARI, A. M.; KHAN, M. R.; AQEL, A. Trace identification of endocrine-disrupting bisphenol A in drinking water by solid-phase extraction and ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of King Saud University - Science**, Riyadh, v. 32, n. 2, p. 1634–1640, 1 mar. 2020.
- AMIRIDOU, D.; VOUTSA, D. Alkylphenols and phthalates in bottled waters. **Journal of Hazardous Materials**, Thessaloniki, v. 185, n. 1, p. 281–286, 15 jan. 2011.
- ANUMOL, T. et al. Rapid direct injection LC-MS/MS method for analysis of prioritized indicator compounds in wastewater effluent. **Environmental Science: Water Research and Technology**, Tucson, v. 1, n. 5, p. 632–643, 4 set. 2015.
- AZNAR, M. et al. Composition of the adhesives used in food packaging multilayer materials and migration studies from packaging to food. **Journal of Materials Chemistry**, Zaragoza, v. 21, n. 12, p. 4358–4370, 28 mar. 2011.
- AZZOUZ, A.; BALLESTEROS, E. Trace analysis of endocrine disrupting compounds in environmental water samples by use of solid-phase extraction and gas chromatography with mass spectrometry detection. **Journal of Chromatography A**, Linares, v. 1360, p. 248–257, set. 2014.
- BACH, C. et al. Chemical compounds and toxicological assessments of drinking water stored in polyethylene terephthalate (PET) bottles: A source of controversy reviewed. **Water Research**, Nancy, v. 46, n. 3, p. 571–583, mar. 2012.
- BACH, C. et al. Effect of sunlight exposure on the release of intentionally and/or non-intentionally added substances from polyethylene terephthalate (PET) bottles into water: Chemical analysis and in vitro toxicity. **Food Chemistry**, Nancy, v. 162, p. 63–71, 1 nov. 2014.
- BACKE, W. J.; FIELD, J. A. Is SPE necessary for environmental analysis? A quantitative comparison of matrix effects from large-volume injection and solid-phase extraction based methods. **Environmental Science and Technology**, Corvallis, v. 46, n. 12, p. 6750–6758, 19 jun. 2012.
- BARCIELA-ALONSO, M. C.; OTERO-LAVANDEIRA, N.; BERMEJO-BARRERA, P. Solid phase extraction using molecular imprinted polymers for phthalate determination in water and wine samples by HPLC-ESI-MS. **Microchemical Journal**, Santiago de Compostela, v. 132, p. 233–237, 1 maio 2017.
- BAYEN, S. et al. Analysis of selected antibiotics in surface freshwater and seawater using direct injection in liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Singapore, v. 1338, p. 38–43, 18 abr.

2014.

BHUNIA, K. et al. Migration of chemical compounds from packaging polymers during microwave, conventional heat treatment, and storage. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, [s.l.], v. 12, n. 5, p. 523–545, 1 set. 2013.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e conseqüências. **Química Nova**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 3, p. 651–666, jun. 2007.

BORRIRUKWISITSAK, S.; KEENAN, H. E.; GAUCHOTTE-LINDSAY, C. Effects of Salinity, pH and Temperature on the Octanol-Water Partition Coefficient of Bisphenol A. **International Journal of Environmental Science and Development**, [s.l.] p. 460–464, 2012.

BORRULL, J. et al. A simple, fast method for the analysis of 20 contaminants of emerging concern in river water using large-volume direct injection liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, L'Ampolla, v. 411, n. 8, p. 1601–1610, 7 mar. 2019.

BRASIL. **PORTARIA DE CONSOLIDAÇÃO Nº 5, DE 28 DE SETEMBRO DE 2017**. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/marco/29/PRC-5-Portaria-de-Consolida----o-n---5--de-28-de-setembro-de-2017.pdf>. Acesso em: 28 jun. 2019.

BUSETTI, F. et al. Trace analysis of environmental matrices by large-volume injection and liquid chromatography-mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Perth, v. 402, n. 1, p. 175–186, 17 jan. 2012.

CHAILURKIT, L. OR; SRIJARUSKUL, K.; ONGPHIPHADHANAKUL, B. Bisphenol A in Canned Carbonated Drinks and Plastic-Bottled Water from Supermarkets. **Exposure and Health**, Bangkok, v. 9, n. 4, p. 243–248, 1 dez. 2017.

CHENG, C.; CHANG, K. C. Sensitive analysis of phthalate esters in plastic bottled water: Via on-line capillary solid-phase microextraction liquid chromatography electrospray ionization-ion trap mass spectrometry. **Analytical Methods**, Chungli, v. 8, n. 19, p. 3910–3919, 21 maio 2016.

CHIAIA, A. C.; BANTA-GREEN, C.; FIELD, J. Eliminating solid phase extraction with large-volume injection LC/MS/MS: Analysis of illicit and legal drugs and human urine indicators in US wastewaters. **Environmental Science and Technology**, Corvallis, v. 42, n. 23, p. 8841–8848, 2008.

CINCOTTA, F. et al. Non-intentionally added substances in PET bottled mineral water during the shelf-life. **European Food Research and Technology**, Messina, v. 244, p. 433–439, 2018.

CIOFI, L. et al. Applicability of the direct injection liquid chromatographic tandem mass spectrometric analytical approach to the sub-ng L⁻¹ determination of perfluoroalkyl acids in waste, surface, ground and drinking water samples. **Talanta**, Florence, v. 176, p. 412–421, 1 jan. 2018.

COLIN, A. et al. Is drinking water a major route of human exposure to alkylphenol and bisphenol contaminants in France? **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, Nancy, v. 66, n. 1, p. 86–99, 7 ago. 2014.

DREOLIN, N. et al. Development and validation of a LC–MS/MS method for the analysis of bisphenol a in polyethylene terephthalate. **Food Chemistry**, Zaragoza, v. 274, p. 246–253, fev. 2019.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - EPA. **Dibutyl phthalate; CASRN 84-74-2 Integrated Risk Information System. Reference Dose for Chronic Oral Exposure (RfD)**. Disponível em: https://cfpub.epa.gov/ncea/iris/iris_documents/documents/subst/0038_summary.pdf#nameddest=rfd. Acesso em: 3 jul. 2019.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - EPA. **Bisphenol A (CASRN 80-05-7) | IRIS | US EPA**. Disponível em: https://cfpub.epa.gov/ncea/iris/iris_documents/documents/subst/0356_summary.pdf#nameddest=rfd. Acesso em: 3 jul. 2019.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - EPA. **Butyl benzyl phthalate (CASRN 85-68-7) | IRIS | US EPA**. Disponível em: https://cfpub.epa.gov/ncea/iris/iris_documents/documents/subst/0293_summary.pdf#nameddest=rfd. Acesso em: 3 jul. 2019.

EUROPEAN CHEMICALS BUREAU. European Union Risk Assessment Report benzyl butyl phthalate (BBP) 3 rd Priority List. **European Commission - Joint research Centre. Luxembourg**, Varese, v. 76, p. 274, 2007.

EUROPEAN UNION. EURAR (European Union Risk Assessment Report), Dibutyl Phthalate (DBP) 1st Priority List. **European Commission - Joint research Centre. Luxembourg**, [s.l.], v. 29, p. 165, 2004.

EUROPEAN UNION. **COMMISSION REGULATION (EU) No 10/2011**. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32011R0010&from=eN>. Acesso em: 3 jul. 2019.

FABREGAT-CABELLO, N. et al. Method development and validation for the determination of selected endocrine disrupting compounds by liquid chromatography mass spectrometry and isotope pattern deconvolution in water samples. Comparison of two extraction techniques †. **Analytical Methods**, Castelló, v. 8, p. 2895–2903, 2016.

FIKAROVÁ, K. et al. A flow-based platform hyphenated to on-line liquid chromatography for automatic leaching tests of chemical additives from microplastics into seawater. **Journal of Chromatography A**, Hradec Králové, v. 1602, p. 160–167, 27 set. 2019.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Types of Water - Municipal | IBWA | Bottled Water**. Disponível em: <https://www.bottledwater.org/types/bottled-water>. Acesso em: 6 jul. 2019.

FRED-AHMADU, O. H. et al. Interaction of chemical contaminants with microplastics: Principles and perspectives. **Science of the Total Environment**, Ota, v. 706, p. 135978, 1 mar. 2020.

FUJIOKA, T. et al. A rapid and reliable technique for N-nitrosodimethylamine analysis in reclaimed water by HPLC-photochemical reaction-chemiluminescence. **Chemosphere**, Nagasaki, v. 161, p. 104–111, 1 out. 2016.

GAMBINO, I. et al. Pet-bottled water consumption in view of a circular economy: The case study of Salento (South Italy). **Sustainability (Switzerland)**, Lecce, v. 12, n. 19, p. 1–13, 27 set. 2020.

GEUEKE, B. Dossier – Bisphenol A. **Food Packaging Forum**, [s./], p. 1–8, 2014.

GOMES, J. M. et al. Saliva biomonitoring using LPME-GC/MS method to assess dentistry exposure to plasticizers. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Belo Horizonte, v. 412, n. 28, p. 7799–7810, 1 nov. 2020.

GORJI, S.; BAHRAM, M.; BIPARVA, P. Optimized stir bar sorptive extraction based on self-magnetic nanocomposite monolithic kit for determining bisphenol a in bottled mineral water and bottled milk samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry Research**, Urmia, v. 6, n. 1, p. 137–156, 2019.

GUART, A. et al. Migration of plasticizersphthalates, bisphenol A and alkylphenols from plastic containers and evaluation of risk. **Food Additives and Contaminants - Part A**, Barcelona, v. 28, n. 5, p. 676–685, 2011.

HAHLADAKIS, J. N. et al. An overview of chemical additives present in plastics: Migration, release, fate and environmental impact during their use, disposal and recycling. **Journal of Hazardous Materials**, Leeds, v. 344, p. 179–199, 2018.

HAO, C. et al. Direct aqueous determination of glyphosate and related compounds by liquid chromatography/tandem mass spectrometry using reversed-phase and weak anion-exchange mixed-mode column. **Journal of Chromatography A**, Ontario, v. 1218, n. 33, p. 5638–5643, 19 ago. 2011.

HARRIS, D. C. **Explorando a química analítica**. 4. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2016.

HEUDORF, U.; MERSCH-SUNDERMANN, V.; ANGERER, J. Phthalates: Toxicology and exposure. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, Frankfurt, v. 210, n. 5, p. 623–634, 2007.

IARC. **Agents Classified by the IARC Monographs**. Disponível em: <https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/09/ClassificationsAlphaOrder.pdf>. Acesso em: 7 jul. 2019.

IBWA. **Buyers' Guide Edition July/August 2019**. Disponível em: <https://www.bottledwater.org/newsroom/bottled-water-reporter>. Acesso em: 26 out. 2020.

ICH-INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION. **Validation of Analytical Procedures : Text and Methodology, Q2 (R1), Geneva.** INMETRO. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**, 2003.

INMETRO. **ORIENTAÇÃO SOBRE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS DOQ-CGCRE-008-07.** Disponível em: www.inmetro.gov.br/Sidoq/pesquisa_link.asp?seq_tipo_documento=5...008. Acesso em: 10 jun. 2019.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA QUALIDADE E TECNOLOGIA (INMETRO). **Orientação sobre validação de métodos analíticos DOQ-CGCRE-008, revisão 08.** Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/pesquisa_link.asp?seq_tipo_documento=5&cod_uo_numeracao=00774&num_documento=008.

JARDIM, W. F. et al. An integrated approach to evaluate emerging contaminants in drinking water. **Separation and Purification Technology**, Campinas, v. 84, p. 3–8, jan. 2012.

JEDDI, M. Z. et al. Concentrations of phthalates in bottled water under common storage conditions: Do they pose a health risk to children? **Food Research International**, Tehran, v. 69, p. 256–265, 1 mar. 2015.

KARAYAKA, S. et al. Determination of endocrine disruptive phenolic compounds by gas chromatography mass spectrometry after multivariate optimization of switchable liquid-liquid microextraction and assessment of green profile. **Chemosphere**, Istanbul, v. 235, p. 205–210, 1 nov. 2019.

KOWAL, S. et al. Determination of the polar pesticide degradation product N,N-dimethylsulfamide in aqueous matrices by UPLC-MS/MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Duisburg, v. 395, n. 6, p. 1787–1794, 21 nov. 2009.

LANDIM, A. P. M. et al. Sustentabilidade quanto às embalagens de alimentos no Brasil. **Polímeros**, Rio de Janeiro, v. 26, n. spe, p. 82–92, 2016.

LETCHER, T. M. **Plastic Waste and Recycling: Environmental Impact, Societal Issues, Prevention, and Solutions**, [s.l.], Elsevier, 2020.

LI, H. et al. Phthalate esters in bottled drinking water and their human exposure in Beijing, China. **Food Additives and Contaminants: Part B**, Beijing, v. 12, n. 1, p. 1–9, 2019.

LI, W.; DUAN, J. Detection of phthalates in water using ultra performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry MRM mode- 'ghost peaks' and measurement methodology. **Analytical Methods**, Xian, v. 3, n. 2, p. 314–321, 2011.

LIAN, L. et al. Dispersive solid-phase extraction of bisphenols migrated from plastic food packaging materials with cetyltrimethylammonium bromide-intercalated zinc

oxide. **Journal of Chromatography A**, Jilin, v. 1612, p. 460666, 8 fev. 2020.

LITTLE, J. N.; FALLICK, G. J. New considerations in detector-application relationships. **Journal of Chromatography A**, Milford, v. 112, n. C, p. 389–397, 1 jan. 1975.

LIU, X. et al. Determination of phthalate esters in environmental water by magnetic Zeolitic Imidazolate Framework-8 solid-phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, Qufu, v. 1409, p. 46–52, 28 ago. 2015.

LOCATELLI, M. et al. Analytical methods for the endocrine disruptor compounds determination in environmental water samples. **Journal of Chromatography A**, Chieti, v. 1434, p. 1–18, 19 fev. 2016.

LORENZ, J. G. et al. Multivariate optimization of the QuEChERS-GC-ECD method and pesticide investigation residues in apples, strawberries, and tomatoes produced in Brazilian South. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Florianópolis, v. 25, n. 9, p. 1583–1591, 1 set. 2014.

MANZO, V. et al. Rotating-disk sorptive extraction coupled to gas chromatography mass spectrometry for the determination of phthalates in bottled water. **Analytical Methods**, Santiago, p. 1–8, 2019.

MARTINS, G. L. **Determinação de Resíduos de Pesticidas em Solo de Lavoura de Arroz Irrigado Empregando QuEChERS modificado e LC-MS/MS**, 149 f. Dissertação (Mestrado em Química - Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

MOHAMMADNEZHAD, N. et al. Ionic liquid-bonded fused silica as a new solid-phase microextraction fiber for the liquid chromatographic determination of bisphenol A as an endocrine disruptor. **Journal of AOAC International**, Urmia, v. 100, n. 1, p. 218–223, 1 jan. 2017.

NOTARDONATO, I. et al. Phthalates and Bisphenol-A Determination and Release from Different Beverage Plastic Containers by Dispersive Liquid-Liquid Microextraction and GC-IT/MS Analysis. **Food Analytical Methods**, Campobasso, v. 12, n. 11, p. 2562–2571, 1 nov. 2019.

OGISO, H.; SUZUKI, T.; TAGUCHI, R. Development of a reverse-phase liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry method for lipidomics, improving detection of phosphatidic acid and phosphatidylserine. **Analytical Biochemistry**, Tokyo, v. 375, n. 1, p. 124–131, 1 abr. 2008.

OLIVEIRA, T. S. et al. Characterization of Pharmaceuticals and Personal Care products in hospital effluent and waste water influent/effluent by direct-injection LC-MS-MS. **Science of the Total Environment**, Golden, v. 518–519, p. 459–478, 5 jun. 2015.

ORSET, C.; BARRET, N.; LEMAIRE, A. How consumers of plastic water bottles are

responding to environmental policies? **Waste Management**, Thiverval-Grignon, v. 61, p. 13–27, 1 mar. 2017.

ORTEGA-ZAMORA, C. et al. Menthol-Based Deep Eutectic Solvent Dispersive Liquid-Liquid Microextraction: A Simple and Quick Approach for the Analysis of Phthalic Acid Esters from Water and Beverage Samples. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, [s.l.], v. 8, n. 23, p. 8783–8794, 2020.

OSTERTAG, F. et al. Development and validation of an RP-HPLC DAD method for the simultaneous quantification of minor and major whey proteins. **Food Chemistry**, Stuttgart, p. 128176, 28 set. 2020.

PACYGA, D. C.; SATHYANARAYANA, S.; STRAKOVSKY, R. S. Dietary Predictors of Phthalate and Bisphenol Exposures in Pregnant Women. **Advances in Nutrition**, Seattle, p. 1–13, 2019.

PEREIRA, V. et al. HPLC-DAD methodology for the quantification of organic acids, furans and polyphenols by direct injection of wine samples. **Journal of Separation Science**, Funchal, v. 33, n. 9, p. 1204–1215, 1 maio 2010.

PÉREZ, R. A. et al. Determination of endocrine-disrupting compounds in water samples by magnetic nanoparticle-assisted dispersive liquid–liquid microextraction combined with gas chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Madrid, v. 408, n. 28, p. 8013–8023, 2016.

PIRINGER, O. G.; BANER, A. L. (EDS.). **Plastic Packaging Materials for Food Barrier Function, Mass Transport**. Weinheim: Wiley & Sons, 2000.

PIRVU, F. et al. Environmental detection of brilliant blue, sunset yellow and tartrazine using direct injection HPLC-DAD technique. **Revista de Chimie**, Bucharest, v. 71, n. 6, p. 390–400, 2020.

PONTELLI, R. C. N.; NUNES, A. A.; OLIVEIRA, S. V. W. B. DE. Impacto na saúde humana de disruptores endócrinos presentes em corpos hídricos: existe associação com a obesidade? **Ciência & Saúde Coletiva**, Ribeirão Preto, v. 21, n. 3, p. 753–766, 2016.

PUBCHEM. **PubChem**. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em: 16 nov. 2020.

RADU, E. et al. Validation of a RP-HPLC-UV method for the determination of Bisphenol A at low levels in natural mineral water. **Revista de Chimie**, Bucharest, v. 67, n. 2, p. 236–240, 2016.

REEMTSMA, T.; ALDER, L.; BANASIAK, U. A multimethod for the determination of 150 pesticide metabolites in surface water and groundwater using direct injection liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Berlin, v. 1271, n. 1, p. 95–104, 4 jan. 2013.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química**

Nova, Campinas, v. 27, n. 5, p. 771–780, out. 2004.

RIPOLLÉS, C. et al. Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry for the residue determination of ethylenethiourea (ETU) and propylenethiourea (PTU) in water. **Journal of Chromatography A**, Castellón, v. 1243, p. 53–61, 22 jun. 2012.

ROBERTSON, G. L. **Food Packaging: Principles and Practice**. 3rd. ed. New York: Taylor & Francis, 2013.

ROWELL, C.; KUIPER, N.; PREUD'HOMME, H. Is container type the biggest predictor of trace element and BPA leaching from drinking water bottles? **Food Chemistry**, Doha, v. 202, p. 88–93, jul. 2016.

SALAZAR-BELTRÁN, D. et al. Determination of phthalates in bottled water by automated on-line solid phase extraction coupled to liquid chromatography with uv detection. **Talanta**, San Nicolás de los Garza, v. 168, p. 291–297, 1 jun. 2017.

SANTANA-MAYOR, Á. et al. Reduced graphene oxide-coated magnetic-nanoparticles as sorbent for the determination of phthalates in environmental samples by micro-dispersive solid-phase extraction followed by ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, San Cristóbal de La Laguna, v. 1565, p. 36–47, 31 ago. 2018.

SHAO, B. et al. Analysis of alkylphenol and bisphenol A in meat by accelerated solvent extraction and liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, Tainjin, v. 105, n. 3, p. 1236–1241, 1 jan. 2007.

SHARMA, S.; CHAUHAN, V. S. Toxins in food packaging materials: A cause of great concern. **International Journal of Home Science**, Kota, v. 280, n. 3, p. 280–282, 2019.

SILANO, V. et al. Draft update of the risk assessment of di-butylphthalate (DBP), butyl-benzyl-phthalate (BBP), bis(2-2 ethylhexyl)phthalate (DEHP), di-isononylphthalate (DINP) 3 and di-isodecylphthalate (DIDP) for use in food contact materials. **EFSA Journal**, [s./], v. 17, 2019.

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

SINGH, P.; WANI, A. A.; LANGOWSKI, H.-C. (EDS.). **Food Packaging Materials - Testing & Quality Assurance**, [s./], Taylor & Francis, 2017.

SODRÉ, F. F. et al. Occurrence of Emerging Contaminants in Brazilian Drinking Waters: A Sewage-To-Tap Issue. **Water, Air, & Soil Pollution**, Campinas, v. 206, n. 1–4, p. 57–67, 2 fev. 2010.

SOHEILIFAR, S. et al. Application of molecularly imprinted polymer in solid-phase microextraction coupled with HPLC-UV for analysis of dibutyl phthalate in bottled water and soft drink samples. **Journal of Liquid Chromatography and Related**

Technologies, Tehran, v. 41, n. 9, p. 552–560, 28 maio 2018.

SOUZA, R. R. et al. DETERMINAÇÃO DE PLASTIFICANTES EM ÁGUA POTÁVEL UTILIZANDO CROMATOGRAFIA GASOSA E ESPECTROMETRIA DE MASSAS. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, n. 7, p. 1453–1458, 2012.

STAPLES, C. A. et al. The environmental fate of phthalate esters: A literature review. **Chemosphere**, Fairfax, v. 35, n. 4, p. 667–749, ago. 1997.

STRINGER, R. G. et al. **Determination of the Composition and Quantity of Phthalate Ester Additives in PVC Children's Toys**. Disponível em: http://www.greenpeace.to/greenpeace/wp-content/uploads/2011/05/toy_final_1997.pdf. Acesso em: 7 jul. 2019.

SURHIO, M. A. et al. Leaching of phthalate esters from different drinking stuffs and their subsequent biodegradation. **Environmental Science and Pollution Research**, Jamshoro, v. 24, n. 22, p. 18663–18671, 1 ago. 2017.

UNITED STATES GEOLOGICAL SURVEY - USGS. **Contaminants of Emerging Concern in the Environment**. Disponível em: <https://toxics.usgs.gov/investigations/cec/index.php>. Acesso em: 2 jul. 2019.

VIEIRA, J. C. et al. HPLC–DAD Method for Simultaneous Determination of Dipyrone (Metamizole) and Caffeine in Tablets and Identification of Major Degradation Product by Direct Infusion ESI–MS. **Chromatographia**, Campo Grande, v. 80, n. 3, p. 489–495, 1 mar. 2017.

VOSOUGH, M. et al. Direct analysis of six antibiotics in wastewater samples using rapid high-performance liquid chromatography coupled with diode array detector: A chemometric study towards green analytical chemistry. **Talanta**, Tehran, v. 135, p. 7–17, 1 abr. 2015.

WANG, F. et al. Simultaneous determination of 15 phthalate esters in commercial beverages using dispersive liquid–liquid microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry. **Analytical Methods**, Guangzhou, v. 9, n. 12, p. 1912–1919, 2017.

WANG, H. et al. Bisphenol analogues in Chinese bottled water: Quantification and potential risk analysis. **Science of the Total Environment**, Guangdong, v. 713, p. 136583, 15 abr. 2020.

WEE, S. Y. et al. Occurrence and risk assessment of multiclass endocrine disrupting compounds in an urban tropical river and a proposed risk management and monitoring framework. **Science of The Total Environment**, Serdang, v. 671, p. 431–442, jun. 2019.

XIAO, C. et al. Hazards of bisphenol A (BPA) exposure: A systematic review of plant toxicology studies. **Journal of Hazardous Materials**, Wuxi, v. 384, p. 121488, 15 fev. 2020.

YIN, S. et al. Determination of 11 phthalate esters in beverages by magnetic solid-phase extraction combined with high-performance liquid chromatography. **Journal of AOAC International**, Chengdu, v. 102, n. 5, p. 1624–1631, 2019.

ZAKI, G.; SHOEIB, T. Concentrations of several phthalates contaminants in Egyptian bottled water: Effects of storage conditions and estimate of human exposure. **Science of the Total Environment**, New Cairo, v. 618, p. 142–150, mar. 2018.

ZHANG, H.; CHEN, X.; JIANG, X. Determination of phthalate esters in water samples by ionic liquid cold-induced aggregation dispersive liquid-liquid microextraction coupled with high-performance liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, Changsha, v. 689, n. 1, p. 137–142, 9 mar. 2011.