



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

**MESTRADO EM TECNOLOGIAS LABORATORIAIS EM
CIÊNCIAS FORENSES**

**DETERMINAÇÃO DE BENZOFENONAS EM MATRIZES
AMBIENTAIS POR MICROEXTRAÇÃO ADSORTIVA EM BARRA
SEGUIDA DE ANÁLISE POR MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS**

Trabalho submetido por
Matilde José de Carvalho Lucas Oliveira Passos
para a obtenção do grau de Mestre em Tecnologias Laboratoriais em
Ciências Forenses

outubro de 2022



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

**MESTRADO EM TECNOLOGIAS LABORATORIAIS EM
CIÊNCIAS FORENSES**

**DETERMINAÇÃO DE BENZOFENONAS EM MATRIZES
AMBIENTAIS POR MICROEXTRAÇÃO ADSORTIVA EM BARRA
SEGUIDA DE ANÁLISE POR MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS**

Trabalho submetido por
Matilde José de Carvalho Lucas Oliveira Passos
para a obtenção do grau de Mestre em Tecnologias Laboratoriais em
Ciências Forenses

Trabalho orientado por
Doutor Nuno da Rosa Neng

e coorientado por
Prof. Doutora Maria Catarina Marques Dias de Almeida

outubro de 2022

Dedicatória

Às minhas Tias,
por todo o apoio que me deram.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Doutor Nuno da Rosa Neng por toda a paciência para me guiar por esta etapa, por tudo o que me ensinou nestes meses e por ser incansável a responder as minhas dúvidas.

À minha coorientadora, Prof. Doutora Maria Catarina Almeida Marques Dias de Almeida pela sua orientação, disponibilidade e apoio no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Doutor José Manuel Nogueira pela sua disponibilidade e de me ter acolhido no seu laboratório de Cromatografia e Eletroforese Capilar da FCUL.

Ao Prof. Doutor Alexandre Quintas, coordenador do curso, pelos conhecimentos transmitido ao longo destes anos.

A todos os docentes deste mestrado por tudo o que me ensinaram e por me ajudarem a chegar a esta fase, em especial ao Prof. Doutor Samir Ahmad que na realização desta dissertação foi uma ajuda preciosa.

Aos meus colegas de laboratório da FCUL, em especial à Oriana Gonçalves por toda a ajuda e paciência, sem nunca esquecer as excelentes conversas e almoços durante estes meses.

Aos meus colegas que me acompanharam neste percurso desde a licenciatura, tanto nos bons momentos como nos mais difíceis, e se terem tornado amigos incríveis.

Aos meus amigos, em especial ao Gonçalo Sirgado e ao Hugo Pereira por estarem sempre presentes ao longo de todos estes anos.

Ao meu namorado Gonçalo Neves por ter sido o meu maior apoio e saber sempre as palavras certas quando era mais necessário.

E por último, à minha família por todo o apoio, especialmente à minha tia Cristina e à minha tia Teresa, por tudo o que fizeram por mim e que sem elas este trabalho não seria possível.

Certificado de Originalidade

“Certifico que sou responsável pelo trabalho submetido neste relatório e que o trabalho é original, não sendo copiado ou plagiado de outra fonte, excetuando o especificado nas referências. Adicionalmente, declaro que o trabalho em si contido não foi submetido anteriormente para qualquer outro propósito.”

28 outubro de 2022

Matilde José de Carvalho e suas Oliveiras Barros

Comunicações

Comunicações Orais

- Passos, Matilde; Almeida, Catarina; Ahmad, Samir; Neng, Nuno. “*Determination of Benzophenones in Environmental Waters by Bar Adsorptive Microextraction*” apresentado nas II Jornadas Científicas Universitárias e Politécnicas Egas Moniz. Monte da Caparica, Portugal. 29 e 30 de abril de 2022.
- Passos, Matilde; Almeida, Catarina; Ahmad, Samir; Neng, Nuno. “*Bar Adsorptive Microextraction (BA μ E) Applied to the Determination of Benzophenones in Water Matrices*” apresentado no *CQE Days 2022*. Lisboa, Portugal. 26 e 27 de maio de 2022.

Comunicações em Poster

- Passos, Matilde; Almeida, Catarina; Ahmad, Samir; Neng, Nuno. “*Application of Bar Adsorptive Microextraction for the Determination of Benzophenones in Water Matrices*” apresentado no *VIII International Congress on Forensic Sciences and Criminal Behavior*. Monte da Caparica, Portugal. 1 e 2 de julho de 2022. Prémio de 3º lugar de melhor poster científico.
- Passos, Matilde; Almeida, Catarina; Ahmad, Samir; Neng, Nuno. “*Detection of Benzophenones in Environmental Water Matrices by Bar Adsorptive Microextraction*” apresentado no *5th Meeting of CQUL - "Forging bonds"*. Lisboa, Portugal. 12 e 13 de julho de 2022.

Resumo

Os contaminantes ambientais emergentes são uma ameaça para o ecossistema e a sua monitorização é crucial. O desenvolvimento científico representa um grande passo para a deteção de substâncias perigosas para o ambiente, no entanto é necessário que as técnicas apresentem uma elevada sensibilidade e que estejam de acordo com os princípios da Química Analítica Verde.

A presente dissertação consistiu no desenvolvimento de uma metodologia analítica com bom desempenho, mais barata e fácil de manipular e que fosse amiga do ambiente. Para o desenvolvimento da metodologia utilizou-se a microextração adsortiva em barra (BA μ E) seguida de análise por cromatografia líquida de alta eficiência deteção por rede de díodos (HPLC-DAD) para a determinação de 8 benzofenonas (benzofenona (BPH), 2,4-dihidroxibenzofenona (BP-1), 2,2',4,4'-tetrahidroxibenzofenona (BP-2), 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona (BP-3), 5-cloro-2-hidroxibenzofenona (BP-7), 2,2'-dihidroxi-4-metoxibenzofenona (BP-8), 3-hidroxibenzofenona (3HBP) e 4-hidroxibenzofenona (4HBP)) em matrizes ambientais e produtos cosméticos.

A metodologia otimizada permitiu obter limites de deteção entre 0,10 e 1,00 $\mu\text{g L}^{-1}$ e de quantificação entre 0,33 e 3,33 $\mu\text{g L}^{-1}$, boa linearidade com coeficiente de determinação superior a 0,99 e recuperações compreendidas entre 50 e 85 %.

A aplicação da metodologia em amostras reais permitiu determinar três benzofenonas (BPH, 3HBP e 4HBP) em diversas matrizes ambientais. Foi possível quantificar a BPH ($0,68 \pm 0,73$ a $2,34 \pm 1,14 \mu\text{g L}^{-1}$) em água do mar, da praia fluvial, da albufeira artificial, da barragem, do estuário e residual. A 4HBP ($0,87 \pm 2,77$ a $2,52 \pm 2,36 \mu\text{g L}^{-1}$) em água da praia fluvial, da albufeira artificial e residual, enquanto a presença da 3HBP foi apenas detetada em água residual ($7,85 \pm 2,42 \mu\text{g L}^{-1}$). Confirmou-se também a presença da BP-3 em dois cosméticos diferentes ($72,33 \pm 6,02$ e $18,13 \pm 1,46 \mu\text{g mg}^{-1}$).

A metodologia demonstrou ser uma alternativa mais ecológica, fácil e simples de manipular, associado a um baixo custo.

Palavras-chave: Contaminantes emergentes; Benzofenonas; Matrizes ambientais; BA μ E; HPLC-DAD.

Determinação de benzofenonas em matrizes ambientais por microextração adsortiva em barra seguida de análise por métodos cromatográficos

Abstract

Emerging environmental contaminants are a threat to the ecosystem and their monitoring is crucial. Scientific development represents a big step towards the detection of hazardous substances to the environment, however it is necessary that the techniques have a high sensitivity and that they are in accordance with the principles of Green Analytical Chemistry.

The present dissertation consisted in the development of an analytical methodology with good performance, cheaper and easier to handle and that was environmentally friendly. For the development of the methodology, bar adsorptive microextraction (BA μ E) was used followed by analysis by high performance liquid chromatography diode-array detector (HPLC-DAD) for the determination of 8 benzophenones (benzophenone (BPH), 2,4-dihydroxybenzophenone (BP-1), 2,2',4,4'-tetrahydroxybenzophenone (BP-2), 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone (BP-3), 5-chloro-2-hydroxybenzophenone (BP-7), 2,2'-dihydroxy-4-methoxybenzophenone (BP-8), 3-hydroxybenzophenone (3HBP) and 4-hydroxybenzophenone (4HBP)) in environmental matrices and cosmetic products.

The optimized methodology allowed to obtain detection limits between 0.10 and 1.00 $\mu\text{g L}^{-1}$ and quantification between 0.33 and 3.33 $\mu\text{g L}^{-1}$, good linearity with a coefficient of determination above 0.99 and recoveries between 50 and 85%.

The application of the methodology in real samples allowed the determination of three benzophenones (BPH, 3HBP and 4HBP) in different environmental matrices. It was possible to quantify BPH (0.68 ± 0.73 to $2.34 \pm 1.14 \mu\text{g L}^{-1}$) in sea water, river beach, artificial reservoir, dam, estuary, and residual water. 4HBP (0.87 ± 2.77 to $2.52 \pm 2.36 \mu\text{g L}^{-1}$) in water from the river beach, artificial reservoirs, and residual, while the presence of 3HBP was only detected in residual water ($7.85 \pm 2.42 \mu\text{g L}^{-1}$). The presence of BP-3 was also confirmed in two different cosmetics (72.33 ± 6.02 and $18.13 \pm 1.46 \mu\text{g mg}^{-1}$).

The methodology proved to be a more ecological alternative, easy and simple to handle, associated with a low cost.

Keywords: Emerging contaminants; Benzophenones; Environmental matrices; BA μ E; HPLC-DAD.

Determinação de benzofenonas em matrizes ambientais por microextração adsortiva em barra seguida de análise por métodos cromatográficos

Índice

<i>Resumo</i>	1
<i>Abstract</i>	3
<i>Índice de Figuras</i>	7
<i>Índice de Tabelas</i>	9
<i>Lista de Abreviaturas, acrónimos e símbolos</i>	11
<i>1. Introdução</i>	15
<i>1.1. Ambiente e poluição</i>	15
<i>1.1.1. Contaminantes ambientais emergentes</i>	16
<i>1.1.2. Benzofenonas</i>	17
<i>1.2. Metodologias analíticas para análise de contaminantes ambientais</i>	21
<i>1.3. Técnicas de extração</i>	24
<i>1.3.1. Microextração sortiva</i>	25
<i>1.3.2. Microextração adsortiva em barra</i>	26
<i>1.4. Técnicas Cromatográficas</i>	29
<i>1.4.1. Cromatografia líquida de alta eficiência</i>	31
<i>1.5. Objetivo</i>	33
<i>2. Materiais e Métodos</i>	35
<i>2.1. Reagentes, materiais e amostras</i>	35
<i>2.2. Instrumentação e sistema cromatográfico</i>	37
<i>2.3. Procedimento Experimental</i>	38
<i>2.3.1. Condições instrumentais</i>	38
<i>2.3.2. Preparação das barras de BAuE</i>	38
<i>2.3.3. Ensaio de otimização</i>	40
<i>2.3.4. Ensaio de validação</i>	42
<i>2.3.5. Ensaio de aplicação a amostras reais</i>	42
<i>3. Resultados e Discussão</i>	45

<i>3.1. Calibração instrumental HPLC-DAD.....</i>	<i>45</i>
<i>3.2. Otimização BAμE-μLD.....</i>	<i>47</i>
<i>3.2.1. Seleção do sorvente para BAμE.....</i>	<i>47</i>
<i>3.2.2. Otimização da dessorção líquida</i>	<i>49</i>
<i>3.2.2.1. Efeito do tipo de solvente</i>	<i>49</i>
<i>3.2.2.2. Efeito do tempo de retroextração</i>	<i>51</i>
<i>3.2.3. Otimização da extração</i>	<i>52</i>
<i>3.2.3.1. Efeito do tempo de equilíbrio.....</i>	<i>52</i>
<i>3.2.3.2. Efeito da velocidade de agitação</i>	<i>53</i>
<i>3.2.4. Otimização dos efeitos na matriz.....</i>	<i>54</i>
<i>3.2.4.1. Efeito de pH da matriz</i>	<i>55</i>
<i>3.2.4.2. Efeito da força iônica</i>	<i>56</i>
<i>3.2.4.3. Efeito do modificador orgânico</i>	<i>57</i>
<i>3.3. Validação do método BAμE-μLD/HPLC-DAD</i>	<i>59</i>
<i>3.4. Aplicação do método em amostras reais.....</i>	<i>62</i>
<i>4. Conclusões e Perspetivas futuras.....</i>	<i>65</i>
<i>5. Referências bibliográficas.....</i>	<i>67</i>

Anexos

Índice de Figuras

Figura 1. Representação esquemática do ciclo urbano da água. Adaptado de EPAL (2022).	16
Figura 2. Esquema ilustrativo para a entrada de filtros UV no ambiente. As linhas a tracejado representam a entrada indireta no ambiente. Adaptado de Cadena-Aizaga et al. (2022).	19
Figura 3. Representação esquemática da análise por BA μ E.	27
Figura 4. Estrutura química dos monómeros dos polímeros estudados.	28
Figura 5. Ilustração do tempo morto (t_M), tempo de retenção ajustado (t'_R) e tempo de retenção (t_R) num cromatograma típico. Adaptado de Skoog et al. (2014).	30
Figura 6. Representação esquemática de um sistema de HPLC simplificado.	32
Figura 7. Esquema da preparação dos dispositivos BA μ E (A) e o seu condicionamento (B).	39
Figura 8. Esquema da metodologia de análise BA μ E- μ LD/HPLC-DAD.	41
Figura 9. Cromatograma obtido através da análise por HPLC-DAD sob condições instrumentais otimizadas da mistura de benzofenonas em estudo, numa concentração de 10 mg L ⁻¹ (legenda: a- BP-2; b- 4HBP; c- 3HBP; d- BP-1; e- BP-8; f- BPH; g- BP-3; h- BP-7).	45
Figura 10. Efeito da seletividade dos ACs e dos polímeros na recuperação de benzofenonas por BA μ E- μ LD/HPLC-DAD. Condições: microextração de 16 h a 990 rpm; retroextração de 60 minutos em ACN.	48
Figura 11. Efeito do tipo de solvente de retroextração na recuperação de benzofenonas por BA μ E- μ LD/HPLC-DAD. Condições: microextração de 16 h a 990 rpm; retroextração de 60 minutos.	50
Figura 12. Efeito do tempo de retroextração na recuperação de benzofenonas por BA μ E- μ LD/HPLC-DAD. Condições: microextração de 16 h a 990 rpm; retroextração em ACN.	51
Figura 13. Efeito do tempo de equilíbrio da microextração na recuperação de benzofenonas por BA μ E- μ LD/HPLC-DAD. Condições: microextração a 990 rpm; retroextração de 60 minutos em ACN.	53
Figura 14. Efeito da velocidade de agitação da microextração na recuperação de benzofenonas por BA μ E- μ LD/HPLC-DAD. Condições: microextração de 16 h; retroextração de 60 minutos em ACN.	54

Figura 15. Efeito do pH da matriz na recuperação de benzofenonas por BA μ E- μ LD/HPLC-DAD. Condições: microextração de 16 h a 700 rpm; retroextração de 60 minutos em ACN. 55

Figura 16. Efeito da força iônica na recuperação de benzofenonas por BA μ E- μ LD/HPLC-DAD. Condições: microextração de 16 h a 700 rpm; retroextração de 60 minutos em ACN. 57

Figura 17. Efeito do modificador orgânico na recuperação de benzofenonas por BA μ E- μ LD/HPLC-DAD. Condições: microextração de 16 h a 700 rpm; retroextração de 60 minutos em ACN. 58

Figura 18. Cromatograma obtido por BA μ E(S-X)- μ LD/HPLC-DAD em água residual não fortificada, sob condições experimentais otimizadas (legenda: b- 4HBP; c- 3HBP; f- BPH). 62

Figura 19. Cromatogramas obtidos por BA μ E(S-X)- μ LD/HPLC-DAD em amostras de cosméticos não fortificadas, sob condições experimentais otimizadas (legenda: g- BP-3). 63

Índice de Tabelas

Tabela 1. Estruturas química, massa molecular, pK_a e $\text{Log } K_{o/w}$ das benzofenonas em estudo. Valores de pK_a e de $\text{Log } K_{o/w}$ obtidos de https://chemaxon.com/calculators-and-predictors	18
Tabela 2. Metodologias de análise de benzofenonas em matrizes ambientais.	23
Tabela 3. Condições experimentais utilizadas para análise de benzofenonas por HPLC-DAD.	37
Tabela 4. Tempos de retenção das benzofenonas em estudo.	38
Tabela 5. LOD e LOQ obtidos para a calibração instrumental do HPLC-DAD.	46
Tabela 6. Parâmetros estudados para determinar a linearidade para a calibração instrumental do HPLC-DAD.	46
Tabela 7. Parâmetros da BA μ E- μ LD/HPLC-DAD otimizados.	59
Tabela 8. LOD e LOQ obtidos para a BA μ E- μ LD/HPLC-DAD.	59
Tabela 9. Parâmetros estudados para determinar a linearidade.	60
Tabela 10. Valores correspondentes ao teste <i>lack-of-fit</i> , com valores do F_{tab} e do F_{cal} . .	61
Tabela 11. Concentrações das benzofenonas determinadas por BA μ E(S-X)- μ LD/HPLC-DAD.	64

Determinação de benzofenonas em matrizes ambientais por microextração adsortiva em barra seguida de análise por métodos cromatográficos

Lista de Abreviaturas, acrónimos e símbolos

3HBP	3-Hidroxibenzofenona
4HBP	4-Hidroxibenzofenona
AC	Carvão Ativado (do inglês <i>Activated Carbon</i>)
ACN	Acetonitrilo
BA μ E	Microextração Adsorptiva em Barra (do inglês <i>Bar Adsorptive Microextraction</i>)
BPH	Benzofenona
BP-1	2,4-Dihidroxibenzofenona
BP-2	2,2',4,4'-Tetrahidroxibenzofenona
BP-3	2-Hidroxi-4-metoxibenzofenona
BP-7	5-Cloro-2-hidroxibenzofenona
BP-8	2,2'-Dihidroxi-4-metoxibenzofenona
DAD	Detetor por Rede de Díodos (do inglês <i>Diode-Array Detector</i>)
DVB	Divinilbenzeno
ETAR	Estação de Tratamento de Águas Residuais
GAC	Química Analítica Verde (do inglês <i>Green Analytical Chemistry</i>)
GC	Cromatografia em Fase Gasosa (do inglês <i>Gas Chromatography</i>)
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
LC	Cromatografia em Fase Líquida (do inglês <i>Liquid Chromatography</i>)
LD	Dessorção Líquida (do inglês <i>Liquid Desorption</i>)
LLE	Extração Líquido-Líquido (do inglês <i>Liquid-Liquid Extraction</i>)
LOD	Limite de Deteção (do inglês <i>Limit of Detection</i>)
LOQ	Limite de Quantificação (do inglês <i>Limit of Quantification</i>)
MS	Espetrometria de Massa (do inglês <i>Mass Spectrometry</i>)
MS/MS	Espetrometria de Massa em Tandem (do inglês <i>Tandem Mass Spectrometry</i>)
OVAT	Estratégia de Otimização Univariante (do inglês <i>One Variable At A Time</i>)
PDMS	Polidimetilsiloxano
pH _{PZC}	pH do Ponto de Carga Zero

PPCPs	Produtos Farmacêuticos de Higiene e Cuidado Pessoal (do inglês <i>Pharmaceutical and Personal Care Products</i>)
RSD	Desvio Padrão Relativo (do inglês <i>Relative Standard Deviation</i>)
S/N	Razão Sinal/Ruído (do inglês <i>Signal-to-Noise</i>)
SAM	Método da Adição de Padrão (do inglês <i>Standard Addition Method</i>)
SBSE	Microextração Sortiva em Barra de Agitação (do inglês <i>Stir Bar Sorptive Extraction</i>)
SPE	Extração em Fase Sólida (do inglês <i>Solid-Phase Extraction</i>)
SPME	Microextração em Fase Sólida (do inglês <i>Solid-Phase Microextraction</i>)
UE	União Europeia
UHPLC	Cromatografia em Fase Líquida de Ultra Alta Eficiência (do inglês <i>Ultra High Performance Liquid Chromatography</i>).
UPLC-Q-ToF-MS	Cromatografia em Fase Líquida de Ultra Alta Eficiência acoplado a Espectrometria de Massa por Tempo de Voo com Quadrupolo (do inglês <i>Ultra-Performance Liquid Chromatography coupled with Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry</i>)
ToF	Tempo de Voo (do inglês <i>Time-of-Flight</i>)
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-Visível
μ LD	Microdessorção Líquida (do inglês <i>Microliquid Desorption</i>)
α	Seletividade
λ	Comprimento de onda
σ	Desvio padrão
Σ	Somatório
\bar{x}	Média
c_M	Fase móvel
c_S	Fase estacionária
K	Coefficiente de distribuição
k'	Fator de capacidade
N	Número de pratos teóricos
n	Número de replicados

$K_{O/W}$	Coeficiente de distribuição octanol-água
pH	Simétrico do logaritmo decimal da concentração em hidrogeniões
pKa	Simétrico do logaritmo decimal da constante de acidez
R_S	Resolução
r^2	Coeficiente de determinação
t_M	Tempo morto
t_R	Tempo de retenção
t'_R	Tempo de retenção ajustado
W	Largura da base de um pico simétrico
\pm	Mais ou menos
%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
g	Gramma
h	Hora
L	Litro
Log	Logaritmo
m	Metro
mAU	Miliunidade de absorvância (do inglês <i>milli-Absorbance Unit</i>)
min	Minuto
mol	Mole
p/p	Peso por peso
p/v	Peso por volume
rpm	Rotações por minuto
v/v	Volume por volume

1. Introdução

Os temas relacionados com a água têm vindo a ganhar destaque nas agendas políticas europeias e internacionais, sendo identificada em diversos estudos como a principal preocupação ambiental. Existem diferentes leis e diretivas para a gestão das águas de forma a proteger e melhorar o estado dos ecossistemas. A problemática da água remete essencialmente para três dimensões, passando pela qualidade da água para consumo humano, pela poluição dos ecossistemas marinhos e pela identificação de quais as principais fontes poluidoras. Existe a necessidade de usar técnicas de amostragem e análise apropriadas para avaliar as concentrações de contaminantes ambientais. A Diretiva 2008/105/CE, de 16 de dezembro estabelece padrões de qualidade ambiental muito restritivos para algumas substâncias (Parlamento Europeu e o Conselho da União Europeia, 2013; Pintado-Herrera et al., 2020).

Um dos objetivos da Lei nº 58/2005, de 29 de dezembro é assegurar a redução da poluição das águas e evitar o agravamento da poluição através de medidas específicas para a redução e eliminação das descargas, das emissões e perdas de substâncias, juntamente com a Diretiva 2008/105/CE, de 16 de dezembro que remete para as normas de qualidade ambiental no domínio da política da água (Assembleia da República, 2005; Parlamento Europeu e o Conselho da União Europeia, 2013). A Decisão de Execução (UE) 2022/1307, de 22 de julho estabelece uma lista de vigilância das substâncias a monitorizar a nível da União Europeia (UE) no domínio da política da água (Comissão Europeia, 2022).

No entanto, apesar da vigilância de substâncias que podem representar um risco significativo para o meio aquático, é necessário prestar especial atenção aos poluentes emergentes, utilizados e descarregados para o meio aquático que ainda não são monitorizados.

1.1. Ambiente e poluição

As principais fontes de entrada de produtos químicos no ambiente são as estações de tratamento de águas residuais (ETARs), bem como outras fontes industriais, urbanas e agrícolas, como deposição atmosféricas, escoamentos da agricultura, atividades industriais, transporte marítimo, instalações agrícolas e atividades recreativas (como exemplificada na figura 1).

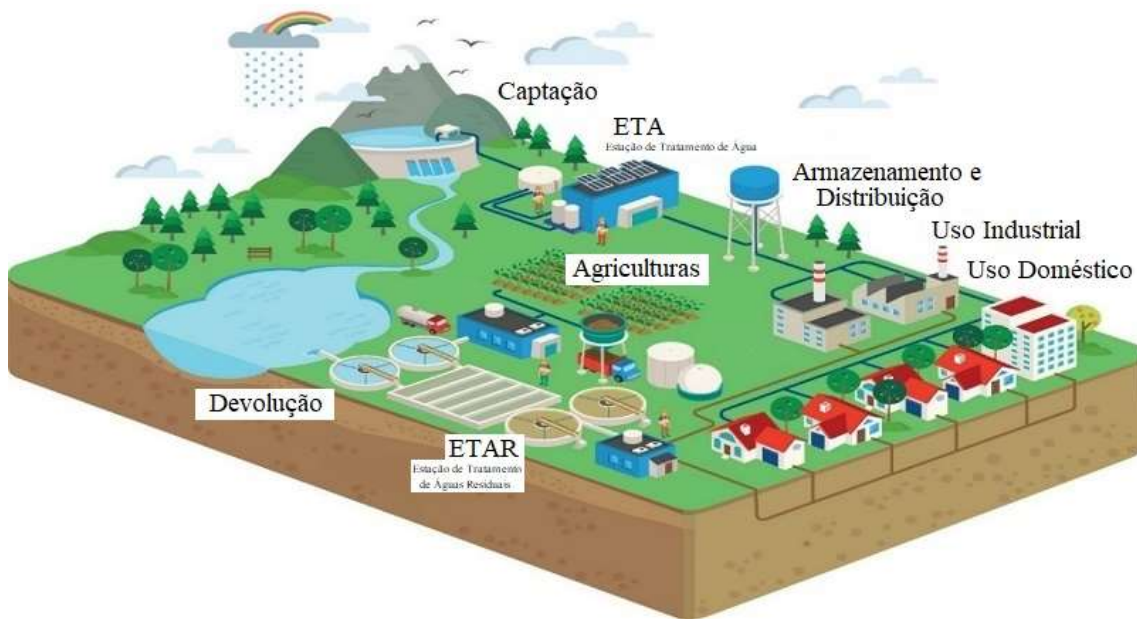


Figura 1. Representação esquemática do ciclo urbano da água. Adaptado de EPAL (2022).

O destino e transporte de algumas dessas substâncias foram estudados em detalhe e são agora regulamentadas com base na sua toxicidade bem como outros impactos ambientais negativos (Pintado-Herrera et al., 2020).

A Diretiva 2008/105/CE, de 16 de dezembro (Parlamento Europeu e o Conselho da União Europeia, 2013) refere ainda que:

“A poluição química das águas de superfície representa uma ameaça para o ambiente aquático, com efeitos como toxicidade aguda e crónica para os organismos aquáticos, acumulação no ecossistema e perdas de habitats e de biodiversidade, além de constituir uma ameaça para a saúde humana.”

1.1.1. Contaminantes ambientais emergentes

Existem estudos constantes a substâncias que podem não só representar ameaças ambientais, mas também perturbar os sistemas endócrino e reprodutivo, alterar o comportamento animal e danificar os tecidos tendo efeitos agudos ou crónicos na vida selvagem e na saúde humana. A ocorrência dessas substâncias no meio ambiente é geralmente observada a um nível vestigial, variando de $\mu\text{g L}^{-1}$ a ng L^{-1} . A monitorização da qualidade da água é crucial para obter um melhor conhecimento do estado do ecossistema. Além disso, e devido aos recentes avanços nas técnicas analíticas, novas

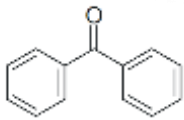
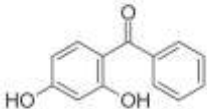
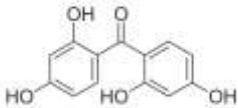
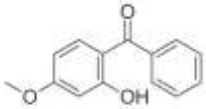
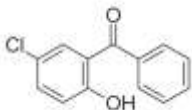
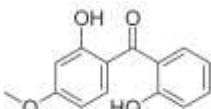
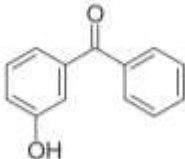
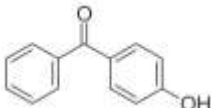
substâncias são relatadas no ambiente todos os anos, sendo conhecidas como contaminantes ambientais emergentes. Estes contaminantes incluem vários tipos de produtos químicos, como por exemplo produtos farmacêuticos de higiene e cuidado pessoal (PPCPs, do inglês *Pharmaceutical and Personal Care Products*). Esses compostos incluem produtos farmacêuticos não sujeitos a receita médica e sujeitos a receita médica para uso humano, veterinário e agrícola, assim como produtos de limpeza, sabonete, dentífricos e cosméticos, que podem incluir o uso de filtros ultravioletas (UV) (Çabuk & Kavaracı, 2020; Lee et al., 2020; Pintado-Herrera et al., 2020; Richardson & Ternes, 2022). A crescente produção e uso de filtros UV orgânicos tem gerado um novo tipo de poluentes ambientais (Seoane et al., 2021). A UE permite o uso de 27 filtros UV e estabeleceu níveis máximos permitidos em produtos cosméticos (Cadena-Aizaga et al., 2020; Richardson & Ternes, 2022).

1.1.2. Benzofenonas

As benzofenonas são um grupo de substâncias identificadas como contaminantes ambientais emergentes (Downs et al., 2016). Estas moléculas são filtros UV orgânicos bastante utilizadas em produtos cosméticos, como por exemplo em protetores solares, perfumes e cremes. Uma das principais características destas moléculas é a sua capacidade de absorção de radiação UV protegendo a pele e, evitando assim, problemas graves tais como o cancro de pele. Embora o principal uso das benzofenonas esteja associado aos PPCPs, esses compostos também estão presentes nas industriais, como em plásticos, embalagens de alimentos, tintas, têxteis, detergentes e produtos de desinfecção. São utilizadas para manter a estabilidade dos produtos de modo a evitar a fotodegradação de polímeros e pigmentos (Cadena-Aizaga et al., 2020; O'Malley et al., 2020; Richardson & Ternes, 2022).

As benzofenonas apresentam estruturas químicas lipofílicas compostas por uma cetona e dois anéis aromáticos onde podem ocorrer diversas substituições. Além disso, algumas das benzofenonas apresentam características relacionadas com poluentes orgânicos, como o coeficiente de distribuição octanol-água ($\log K_{O/W} > 3$) e estabilidade contra degradação biótica. (Cadena-Aizaga et al., 2022; Chávez-Moreno et al., 2018; Guo et al., 2020). A tabela 1 apresenta as estruturas química, massa molecular, pK_a e $\log K_{O/W}$ das benzofenonas estudadas no presente trabalho.

Tabela 1. Estruturas química, massa molecular, pK_a e $\text{Log } K_{o/w}$ das benzofenonas em estudo. Valores de pK_a e de $\text{Log } K_{o/w}$ obtidos de <https://chemaxon.com/calculators-and-predictors>.

Substância	Estrutura Química	Massa Molecular (g/mol)	pK_a	$\text{Log } K_{o/w}$
Benzofenona (BPH)		182,22	Não ionizável	3,27
2,4-dihidroxibenzofenona (BP-1)		214,22	7,75 / 9,06	3,35
2,2',4,4'-tetraidroxibenzofenona (BP-2)		246,22	7,71 / 8,00 / 8,81 / 9,40	3,43
2-hidroxi-4-metoxibenzofenona (BP-3)		228,24	8,07	3,38
5-cloro-2-hidroxibenzofenona (BP-7)		232,66	6,63	4,15
2,2'-dihidroxi-4-metoxibenzofenona (BP-8)		244,24	6,78 / 7,43	3,75
3-hidroxibenzofenona (3HBP)		198,22	8,88	2,98
4-hidroxibenzofenona (4HBP)		198,22	7,85	2,98

Devido a sua utilização constante, os filtros UV têm vindo a ser encontrados em diversas matrizes ambientais (Rodríguez-Escales & Sanchez-Vila, 2020), incluindo rios, lagos, água do mar, águas de saneamento básico, e ainda em sedimentos e animais (González-Rubio et al., 2020; Huang et al. 2021; O'Malley et al., 2021). As

benzofenonas entram no ambiente através de vias diretas, como por exemplo, lavadas da pele durante atividades recreativa, e indiretas, como por exemplo através de descargas de águas residuais (por absorção no corpo e posterior excreção), como pode ser observado na figura 2 (Huang et al., 2021; Labille et al., 2020; O'Malley et al., 2020).

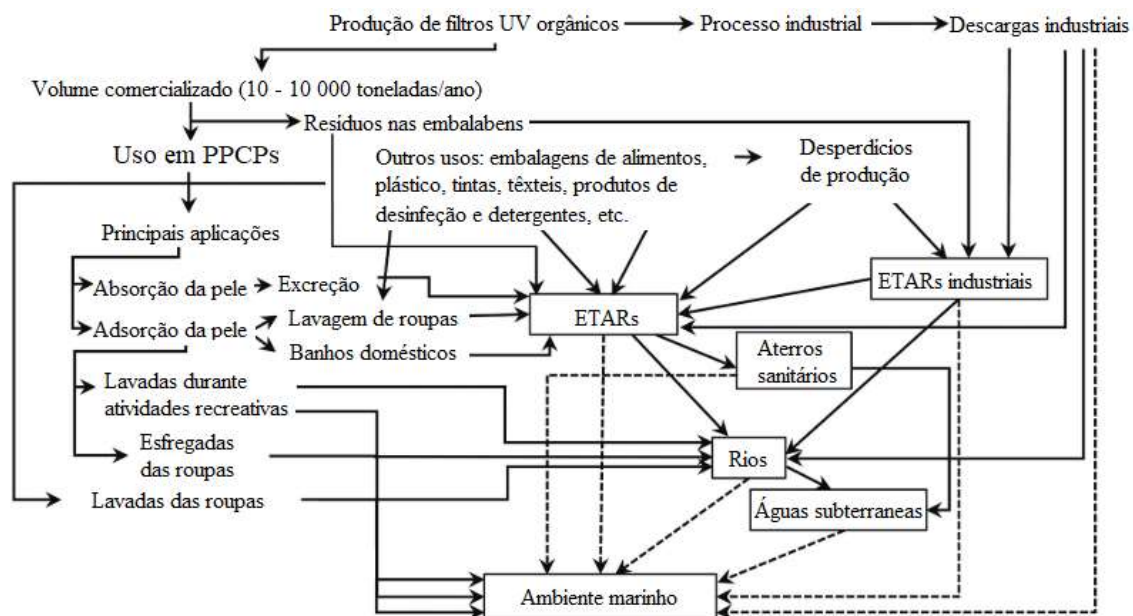


Figura 2. Esquema ilustrativo para a entrada de filtros UV no ambiente. As linhas a tracejado representam a entrada indireta no ambiente. Adaptado de Cadena-Aizaga et al. (2022).

A presença de benzofenonas no meio ambiente tem vindo a gerar alguma preocupação devido à toxicidade destas substâncias para o ecossistema e para o ser humano. A exposição a estes compostos tem vindo a demonstrar efeitos adversos, como a toxicidade em corais, causando branqueamento e morte dos mesmos, e exibindo propriedades de desregulação endócrina em peixes, moluscos e roedores associados a efeitos adversos na fecundidade e reprodução (Comissão Europeia, 2018; Downs et al., 2016; Labille et al., 2020; O'Malley et al., 2021; Richardson & Ternes, 2022; Vandergrift et al., 2022). Por outro lado, estes compostos estão também associados a efeitos adversos à saúde em humanos, como obesidade, doenças relacionadas com a tiroide, diabetes e disfunção reprodutiva, como endometriose (Downs et al., 2016; González-Rubio et al., 2020; Wang & Kannan, 2017).

As concentrações relatadas de benzofenonas em águas ambientais são geralmente baixas. No entanto, em ambientes de águas recreativas e águas residuais, as

concentrações podem atingir de ng L^{-1} até mg L^{-1} (Cadena-Aizaga et al., 2022, 2020; Downs et al., 2016; Seoane et al., 2021).

Em estudos realizados em matrizes ambientais, em Espanha, foi registado $0,692 \mu\text{g L}^{-1}$ em amostras de água do mar e $0,230 \mu\text{g L}^{-1}$ em amostras de água de rio de BP-3 (Vila et al., 2016). Num estudo realizado ao redor da Ilha de Gran Canária, foi detetado concentrações de BP-3 até $3,317 \mu\text{g L}^{-1}$ (Sánchez Rodríguez et al., 2015). Nas ilhas Virgens Americanas foram detetadas concentrações de BP-3 entre 75 e $1400 \mu\text{g L}^{-1}$ em amostras de água do mar, enquanto nas ilhas Havaianas as concentrações registadas foram de $0,800$ a $19,200 \mu\text{g L}^{-1}$, onde foi concluído que a BP-3 representa um perigo para a conservação dos recifes e ameaça a resiliência dos corais às mudanças climáticas (Downs et al., 2016). Por causa desta toxicidade, o Havaí restringiu o uso desta benzofenona (Huang et al., 2021). Em outro estudo realizado em águas residuais no estado de Nova Iorque, foi detetado concentrações de $0,077 \mu\text{g L}^{-1}$ de 4HBP, $0,049 \mu\text{g L}^{-1}$ de BP-3, $0,026 \mu\text{g L}^{-1}$ de BP-1, $0,015 \mu\text{g L}^{-1}$ de BP-2 e $0,003 \mu\text{g L}^{-1}$ de BP-8, confirmando pela primeira vez a ocorrência de quatro produtos de degradação da BP-3 (BP-1, 4HBP, BP-8 e BP-2) que apresentam toxicidade estrogénica (Wang & Kannan, 2017).

A benzofenona mais estudada é a BP-3, uma vez que corresponde a um dos filtros UV mais usados em cosméticos. Estudos realizados à BP-3 demonstraram propriedades desreguladoras do sistema endócrino, onde estudos *in vitro*, sugerem que a BP-3 pode afetar a reprodução e o desenvolvimento. Porém, a BP-1 e a BP-8 demonstraram ser mais tóxicas para os corais do que a BP-3. Isto deve-se ao facto de que a BP-1 e a BP-8 não serem apenas utilizadas em cosméticos, mas também serem metabolitos da BP-3. Alguns produtos metabólicos da BP-3 são mais tóxicos do que o composto original. Por exemplo, as atividades estrogénicas da BP-1, BP-8 e 4HBP foram relatadas como sendo maiores do que as da BP-3. A BP-8 é o produto hidróxilado da BP-3, enquanto 4HBP, BP-1 e BP-2 são os produtos desmetilados. Apesar da BP-1 ser o principal metabolito em animais e humanos, os quatro metabolitos foram relatados como ocorrendo na urina humana, soro e leite materno. A 4HBP demonstrou ser um derivado primário da BP-3 em afluentes, o que sugere a existência de múltiplas fontes para este composto (além da excreção humana), incluindo a transformação de BP-3 a 4HBP no sistema de esgoto (Fentet al. 2010; Huang et al., 2021; Kim & Choi, 2014; Li & Kannan, 2022; Wang & Kannan, 2017). A Comissão Europeia estabelece uma lista

de vigilância das substâncias para as quais devem ser recolhidos dados de monitorização. Nesta lista, o limite de quantificação máximo aceitável para a BP-3 em água é de 670 ng L⁻¹ (Comissão Europeia, 2022).

Segundo a Decisão 2019/701, de 5 de abril é estabelecido um glossário de denominações comuns de ingredientes a utilizar na rotulagem dos produtos cosméticos, estado presentes todas as benzofenonas que se podem utilizar em produtos cosméticos, desde a BP-1 até à BP-12, e a BPH (Comissão Europeia, 2019).

A legislação relativa aos produtos cosméticos e de higiene corporal, é marcada pela necessidade de garantir os direitos dos consumidores e a proteção da saúde pública, sendo necessárias frequentes alterações, a maioria das quais visam a adaptação ao progresso científico. No caso da BP-3, a concentração prevista inicialmente nos produtos de proteção solar foi reduzida para 6 % p/p, e nos produtos cosméticos para proteger a formulação até 0,5 % p/p (Comissão Europeia, 2017).

No caso da BPH, esta é utilizada como substância aromatizante na indústria para embalagem de alimentos nas tintas de impressão. Está presente no Regulamento de Execução 872/2012, de 1 de outubro onde é apresentada a lista das substâncias aromatizantes permitidas (Comissão Europeia, 2012). No entanto, esta substância pode migrar através da embalagem para o alimento caso não exista uma barreira funcional (Anadón et al., 2009).

Por último, uma das decisões mais recentes relacionadas com as benzofenonas estabelece critérios para atribuição do rótulo ecológico a produtos cosméticos e produtos de higiene animal. As substâncias especificamente excluídas incluem a BPH, BP-1, BP-2, BP-3, BP-4 e BP-5. Estes critérios destinam-se, a incentivar ao uso de produtos com impacto reduzido em termos de ecotoxicidade e de biodegradabilidade (Comissão Europeia, 2021).

1.2. Metodologias analíticas para análise de contaminantes ambientais

As metodologias de análise aplicadas para a determinação de contaminantes ambientais emergentes, neste caso para as benzofenonas, são escolhidas de acordo com as características das moléculas e da matriz em análise, de modo que os analitos sejam isolados e que a metodologia em estudo apresente os melhores resultados possíveis.

Para determinação de benzofenonas, diversas metodologias já foram aplicadas em matrizes ambientais. O uso da técnica de extração em fase sólida (SPE, do inglês *Solid-Phase Extraction*) é a técnica que apresenta mais estudos. A técnica de extração líquido-líquido (LLE, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*) também tem sido relatada, assim como a microextração em fase sólida (SPME, do inglês *Solid-Phase Microextraction*) e a microextração sortiva em barra de agitação (SBSE, do inglês *stir bar sorptive extraction*). Uma das técnicas mais recentes consiste na microextração adsortiva em barra (BA μ E, do inglês *Bar Adsorptive Microextraction*). A análise de benzofenonas tem sido realizada através da cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a detecção por rede de díodos (HPLC-DAD do inglês *High Performance Liquid Chromatography coupled to Diode-Array Detector*) ou até mesmo por cromatografia em fase líquida de ultra alta eficiência acoplado a detecção por rede de díodos (UHPLC-DAD do inglês *Ultra High Performance Liquid Chromatography coupled to Diode-Array Detection*). Outros estudos apresentam o uso de cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS, do inglês *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*), podendo ainda recorrer-se à cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa em tandem (GC-MS/MS do inglês *Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*) ou à cromatografia em fase gasosa com espectrometria de massa por tempo de voo (GC-ToF/MS, do inglês *Gas Chromatography-Time-of-Flight/Mass Spectrometry*) (Almeida et al., 2013; Cadena-Aizaga et al., 2022, 2020; Chávez-Moreno et al., 2018; Kawaguchi et al., 2008; Labille et al., 2020; Nejumal et al., 2021; Sánchez Rodríguez et al., 2015; Vila et al., 2016; Wang & Kannan, 2017).

De todas as estratégias analíticas, a SPE seguida de análise por cromatografia em fase líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS do inglês *Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*) tem sido a mais utilizada para matrizes ambientais (Cadena-Aizaga et al., 2022, 2020; Sánchez Rodríguez et al., 2015).

A tabela 2 apresenta algumas metodologias de análise de benzofenonas em matrizes ambientais, onde são descritas as recuperações, os limites de detecção (LODs, do inglês *Limit of Detection*) e os limites de quantificação (LOQs, do inglês *Limit of Quantification*).

Tabela 2. Metodologias de análise de benzofenonas em matrizes ambientais.

Tipo de matriz	Benzofenonas em estudo	Metodologia de análise	Recuperação (%)	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Referência
Água do mar	BP-3	SPE-UHPLC-MS/MS	43,8 - 100	0,011	0,036	(Cadena-Aizaga et al., 2022)
Águas residuais				0,036	0,121	
				0,025	0,052	
				-	-	
				0,556	1,852	
Água do mar	BPH	SPE-UPLC-Q-ToF-MS	90 - 94	0,020	0,060	(Nejuma et al., 2021)
Água do rio	BP-3			-	-	
				0,840	2,520	
Água do mar	BP-3 BP-8	LLE-UPLC-MS/MS	89 - 93	0,001	0,005	(Labille et al., 2020)
				-	-	
				0,008	0,020	
Águas residuais	BP-3	on-line-SPE-HPLC-UV	65	2,500	8,400	(Chávez-Moreno et al., 2018)
Águas residuais	BP-1 BP-2 BP-8 4HBP	SPE-HPLC-MS/MS	83 - 95	-	0,0002 - 0,0005	(Wang & Kannan, 2017)
Água do mar	BP-3	SPME-GC-MS/MS	73 - 115	0,001	-	(Vila et al., 2016)
Água do rio						
Água do mar	BP-3	SPE-UPLC-DAD	94 - 104	0,001	0,004	(Sánchez Rodríguez et al., 2015)
Água do mar	BPH	BA μ E-LD/HPLC-DAD	83,3 - 103,5	0,300	1,000	(Almeida et al., 2013)
Água do rio	BP-3 4HBP			-	-	
				0,500	1,600	
Água do rio	BPH BP-1 BP-3 3HBP 4HBP	SBSE-GC-MS	102 - 128,1	0,0005 - 0,002	0,002 - 0,010	(Kawaguchi et al., 2008)

1.3. Técnicas de extração

Antes de realizar a análise das amostras através de métodos instrumentais é geralmente necessário um passo inicial de preparação das amostras em estudo, devido à sua complexidade. Para que a técnica de extração seja a mais adequada possível, esta é selecionada através das características da matriz, dos compostos, e tendo a consideração a instrumentação analítica a ser utilizada.

Para a preparação de amostras é necessário não só o uso de processos de homogeneização para uniformização dos componentes da amostra, mas também o recurso a técnicas de extração. A concentração é incrementada de forma a diminuir os limiares analíticos aumentando a sensibilidade. A limpeza da matriz é também importante para a remoção de interferentes de forma a aumentar a seletividade. E quando necessário, procede-se à derivatização para melhorar ou possibilitar a detecção dos analitos. O uso de um solvente compatível com a instrumentação analítica é também essencial para tornar possível a sua identificação e quantificação. Como a preparação de amostras apresenta diversos passos analíticos demorados, podem ocorrer erros associados, sobretudo em análise vestigial (Nogueira, 2015).

As técnicas de preparação mais utilizadas são a LLE e a SPE. A LLE é uma das técnicas mais tradicionais para extrair contaminantes em matrizes ambientais, mas apresenta a desvantagem do uso de grandes quantidades de solventes tóxicos. A SPE, uma das técnicas de extração mais utilizadas pela sua fácil manipulação, apresenta como desvantagem o uso de grandes quantidades de amostra e de solvente para extração. Deste modo, tornou-se necessário o desenvolvimento de técnicas analíticas que fossem mais amigas do ambiente, e que minimizassem ou eliminassem as desvantagens observadas. O conceito de química analítica verde (GAC, do inglês *Green Analytical Chemistry*) promove a redução ou até a eliminação da utilização de substâncias tóxicas em procedimentos laboratoriais (Nogueira, 2015). Com este intuito, têm sido desenvolvidas técnicas de preparação inovadoras com elevada sensibilidade e ambientalmente mais favoráveis. Entre estas destacam as técnicas baseadas em mecanismos de sorção, nomeadamente a SPME, a SBSE e BA μ E (Cadena-Aizaga et al., 2020; Mitra, 2003; Nogueira, 2015).

Estas abordagens de amostragem miniaturizadas têm vindo a ser mais utilizadas em quase todas as áreas científicas, devido à relação custo-benefício, manuseamento

mais facilitado, bem como redução acentuada ou até mesmo ausência de solventes orgânicos tóxicos, e ainda a utilização de baixos volumes de amostra.

1.3.1. Microextração sortiva

A SPME e a SBSE são técnicas de microextração sortiva bastante utilizada em diversas matrizes. Estas técnicas combinam num só passo a extração e concentração dos analitos. Estas técnicas permitem a miniaturização e simplificação do procedimento de extração através da utilização de dispositivos analíticos de fácil manipulação, tamanho reduzido, elevada eficiência e sensibilidade para diversos tipos de matrizes e analitos, sendo assim ideais para análise vestigial devido à sua compatibilidade com os principais métodos cromatográficos.

A SPME foi introduzida por Arthur & Pawliszyn (1990), sendo esta a primeira aplicação de um dispositivo para o enriquecimento estático baseado em sorção para compostos orgânicos em matrizes aquosas. A fase de extração da SPME consiste numa fibra de sílica fundida revestida com uma fase sorvente usada para enriquecimento de compostos tanto por imersão direta como por *headspace*. A SPME tem a característica de ser uma técnica *solventfree* na etapa de retroextração com o uso da dessorção térmica. A retroextração pode ser feita tanto por dessorção líquida (LD, do inglês *Liquid Desorption*) como por dessorção térmica, dependendo essencialmente dos analitos alvo e do sistema instrumental. A extração por SPME baseia-se essencialmente no equilíbrio de partição dos analitos entre a matriz da amostra e o material sorvente. A fase sorvente pode ser constituída por polidimetilsiloxano (PDMS), podendo também ser usados revestimentos à base de divinilbenzeno (DVB), PDMS/DVB, DVB/Carboxen/PDMS, polietilenoglicol, poliacrilato, entre outros. A otimização dos parâmetros que influenciam a extração é fundamental, sendo nomeadamente, a escolha da fibra de SPME, as condições da matriz, o modo de extração e de retroextração essenciais para a obtenção de boas recuperações dos analitos. A SPME tem como vantagens a redução ou mesmo eliminação do uso de solventes, o facto de não ser necessárias grandes quantidades de amostra e redução do tempo para preparação de amostras. No entanto, a SPME pode saturar facilmente devido à pouca quantidade de fase sorvente na fibra. Para além disso, as fibras são dispendiosas e frágeis, particularmente se estiverem envolvidas amostras sujas e complexas, promovendo uma rápida degradação (Mitra, 2003).

A SBSE foi introduzida por Baltussen et al. (1999) e os dispositivos são constituídos por barras de agitação magnéticas incorporadas dentro de tubos de vidro selados e revestidos exteriormente por PDMS. A SBSE é uma técnica que pode ser *solventless* e usada para enriquecimento de compostos tanto por imersão direta como por *headspace*. Do mesmo modo, a retroextração pode ser feita tanto por LD como por dessorção térmica. Tal como a técnica de SPME, também a SBSE é uma técnica de equilíbrio de partição dos analitos entre a matriz da amostra e o material sorvente. A otimização dos parâmetros que influenciam a extração com a SBSE são as condições da matriz, o modo de extração e de retroextração. A SBSE tem a vantagem de ter maior sensibilidade devido a possuir uma maior fase sorvente e o PDMS ser bastante resistente a uma vasta amplitude de temperaturas. No entanto, o PDMS apresenta a desvantagem de não extrair bem compostos polares, devido à sua característica apolar e para poder usar como uma técnica *solventless* é necessário adquirir um equipamento complementar (Mitra, 2003; Nogueira, 2012, 2015).

1.3.2. Microextração adsortiva em barra

A BA μ E é uma técnica introduzida por Neng et al. (2010) como alternativa a técnicas como a SPME e a SBSE. Consiste numa técnica simples, miniaturizada e com o uso de poucos solventes orgânicos. Apresenta uma elevada eficácia para a microextração de compostos polares ($\log K_{O/W} < 2$) e semi-polares ($2 \leq \log K_{O/W} \leq 3$), como é o caso das benzofenonas. Esta técnica permite seleccionar a fase sorvente mais adequada de acordo com a análise, aumentando a eficiência na análise vestigial numa grande diversidade de matrizes. A BA μ E promove os princípios da GAC devido à redução da quantidade de solventes orgânicos utilizados para a microdessorção líquida (μ LD, do inglês *Microliquid Desorption*) e de volume de amostra (Ide & Nogueira, 2018).

A técnica de BA μ E consiste num processo de enriquecimento por tecnologia de amostragem por flutuação. Com recurso a agitação magnética, os dispositivos ficam suspensos no vórtex formado, uma vez que apresentam menor densidade que a matriz aquosa. Esta abordagem favorece a preservação do dispositivo, evitando que este entre em contato com as paredes de vidro do frasco de amostragem, apresentado na figura 3. Os dispositivos BA μ E consistem em cilindros ocos de polipropileno (3 mm de diâmetro e 7,5 mm de comprimento) e podem ser preparados em laboratório pela fixação de

quantidades adequadas de materiais sorventes, através da utilização de um adesivo conveniente (Ide & Nogueira, 2018; Neng et al., 2010).

Os parâmetros fundamentais para uma otimização do método incluem a seleção do material sorvente, o solvente orgânico para retroextração, o tempo de retroextração, a velocidade de agitação, o tempo de equilíbrio, o pH, a polaridade e a força iônica da matriz (Almeida et al., 2013; Ide & Nogueira, 2018).

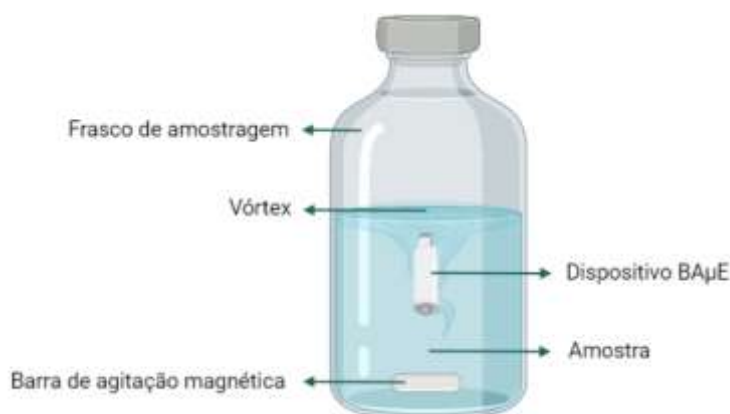


Figura 3. Representação esquemática da análise por BAμE.

Os sorventes mais usados têm sido os carvões ativados (ACs, do inglês *Activated Carbon*) e as fases poliméricas. Os materiais sólidos adsorvem facilmente moléculas polares através dos seus poros que exercem elevadas interações eletrostáticas e/ou dispersivas. Os ACs possuem elevada capacidade adsortiva para a microextração de compostos orgânicos. As propriedades dos ACs são muito diversificadas, uma vez que dependem do material do qual foram obtidos, da forma como foram preparados, bem como o tratamento adotado para ativação. Estas propriedades condicionam as áreas superficiais, a porosidade e o pH do ponto de carga zero (pH_{PZC}). Este último corresponde ao pH na qual a carga total à superfície do carvão é nula. Quando o pH do meio é inferior ao pH_{PZC} do AC, a carga à superfície do mesmo é positiva, por outro lado, quando o pH do meio é superior ao pH_{PZC} a carga tornar-se negativa. Por causa desta característica os ACs exibem elevada estabilidade em diferentes meios de pH, melhorando o enriquecimento de certos analitos, em especial os ionizáveis. Enquanto as interações dos ACs são maioritariamente interações electrostáticas e/ou dispersivas, com os polímeros ocorrem não só interações electrostáticas e/ou dispersivas, mas também ligações π - π , dipolo-dipolo, iónicas e pontes de hidrogénio, devido ao facto dos

polímeros serem geralmente de fase-reversa. Nos polímeros, o tamanho da partícula, a área superficial, a microporosidade e o pH têm grande influência nos mecanismos de interação com as moléculas alvo. Os polímeros podem ser de DVB, de poliestireno-DVB, de pirrolidina modificada, de sílica ou até mesmo de ciano, entre outros (figura 4) (Ahmad et al., 2020; Almeida & Nogueira, 2014; Almeida et al., 2013; Oliveira et al., 2021).

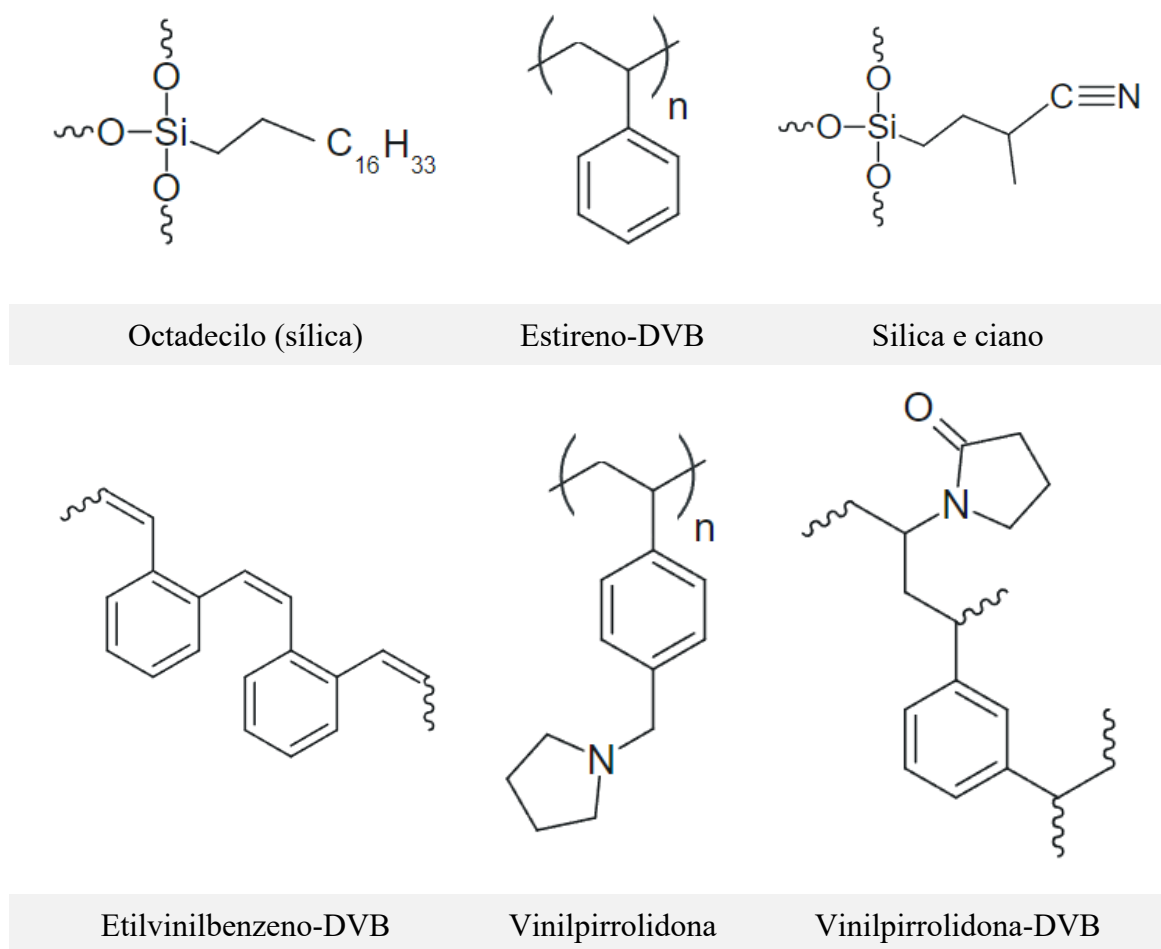


Figura 4. Estrutura química dos monómeros dos polímeros estudados.

A BA μ E tem demonstrado ser uma técnica bastante versátil, com elevada sensibilidade, eficiência e reprodutibilidade, apresentado excelentes resultados em diversos estudos, como por exemplo em PPCPS, pesticidas, substâncias de abuso, entre outros (Ahmad et al., 2014, 2020, 2017; Almeida & Nogueira, 2014; Neng et al., 2010; Oliveira et al., 2021).

1.4. Técnicas Cromatográficas

A cromatografia é uma técnica de análise versátil e bastante útil que permite a separação, identificação e determinação de diversos componentes em misturas bastante complexas. Com o intuito de identificar os componentes numa mistura, é necessário ser feita uma separação dos mesmos com recurso a técnicas cromatográficas. A cromatografia realiza-se através de um conjunto de métodos de separação nos quais os componentes numa mistura se distribuem entre duas fases, uma fase estacionária sólida ou líquida, fixa numa coluna ou numa superfície sólida, através da qual é percorrida por uma fase móvel, que pode ser líquida, gasosa ou um fluido supercrítico (Skoog et al. 2014).

Para que a separação resulte são necessárias diferenças na velocidade de arraste dos componentes pela fase móvel. Estas diferenças são criadas pelas interações dos diferentes compostos com a fase estacionária, promovendo distribuições diferenciadas no equilíbrio entre as fases móvel e estacionária. As concentrações relativas de um componente na fase estacionária (c_S) e na fase móvel (c_M) relacionam-se através do coeficiente de distribuição (K), dado pela equação (1):

$$K = \frac{c_S}{c_M} \quad (1)$$

Quanto maior for o valor de c_S , maior será o valor de K , levando a uma maior interação com a fase estacionária. Os componentes com um valor de K elevado mover-se-ão mais lentamente ao longo da coluna, havendo uma separação dos componentes com um valor de K mais baixo. Uma separação não pode ser efetuada sem haver diferenças na distribuição entre os componentes. Para que ocorra uma migração dos compostos de forma diferencial, é necessário existir variáveis experimentais que afetam a distribuição, como características das fases móvel e estacionária, assim como de outros fatores experimentais.

A separação de dois compostos numa coluna só se efetuará de forma diferencial se a retenção dos mesmos não coincidir, sendo necessários volumes diferentes de fase móvel para eluir cada componente individualmente. Um composto não retido será eluído no tempo morto (t_M), enquanto um composto retido eluirá posteriormente,

atravessando a coluna num tempo de retenção (t_R) superior, sendo o tempo de retenção ajustado (t'_R) o tempo que o composto despende na fase estacionária (figura 5).

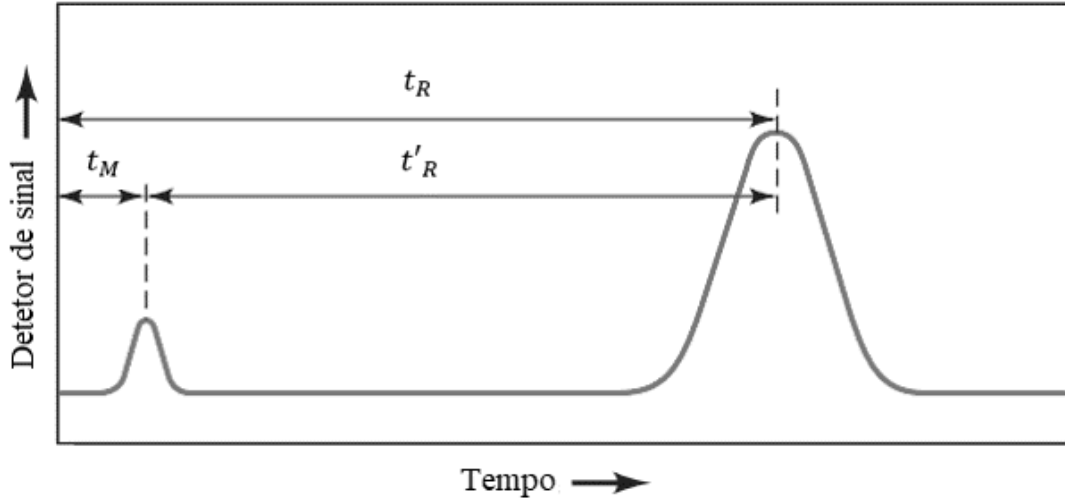


Figura 5. Ilustração do tempo morto (t_M), tempo de retenção ajustado (t'_R) e tempo de retenção (t_R) num cromatograma típico. Adaptado de Skoog et al. (2014).

O fator de capacidade (k'), uma medida de grau de retenção, pode ser calculado a partir da equação (2), desde que a velocidade de fluxo se mantenha constante:

$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{t'_R}{t_M} \quad (2)$$

A separação de dois compostos adjacentes pode exprimir-se através do fator de separação ou da seletividade (α), que está relacionado com a fase estacionária e condições de operação, traduzindo-se pela razão entre os fatores de capacidade de dois compostos adjacentes, equação (3):

$$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A} \quad (3)$$

Uma vez que a cromatografia é um fenómeno de transferência de massa, a eficiência de uma coluna cromatográfica pode ser expressa pelo número de pratos

teóricos (N), grandeza que exprime o número de equilíbrios que ocorrem durante a separação, sendo tanto maior quanto maior for N , e que pode ser calculada pela equação (4), em que W é a largura da base de um pico simétrico:

$$N = 16 \times \left(\frac{t_R}{W}\right)^2 \quad (4)$$

A finalidade das aplicações cromatográficas consiste em separar todos os componentes de uma mistura. A medida de separação entre dois compostos designada por resolução (R_S). Desta forma, pode recorrer-se a uma expressão que exprime a R_S em termos dos três fatores fundamentais: seletividade (α), fator de capacidade (k') e eficiência (N), tal como apresentado na equação (5). Considera-se que ocorre separação completa ou resolução entre picos adjacentes sempre que R_S seja superior ou igual a 1,5:

$$R_S = \frac{1}{4} \times \sqrt{N} \times \left(\frac{\alpha-1}{\alpha}\right) \times \left(\frac{k'_B}{(k'_b+1)}\right) \quad (5)$$

As técnicas cromatográficas podem ser classificadas tendo em consideração três critérios, a natureza física da fase móvel, o suporte da fase estacionária e a natureza do mecanismo de separação (Christian et al., 1967; Skoog et al., 2014; Harris, 2007).

1.4.1. Cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) teve origem no recurso à modernização da instrumentação cromatográfica. Atualmente continuam a ser desenvolvidas novas instrumentações cromatográficas que permitem alcançar melhores resoluções e com maior rapidez. (Fanali et al., 2013; Skoog et al., 2007).

A constituição básica de um HPLC inclui uma bomba que propulsiona o eluente contido em reservatórios (estes devem ser o mais inerte possível), um sistema de injeção para introduzir a amostra no sistema, uma coluna de separação, e um detetor para

registrar a separação dos compostos. Este último é controlado por um *software* que nos permite fazer a análise qualitativa e quantitativa dos analitos em estudo (figura 6).

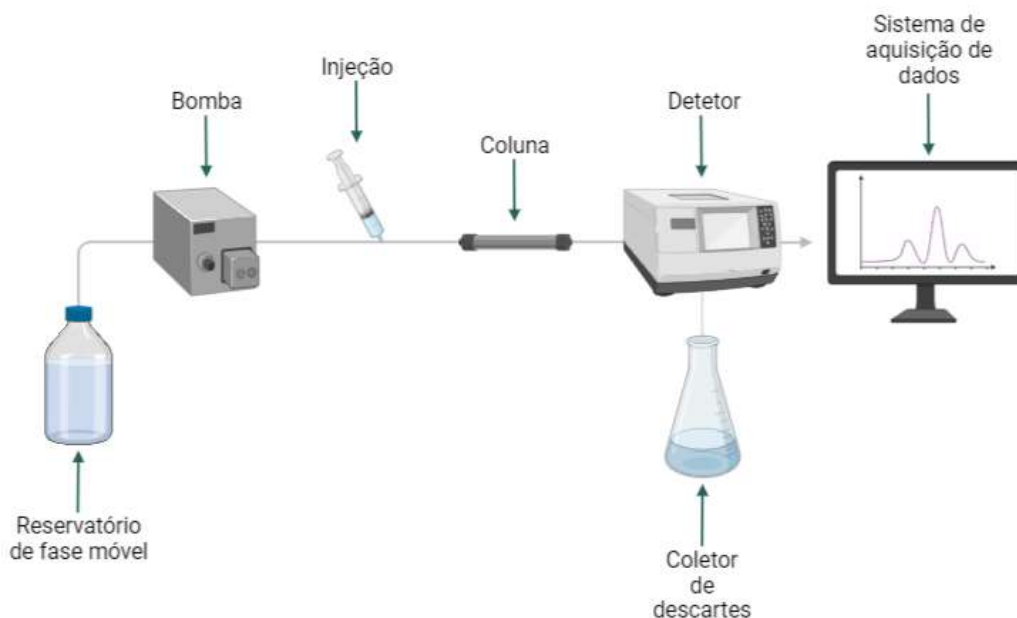


Figura 6. Representação esquemática de um sistema de HPLC simplificado.

A fase móvel presente nos reservatórios, deve, antes de entrar no sistema de análise, passar por um sistema que permite degaseificar a fase móvel para não prejudicar a análise com a presença de gases dissolvidos. As análises tanto podem ser realizados por eluição isocrática (fase móvel constante) ou por gradiente (fase móvel variável).

Para que a amostra entre no sistema, é necessário um sistema de injeção constituído por uma seringa e válvulas especiais que permitem a introdução da amostra no sistema com grande precisão e exatidão. Existe ainda dois modos de injeção, o *stop-flow* e o *loop*, sendo o *loop* o mais usado.

Através das colunas cromatográficas é efetuada a separação dos analitos da amostra. O material e as dimensões das colunas podem variar. Normalmente as colunas são de aço inoxidável, e as colunas de enchimento apresentam diâmetro compreendido entre 3 e 30 μm , enquanto as colunas analíticas usuais têm cerca de 5 a 30 cm de comprimento e 4 a 10 mm de diâmetro interno. Dependendo do tipo de análise ou amostras a estudar, podem ser usadas pré-colunas, colocadas à entrada da coluna analítica que têm como finalidade aumentar o tempo de vida da mesma, retendo

eventuais impurezas. Consoante a polaridade das partículas usadas para o enchimento das colunas, estas podem ser classificadas, em fase normal, para um enchimento com partículas de características mais polares, e em fase reversa, para partículas com características apolares, sendo as últimas as mais usadas e, na sua grande maioria, constituídas por metil, octil e octadecilsílica (Fanali et al., 2013).

Para se poder analisar os resultados da separação pela coluna cromatográfica, os compostos são posteriormente detetados por um dispositivo adequado. Existem diversos sistemas de deteção que se baseiam tanto em propriedades físicas como nas propriedades químicas dos solutos, podendo ainda basear-se na variação das propriedades físicas da fase móvel como é, por exemplo, o índice de refração. Um dos detetores mais comuns em HPLC é o ultravioleta-visível (UV-Vis), podendo operar com comprimento de onda variável ou múltiplo. Os detetores por rede de díodos (DAD, do inglês *Diode-Array Detector*), cujo princípio de funcionamento permite o varrimento espectral em simultâneo, tem as vantagens qualitativas em particular para identificação. Outros detetores muito usados são a fluorescência, eletroquímico, condutividade e o acoplamento a espectroscopia de massa (Fanali et al., 2013).

1.5. Objetivo

A presente dissertação tem como principal objetivo o desenvolvimento de um método analítico com capacidade de detetar e quantificar oito benzofenonas (benzofenona, 2,4-dihidroxibenzofenona, 2,2',4,4'-tetrahidroxibenzofenona, 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona, 2,2'-dihidroxi-4-metoxibenzofenona, 3-hidroxibenzofenona, 4-hidroxibenzofenona e 5-cloro-2-hidroxibenzofenona), em matrizes ambientais. A metodologia implementada consiste na BA μ E- μ LD/HPLC-DAD.

De forma a desenvolver a metodologia, foram traçados os seguintes objetivos:

- Otimização da metodologia segundo vários parâmetros que pode afetar a eficiência na recuperação dos analitos (como por exemplo, material sorvente, tipo de solvente, tempo de dessorção, velocidade de agitação, tempo de equilíbrio, pH da matriz, força iónica e modificador orgânico);
- Validação da metodologia;
- Aplicação do método analítico a matrizes ambientais (como por exemplo, águas residuais, água do mar, água do rio) e em produtos cosméticos.

Determinação de benzofenonas em matrizes ambientais por microextração adsortiva em barra seguida de análise por métodos cromatográficos

2. Materiais e Métodos

2.1. Reagentes, materiais e amostras

O acetonitrilo (ACN, 99,9 %) e o metanol (MeOH, 99,8 %) de qualidade para HPLC, foram obtidos da Honeywell (França). O propano-2-ol (2-PrOH, 99,9 %) de qualidade para HPLC, ácido clorídrico (HCl, 37 %), cloreto de sódio (NaCl, 99,5 %) e o ácido acético glacial (CH₃COOH, 99,8 %) foram fornecidos pela Carlo Erba (Itália). O hidróxido de sódio (NaOH, 98,0 %), foi fornecido pela AnalaR BDH Chemicals (Reino Unido).

A água ultra-pura foi obtida através do sistema de purificação de água Milli-Q da Millipore (Estados Unidos da América).

Os padrões de benzofenona (BPH, 99%), 2,2',4,4'-tetrahidroxibenzofenona (BP-2, 97%), 3-hidroxibenzofenona (3HBP, 99%), 5-cloro-2-hidroxibenzofenona (BP-7, 99%) e 2,2'-dihidroxi-4-metoxibenzofenona (BP-8, 98%) foram adquiridos de Sigma-Aldrich (Alemanha). Os padrões de 2,4-dihidroxibenzofenona (BP-1, 99%), 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona (BP-3, 98%) e 4-hidroxibenzofenona (4HBP, 99%) foram adquiridos da Acros Organics (Estados Unidos da América).

Para além do material corrente de laboratório foi utilizada uma micropipeta de 1-5 mL (VWR International, Estados Unidos da América), uma micropipeta de 100-1000 µL e uma de 20-200 µL (Labbox, Espanha), frascos de vidro transparente de 25 mL com tampas de borracha de 20 mm (VWR International, Estados Unidos da América). Assim como frascos de vidro transparente de 5 mL e 10 mL com tampas de plástico (diâmetro de 18 e 22 mm respetivamente), *vials* de 2 mL (12×32 mm) e respetivas tampas com septo de politetrafluoretileno/silicone (diâmetro de 11 mm) e *inserts* de 300 µL (6×31 mm) adquiridos na Labbox (Espanha). Um encapsulador manual (Agilent Technologies, Estados Unidos da América) e barras de agitação magnética revestidas de Teflon (22×5 e 12×3 mm, VWR International, Estados Unidos da América).

As fases sorventes utilizadas para o revestimento dos dispositivos BAµE eram constituídas por diferentes ACs e polímeros, sendo as informações sobre os mesmos disponibilizadas pelos fornecedores. Os carvões ativados CA 1 (área superficial de 1400 m²g⁻¹ e pHPZC 2,2), CN 1 (área superficial de 1400 m²g⁻¹ e pHPZC 6,4) e SX PLUS (SX+, área superficial de 1100 m²g⁻¹ e pHPZC 8,4) foram fornecidos pela Salmon & Cia (Portugal) e o R (área superficial de 937 m²g⁻¹ e pHPZC 6,5) foi adquirido da Riëdel-de

Haën (Alemanha). Para os polímeros, o Oasis® HLB (HLB, co-polímero de N-vinilpirrolidona-divinilbenzeno de fase reversa; tamanho da partícula de 30 µm, tamanho do poro de 80 Å e área de superfície de 800 m²g⁻¹) foi fornecidos pela Waters (Estados Unidos da América), o Strata®-X (S-X, polímero de N-vinilpirrolidona de fase reversa; tamanho da partícula de 33 µm, tamanho do poro de 85 Å e área superficial de 800 m²g⁻¹), o Strata® CN (S-CN, co-polímero de sílica e ciano de fase reversa; tamanho da partícula de 55 µm, tamanho do poro de 70 Å e área superficial de 500 m²g⁻¹) e o Strata® SDB-L (S-DVB, co-polímero de estireno-divinilbenzeno de fase reversa; tamanho da partícula de 100 µm, tamanho do poro de 260 Å e área superficial de 500 m²g⁻¹) foram fornecidos pela Phenomenex (Estados Unidos da América), enquanto o ENVI™-18 (C18, polímero octadecilo de fase reversa; tamanho da partícula de 45 µm, tamanho do poro de 60 Å e área superficial de 475 m²g⁻¹) foi fornecido pela Sigma-Aldrich (Estados Unidos da América) e o LiChrolut EN (DVB, co-polímero de etilvinilbenzeno-divinilbenzeno de fase reversa; tamanho da partícula de 40 a 120 µm, tamanho do poro de 60 Å e área superficial de 1200 m²g⁻¹) foi fornecido pela Merck Millipore (Alemanha).

Todas as amostras de água utilizadas na presente dissertação foram obtidas em Portugal continental. Para a recolha das amostras de água foi utilizado recipientes de 1,5 L e coletado à superfície dos seguintes locais:

- A amostra de água do mar foi recolhida da praia de São Martinho do Porto;
- A amostra de água de uma praia fluvial foi recolhida na nascente do rio Alviela, na praia Fluvial dos Olhos d'Água;
- A amostra de água de uma albufeira artificial foi recolhida do Parque Verde do Bonito do Entroncamento;
- A amostra de água de uma barragem foi recolhida de Castelo de Bode;
- A amostra de água do rio foi recolhida do rio Tejo em duas zonas diferentes, sendo a água do rio da zona de Vila Nova da Barquinha, e a água do estuário da zona de Porto Brandão;
- A amostra de água de efluente foi obtida da ETAR de Alcântara;

• A amostra de água para consumo foi recolhida no laboratório de Cromatografia e Eletroforese Capilar da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa a partir dos sistemas de fornecimento de águas municipais de Lisboa.

As amostras de cosméticos foram obtidas de lojas locais sendo estas um protetor solar da marca Hawaiian Tropic (Protective Dry Oil SPF 15) e um bálsamo labial da marca LuxiLips (Neutral Lip Balm SPF 30).

2.2. Instrumentação e sistema cromatográfico

As análises foram realizadas num sistema de HPLC-DAD constituído por um degaseificador (G1322A), uma bomba quaternária (G1311A), um amostrador automático (G1313A), um compartimento da coluna termostaticado (G1316A) e um DAD (G1315B). O registo de dados e controlo instrumental foram efetuados a partir do *software* LC3D *ChemStation* (versão Rev.A.10.02[1757]; Agilent Technologies). As separações cromatográficas foram efetuadas numa coluna Kinetex C18 (150×4,6 mm, 5 µm de tamanho de partícula; Phenomenex, Estados Unidos da América). As condições instrumentais utilizadas para análise das benzofenonas estão descritas na tabela 3.

Tabela 3. Condições experimentais utilizadas para análise de benzofenonas por HPLC-DAD.

Parâmetros	
Composição da fase móvel	Eluente A: água ultra-pura com 2,5% de CH ₃ COOH (v/v) Eluente B: ACN
Temperatura da coluna (°C)	20
Fluxo (mL min ⁻¹)	0,60
Comprimento de onda (λ _{max} , nm)	255, 290
Modo	Isocrático 40:60 % (A:B)
Duração da corrida (min)	15

As pesagens foram realizadas numa balança analítica (Mettler Toledo AG135, Suíça) e para o tratamento ultrassónico utilizou-se um banho de ultrassons com termóstato (Branson 3510 E-DTH, 42 +/- 2,5 kHz, 100 W, Suíça). Foi ainda utilizado um vórtex (Velp, Itália), uma placa magnética de aquecimento modelo MR 3001 (Heidolph, Alemanha) e duas placas de agitação magnética com quinze posições

(Variomag H+P Labortechnik AG Multipoint 1,5 e Cimarec i Poly Komet, Alemanha). O pH das amostras foi controlado com recurso a um medidor de pH modelo 744 pH Meter contendo um eléctrodo combinado de vidro (Metrohm, Suíça). As soluções *stock* individuais de BPH, BP-1, BP-2, BP-3, BH-7, BP-8, 3HBP e 4HBP, com concentração de 1000,0 mg L⁻¹, foram preparadas em ACN e armazenadas num congelador vertical (-20 °C; Jocel JCV-220L, Portugal) durante todo o trabalho, sendo renovadas quando necessário. Para guardar as soluções padrão com a mistura das oito benzofenonas a 10 e 100 mg L⁻¹ foi utilizado um frigorífico (0 a 6 °C; Liebherr FKEX 2600, Áustria), assim como as respetivas diluições preparadas em água ultra-pura.

2.3. Procedimento Experimental

2.3.1. Condições instrumentais

De forma a conseguir as melhores condições instrumentais por HPLC-DAD, os compostos alvo foram analisados individualmente com a finalidade de obter os respetivos tempos de retenção espectros UV-vis para seleccionar o comprimento de onda adequado (tabela 4). Diversos parâmetros foram estudados de forma a obter a melhor resolução, seletividade e sensibilidade, bem como a composição da fase móvel.

Tabela 4. Tempos de retenção das benzofenonas em estudo.

Analitos	Comprimento de Onda (λ_{max}, nm)	Tempo de retenção (min)
BP-2	290	3,1
4HBP	290	4,0
3HBP	255	4,3
BP-1	290	4,7
BP-8	290	5,7
BPH	255	7,2
BP-3	290	9,2
BP-7	255	11,3

2.3.2. Preparação das barras de BA μ E

Os dispositivos BA μ E foram preparados no laboratório através da utilização de cilindros ocos à base de polipropileno (7,5 mm de comprimento e 3 mm de diâmetro) revestidos com material adesivo, de modo a serem seguidamente cobertos com os

diferentes materiais sorventes, como representado na figura 7A. Previamente à utilização, cada dispositivo foi condicionado em água ultra-pura sob agitação durante 10 min, como representado na figura 7B, de modo a retirar o excesso de material adsorvente, repetindo-se este procedimento duas vezes. Seguidamente, os dispositivos foram secos com papel para retirar a água restante no interior dos cilindros e na superfície dos revestimentos, permitindo a sua utilização.

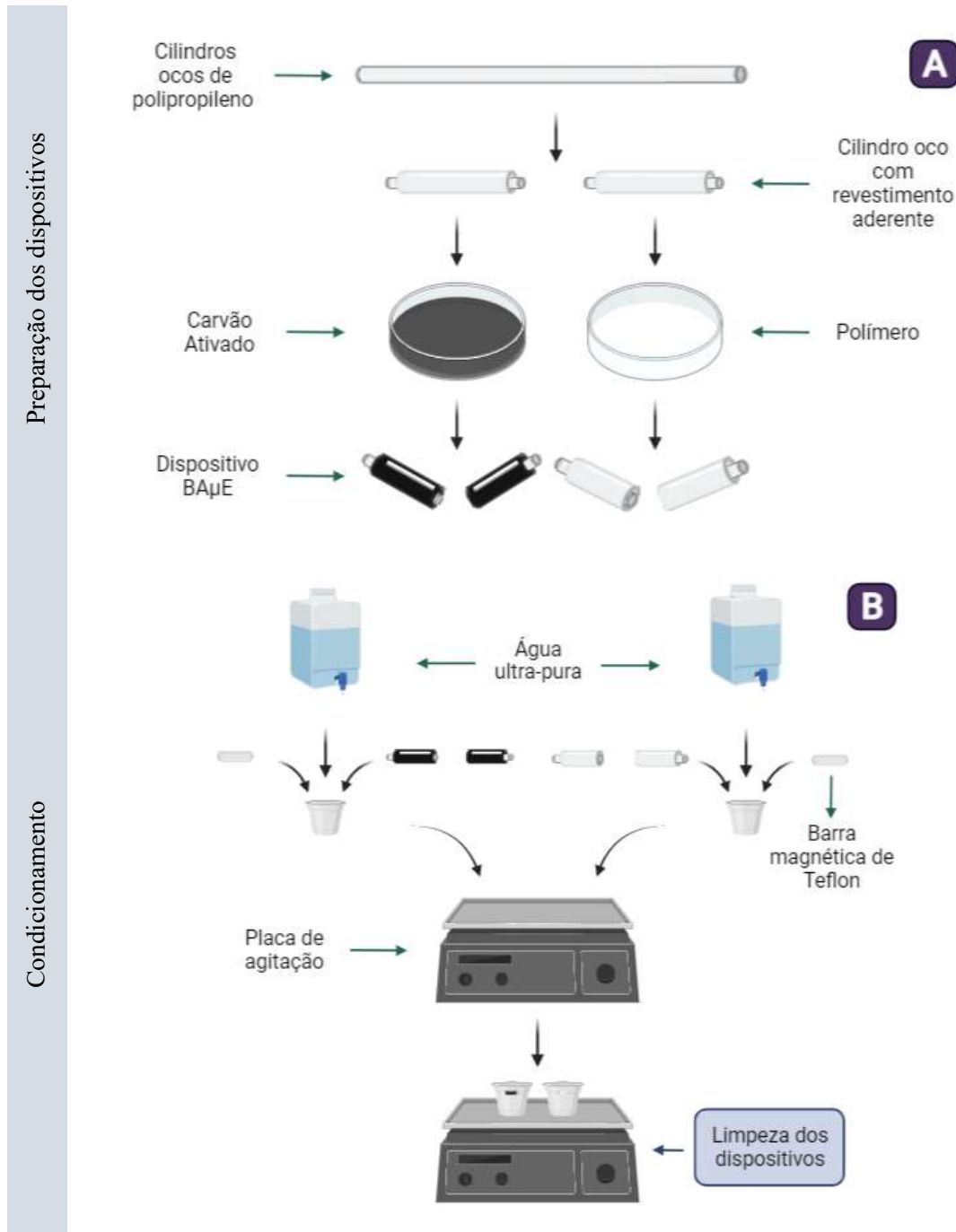


Figura 7. Esquema da preparação dos dispositivos BAμE (A) e o seu condicionamento (B).

2.3.3. Ensaios de otimização

Para a otimização dos parâmetros da BA μ E- μ LD/HPLC-DAD foram realizados através de ensaios de extração, colocando 25 mL de água ultra-pura num frasco de vidro e fortificando com 200 μ L da solução mistura das oito benzofenonas com concentração de 10,0 mg L⁻¹, de forma a obter uma concentração final de 80,0 μ g L⁻¹, colocou-se também a barra de agitação e o dispositivo de microextração com o sorvente selecionado. A microextração foi efetuada por meio da agitação da barra magnética durante um determinado período, a uma dada velocidade, à temperatura ambiente, como representado na figura 8A.

Após a extração, o dispositivo de microextração é retirado do frasco e seco em papel. Num *vial*, contendo um *insert*, foi colocado 100 μ L do solvente orgânico, para depois se proceder à retroextração. A retroextração é feita através do tratamento ultrassónico durante um determinado tempo (figura 8B). Foi adicionado de seguida 100 μ L de água ultra-pura no *insert*, e, só depois, o dispositivo de microextração foi retirado e o *vial* selado com auxílio de um encapsulador. Foram ainda realizados ensaios em branco usando água ultra-pura com 200 μ L de ACN. Todos os ensaios foram efetuados em triplicado. Por fim colocaram-se os *vials* no amostrador automático para posterior análise por HPLC-DAD (figura 8C).

Foram estudados diversos parâmetros para a otimização do processo, nomeadamente, o solvente para dessorção (MeOH, ACN e MeOH/ACN, v/v), o tempo de dessorção (15, 30, 45 e 60 min), o tempo de equilíbrio (1, 2, 3, 4 e 16 h), a velocidade de agitação (750 e 990 rpm), o pH da matriz (2, 5,5, 8 e 11), a força iónica da matriz (0, 5, 10 e 15 % em NaCl, p/v), e o modificador orgânico (0, 5, 10 e 15 % em MeOH, v/v). Os parâmetros anteriores foram os escolhidos de acordo com trabalhos anteriores (Almeida et al., 2013). Por forma a otimizar a eficiência da extração os parâmetros acima referidos foram estudados seguindo uma estratégia de otimização univariável (OVAT, do inglês *One Variable at a Time*). Esta é utilizada na maioria dos trabalhos envolvendo BA μ E. Nesta abordagem, todas as variáveis, exceto uma, estão fixas, e o comportamento do sistema é estudado a vários níveis dessa mesma variável. O cálculo das recuperações foi feito por comparação das áreas dos picos obtidos em cada ensaio com as dos picos das áreas dos padrões de controlo. Este cálculo está detalhado no anexo 1 equação 7.

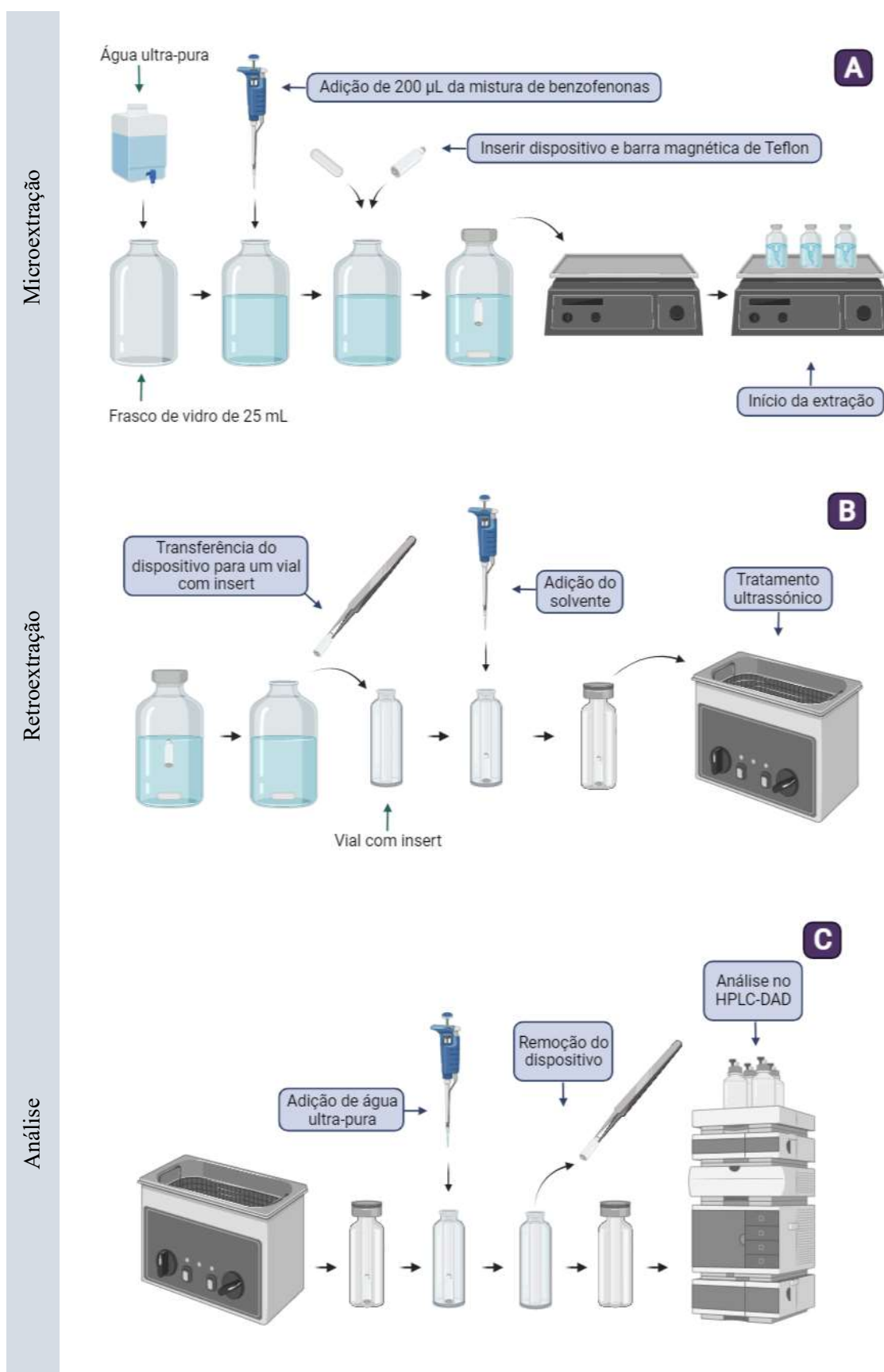


Figura 8. Esquema da metodologia de análise BAμE-μLD/HPLC-DAD.

2.3.4. Ensaios de validação

Para validação da metodologia de análise por BA μ E- μ LD/HPLC-DAD foram utilizados os procedimentos analíticos descritos anteriormente nas condições otimizadas.

Nos estudos de validação foi necessário a avaliação de diversos parâmetros, como a linearidade, sensibilidade, seletividade, exatidão, precisão e recuperação, conforme realizado em estudos anteriores.

Para a quantificação das substâncias em análise, foram utilizados os padrões das benzofenonas e analisados através da metodologia proposta para a construção das retas de calibração. Foram utilizadas diferentes concentrações das soluções para a fortificação, com uma gama compreendida entre 1,0 e 100,0 $\mu\text{g L}^{-1}$.

A linearidade foi avaliada utilizando os respectivos coeficientes de determinação (r^2) e a dispersão de resíduos, assim como posterior aplicação do teste *lack-of-fit*.

A seletividade foi verificada através da ausência de interferentes nos tempos de retenção iguais a cada analito através da análise de amostras em branco. Enquanto a sensibilidade da metodologia foi avaliada através da determinação do LOD e LOQ com recurso à razão sinal/ruído (S/N) de 3:1 e 10:1, respetivamente.

Para a determinação da repetibilidade ($n = 5$) e da precisão intermédia ($n = 5$, por 3 dias consecutivos) realizaram-se ensaios nas condições otimizadas para a análise após fortificação com a mistura dos analitos em estudo. Foi utilizado três níveis de concentração dos analitos: baixa, média e alta, correspondentes a 5,0, 40,0 e 100,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os critérios de aceitação utilizados para a exatidão e precisão foi que o desvio padrão relativo (RSD, do inglês *Relative Standard Deviation*) fossem $\leq 20\%$ (Cadena-Aizaga et al., 2020).

2.3.5. Ensaios de aplicação a amostras reais

Os ensaios em amostras reais, foram realizados em águas recolhidas de diferentes locais, assim como em cosméticos. As amostras de água foram armazenadas no frigorífico até à sua análise. Foi aplicada a metodologia otimizada e validada já descrita anteriormente.

Para uma melhor análise dos analitos, foi utilizado o método da adição de padrão (SAM, do inglês *Standard Addition Method*), onde se utilizou as respectivas matrizes em estudo para a realização das retas de calibração, em vez das retas já preparadas em água ultra-pura. De modo a obter as retas de calibração, foram utilizadas diferentes concentrações das soluções para a fortificação, fazendo quatro níveis de concentração dos analitos, correspondentes a 20,0, 40,0, 60,0 e 80,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, e o ponto zero, onde não foi realizada a fortificação. No caso das amostras de água, foram utilizadas 25 mL para cada ensaio e todas as amostras foram filtradas (Whatman nº1) sob vácuo antes dos ensaios de extração.

Para realização das retas de calibração dos cosméticos, foram dissolvidas pequenas quantidades de amostra em água ultra-pura. No caso do protetor solar, foi dissolvido 0,4 mg de creme em 500 mL de água ultra-pura, e para o bálsamo labial foi dissolvido 2,0 mg de creme em 400 mL de água ultra-pura.

3. Resultados e Discussão

3.1. Calibração instrumental HPLC-DAD

A calibração instrumental foi realizada a partir da injeção do padrão mistura no sistema cromatográfico. A figura 9 ilustra o cromatograma obtido a partir da injeção direta do padrão mistura com uma concentração de $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ no HPLC-DAD.

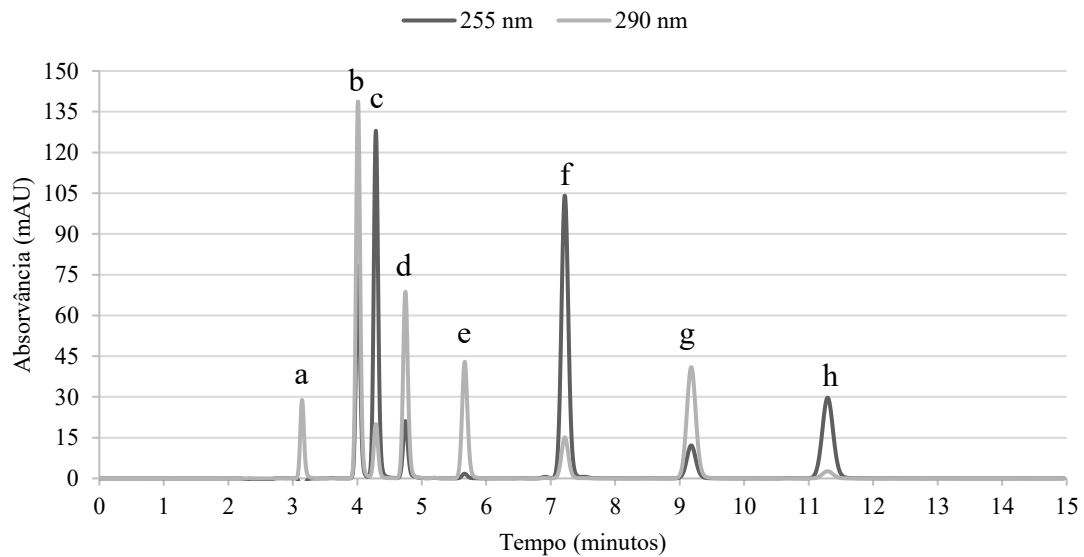


Figura 9. Cromatograma obtido através da análise por HPLC-DAD sob condições instrumentais otimizadas da mistura de benzofenonas em estudo, numa concentração de 10 mg L^{-1} (legenda: a- BP-2; b- 4HBP; c- 3HBP; d- BP-1; e- BP-8; f- BPH; g- BP-3; h- BP-7).

Foi preparada, partindo da solução mistura de benzofenonas (com $100,0 \text{ mg L}^{-1}$), os padrões de calibração através de diluições sucessivas, em proporções 1:1 (v/v) da solução padrão. Foram determinados os LOD e LOQ com recurso ao S/N de 3:1 e 10:1, respetivamente. Foram obtidos valores de LOD entre $0,01$ e $0,10 \text{ mg L}^{-1}$ e valores de LOQ entre $0,03$ e $0,33 \text{ mg L}^{-1}$ como apresentado na tabela 5.

Tabela 5. LOD e LOQ obtidos para a calibração instrumental do HPLC-DAD.

Analitos	LOD (mg L⁻¹)	LOQ (mg L⁻¹)
BP-2	0,100	0,333
4HBP	0,020	0,067
3HBP	0,020	0,067
BP-1	0,050	0,167
BP-8	0,050	0,167
BPH	0,010	0,033
BP-3	0,050	0,167
BP-7	0,050	0,167

Por forma a construir as retas de calibração e estudar a linearidade, prepararam-se soluções com a mistura de benzofenonas, partindo das mesmas soluções. Todas as soluções foram preparadas e analisadas em duplicado. As concentrações utilizadas foram compreendidas entre 0,3 e 10,0 mg L⁻¹, onde foi verificada uma boa linearidade, com $r^2 \geq 0,9978$ (tabela 6).

Tabela 6. Parâmetros estudados para determinar a linearidade para a calibração instrumental do HPLC-DAD.

Analitos	Gama de trabalho (mg L⁻¹)	Reta de calibração	r²
BP-2	0,3 - 10,0	y = 14,188x - 2,1644	0,9984
4HBP		y = 73,773x - 10,6090	0,9983
3HBP		y = 71,361x - 10,3480	0,9983
BP-1		y = 42,034x - 6,0801	0,9981
BP-8		y = 30,351x - 4,6255	0,9982
BPH		y = 94,149x - 10,6960	0,9978
BP-3		y = 44,477x - 6,3389	0,9979
BP-7		y = 39,925x - 5,0441	0,9985

Realizou-se ainda análises relativas à repetibilidade (n = 5) e à precisão intermédia (n = 5, por 3 dias) com concentrações de 0,9, 1,8 e 2,7 mg L⁻¹, onde foram obtidos RSDs ≤ 8 %.

3.2. Otimização BA μ E- μ LD

Após a otimização das condições instrumentais de análise, seguiu-se o estudo da influência dos parâmetros experimentais nas etapas de extração e dessorção. Este foi seguido com o intuito de otimizar as variáveis experimentais para a obtenção de uma metodologia com elevada sensibilidade, repetibilidade e precisão.

Procedeu-se à otimização das variáveis experimentais que condicionam a extração por BA μ E. No desenvolvimento de uma nova metodologia de análise por BA μ E os parâmetros estudados incluem a seletividade do revestimento do dispositivo, o solvente de dessorção, o tempo de dessorção, o tempo de equilíbrio, a velocidade de agitação, o pH da matriz, a força iônica e a polaridade. Assim sendo, utilizando a OVAT, procedeu-se ao estudo da influência das variáveis experimentais.

Os parâmetros iniciais fixos foram: 25 mL de água ultra-pura fortificada com 200 μ L de solução mistura de benzofenonas com concentração final de 80,0 μ g L⁻¹; microextração de 16 h a 990 rpm com um pH de 5,5; retroextração com 100 μ L de ACN e 60 minutos sob tratamento ultrassônico.

3.2.1. Seleção do sorvente para BA μ E

De modo a iniciar a otimização da metodologia, foi necessário selecionar o material sorvente mais adequado para a microextração das benzofenonas. Com os diversos parâmetros iniciais fixos anteriormente descritos, foram então testados seis polímeros (HLB, S-X, S-DVB, S-CN, DVB e C18) e quatro ACs (CN 1, CA 1, SX+ e R). Na figura 10 estão representados os resultados obtidos para a escolha do sorvente adequado.

Os resultados apresentados demonstram que tanto o polímero HLB como o S-X apresentaram ótimos resultados para as diferentes benzofenonas em estudo (recuperações entre 56 a 76 % e 52 a 80 %, respetivamente), enquanto os ACs SX + e R demonstraram ter as piores recuperações (recuperações entre 1 a 4 % e 2 a 10 %, respetivamente). Para a BP-2 e a BP-1, as melhores recuperações foram com o polímero S-X, e para a 4HBP, a BP-8, a BP-3 e a BP-7, as melhores recuperações foram com o polímero HLB. Contudo, para a 3HBP e para a BPH, o carvão CA 1 demonstrou melhores recuperações, mas para os restantes analitos a eficiência da recuperação é menor comparado com alguns dos polímeros.

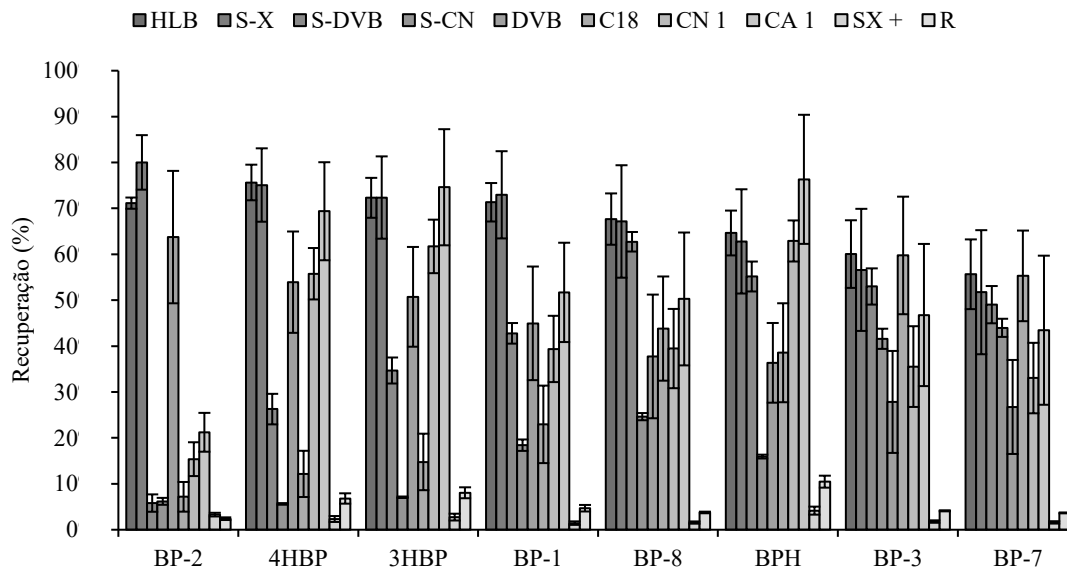


Figura 10. Efeito da seletividade dos ACs e dos polímeros na recuperação de benzofenonas por BA μ E- μ LD/HPLC-DAD. Condições: microextração de 16 h a 990 rpm; retroextração de 60 minutos em ACN.

As benzofenonas em estudo apresentam características apolares (BPH, BP-1, BP-2, BP-3, BP-7 e BP-8) e semi-polares (3HBP e 4HBP), o que pode ter grande influência no tipo de mecanismos de interação envolvidos com os sorventes selecionados. A base polimérica depende principalmente da polaridade das benzofenonas para que haja interações. A partir dos resultados obtidos, o S-X e o HLB parecem promover interações químicas muito mais fortes na maioria das benzofenonas estudadas do que os outros polímeros. Os mecanismos de interação entre as benzofenonas parecem ser influenciados predominantemente por interações π - π e/ou ligações de hidrogênio, devido aos anéis aromáticos presentes nos sorventes S-X e HLB e nas benzofenonas.

No caso dos carvões, a porosidade e a textura da superfície podem promover interações eletrostáticas e/ou dispersivas, π - π e hidrofóbicas com compostos orgânicos. As interações eletrostáticas e/ou dispersivas resultantes são condicionadas pelo pH_{PZC}, sendo que o pH ensaiado (5,5), as cargas superficiais dos ACs desempenham um papel importante nas interações com as moléculas envolvidas. O carvão CA 1 apresenta carga negativa a pH 5,5, enquanto os carvões CN 1, SX+ e R apresentam carga positiva. As benzofenonas em estudo apresentam majoritariamente características alcalinas, sendo assim, uma solução aquosa com um pH mais ácido tende a favorecer o processo de microextração, uma vez que os analitos se encontram na sua forma neutra ($6,63 \leq pK_a \leq$

9,40). No entanto, esta característica não parece ajudar em todos os analitos, visto que com o CA 1, que foi o AC com melhores recuperações, a recuperação da BP-2 foi apenas de 21 %.

Tendo em conta os resultados, foram selecionados dois polímeros, o S-X e o HLB, para proceder com a otimização. Estes foram os sorventes que de um modo geral, apresentaram os melhores resultados para as benzofenonas. Apesar de alguns polímeros e carvões aparentarem uma melhor extração em algumas das benzofenonas que o S-X ou o HLB, a recuperação é muito baixa para outras benzofenonas. Como é possível observar na figura 10, o carvão CA 1 tem uma recuperação de 76 % para a BPH, mas apenas de 21 % para a BP-1. O mesmo se aplica ao carvão CN 1 e ao polímero S-DVB.

3.2.2. *Otimização da dessorção líquida*

A segunda fase da otimização da BA μ E passa pela avaliação de dois parâmetros, a capacidade do solvente de retroextração para promover a dessorção dos analitos dos dispositivos BA μ E após a etapa de extração, e o tempo de dessorção sob tratamento ultrassónico necessário para assegurar a máxima recuperação dos analitos. Com os diversos parâmetros iniciais fixos descritos anteriormente, seguiu-se a otimização tanto para o sorvente S-X como para o HLB.

3.2.2.1. *Efeito do tipo de solvente*

Primeiro foi otimizado o tipo de solvente necessário para a retroextração. Para a LD, a escolha do solvente adequado é bastante importante, pois este é decisivo para obter uma boa recuperação, dado que é este que promove a quebra das interações entre os analitos e as fases sorventes. Este processo pode ser acelerado através de tratamento ultrassónico. Foi testado ACN, MeOH e uma mistura 50:50 (v/v) de ACN/MeOH. Segundo estudos anteriores (Almeida et al., 2013), solventes orgânicos polares apresentam melhores resultados para uma boa recuperação dos analitos, tanto o ACN como o MeOH são solventes polares ($\log K_{O/W}$ -0,77 MeOH e -0,34 ACN). Na figura 11 estão representados os resultados obtidos para os polímeros S-X e HLB da otimização do solvente para retroextração.

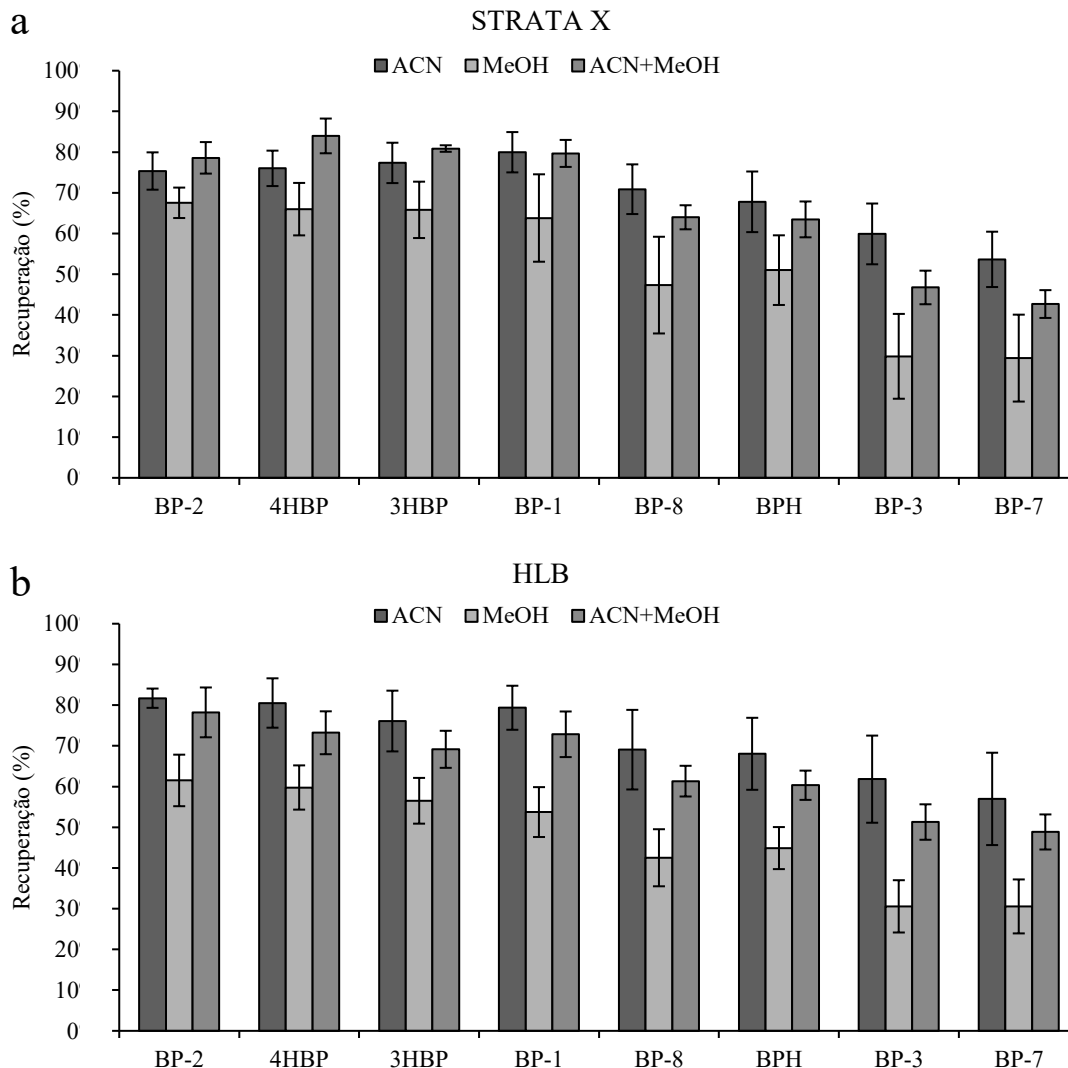


Figura 11. Efeito do tipo de solvente de retroextração na recuperação de benzofenonas por BA μ E- μ LD/HPLC-DAD. Condições: microextração de 16 h a 990 rpm; retroextração de 60 minutos.

Os resultados apresentados demonstram que, para a maioria das benzofenonas, o ACN foi o solvente que melhor se adequa para a retroextração. Para o polímero S-X, as recuperações estabeleceram-se entre os 54 e 80 % com o uso de ACN como solvente de retroextração, enquanto com MeOH as recuperações foram apenas entre 29 e 68 %. Com a mistura de ACN e MeOH, para o mesmo polímero, as recuperações foram entre 43 e 84 %. A mistura de ACN e MeOH apesar de ter resultados de recuperação semelhantes ao ACN, demonstrou recuperação mais baixas nas benzofenonas BP-3 e BP-7, com recuperações abaixo do 50 %. Para o polímero HLB, as recuperações foram semelhantes, visto que com o uso de ACN, as recuperações estabeleceram-se entre os 57 e 82 %, com MeOH entre 31 e 62 %, e com a mistura dos dois entre 49 e 78 %. Apesar da diferença de recuperações entre o ACN e a mistura de ACN/MeOH não ser

muito elevada, o ACN demonstrou ser o solvente indicado para a quebra das interações entre as benzofenonas e os sorventes, tendo sido selecionado para os restantes ensaios de otimização.

3.2.2.2. Efeito do tempo de retroextração

Para a otimização do tempo de retroextração, foram testados quatro períodos de tempo diferentes sob tratamento ultrasónico, sendo estes de 15, 30, 45 e 60 minutos. Na figura 12 estão representados os resultados obtidos para os polímeros S-X e HLB da otimização do tempo de retroextração.

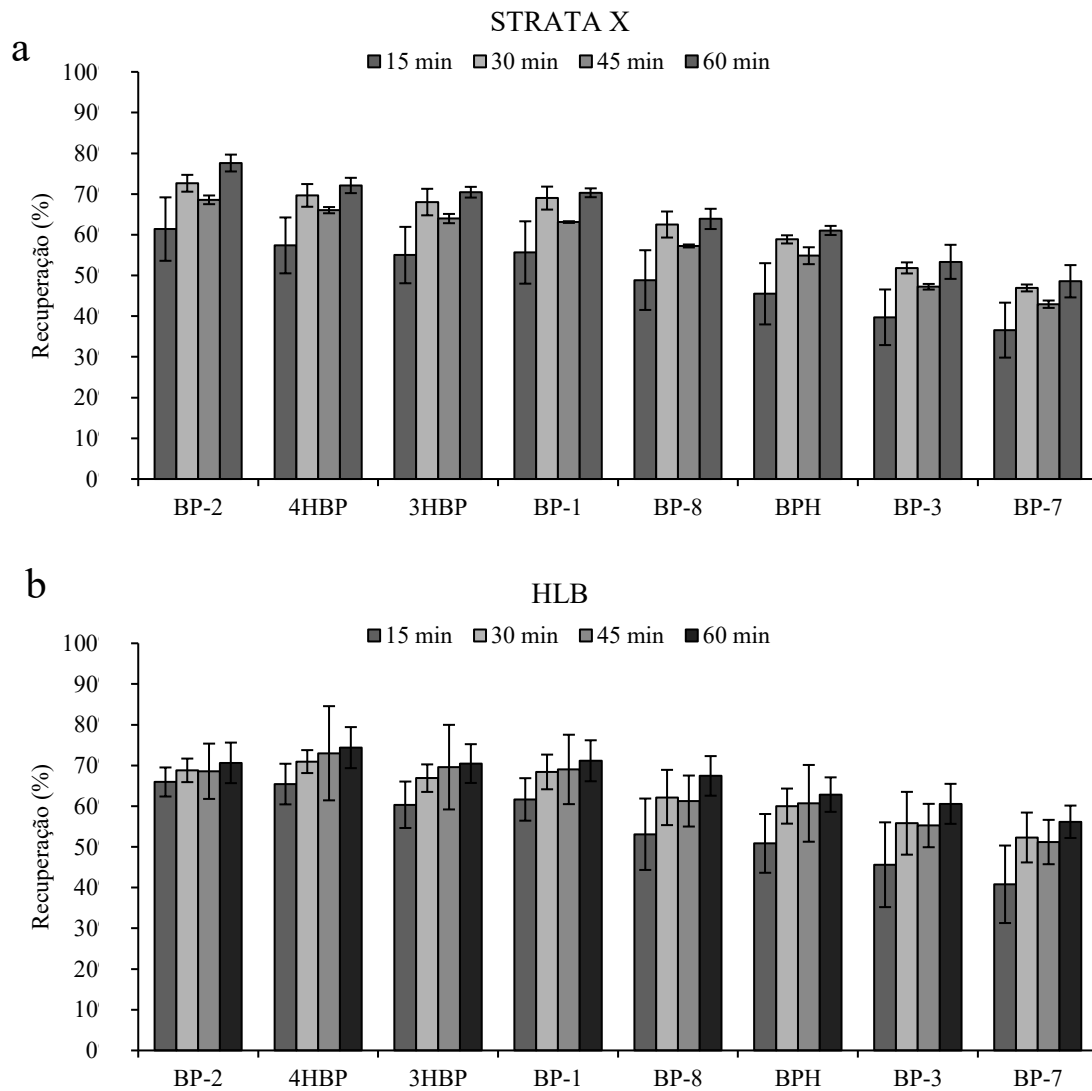


Figura 12. Efeito do tempo de retroextração na recuperação de benzofenonas por BA μ E- μ LD/HPLC-DAD. Condições: microextração de 16 h a 990 rpm; retroextração em ACN.

Os resultados apresentados demonstram que para todas as benzofenonas, 60 minutos foi o melhor tempo para a retroextração. No geral, tanto para o S-X como para o HLB, as recuperações para o período de 15 minutos foram inferiores em todas as benzofenonas. Com o polímero HLB as melhores recuperações foram conseguidas com o período de 60 minutos de retroextração, no entanto com S-X a recuperações não diferem muito entre os períodos de 30 e 60 minutos. Procedeu-se à otimização com 60 minutos de retroextração para ambos os polímeros em estudo.

3.2.3. Otimização da extração

Para realizar uma boa extração, o equilíbrio entre os analitos e as fases sorventes tem de ser otimizado. A terceira fase da otimização da BA μ E passa pela avaliação de dois parâmetros, o tempo e a velocidade de agitação de extração. Procedeu-se a otimização tanto para o S-X como para o HLB, com os parâmetros de retroextração já otimizados.

3.2.3.1. Efeito do tempo de equilíbrio

Para a otimização do tempo de equilíbrio, foram testados cinco períodos de tempo diferentes, sendo estes de 1, 2, 3, 4 e 16 horas. Este processo é bastante importante, uma vez que influencia a transferência dos analitos para as fases sorventes e determina a eficiência do método em estudo. Na figura 13 estão representados os resultados obtidos para os polímeros S-X e HLB do estudo do tempo de equilíbrio.

Os resultados apresentados demonstram que para todas as benzofenonas, 16 horas foi o melhor período de tempo para a extração. No geral, tanto para o S-X como para o HLB, as recuperações com 1 hora foram cerca de 20 a 30 % em todas as benzofenonas, demonstrando assim a influencia que o tempo tem para a recuperação da extração. No entanto, para o BP-3 e BP-7, usando o sorvente S-X, 4 horas aparenta atingir o máximo da eficiência de recuperação. Neste sentido, seguiu-se a otimização com o tempo de extração otimizado de 16 horas.

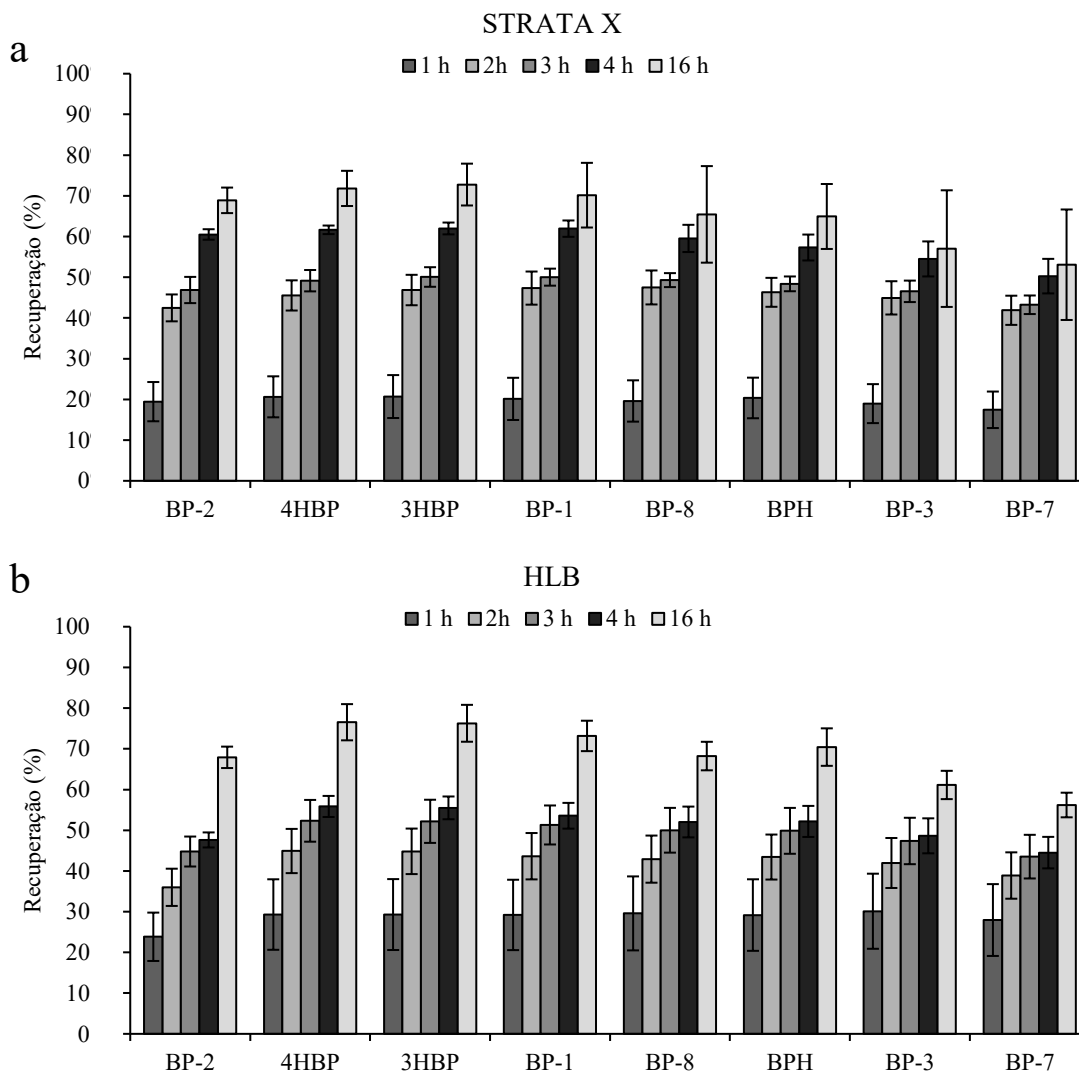


Figura 13. Efeito do tempo de equilíbrio da microextração na recuperação de benzofenonas por BA μ E- μ LD/HPLC-DAD. Condições: microextração a 990 rpm; retroextração de 60 minutos em ACN.

3.2.3.2. Efeito da velocidade de agitação

Para a otimização da velocidade de agitação para a extração, foram testadas duas velocidades diferentes, sendo estas de 700 e 990 rpm. A velocidade influencia a eficiência do processo através da transferência da massa do analito para a amostra. Na figura 14 estão representados os resultados obtidos para os polímeros S-X e HLB da otimização da velocidade de agitação.

O efeito da velocidade de agitação é essencial pois pode acelerar o processo de extração, no entanto o aumento da velocidade pode causar danos à fase sorvente devido ao contacto direto entre o dispositivo de microextração e a barra de agitação magnética, podendo assim, aumentar o erro (Almeida et al., 2013). Enquanto uma velocidade de

agitação baixa não consegue formar o vórtex para manter o dispositivo no meio da amostra para extração.

Os resultados apresentados demonstram que a diferença entre as recuperações para todas as benzofenonas para as duas velocidades não é muita significativa, no entanto continuou-se a otimização com a velocidade de agitação estabelecida nos 700 rpm.

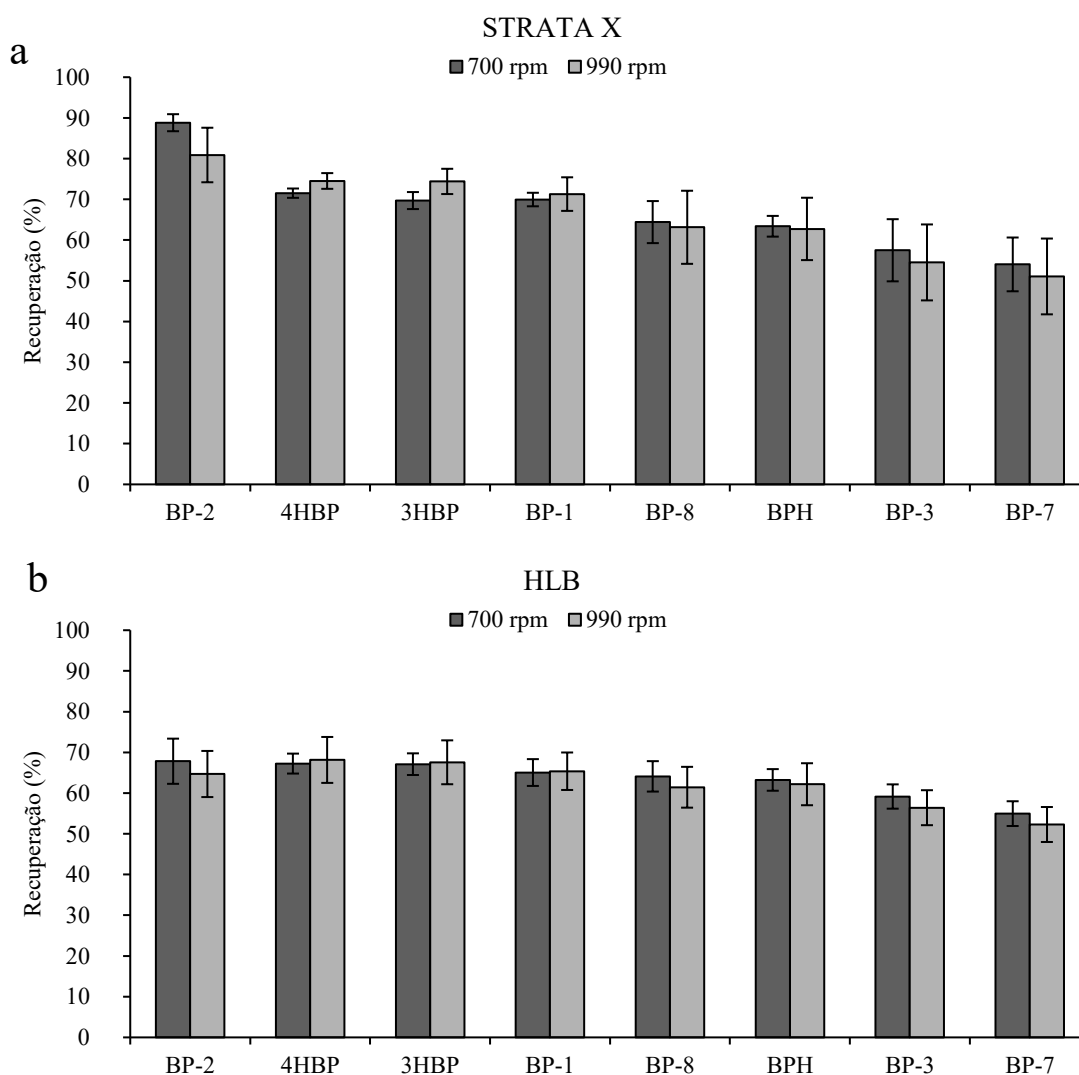


Figura 14. Efeito da velocidade de agitação da microextração na recuperação de benzofenonas por BA μ E- μ LD/HPLC-DAD. Condições: microextração de 16 h; retroextração de 60 minutos em ACN.

3.2.4. Otimização dos efeitos na matriz

A quarta fase da otimização da BA μ E passa pela avaliação de três parâmetros, a influência do pH, da força iônica e do modificador orgânico na matriz. Com os diversos

parâmetros anteriormente otimizados, seguiu-se a otimização tanto para o S-X como para o HLB.

3.2.4.1. Efeito de pH da matriz

Para a otimização do efeito do pH da matriz, foram testados quatro pH diferentes, sendo estes pH 2, 5,5, 8 e 11. O pH da matriz tem uma grande influência na extração, devido ao efeito da ionização dos analitos. Na figura 15 estão representados os resultados obtidos para os polímeros S-X e HLB da otimização do pH.

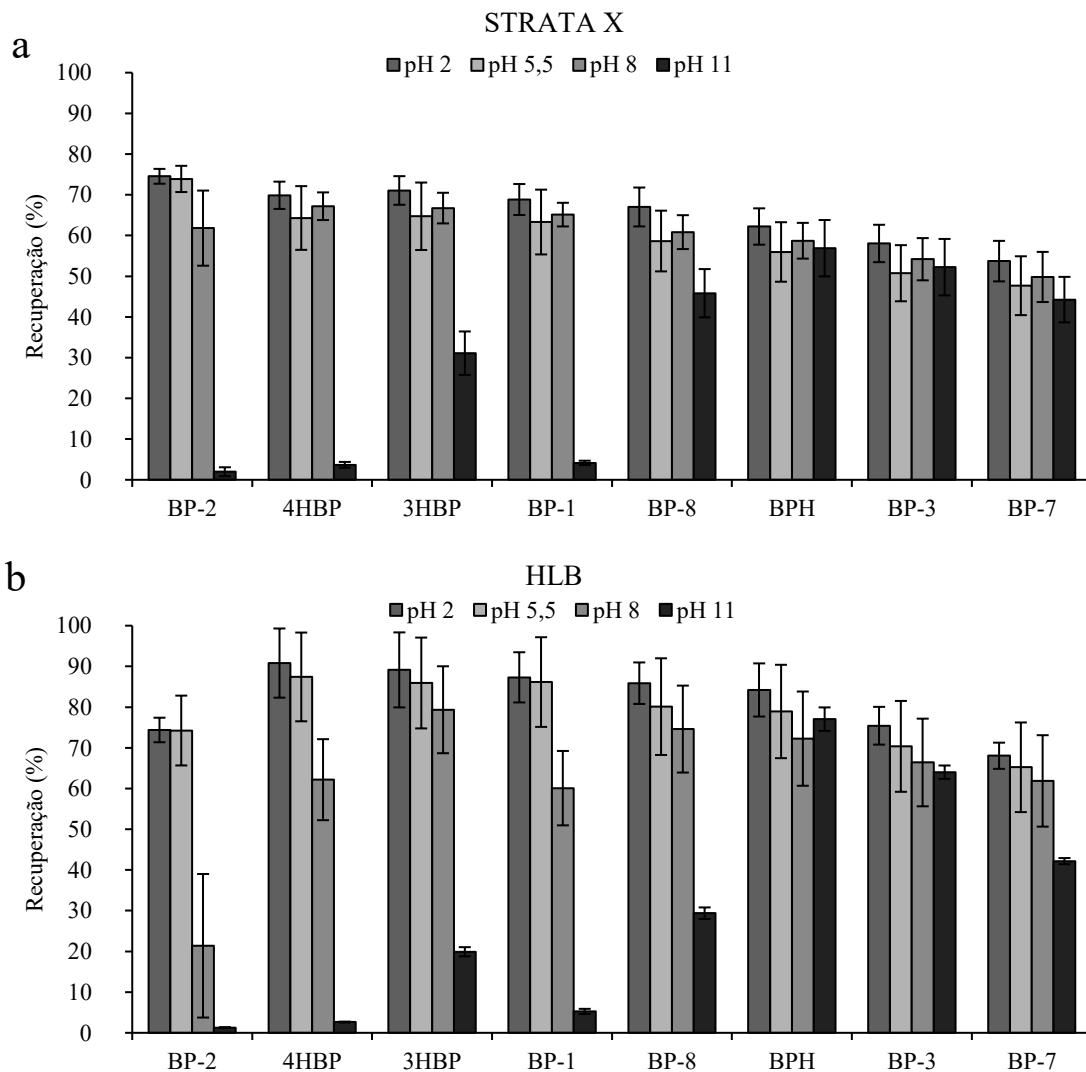


Figura 15. Efeito do pH da matriz na recuperação de benzofenonas por BA μ E- μ LD/HPLC-DAD. Condições: microextração de 16 h a 700 rpm; retroextração de 60 minutos em ACN.

Os resultados apresentados demonstram que a pH 11 para a BP-1, BP-2, BP-8, 3HBP, 4HBP as recuperações foram bastante baixas em comparação com os outros pH. Para todas as benzofenonas, o pH 2 foi o que apresentou melhores resultados.

As benzofenonas em estudo apresentam características básicas ($pK_a > 6,50$), com exceção da BPH que não é ionizável. Portanto, quando mantidas em meio ácido, estas mantem-se na sua forma neutra e quando sujeitas a um meio básico, estas moléculas estão predominantemente com carga negativa, diminuindo assim a recuperação. Após análise dos resultados, seguiu-se com a otimização com o pH 2 na matriz.

3.2.4.2. Efeito da força iônica

Para a otimização do efeito da força iônica foram testadas quatro percentagens de NaCl diferentes, sendo estas de 0, 5, 10 e 15 % (p/v) de NaCl. De forma geral, a adição de um eletrólito forte às amostras aumenta a força iônica e diminui a solubilidade dos compostos orgânicos (*salting-out*), favorecendo assim a migração dos compostos para o sorvente, no entanto este efeito depende muito das propriedades físico-químicas de cada molécula. Na figura 16 estão representados os resultados obtidos para os polímeros S-X e HLB da otimização do efeito da força iônica.

Os resultados apresentados demonstram que no geral, tanto para o S-X como para o HLB, as recuperações com a adição de NaCl, foram inferiores em quase todas as benzofenonas, sendo particularmente acentuado para o HLB. Seguiu-se a otimização da microextração sem a adição de sal.

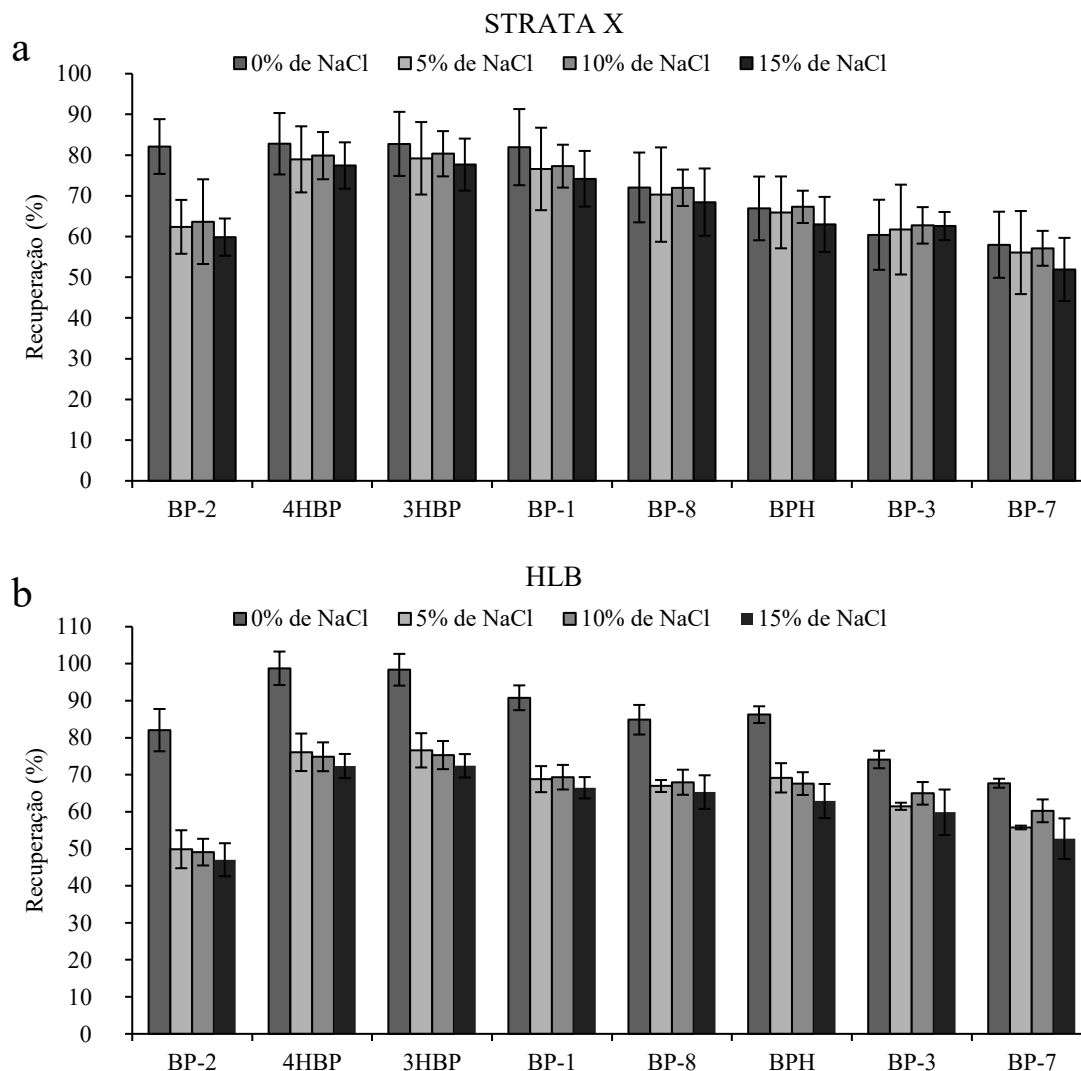


Figura 16. Efeito da força iônica na recuperação de benzofenonas por BA μ E- μ LD/HPLC-DAD. Condições: microextração de 16 h a 700 rpm; retroextração de 60 minutos em ACN.

3.2.4.3. Efeito do modificador orgânico

Para a otimização do efeito da polaridade foram testadas quatro percentagens de MeOH diferentes, sendo estas de 0, 5, 10 e 15 % (v/v) de MeOH. Este parâmetro tem a função de minimizar a possível adsorção dos analitos às paredes do frasco (*wall-effect*) dos analitos mais hidrofóbicos. Contudo, pode também aumentar a solubilidade dos solutos na fase aquosa, diminuindo as recuperações obtidas. Com compostos polares, a adição de MeOH geralmente leva a uma diminuição da recuperação dos analitos. Na figura 17 estão representados os resultados obtidos para os polímeros S-X e HLB da otimização do efeito do modificador orgânico.

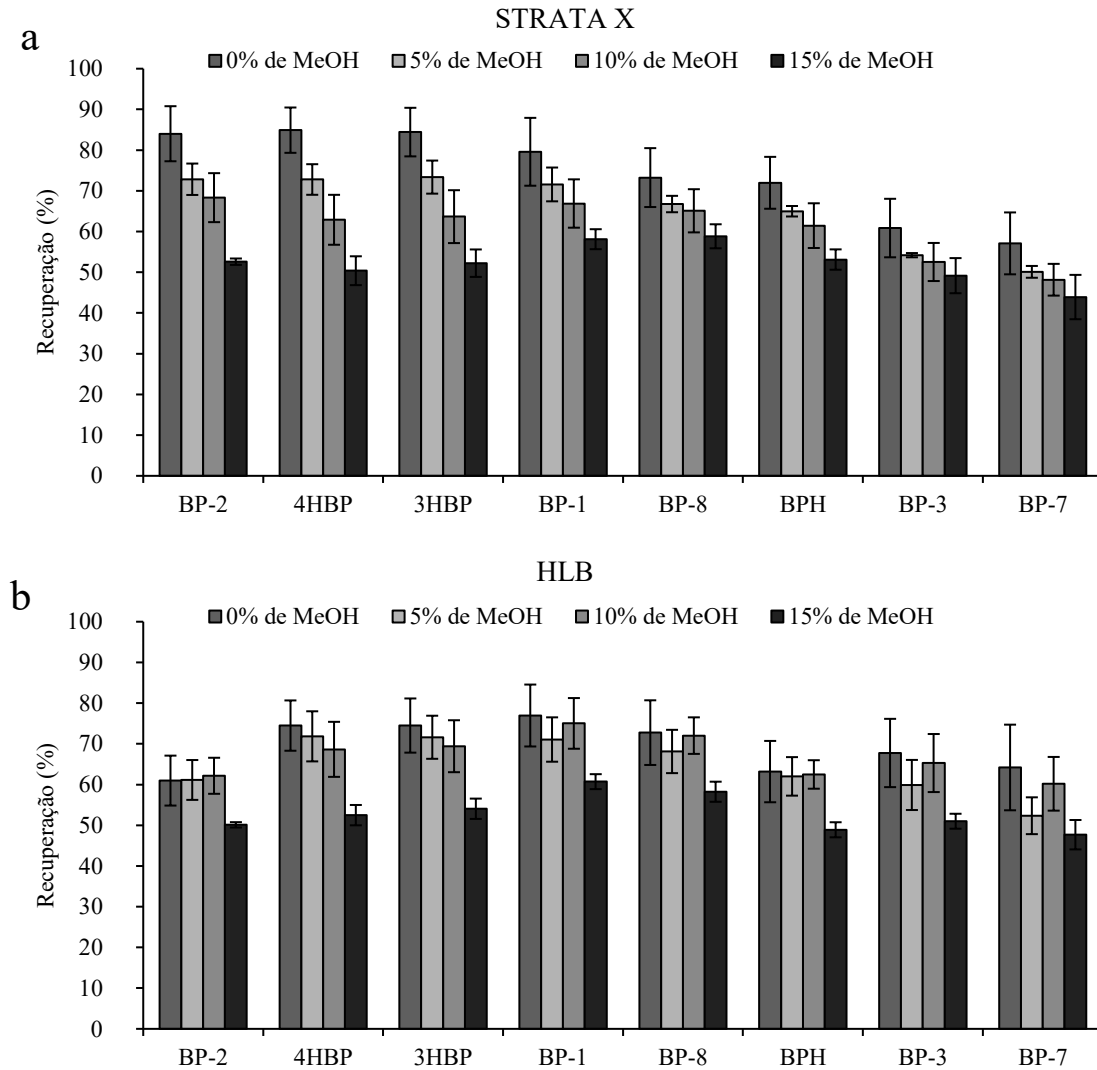


Figura 17. Efeito do modificador orgânico na recuperação de benzofenonas por BA μ E- μ LD/HPLC-DAD. Condições: microextração de 16 h a 700 rpm; retroextração de 60 minutos em ACN.

Os resultados apresentados demonstram que para todas as benzofenonas com o polímero S-X, a adição de MeOH piora as recuperações. No geral, tanto para o S-X como para o HLB, as recuperações foram inferiores em quase todas as benzofenonas, com a adição de MeOH. De acordo com o apresentado, a adição de um modificador orgânico não apresenta vantagens na eficiência do processo de extração.

3.3. Validação do método BA μ E- μ LD/HPLC-DAD

Após estabelecer as condições ótimas para o método em estudo, seguiu-se a validação com os parâmetros otimizados, que se encontram resumidos na tabela 7.

Tabela 7. Parâmetros da BA μ E- μ LD/HPLC-DAD otimizados.

Parâmetros		
Material sorvente	S-X	HLB
Solvente de retroextração	ACN	ACN
Tempo de retroextração	60 minutos	60 minutos
Tempo de extração	16 h	16 h
Rotações de extração	700 rpm	700 rpm
pH	2	2
Força iônica	0 %	0 %
Modificador orgânico	0 %	0 %

A sensibilidade do método foi determinada através do cálculo dos LODs e dos LOQs (tabela 8) segundo a razão S/N 3:1 e 10:1, obtendo valores entre 0,10 a 1,00 $\mu\text{g L}^{-1}$ e de 0,33 a 3,33 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Os limites analíticos determinados para o S-X demonstraram ser mais baixos do que para o HLB, mais especificamente na BP-2, BP-8 e BPH.

Tabela 8. LOD e LOQ obtidos para a BA μ E- μ LD/HPLC-DAD.

Analitos	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)		LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	
	S-X	HLB	S-X	HLB
BP-2	0,50	1,00	1,67	3,33
4HBP	0,20	0,20	0,67	0,67
3HBP	0,30	0,30	1,00	1,00
BP-1	0,40	0,30	1,33	1,00
BP-8	0,40	0,50	1,33	1,67
BPH	0,10	0,20	0,33	0,67
BP-3	0,40	0,40	1,33	1,33
BP-7	0,50	0,50	1,67	1,67

As equações de retas, coeficientes de determinação e as gamas de trabalho encontram-se resumidas na tabela 9.

Tabela 9. Parâmetros estudados para determinar a linearidade.

Analitos	BA μ E(S-X)- μ LD/HPLC-DAD			BA μ E(HLB)- μ LD/HPLC-DAD		
	Gama de trabalho ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Reta de calibração	r^2	Gama de trabalho ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Reta de calibração	r^2
BP-2	3 - 100	$y = 1,1169x - 0,0191$	0,9947	10 - 100	$y = 1,0678x - 4,8788$	0,9990
4HBP	1 - 100	$y = 7,0267x - 0,8366$	0,9980	1 - 100	$y = 6,4929x - 4,5430$	0,9966
3HBP	3 - 100	$y = 6,8779x - 5,9435$	0,9971	3 - 100	$y = 6,2221x - 10,8150$	0,9962
BP-1	3 - 100	$y = 3,9259x - 5,8263$	0,9955	3 - 100	$y = 3,4058x - 4,4090$	0,9952
BP-8	3 - 100	$y = 2,6895x - 5,3605$	0,9944	3 - 100	$y = 2,5433x - 3,7713$	0,9939
BPH	1 - 100	$y = 8,5521x - 20,4460$	0,9928	1 - 100	$y = 7,9680x - 13,0940$	0,9916
BP-3	3 - 100	$y = 3,5624x - 12,0320$	0,9902	3 - 100	$y = 3,6004x - 8,9943$	0,9956
BP-7	3 - 100	$y = 3,1356x - 12,9490$	0,9951	3 - 100	$y = 3,1538x - 12,2490$	0,9947

A partir dos r^2 obtidos, pode verificar-se uma boa linearidade para todas as regressões lineares realizadas, sendo superiores a 0,99. Uma análise da distribuição dos resíduos sugeriu que estes apresentavam uma distribuição aleatória. Esta distribuição sugere assim a presença de homocedasticidade nos dados o que reforça a sua relação linear. Para além da verificação dos r^2 e da dispersão dos resíduos, foi também avaliada a homocedasticidade através da aplicação do teste de *lack-of-fit*, estudando assim a uniformidade da distribuição dos dados. No teste de *lack-of-fit*, os dados experimentais são comparados através do valor tabelado (F_{tab}) com o calculado (F_{cal}), utilizando um nível de confiança (para este caso de 95 %) e conforme os graus de liberdade da distribuição em estudo. A uniformidade é verificada quando $F_{\text{tab}} > F_{\text{cal}}$, o que pode se verificar na tabela 10.

A presente metodologia foi ainda avaliada através de ensaios de repetibilidade (intra-dia, $n = 5$) e precisão intermédia (inter-dia, $n = 15$), a concentrações de 5,0, 40,0 e 100,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ e calculada os respetivos RSDs com um critério de aceitação $< 20\%$ (anexos 2). Os ensaios de repetibilidade e precisão intermédia demonstraram a

eficiência do método, visto que os valores de RSDs foram entre 3,8 a 15 % para o S-X e de 1,7 a 15 % para o HLB.

Tabela 10. Valores correspondentes ao teste *lack-of-fit*, com valores do F_{tab} e do F_{cal} .

Analitos	BA μ E(S-X)- μ LD/HPLC-DAD		BA μ E(HLB)- μ LD/HPLC-DAD	
	F_{tab}	F_{cal}	F_{tab}	F_{cal}
BP-2	2,741	0,008	4,459	0,002
4HBP	2,577	0,006	3,259	0,011
3HBP	2,741	0,010	3,708	0,014
BP-1	2,741	0,025	3,708	0,017
BP-8	2,741	0,027	3,708	0,020
BPH	2,577	0,004	3,259	0,003
BP-3	2,741	0,027	3,708	0,013
BP-7	2,958	0,018	3,708	0,012

3.4. Aplicação do método em amostras reais

De modo a realizar a análise em amostras reais, aplicou-se a metodologia otimizada e validada com recurso ao método SAM, a amostras de água do mar, água de uma praia fluvial, água de uma albufeira artificial, água de uma barragem, água do rio, água do estuário, água para consumo, água residual e duas amostras de cosméticos (protetor solar e um bálsamo labial). Inicialmente, as matrizes em estudo foram fortificadas com quatro níveis de concentração, correspondentes a 20,0, 40,0, 60,0 e 80,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, e ainda um ensaio sem fortificação (ponto zero).

Numa primeira abordagem observou-se a presença das benzofenonas com recurso à comparação dos tempos de retenção. Assim, identificaram-se quatro benzofenonas diferentes nas matrizes estudadas. Na amostra de água de uma barragem detetou-se a BPH, na água do mar, água do estuário, água de uma praia fluvial e de uma albufeira artificial detetaram-se a 4HBP e a BPH e na água residual detetou-se a 4HBP, a 3HBP e a BPH. Enquanto nas amostras de água do rio e água para consumo não foi possível detetar a presença de nenhuma das benzofenonas estudadas. A figura 18 apresenta o cromatograma correspondente a uma amostra residual sem fortificação.

Nas amostras de cosméticos (protetor solar e um bálsamo labial) foram detetadas a BP-3 conforme seria de esperar, uma vez que estava indicada a sua presença na embalagem. A figura 19 apresenta os cromatogramas correspondentes a uma amostra de protetor solar (a) e uma de bálsamo labial (b) sem fortificação.

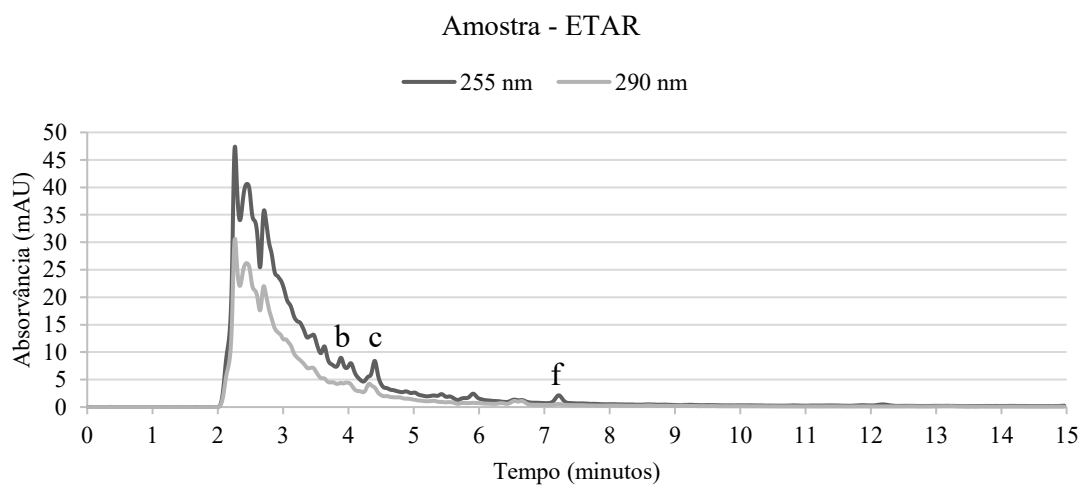


Figura 18. Cromatograma obtido por BA μ E(S-X)- μ LD/HPLC-DAD em água residual não fortificada, sob condições experimentais otimizadas (legenda: b- 4HBP; c- 3HBP; f- BPH).

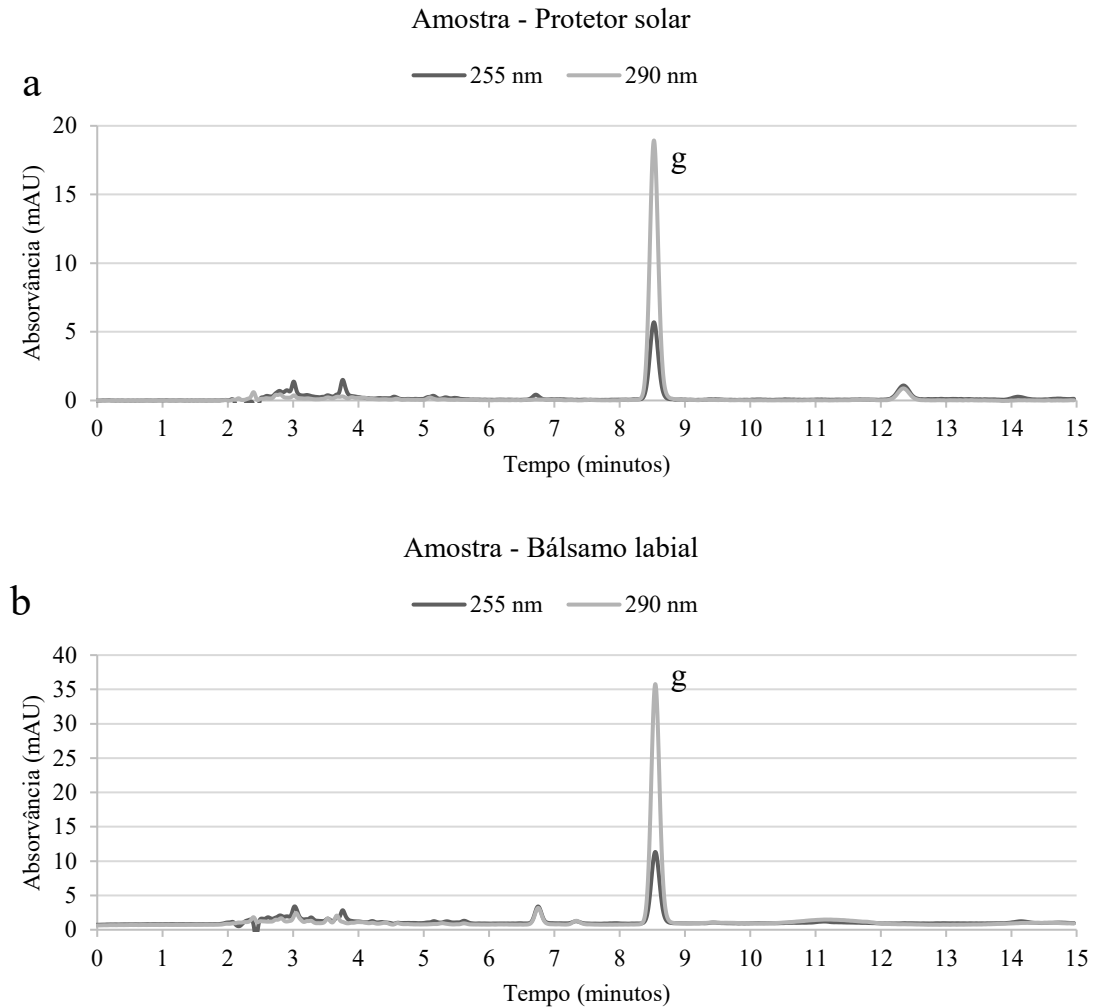


Figura 19. Cromatogramas obtidos por BA μ E(S-X)- μ LD/HPLC-DAD em amostras de cosméticos não fortificadas, sob condições experimentais otimizadas (legenda: g- BP-3).

Com recurso ao SAM, foi possível quantificar a maior parte das benzofenonas identificadas com a exceção da 4HBP na amostra da água do mar e da água do estuário que se encontrava abaixo do LOQ do presente método. Na determinação da BP-3 nos cosméticos, foi possível verificar um valor de $7,23 \pm 0,60$ % para o protetor solar e $1,81 \pm 0,15$ % para o para o bálsamo labial, respetivamente. Considerando as percentagens observadas, a percentagem presente no protetor solar, não está em conformidade com o Regulamento (UE) 2017/238, de 10 de fevereiro, ultrapassando os 6 % permitidos, no entanto, o bálsamo labial apresentar estar em conformidade com esse mesmo regulamento. As concentrações determinadas encontram-se na tabela 11.

Tabela 11. Concentrações das benzofenonas determinadas por BA μ E(S-X)- μ LD/HPLC-DAD.

Amostras	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)			
	4HBP	3HBP	BPH	BP-3
Água de uma barragem	< LOD	< LOD	$0,68 \pm 0,73$	< LOD
Água do mar	< LOQ	< LOD	$1,57 \pm 1,74$	< LOD
Água do estuário	< LOQ	< LOD	$1,59 \pm 2,18$	< LOD
Água de uma praia fluvial	$0,87 \pm 2,77$	< LOD	$0,92 \pm 1,24$	< LOD
Água de uma albufeira artificial	$1,73 \pm 1,30$	< LOD	$1,57 \pm 3,49$	< LOD
Água residual	$2,52 \pm 2,36$	$7,85 \pm 2,42$	$2,34 \pm 1,14$	< LOD
Água do rio	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Água para consumo	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Protetor solar	< LOD	< LOD	< LOD	$72,33 \pm 6,02^a$
Bálsamo labial	< LOD	< LOD	< LOD	$18,13 \pm 1,46^a$

a) $\mu\text{g mg}^{-1}$

4. Conclusões e Perspetivas futuras

O presente trabalho propõe o desenvolvimento, otimização, validação e aplicação da metodologia BA μ E- μ LD/HPLC-DAD para a determinação de oito benzofenonas, a BPH, a BP-1, a BP-2, a BP-3, a BP-7, a BP-8, a 3HBP e a 4HBP em matrizes ambientais e produtos cosméticos. Esta abordagem foi desenvolvida para a monitorização destes contaminantes emergentes ambientais de modo a combater as ameaças destas substâncias no ecossistema, demonstrando ser uma metodologia bastante adequada, empregando os princípios da GAC, e, para além de ser simples e fácil de manipular, é de baixo custo, com um ótimo desempenho associado à sensibilidade e seletividade.

O desenvolvimento da metodologia consistiu na otimização de parâmetros tais como a seleção da fase sorvente dos dispositivos BA μ E, o solvente de retroextração, o tempo de retroextração, o tempo de extração, a velocidade de agitação, o pH da matriz, a força iónica e o modificador orgânico. As condições otimizadas foram de 16 horas de extração a 700 rpm e pH 2 seguida de retroextração com ACN durante 1 hora sob tratamento ultrassónico para os sorventes S-X e HLB.

A validação da metodologia realizou-se igualmente para ambos os polímeros nas condições otimizadas. Para o polímero S-X, os LODs foram entre 0,10 e 0,50 $\mu\text{g L}^{-1}$ e os LOQs foram entre 0,33 e 1,67 $\mu\text{g L}^{-1}$, enquanto para o polímero HLB, os LODs foram entre 0,20 e 1,00 $\mu\text{g L}^{-1}$ e os LOQs foram entre 0,67 e 3,33 $\mu\text{g L}^{-1}$. As gamas de trabalho para o S-X foram entre 1,00 e 100,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a 4HBP e para a BPH e entre 3,0 e 100,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a BP-2, 3HBP, BP-1, BP-8, BP-3 e BP-7. No caso das gamas de trabalho para o HLB, estas foram compreendidas entre 1,0 e 100,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a 4HBP e para a BPH, entre 3,0 e 100,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a 3HBP, BP-1, BP-8, BP-3 e BP-7 e entre 10,0 e 100,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a BP-2, observando-se uma boa linearidade com ambos os polímeros ($r^2 > 0,99$). As recuperações observadas foram entre 50 e 85 % com RSDs \leq 15%.

A metodologia otimizada e validada foi aplicada a diversas matrizes (água do mar, água de uma praia fluvial, água de uma albufeira artificial, água de uma barragem, água do estuário, água residual, água do rio, água para consumo e amostras de cosméticos (protetor solar e um bálsamo labial). Nas amostras, foi possível detetar a existência de diversas benzofenonas, nomeadamente da BPH em água do mar, da praia fluvial, da albufeira artificial, da barragem, do estuário e residual, da 4HBP em água do

mar, água da praia fluvial, da albufeira artificial, do estuário e residual, enquanto a presença da 3HBP apenas foi detetada na água residual. Para as amostras de cosmético, confirmou-se a existência da BP-3 em ambas as amostras estudadas, no entanto para a amostra do protetor solar determinou-se um valor de $7,23 \pm 0,60$ %, ligeiramente acima do estipulado pela norma da UE (≤ 6 %), enquanto para a amostra do bálsamo o valor determinado ($1,81 \pm 0,15$ %) encontrava-se em conformidade (< 2 %).

Para trabalhos futuros, poderia recorrer a utilização de um desenho experimental diferente do aplicado (OVAT), como o *Central Composite design* ou o *Box-Behnken Design*, para determinar possíveis interações entre os parâmetros. A utilização de uma instrumentação diferente como LC-MS de modo a tentar baixar os limites de deteção e quantificação seria também uma hipótese. A adição de novas benzofenonas ao estudo poderá ser também uma alternativa a considerar. Dado a presença das benzofenonas detetadas nas amostras ambientais estudadas, uma monitorização mais prolongada nesses locais e/ou até expandir a zona da amostragem seria de todo um trabalho de interesse para controlo dessas substâncias.

5. Referências bibliográficas

- Ahmad, S. M., Almeida, C., Neng, N. R., & Nogueira, J. M. F. (2014). Application of bar adsorptive microextraction (BA μ E) for anti-doping control screening of anabolic steroids in urine matrices. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 969, 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.07.040>
- Ahmad, Samir M., Calado, B. B. C., Oliveira, M. N., Neng, N. R., & Nogueira, J. M. F. (2020). Bar adsorptive microextraction coated with carbonbased phase mixtures for performance-enhancement to monitor selected benzotriazoles, benzothiazoles, and benzenesulfonamides in environmental water matrices. *Molecules*, 25(9), 1–13. <https://doi.org/10.3390/molecules25092133>
- Ahmad, Samir M., Ide, A. H., Neng, N. R., & Nogueira, J. M. F. (2017). Application of bar adsorptive microextraction to determine trace organic micro-pollutants in environmental water matrices. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 97(5), 484–498. <https://doi.org/10.1080/03067319.2017.1324024>
- Almeida, C., & Nogueira, J. M. F. (2014). Determination of trace levels of parabens in real matrices by bar adsorptive microextraction using selective sorbent phases. *Journal of Chromatography A*, 1348, 17–26. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.04.057>
- Almeida, C., Stepkowska, A., Alegre, A., & Nogueira, J. M. F. (2013). Determination of trace levels of benzophenone-type ultra-violet filters in real matrices by bar adsorptive micro-extraction using selective sorbent phases. *Journal of Chromatography A*, 1311, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.08.007>
- Anadón, A., Bell, D., Binderup, M., Bursch, W., Castle, L., Engel, K., ... Wölfle, D. (2009). Scientific Opinion of EFSA prepared by the Panel on food contact materials, enzymes, flavourings and processing aids (CEF) on Toxicological evaluation of benzophenone. *The EFSA Journal*, (1104), 1–30.
- Arthur, C. L., & Pawliszyn, J. (1990). Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers. *Analytical Chemistry*, 62(19), 2145–2148. <https://doi.org/10.1021/ac00218a019>
- Assembleia da República. (2005). Lei n.o 58/2005. *Diário Da República — I Série - A N.º 249 - 29 de Dezembro de 2005*, 249, 7280–7310.

- Baltussen, E., Sandra, P., David, F., & Cramers, C. (1999). Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: Theory and principles. *Journal of Microcolumn Separations*, 11(10), 737–747. Retrieved from [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1520-667X\(1999\)11:10%3C737::AID-MCS7%3E3.0.CO;2-4](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1520-667X(1999)11:10%3C737::AID-MCS7%3E3.0.CO;2-4)
- Çabuk, H., & Kavaracı, O. (2020). Magnetic retrieval of a switchable hydrophilicity solvent: fast homogeneous liquid–liquid microextraction for the determination of benzophenone-type UV filters in environmental waters. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 00(00), 1–17. <https://doi.org/10.1080/03067319.2020.1757088>
- Cadena-Aizaga, M. I., Montesdeoca-Esponda, S., Sosa-Ferrera, Z., & Santana-Rodríguez, J. J. (2022). Occurrence and environmental hazard of organic UV filters in seawater and wastewater from Gran Canaria Island (Canary Islands, Spain). *Environmental Pollution*, 300. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.118843>
- Cadena-Aizaga, M. I., Montesdeoca-Esponda, S., Torres-Padrón, M. E., Sosa-Ferrera, Z., & Santana-Rodríguez, J. J. (2020). Organic UV filters in marine environments: An update of analytical methodologies, occurrence and distribution. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, 25. <https://doi.org/10.1016/j.teac.2019.e00079>
- Chávez-Moreno, C. A., Hinojosa-Reyes, L., Ruiz-Ruiz, E. J., Hernández-Ramírez, A., & Guzmán-Mar, J. L. (2018). Optimization of solid-phase extraction of parabens and benzophenones in water samples using a combination of Plakett-Burman and Box-Behnken designs. *Journal of Separation Science*, 41(24), 4488–4497. <https://doi.org/10.1002/jssc.201800796>
- Christian, G. D., Dasgupta, P. K. (Sandy), & Schug, K. A. (1967). Analytical chemistry. *Journal of Chemical Education* (7.^a ed, Vol. 63). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1021/ed063pa277.3>
- Comissão Europeia. (2012). REGULAMENTO DE EXECUÇÃO (UE) N. o 872/2012 DA COMISSÃO de 1 de outubro de 2012. *Jornal Oficial Da União Europeia*, 267, 1–161.
- Comissão Europeia. (2017). Regulamento (UE) 2017/238 da Comissão de 10 de

- fevereiro de 2017. *Jornal Oficial Da União Europeia*, 36, 37–38.
- Comissão Europeia. (2018). *RELATÓRIO DA COMISSÃO AO PARLAMENTO EUROPEU E AO CONSELHO Revisão do Regulamento (CE) n.º 1223/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho relativo aos produtos cosméticos no que respeita às substâncias com propriedades desreguladoras*.
- Comissão Europeia. (2019). DECISÃO (UE) 2019/701 DA COMISSÃO de 5 de abril de 2019. *Jornal Oficial Da União Europeia*, 121, 1–370.
- Comissão Europeia. (2021). DECISÃO (UE) 2021/1870 DA COMISSÃO de 22 de outubro de 2021. *Jornal Oficial Da União Europeia*, 379, 8–48.
- Comissão Europeia. (2022). DECISÃO DE EXECUÇÃO (UE) 2022/1307 DA COMISSÃO de 22 de julho de 2022. *Jornal Oficial Da União Europeia*, 197, 117–121.
- Downs, C. A., Kramarsky-Winter, E., Segal, R., Fauth, J., Knutson, S., Bronstein, O., ... Loya, Y. (2016). Toxicopathological Effects of the Sunscreen UV Filter, Oxybenzone (Benzophenone-3), on Coral Planulae and Cultured Primary Cells and Its Environmental Contamination in Hawaii and the U.S. Virgin Islands. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 70(2), 265–288. <https://doi.org/10.1007/s00244-015-0227-7>
- EPAL. (2022). Ciclos da Água. Retrieved October 20, 2022, from <https://www.epal.pt/EPAL/homepage>
- Fanali, S., Haddad, P., Poole, C., Schoenmakers, P., & Lloyd, D. (2013). Liquid Chromatography: Fundamentals and Instrumentation. *Syria Studies* (Vol. 7). Amsterdam: Elsevier.
- Fent, K., Zenker, A., & Rapp, M. (2010). Widespread occurrence of estrogenic UV-filters in aquatic ecosystems in Switzerland. *Environmental Pollution*, 158(5), 1817–1824. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.11.005>
- González-Rubio, S., Vike-Jonas, K., Gonzalez, S. V., Ballesteros-Gómez, A., Sonne, C., Dietz, R., ... Asimakopoulos, A. G. (2020). Bioaccumulation potential of bisphenols and benzophenone UV filters: A multiresidue approach in raptor tissues. *Science of the Total Environment*, 741. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140330>

- Guo, Q., Wei, D., Zhao, H., & Du, Y. (2020). Predicted no-effect concentrations determination and ecological risk assessment for benzophenone-type UV filters in aquatic environment. *Environmental Pollution*, 256, 113460. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113460>
- Harris, D. C. (2007). Quantitative Chemical Analysis. *Methods in Geochemistry and Geophysics* (7^a ed). New York, NY: Craig Bleyer. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-40826-6.50009-1>
- Huang, Y., Law, J. C. F., Lam, T. K., & Leung, K. S. Y. (2021). Risks of organic UV filters: a review of environmental and human health concern studies. *Science of the Total Environment*, 755, 142486. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142486>
- Ide, A. H., & Nogueira, J. M. F. (2018). New-generation bar adsorptive microextraction (BA μ E) devices for a better eco-user-friendly analytical approach—Application for the determination of antidepressant pharmaceuticals in biological fluids. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 153, 126–134. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.02.001>
- Kawaguchi, M., Ito, R., Honda, H., Endo, N., Okanouchi, N., Saito, K., ... Nakazawa, H. (2008). Simultaneous analysis of benzophenone sunscreen compounds in water sample by stir bar sorptive extraction with in situ derivatization and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1200(2), 260–263. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.05.084>
- Kim, S., & Choi, K. (2014). Occurrences, toxicities, and ecological risks of benzophenone-3, a common component of organic sunscreen products: A mini-review. *Environment International*, 70, 143–157. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.05.015>
- Labille, J., Slomberg, D., Catalano, R., Robert, S., Apers-Tremelo, M. L., Boudenne, J. L., ... Radakovitch, O. (2020). Assessing UV filter inputs into beach waters during recreational activity: A field study of three French Mediterranean beaches from consumer survey to water analysis. *Science of the Total Environment*, 706. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136010>
- Lee, S. H., Xiong, J. Q., Ru, S., Patil, S. M., Kurade, M. B., Govindwar, S. P., ... Jeon, B. H. (2020). Toxicity of benzophenone-3 and its biodegradation in a freshwater microalga *Scenedesmus obliquus*. *Journal of Hazardous Materials*, 389(November

- 2019), 122149. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122149>
- Li, Z. M., & Kannan, K. (2022). Comprehensive Survey of 14 Benzophenone UV Filters in Sunscreen Products Marketed in the United States: Implications for Human Exposure. *Environmental Science and Technology*. <https://doi.org/10.1021/acs.est.2c03885>
- Mitra, S. (2003). *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry. Methodology*. New Jersey: JOHN WILEY & SONS , INC.
- Nejumaal, K. K., Sreejith, M. V., Dineep, D., Aravind, U. K., & Aravindakumar, C. T. (2021). Identification and Ecological Hazard Analysis of Contaminants of Emerging Concerns (CECs) in Water Bodies Located in a Coastal Metropolitan Environment. *Water, Air, and Soil Pollution*, 232(10). <https://doi.org/10.1007/s11270-021-05374-y>
- Neng, N. R., Silva, A. R. M., & Nogueira, J. M. F. (2010). Adsorptive micro-extraction techniques—Novel analytical tools for trace levels of polar solutes in aqueous media. *Journal of Chromatography A*, 1217(47), 7303–7310. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.09.048>
- Nogueira, J. M.F. (2012). Novel sorption-based methodologies for static microextraction analysis: A review on SBSE and related techniques. *Analytica Chimica Acta*, 757, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.10.033>
- Nogueira, José M.F. (2015). Stir-bar sorptive extraction: 15 years making sample preparation more environment-friendly. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 71, 214–223. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.05.002>
- O'Malley, E., McLachlan, M. S., O'Brien, J. W., Verhagen, R., & Mueller, J. F. (2021). The presence of selected UV filters in a freshwater recreational reservoir and fate in controlled experiments. *Science of the Total Environment*, 754, 142373. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142373>
- O'Malley, E., O'Brien, J. W., Verhagen, R., & Mueller, J. F. (2020). Annual release of selected UV filters via effluent from wastewater treatment plants in Australia. *Chemosphere*, 247, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.125887>
- Oliveira, M. N., Gonçalves, O. C., Ahmad, S. M., Schneider, J. K., Krause, L. C., Neng, N. R., ... Nogueira, J. M. F. (2021). Application of bar adsorptive microextraction

- for the determination of levels of tricyclic antidepressants in urine samples. *Molecules*, 26(11). <https://doi.org/10.3390/molecules26113101>
- Parlamento Europeu e o Conselho da União Europeia. (2013). DIRECTIVA 2008/105/CE DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO de 16 de Dezembro de 2008. *Jornal Oficial Da União Europeia*, 226, 1–27.
- Pintado-Herrera, M. G., Allan, I. J., González-Mazo, E., & Lara-Martín, P. A. (2020). Passive Samplers vs Sentinel Organisms: One-Year Monitoring of Priority and Emerging Contaminants in Coastal Waters. *Environmental Science and Technology*, 54(11), 6693–6702. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c00522>
- Richardson, S. D., & Ternes, T. A. (2022). Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues. *Analytical Chemistry*, 94(1), 382–416. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c04640>
- Rodríguez-Escales, P., & Sanchez-Vila, X. (2020). Modeling the fate of UV filters in subsurface: Co-metabolic degradation and the role of biomass in sorption processes. *Water Research*, 168, 115192. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.115192>
- Sánchez Rodríguez, A., Rodrigo Sanz, M., & Betancort Rodríguez, J. R. (2015). Occurrence of eight UV filters in beaches of Gran Canaria (Canary Islands). An approach to environmental risk assessment. *Chemosphere*, 131, 85–90. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.02.054>
- Seoane, M., Cid, Á., Herrero, C., & Esperanza, M. (2021). Comparative acute toxicity of benzophenone derivatives and bisphenol analogues in the Asian clam *Corbicula fluminea*. *Ecotoxicology*, 30(1), 142–153. <https://doi.org/10.1007/s10646-020-02299-w>
- Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2007). Principles of Instrumental Analysis. *Brooks/Cole* (6^a ed). Belmont: Brooks/Cole. <https://doi.org/10.1109/ACSSC.2017.8335505>
- Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2014). Fundamentals of Analytical Chemistry. *Brooks/Cole* (9^a ed). Belmont: Brooks/Cole.
- Vandergrift, G. W. G. A. of T.-L. B.-3 in a F.-B. R. U. D. M. S., Lattanzio-Battle, W., Rodgers, T. R., Atkinson, J. B., Krogh, E. T., & Gill, C. G. (2022). Geospatial

- Assessment of Trace-Level Benzophenone-3 in a Fish-Bearing River Using Direct Mass Spectrometry. *ACS Environmental Science and Technology Water*, 2(2), 262–267. <https://doi.org/10.1021/acsestwater.1c00205>
- Vila, M., Celeiro, M., Lamas, J. P., Dagnac, T., Llompart, M., & Garcia-Jares, C. (2016). Determination of fourteen UV filters in bathing water by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical Methods*, 8(39), 7069–7079. <https://doi.org/10.1039/c6ay01787h>
- Wang, W., & Kannan, K. (2017). Mass loading and emission of benzophenone-3 (BP-3) and its derivatives in wastewater treatment plants in New York State, USA. *Science of the Total Environment*, 579, 1316–1322. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.11.124>

Anexos

1. Cálculos efetuados

A determinação da média (\bar{x}), desvio padrão (σ) e a aplicação do método dos mínimos quadrados (linearização) foram efetuados com recurso às funções pré-definidas no *software Microsoft Excel*.

De forma a determinar a dispersão dos resultados, assim como a repetibilidade e a precisão intermédia na validação da metodologia, recorreu-se à determinação do RSD através da seguinte expressão:

$$RSD = \frac{\sigma}{\bar{x}} \times 100 \quad (6)$$

A recuperação foi determinada através da seguinte expressão:

$$Recuperação = \frac{\text{Área do pico Amostra}}{\text{Área do pico Padrão}} \times 100 \quad (7)$$

O teste de *lack-of-fit* foi realizado através da seguinte expressão:

$$F = \frac{MSS_{LoF}}{MSS_{erro}} = \frac{\sum(\bar{y}_i - \hat{y}_i)^2 / (n-2)}{\sum(y_i - \bar{y}_i)^2 / n(p-1)} \quad (8)$$

Onde y_i é o valor do sinal na concentração i ; \bar{y}_i é o valor médio do sinal dos replicados na concentração i ; \hat{y}_i é o valor do sinal na concentração i , sendo calculada a partir da reta de calibração; n o número de concentrações diferentes na reta de calibração e p número de replicados por cada concentração diferente na curva de calibração.

2. Repetibilidade e Precisão intermédia - Validação do método

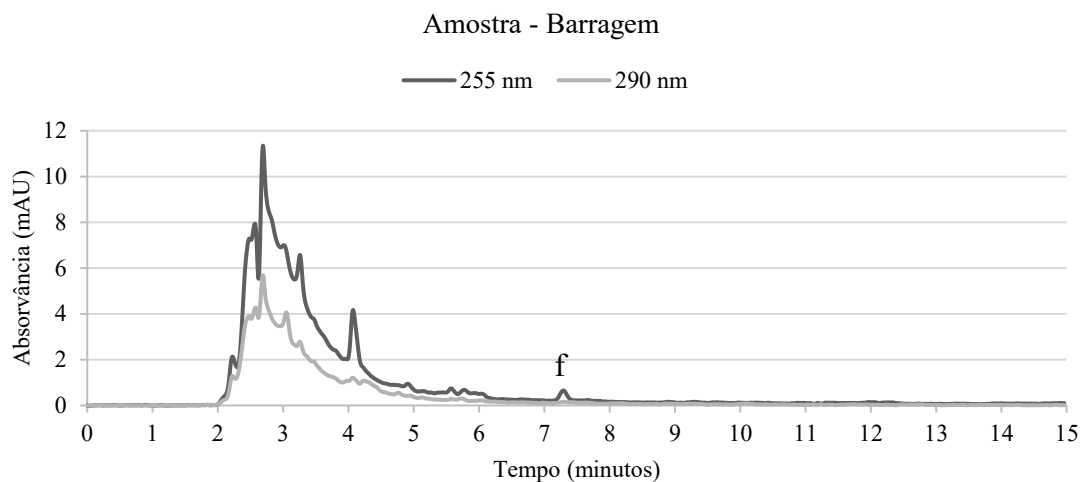
Valores da precisão intermédia e da repetibilidade para o método BA μ E(S-X)- μ LD/HPLC-DAD.

Analitos	Nível de fortificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)			
		Repetibilidade ($n = 5$) (RSD, %)		Precisão intermédia ($n = 15$) (RSD, %)	
BP-2	5	82	$\pm 6,1$	76	$\pm 8,1$
	40	69	$\pm 7,3$	66	$\pm 9,4$
	100	57	$\pm 8,8$	53	$\pm 9,1$
4HBP	5	79	$\pm 6,2$	78	$\pm 9,1$
	40	70	$\pm 3,9$	72	$\pm 5,5$
	100	65	$\pm 9,6$	62	$\pm 8,4$
3HBP	5	76	$\pm 6,6$	75	$\pm 9,8$
	40	69	$\pm 4,5$	70	$\pm 6,0$
	100	66	$\pm 9,9$	62	$\pm 9,1$
BP-1	5	70	$\pm 7,5$	70	$\pm 10,9$
	40	66	$\pm 3,9$	67	$\pm 7,0$
	100	65	$\pm 11,1$	60	$\pm 11,6$
BP-8	5	72	$\pm 9,9$	71	$\pm 11,6$
	40	67	$\pm 3,9$	67	$\pm 8,1$
	100	66	$\pm 11,6$	59	$\pm 13,7$
BPH	5	76	$\pm 10,2$	74	$\pm 12,0$
	40	67	$\pm 3,8$	66	$\pm 6,9$
	100	62	$\pm 11,8$	57	$\pm 12,2$
BP-3	5	61	$\pm 11,4$	61	$\pm 13,5$
	40	58	$\pm 8,6$	58	$\pm 10,9$
	100	58	$\pm 10,8$	53	$\pm 14,8$
BP-7	5	60	$\pm 8,9$	58	$\pm 13,0$
	40	60	$\pm 7,4$	57	$\pm 9,9$
	100	54	$\pm 15,0$	52	$\pm 14,3$

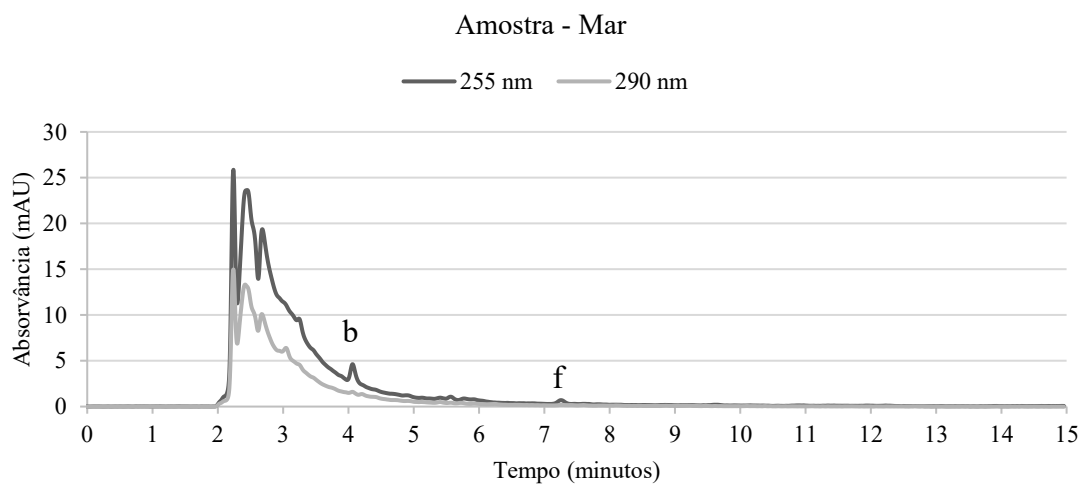
Valores da precisão intermédia e da repetibilidade para o método BA μ E(HLB)- μ LD/HPLC-DAD.

Analitos	Nível de fortificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)			
		Repetibilidade ($n = 5$) (RSD, %)		Precisão intermédia ($n = 15$) (RSD, %)	
BP-2	5	83	$\pm 8,5$	71	$\pm 15,0$
	40	60	$\pm 5,8$	56	$\pm 9,4$
	100	50	$\pm 4,2$	51	$\pm 9,8$
4HBP	5	85	$\pm 1,7$	74	$\pm 12,6$
	40	71	$\pm 6,8$	67	$\pm 7,8$
	100	59	$\pm 7,0$	61	$\pm 8,1$
3HBP	5	80	$\pm 2,8$	70	$\pm 11,9$
	40	68	$\pm 7,0$	65	$\pm 8,2$
	100	58	$\pm 6,1$	59	$\pm 8,0$
BP-1	5	70	$\pm 7,4$	62	$\pm 13,0$
	40	62	$\pm 8,5$	59	$\pm 9,9$
	100	52	$\pm 13,5$	55	$\pm 11,5$
BP-8	5	70	$\pm 8,1$	64	$\pm 12,3$
	40	62	$\pm 8,0$	59	$\pm 11,0$
	100	57	$\pm 6,5$	57	$\pm 8,8$
BPH	5	80	$\pm 13,1$	71	$\pm 14,3$
	40	60	$\pm 4,2$	60	$\pm 7,6$
	100	58	$\pm 4,5$	57	$\pm 8,3$
BP-3	5	64	$\pm 8,0$	60	$\pm 11,7$
	40	55	$\pm 7,6$	53	$\pm 12,3$
	100	54	$\pm 8,7$	53	$\pm 9,9$
BP-7	5	60	$\pm 10,3$	57	$\pm 11,5$
	40	51	$\pm 9,5$	51	$\pm 13,6$
	100	56	$\pm 8,9$	53	$\pm 9,6$

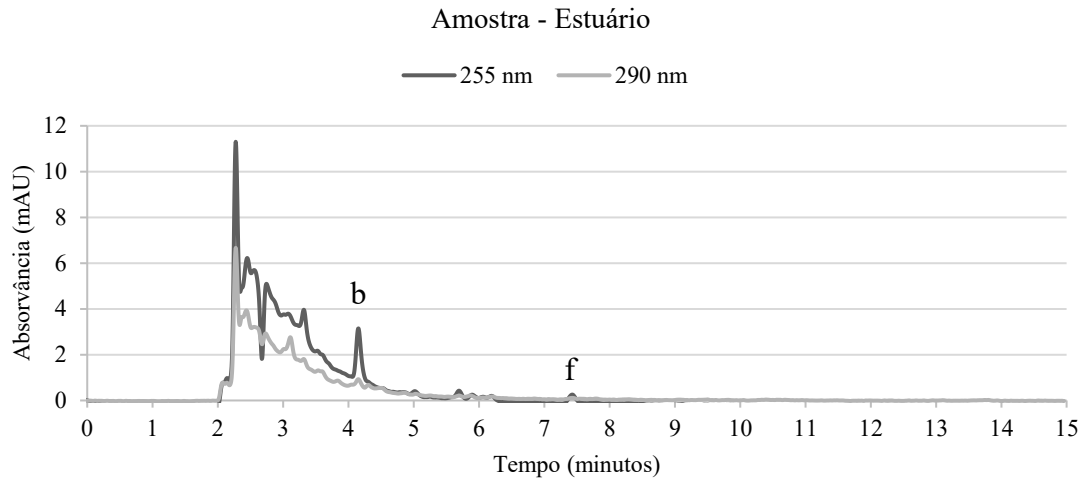
3. Cromatogramas das amostras – Aplicação em amostras reais



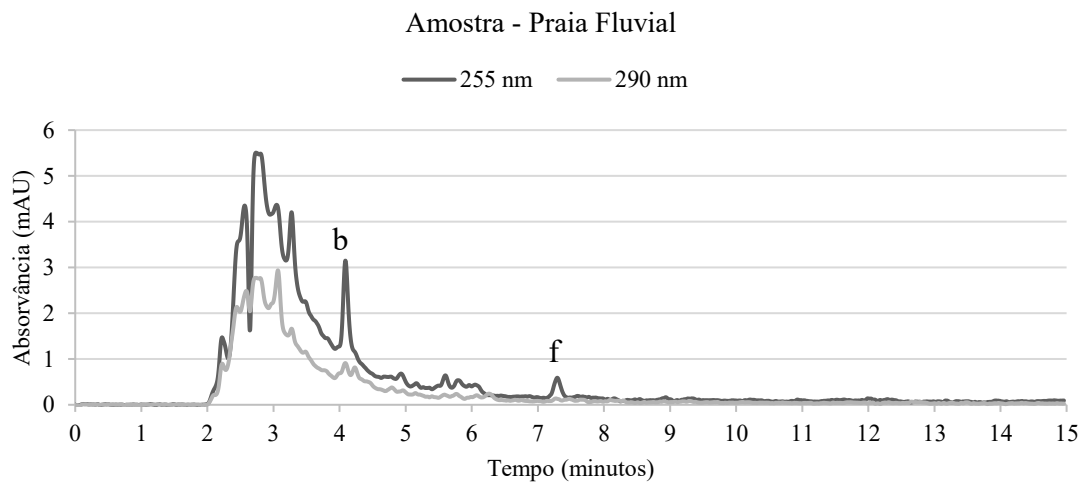
Cromatograma obtido por BA μ E(S-X)- μ LD/HPLC-DAD em água de uma barragem não fortificada, sob condições experimentais otimizadas (legenda: f- BPH).



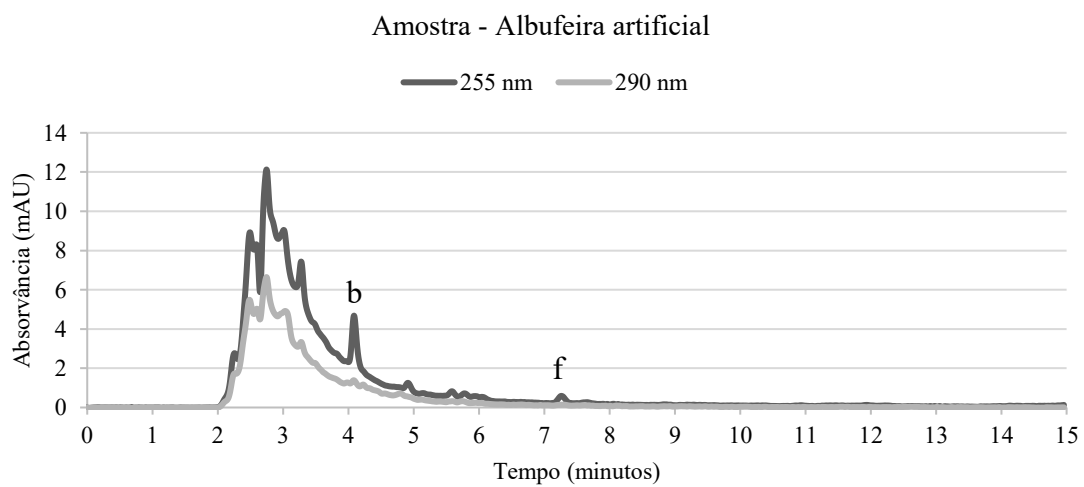
Cromatograma obtido por BA μ E(S-X)- μ LD/HPLC-DAD em água do mar não fortificada, sob condições experimentais otimizadas (legenda: b- 4HBP; f- BPH).



Cromatograma obtido por BA μ E(S-X)- μ LD/HPLC-DAD em água do estuário não fortificada, sob condições experimentais otimizadas (legenda: b- 4HBP; f- BPH).

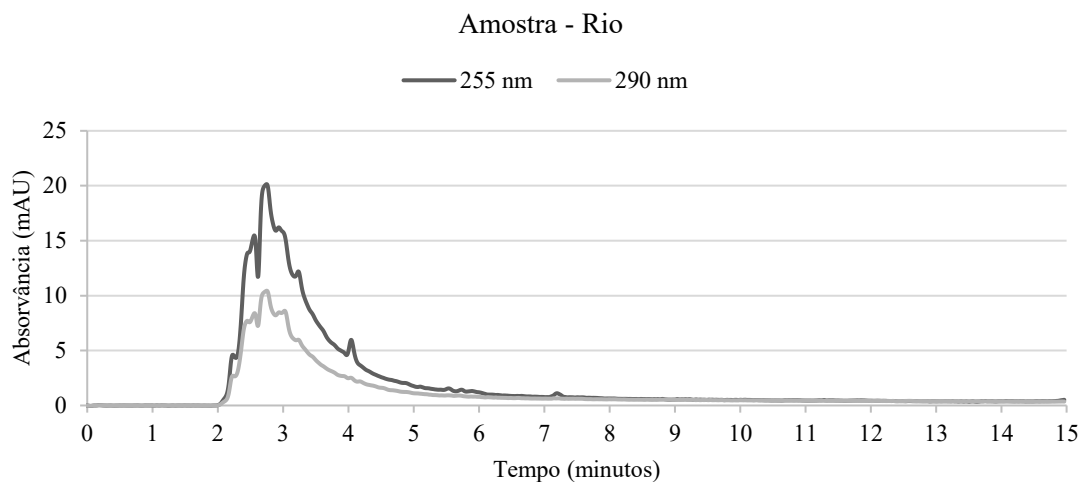


Cromatograma obtido por BA μ E(S-X)- μ LD/HPLC-DAD em água de uma praia fluvial não fortificada, sob condições experimentais otimizadas (legenda: b- 4HBP; f- BPH).

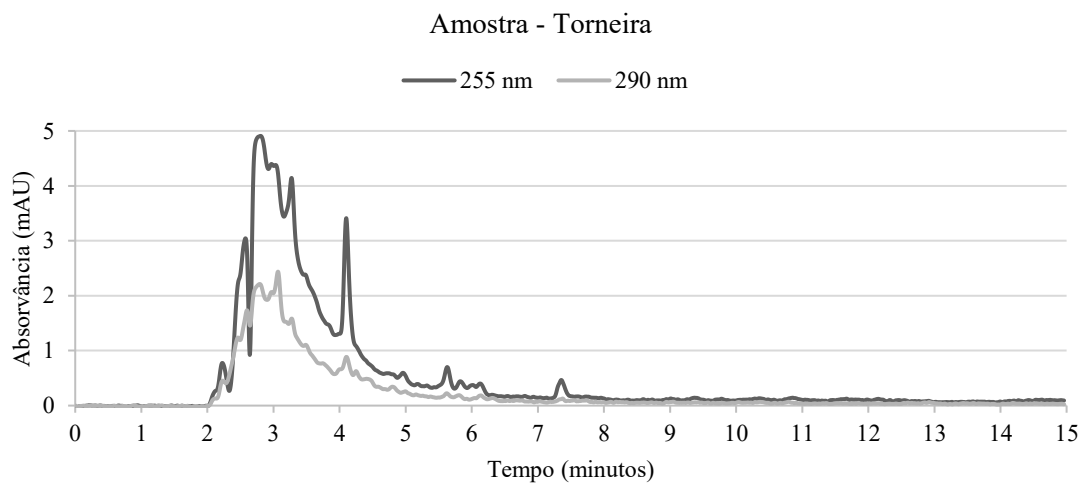


Cromatograma obtido por BA μ E(S-X)- μ LD/HPLC-DAD em água de uma albufeira artificial não fortificada, sob condições experimentais otimizadas (legenda: b- 4HBP; f- BPH).

Determinação de benzofenonas em matrizes ambientais por microextração adsorativa em barra seguida de análise por métodos cromatográficos



Cromatograma obtidos por BA μ E(S-X)- μ LD/HPLC-DAD em água do rio não fortificada, sob condições experimentais otimizadas.



Cromatogramas obtidos por BA μ E(S-X)- μ LD/HPLC-DAD em água para consumo não fortificada, sob condições experimentais otimizadas.

