UNESP- UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Campus de Araraquara

Programa de Pós- Graduação em Química

Parabenos em água superficial: estudo analítico e aplicação em amostras ambientais

MILENA FONTES LUIZETE

Dissertação de Mestrado 2013

MILENA FONTES LUIZETE

Parabenos em água superficial: estudo analítico e aplicação em amostras ambientais

Dissertação apresentada ao Instituto de Química,

Universidade Estadual Paulista, como parte

dos requisitos para obtenção do

Título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Wagner Vilegas

Co-orientador: Prof. Dr. Mary Rosa Rodrigues de Marchi

Araraquara

2013

FICHA CATALOGRÁFICA

Luizete, Milena Fontes

L953p Parabenos em água superficial: estudo analítico e aplicação em amostras ambientais / Milena Fontes Luizete. – Araraquara : [s.n], 2013

72 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química

Orientador: Wagner Vilegas

Coorientador: Mary Rosa Rodrigues de Marchi

1. Química analítica. 2. Parabenos. 3. Água. 4. Efeito matriz. I. Título.

Elaboração: Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

MILENA FONTES LUIZETE

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Química.

Araraquara, 17 de junho de 2013.

BANCA EXAMINADORA

Profª. Drª. Mary Rosa Rodrigues de Marchi (Co-orientador)
Professor Adjunto do Instituto de Química / UNESP / Araraquara - SP

Prof. Dr. Mario Sergio Galhiane
Professor Adjunto da Faculdade de Ciências / UNESP / Bauru - SP

Profª. Drª. Eny Maria Vieira
Professor Doutor do Departamento de Química e Física Molecular / USP / São Carlos - SP

Dados Curriculares

Milena Fontes Luizete

1 Dados Pessoais

Nascimento: 27/10/1988

Nacionalidade: Brasileira

Naturalidade: Catanduva- SP

Estado Civil: solteira

Filiação: Luis Antônio Luizete e Marilaine Agda Fontes Luizete

2 Formação Acadêmica

Bacharel em Química com atribuições tecnológicas

Concluído em julho de 2011 no Instituto de Química UNESP Araraquara

‘’Dedico esta dissertação às pessoas mais importantes de minha vida: meus pais, Luis e Marilaine; e minha irmã Marina. ‘’

Agradecimentos

À Deus, pela minha vida;

Aos meus pais, pelo amor incondicional e pelo constante esforço e trabalho para manter eu e minha irmã Marina no caminho do estudo. Sem eles, nada disso seria possível;

À minha irmã, Marina, pela alegria;

À minha grande família; aos meus avós Lico, Vanda, Tonho e Cida (*in menorian*), pelo carinho, apoio e lição de vida;

Ao Érico, meu companheiro e grande amigo, pela compreensão e força, estando ao meu lado desde o início da faculdade;

Aos meus verdadeiros amigos, que compartilharam comigo o dia a dia, riram, choraram, e acalmaram toda minha ansiedade. Em especial a Ana Carol, Bruno, Carol, Karina, Mariana, Verônica, Vitória;

A todos os professores que passaram pela minha jornada, desde os do pré-primário aos da faculdade. Em especial, à professora Mary Rosa, que muito mais que uma professora, foi minha mãe científica;

Aos companheiros do GRESCO, pelo cotidiano, apoio e aprendizado;

Ao Instituto de Química, pela morada, e aos seus trabalhadores,

A CAPES e à FACTE pelo apoio financeiro,

A todos que passaram pela minha vida.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 15

1.1 Saneamento Básico 15

1.2 Produtos de Cuidado Pessoal (PCP) 18

1.3 Parabenos 18

1.4 Estratégia analítica para determinação de parabenos em matrizes ambientais 20

2 Objetivos 26

3 PARTE EXPERIMENTAL – MATERIAIS E MÉTODOS 27

3.1. Materiais 27

3.1.1. Reagentes, solventes e padrões. 27

3.1.2. Gás utilizado para pré- concentração das amostras 27

3.1.3. Coluna Cromatográfica 27

3.1.4. Extração em Fase Sólida 27

3.2. Métodos 27

3.2.1. Limpeza da vidraria 27

3.2.2. Preparação das soluções padrão 28

3.2.3. Condições Cromatográficas 28

3.2.5. Otimização da Derivação 30

3.2.6. Faixa de trabalho, linearidade e curva de calibração 32

3.2.7. Limites de detecção e quantificação instrumentais 33

3.2.8. Preparo da Amostra 35

3.2.9. Avaliação de efeito matriz 37

3.2.10. Estudo da Recuperação 38

3.2.11. Análise de parabenos em água do rio Ribeirão das Cruzes antes e após o lançamento de efluente de ETE. 39

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES 40

4.1. Condições Cromatográficas 40

4.1.1. Para os parabenos derivados 40

4.1.2. Para os parabenos não derivados 46

4.2. Problemas com os parabenos não derivados 55

4.3. Otimização da reação de derivação 57

4.3.1. Planejamento Experimental 57

4.4. Otimização da análise no modo MS/MS para os parabenos derivados 61

4.5 Faixa de trabalho, linearidade, curva de calibração e limites de detecção e de quantificação do sitema cromatográfico 62

4.7 Curva de calibração construídas a partir do extrato da matriz 67

4.8 Estudo de Recuperação 71
4.9 Análise de parabenos em água do rio Ribeirão das Cruzes antes e após o lançamento de efluente de ETE. 71
5 Conclusões e perspectivas futuras 73
Referências ..... **Erro! Indicador não definido.**

Lista de figuras

Figura 1 - UGRHI-13 (Tietê-Jacaré) e sua localização no estado de São Paulo (Fonte: SIGRH, 2013). 16
Figura 2 - Reação geral de sililação. Onde sample é o composto a ser sililado e –X é um grupo que varia de acordo com o agente de sililação 23
Figura 3 - Curva de calibração com os parâmetros utilizados para o cálculo de LD. Fonte: Ribeiro et al, (2008). 34
Figura 4 - Curva de calibração com os parâmetros utilizados para o cálculo de LQ. Fonte: Ribeiro et al, (2008). 35
Figura 5 - Estruturas (a) Oasis-HLB e (b) Strata-X 36
Figura 6 - Método de avaliação de efeito matriz. Fonte: Cardoso et al, (2008). 37
Figura 7 - Diagrama unifilar do Ribeirão das Cruzes, com a localização dos pontos de amostragem incluídos neste trabalho (fonte: Franco, 2013). 39
Figura 8 - Cromatogramas (CG-EM) e espectro de massas obtidos para solução padrão de metilparabeno(MeP) (1 µg mL^{-1}) em acetato de etila após derivação com MTSFA. 41
Figura 9 - Cromatogramas (CG-EM) e espectro de massas obtidos para solução padrão de etilparabeno (EtP) (1 µg mL^{-1}) em acetato de etila após derivação com MTSFA. 42
Figura 10 - Cromatogramas (CG-EM) e espectro de massas obtidos para solução padrão de propilparabeno (PrP) (1 µg mL^{-1}) em acetato de etila após derivação com MTSFA. 43
Figura 11 - Cromatogramas (CG-EM) e espectro de massas obtidos para solução padrão de *iso*-butilparabeno (*i*-BuP) (1 µg mL^{-1}) em acetato de etila após derivação com MTSFA. 44
Figura 12 -Cromatogramas (CG-EM) e espectro de massas obtidos para solução padrão de *n*-butilparabeno (*n*-BuP) (1 µg mL^{-1}) em acetato de etila após derivação com MTSFA. 45
Figura 13 - Cromatogramas (CG-EM) e espectro de massas obtidos para solução padrão de metilparabeno-d4 (*MeP-d4*) (1 µg mL^{-1}) em acetato de etila. 47
Figura 14 - Cromatogramas (CG-EM) e espectro de massas obtidos para solução padrão de metilparabeno (*MeP*) (5 µg mL^{-1}) em acetato de etila. 48
Figura 15 - Cromatogramas (CG-EM) e espectro de massas obtidos para solução padrão de etilparabeno (*EtP*) (5 µg mL^{-1}) em acetato de etila 49
Figura 16 - Cromatogramas (CG-EM) e espectro de massas obtidos para solução padrão de propilparabeno (Pr*P*) (5 µg mL^{-1}) em acetato de etila. 50
Figura 17 - Cromatogramas (CG-EM) e espectro de massas obtidos para solução padrão de *i*-butilparabeno (*i*-Bu*P*) (5 µg mL^{-1}) em acetato de etila. 51
Figura 18 - Cromatogramas (CG-EM) e espectro de massas obtidos para solução padrão de *n*-butilparabeno (*n*-Bu*P*) (5 µg mL^{-1}) em acetato de etila. 52
Figura 19- Cromatograma (GC-MS, SCAN) para uma solução padrão mista contendo os parabenos sem derivação (5 µg mL-1) 53
Figura 20- Cromatograma (GC-MS, SCAN) para uma solução padrão mista contendo os parabenos sem derivação (5 µg mL^{-1}), programa de temperatura da coluna modificado (Tabela 14). 54
Figura 21 - Cromatograma da mistura de parabenos (600 ng mL^{-1}) obtido em modo MS/MS. 55
Figura 22 - Cromatograma da mistura de parabenos (600 ng mL^{-1}) obtidas no modo MS/MS. 56
Figura 23- Gráficos de efeitos para cada variável. 58
Figura 24 - Gráfico de pareto. 59
Figura 25- Gráfico tridimensional (denominado gráfico de cubo) apresentado a interação entre as variáveis investigadas a condição de ótimo em destaque. 59
Figura 26 - Comatograma obtido através da análise dos parabenos derivados (a) com 1% de piridina, (b) sem piridina no meio reacional. 60
Figura 27 - Cromatograma (GC-MS/MS) para os parabenos derivados na condições de derivação e ionização otimizadas 62
Figura 28- Graficos de linearidade para cada um dos parabenos estudados.. 63
Figura 29 - Cromatogramas obtidos pela eluição com metanol: acetato de etila (1:1; v/v). 65
Figura 30 - Cromatogramas obtidos pela eluição com hexano: acetato de etila (1:1; v/v). 65

Figura 31 - Cromatogramas obtidos pela eluição com acetonitrila: acetato de etila (1:1; v/v). 66
Figura 32- Graficos de linearidade para cada um dos parabenos estudos. 68
Figura 34 - Porcentagem de efeito matriz para cada composto, considerando a diferença para cada ponto da curva analítica construida no solvente e no extrato da matriz [NUNES, 2010].. 70
Figura 33 - Porcentagem do efeito matriz para cada compostos, considerando a diferença dos coeficientes angulares das curvas analíticas construidas no solvente e no extrato da matriz [Thompson et al., 2002]. 70

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Aspectos considerados relevantes e analisados pela CETESB. (Adaptado CETESB 2011). 17
Tabela 2 - Propriedades físico químicas dos parabenos estudados. 19
Tabela 3 - Estudos realizados em matrizes ambientais e as respectivas concentrações encontradas para os parabenos. 20
Tabela 4 - Métodos de extração e condições cromatográficas descritos na literatura para determinação de parabenos em água. 21
Tabela 5 - Diferentes procedimentos para a reação de sililação de compostos fenólicos. 24
Tabela 6 - Concentração de cada parabeno nas soluções individuais (estoque) em acetato de etila. 28
Tabela 7 - Condições cromatográficas inicialmente utilizadas para a análise dos parabenos após a derivação. 29
Tabela 8 - Condições cromatográficas inicialmente utilizadas para a análise dos parabenos não derivados. 29
Tabela 9 - Variáveis utilizadas no Planejamento Fatorial. 31
Tabela 10 - Ensaios do Planejamento Experimental. 31
Tabela 11 - Modificações realizadas no método proposto por Ramaswamy et al, 2011. 37
Tabela 12 - Analitos de interesse derivados com seus respectivos m/z. 40
Tabela 13 - Analitos de interesse não derivados com seus respectivos m/z. 46
Tabela 14 - Condições cromatográficas modificadas. 53
Tabela 15 - Condições otimizadas para o método MS-MS para os parabenos não derivados. 54
Tabela 16 - Média das áreas para os cinco parabenos em cada ensaio realizado. 57
Tabela 17 - Condições estabelecidas para o processo de derivação. 60
Tabela 18 - Condições otimizadas para o método MS-MS para os parabenos derivados. 61
Tabela 19 - Curvas analíticas obtidas para as soluções padrão em acetato de etila em concentrações de 10 a 100 ng mL-1 e outro de 200 a 600 ng mL-1. 64
Tabela 20 - Limites de detecção e de quantificação do sistema analítico. 64
Tabela 21 - Recuperação média (R%) e CV (%) para o estudo para escolha do melhor eluente na extração em fase sólida (n =3). 66
Tabela 22 - Curvas analíticas obtidas para as soluções padrão no extrato da matriz em concentrações de 10 a 100 ng mL-1 e outro de 200 a 600 ng mL-1. 69
Tabela 23 - Limites de detecção e de quantificação do método proposto. 69
Tabela 24 - Recuperação média (R%) e CV (%) para o estudo em três níveis de fortificação para extração em fase sólida (n =3). 71
Tabela 25 - Recuperação média (R%) e CV (%) do metilparabeno-d4 nas análises antes e após o lançamento de esgoto tratado (n=3). 71
Tabela 26 - Análise de parabenos em água de rio antes e após o lançamento de esgoto tratado. 72

Resumo

Produtos de cuidado pessoal são amplamente utilizados pela população. Em sua composição existe uma classe de compostos denominada parabenos que é utilizada pela sua propriedade bactericida e função de conservantes, sendo que tem sido apontados com possíveis alteradores endócrinos para a biota aquática. A literatura internacional relata a presença destes compostos em água naturais, em diversos países, muitas vezes em altas concentrações. No Brasil não há publicações nos quais os parabenos foram determinados em matriz aquosa. Considerando-se que pouca atenção tem sido dada à otimização e validação de método para análise de parabenos em amostras aquosas, neste trabalho desenvolveu-se à validação de método para a análise de parabenos em água de rio, fazendo-se o uso de cartuchos de poliestireno- divinilbenzeno (PSDVB) para extração em fase sólida (SPE) e cromatografia gasosa (CG) acoplada a espectrometria de massas (EM), em tandem, para a quantificação de metil, etil, propil, *i*-butil, e *n*-butil parabenos. A recuperação do método foi avaliada em amostras de água obtida no Ribeirão das Cruzes (Araraquara-SP) fortificadas em 3 níveis de concentração: 1; 0,5 e 0,1 ng L^{-1}. A extração dos analitos (500 mL, n=3) resultou em valores de recuperação entre 56 – 100%, e CV menores que 11%. Foi avaliado o efeito de matriz, que indicou ser mandatória a utilização de curvas construídas na matriz para obtenção de dados confiáveis. O método validado foi aplicado com bom desempenho (recuperação do surrogate metilparabeno-d4 superior a 80% com CV <5%) às amostras de água do Ribeirão das Cruzes, a montante a jusante da Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) de Araraquara. No ponto a montante todos os parabenos estiveram abaixo dos limites de detecção do método, no entanto para as amostras coletadas jusante da ETE o metil e etilparabenos foram identificados, sendo possível a quantificação apenas do metilparabeno (206 ng L^{-1}). Este trabalho contribui para a literatura com um método validado para a determinação de parabenos em água de rio e indica, pelos dados iniciais obtidos, que há necessidade de um estudo apurado sobre a ocorrência e dispersão de parabenos em águas naturais, aliado a estudos de avaliação do risco ecotoxicológico que estas substâncias possam representar.

Palavras-chave: Parabenos, água, efeito matriz, CG-EM/EM.

Abstract

Personal care products are widely used by the population. In its composition there is a class of compounds called parabens which is used for its bactericidal property and function of preservatives, and has been identified with potential endocrine disrupters on aquatic biota. The international literature reports the presence of these natural compounds in water, in many countries, often in high concentrations. In Brazil there are no publications in which the parabens were determined in aqueous matrix. Considering that little attention has been paid to the optimization and validation of method for analysis of parabens in aqueous samples in this study was developed to validate the method for the analysis of parabens in river water, making the use of cartridges polystyrene-divinylbenzene (PSDVB) for solid phase extraction (SPE) and gas chromatography (GC) coupled with mass spectrometry (MS), tandem for the quantification of methyl, ethyl, propyl, i-butyl, and n-butyl parabens. The recovery of the method was evaluated in water samples obtained in Ribeirão das Cruzes (Araraquara-SP) fortified at 3 levels of concentrations: 1, 0.5 and 0.1 ng L^{-1}. The extraction of analytes (500 mL, n = 3) resulted in recovery values between 56-100% and CV less than 11%. The effect of matrix, which indicated that it was mandatory to the use curves built into the array to obtain reliable data. The validated method was applied with good performance (recovery of surrogate methyl-d4 than 80% with CV <5%) to water samples from Ribeirão das Cruzes, upstream to downstream of Sewage Treatment Plant (WWTP) in Araraquara. At any point upstream parabens were below the detection limits method, however to samples collected downstream of the STP only the methyl and ethyl paraben were identified, only possible to quantify the methylparaben (206 ng L^{-1}). This work contributes to the literature with a validated method for the determination of parabens in water and displays river, achieved by initial data which is no need for a study on the determined occurrence and spread of parabens in natural waters, coupled with evaluation studies the ecotoxicological risk that these substances may pose.

Keywords: Parabens, water, matrix effect, GC-MS.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Saneamento Básico

Saneamento básico é a atividade que relaciona o abastecimento de água potável, o manejo de água pluvial, coleta e tratamento de esgoto. Este relaciona-se, também, com a limpeza urbana, manejo do resíduos sólidos, controle de pragas e qualquer tipo de agente patogênico, visando à saúde pública [CARDOSO et al., 2010].

Esgoto sanitário é o termo utilizado para as águas que, após a utilização humana, apresentam as suas características naturais alteradas. Conforme o uso predominante, comercial, industrial ou doméstico, essas águas apresentarão características diferentes.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), doenças relacionadas a sistemas de tratamentos precários de água e esgoto juntamente com as deficiências de higiene são responsáveis por inúmeras mortes em todo mundo. A perpetuação de sistemas inadequados de esgotamento sanitário também é causadora de 88% dos óbitos por diarreias registrados mundialmente, com maior ocorrência nos países em desenvolvimento [WHO, 2011]. A expansão urbana sem o devido planejamento torna esse problema ainda mais complexo, quando ocorre a ocupação de áreas sem infraestrutura adequada para a moradia.

Segundo as Nações Unidas, a população mundial passará de 9 bilhões de pessoas até 2050 (aproximadamente 50 por cento a mais em relação a 2000). Ademais, a maioria da atual população mundial vive em áreas urbanas. Populações crescentes, especialmente quando concentradas nas cidades, tendem a gerar maiores volumes de esgoto, sobrecarregando rios e sistemas de tratamento, o que resulta em águas cada vez mais poluídas. Estima-se que 42% da água utilizada para finalidades domésticas e municipais acabam retornando ao ciclo da água, volume este que corresponde a 11% do total dos efluentes [Agência Nacional de Águas (ANA), 2011].

Apesar de todos esses transtornos gerados pela falta de saneamento ambiental, cerca de 2,5 bilhões de pessoas não contam com esse serviço em suas residências, sendo que 1,6 bilhão são de países da África e da Ásia, conforme dados divulgados em 2010 pelo Programa das Nações Unidas Para o Meio Ambiente (PNUMA) [ANA, 2011].

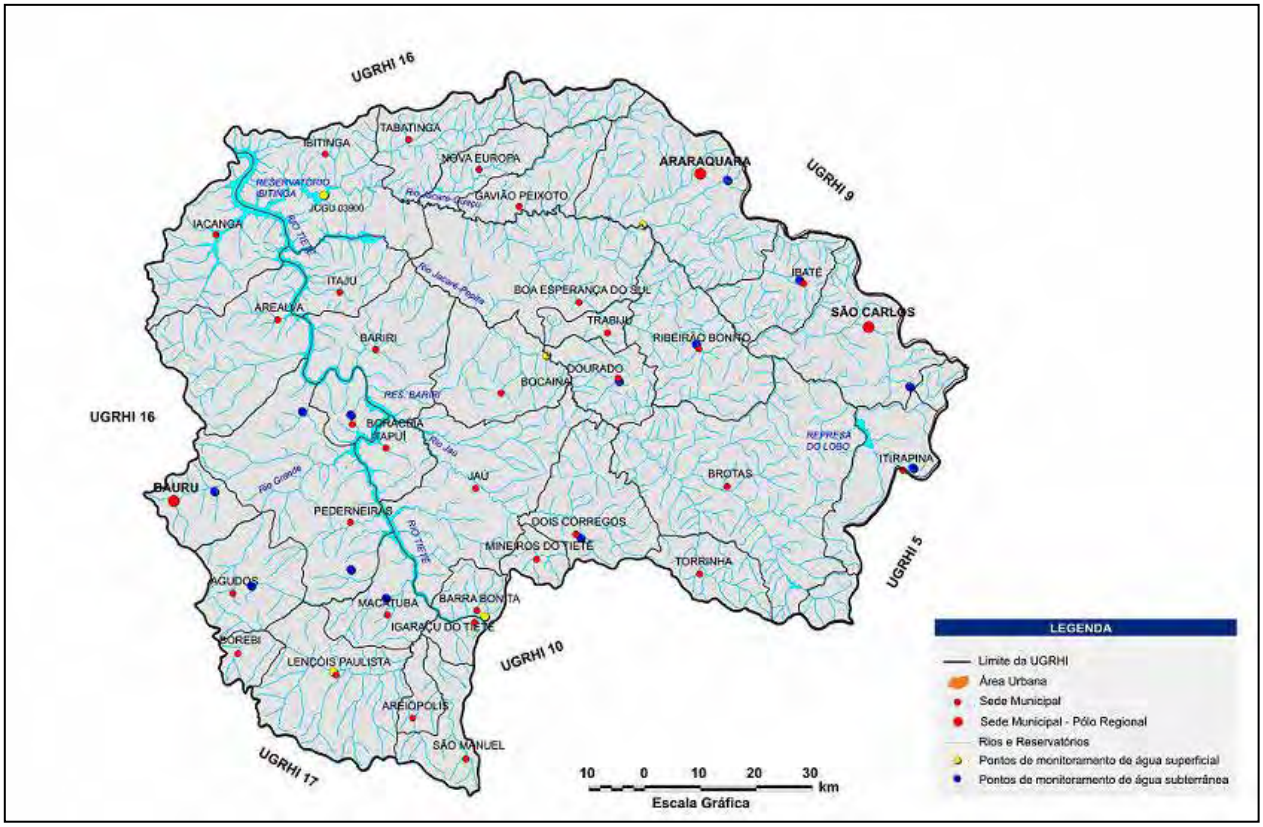
No entanto, a ONU (Organização das Nações Unidas) estabeleceu como uma de suas oito metas para os ODM (Objetivos de Desenvolvimento do Milênio) reduzir em 2/3 a mortalidade infantil de crianças menores de cinco anos, e à metade, a população sem acesso permanente e sustentável à água potável segura e esgotamento sanitário até 2015 [Objetivos do Milênio.org, 2011].

No Brasil, a Pesquisa Nacional de Saneamento Básico realizada em 2008 revelou que apenas 55,2% dos municípios realizam coleta de esgoto e destes, apenas 1/3 fazem o tratamento do esgoto coletado. Estes números fizeram com que o Brasil ocupasse a 7ª posição no ranking de 2009 dos

países com o pior sistema de tratamento de esgoto no mundo, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), ficando atrás de países como a Jamaica, por exemplo. Enquanto temos os melhores desempenhos referentes ao abastecimento de água, registramos os piores índices em relação ao tratamento do esgoto produzido [Docol, 2011].

No estado de São Paulo, as bacias hidrográficas são divididas em vinte e duas unidades de gerenciamento de recursos hídricos (UGRHIs) [DAE, 2010]. A UGRHI 13, conhecida como Tietê-Jacaré (Figura 1), está localizada no centro do Estado de São Paulo (entre 49°32'-47°30' longitude e 21°37' - 22°51' de latitude), engloba três rios principais, parte do Rio Tietê (em um total de 150 km da barragem de Barra Bonita até a barragem da Ibitinga), o Rio Jacaré-Guaçu e o Rio Jacaré Pepira [TUNDISI et al. 2008].

Figura 1 – Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos numero 13 (UGRHI-13 : Tietê-Jacaré)
Fonte: São Paulo, 2013 .



Os principais problemas em relação aos recursos hídricos, observados nesta UGRHI, estão relacionados com contaminantes de origem agroindustrial e doméstica, que acarretam a carência de oxigênio, eutrofização e toxicidade nos recursos hídricos, além da erosão marginal. A CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental), que fiscaliza a qualidade das águas do estado de São Paulo, destacou em seu último Relatório [CETESB, 2012] que as principais fontes poluidoras

nesta UGRHI foram cargas pontuais de origem doméstica (poluentes orgânicos, nutrientes e bactérias); efluentes industriais (poluentes orgânicos e inorgânicos, dependendo da atividade industrial); cargas difusas de origem urbana e agrícola (poluentes advindos da drenagem destas áreas: fertilizantes, defensivos agrícolas e materiais em suspensão). A análise de todos os poluentes que possam estar presentes nas águas superficiais é inexequível. Portanto, a CETESB faz uso de, aproximadamente, 50 variáveis na análise de qualidade de água (físicas, químicas, hidrobiológicas, microbiológicas e ecotoxicológicas). Na Tabela 1, são apresentadas as variáveis consideradas mais representativas.

Tabela 1 - Aspectos considerados relevantes e analisados pela CETESB. (Adaptado CETESB 2012).

Aspectos		
Físicos	Temperatura da água	
	Transparência	
	Turbidez	
	Condutividade	
	Série de Sólidos	
Químicos	Nutrientes	Carbono Orgânico Total
		Fósforo Total
		Nitrogênio
		Nitrito
		Nitrato
		Nitrogênio Amoniacal Total
	Metais	Cromo Total
		Estanho
		Mercúrio
		Níquel
		Zinco
	Orgânicos	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs)
		PCBs
		Solventes Aromáticos
		Fenóis Totais
		Surfactantes
	Outros	pH
		Salinidade
		Sulfeto
		Óleos e Graxas
Microbiológicos	Enterococos e Coliformes Termotolerantes	
Hidrobiológicos	Clorofila A e Feofitina A	
Ecotoxicológico	Toxicidade (Microtox)	

A lista de substâncias apresentadas na Tabela 1 não é exaustiva. Um número cada vez maior de contaminantes tem sido detectado em águas, por dois motivos: novos componentes químicos estão sendo lançados para uso na agricultura, nas indústrias e nos domicílios, que podem entrar e persistir no meio ambiente; e novas técnicas de ensaio fazendo com que os contaminantes sejam detectados em concentrações cada vez menores [Agência Nacional de Águas (ANA), 2011]. Existem compostos encontrados em concentrações menores que a grandeza de micrograma por litro, também denominados micropoluentes, que incluem fármacos, produtos de cuidado pessoal (PCP), e outros [LEAL et al., 2011].

1.2 Produtos de Cuidado Pessoal (PCP)

Os PCP incluem sabões, loções, creme dental, fragrâncias, filtros solares, dentre outros. São amplamente utilizados pela população e, consequentemente, grandes quantidade destes atingem o meio ambiente através do seu uso regular. Estudos recentes indicam que alguns constituintes dos PCP possuem potencial bioacumulativo, bioativo, estrogênico e mutagênico [BRAUSCH et al., 2011], sendo o último ainda não bem definido pela comunidade científica, uma vez que determinados autores não atribuem este caráter a estas substâncias [CALAFAT et al., 2010]. Entretanto, a inserção de compostos com potencial bioacumulativo, bioativo e estrogênico no ambiente, já são justificativas suficientemente relevantes para que os constituintes dos PCP sejam estudados, no intuito de subsidiar políticas publicas para gerenciamento de recursos hídricos que propiciem melhor qualidade ambiental e, portanto melhor qualidade de vida à população.

Dentre os constituintes dos PCP, destacam-se os parabenos, que são utilizados em cerca de 22.000 cosméticos por apresentarem propriedades antimicrobiana e bactericida [ANDERSEN et al., 2008]. Estes também podem ser adicionados aos alimentos, agindo como conservantes. O largo espectro de utilização dos parabenos contribui para que estes compostos tenham distribuição ubíqua no meio ambiente [SHANMUGAM et al., 2010].

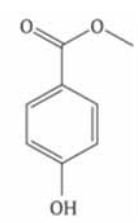
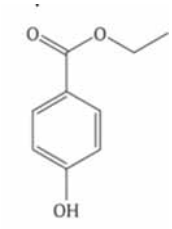
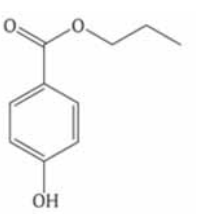
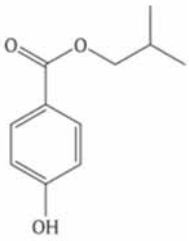
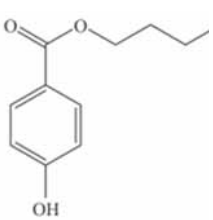
1.3 Parabenos

Os parabenos constituem um grupo de substâncias químicas formado por para-hidróxi-ésteres do ácido benzóico, com substituintes alquílicos, que variam de metil a butil, ou grupo benzil [PHILIP et al., 2012]. Estes são utilizados como conservantes e antimicrobianos, individualmente ou em mistura. São facilmente biodegradáveis sob condições aeróbias, entretanto, devido seu elevado

consumo e a introdução contínua no meio ambiente, pode ser levado à situação de 'pseudo-persistente' [JONKERS et al., 2010].

Neste trabalho serão estudados os parabenos mais encontrados em matrizes aquosas, são eles: metilparabeno (MeP), etilparabeno (EtP), propilparabeno (PrP), *n*-butilparabeno (*n*-BuP) e *iso*-butilparabeno (*i*-BuP). A Tabela 2 apresenta as estruturas moleculares destas substâncias e sumariza algumas de suas características físico químicas.

Tabela 2 - Propriedades físico químicas dos parabenos estudados.

	MetilParabeno	EtilParabeno	PropilParabeno	*i*-ButilParabeno	*n*-ButilParabeno
Estrutura molecular					
CAS	99-76-3	120-47-8	94-13-3	4247-02-3	94-26-8
Massa Molar (g/mol)	152,15	166,18	180,20	194,23	194,23
Log D_{ow}	1,86	2,37	2,88	3,23	3,38
pK_a	8,31	8,31	8,23	8,17	8,17
Solubilidade (mg L^{-1})	5600	2500	1200	540	600

CAS- Chemical Abstracts Service; pKa:constante de acidez; D_{ow}: partição octanol:água.

Os parabenos tem sido estudados em diversas matrizes ambientais, a Tabela 3 sumariza alguns estudos destacados neste trabalho.

Tabela 3 – Estudos selecionados da literatura, enfocando a determinação de parabenos em matrizes ambientais.

Referência	Matriz	Faixa de concentração encontrada (ng L^{-1})
Benjitis et al. 2004	Água de rio e esgoto industrial (Bélgica)	[MeP]=2,1-85,1 [EtP]= nd-53,8 [PrP]=3,1-78,4
Canosa et al. 2006	Esgoto Hospitalar Afluente e Efluente de ETE (Espanha)	[MeP]=0,43-2,4 [EtP]= 0,052-0,21 [PrP]=0,064-0,98 [BuP]=0,019-0,096
Peng et al. 2008	Água de rio (China)	[MeP]= ND*- 1062 [BuP]=ND- 2142
Jonkers et al. 2009	Água de rio (Suíça)	[MeP]=65-9880 [EtP]= 2,2-719 [PrP]=43-1540 [BuP]=9,7-864
Ramaswamy et al. 2010	Água de rio (Índia)	[parabenos] $_{total}$= 124 [MeP]= 3,43-22,8 [EtP]=2,47-147 [PrP]= 38,6-57
Jonkers et al. 2010	Água de Rio (Portugal)	[MeP]=2,1-62 [EtP]= 0,3-15 [PrP]=0,5-64 [BuP]=0,2-42 [BeP]=0,2-0,3
Mariño et al. 2011	Efluente e Afluente de ETE (Espanha)	[MeP]=290-10000 [EtP]= 250-1600 [PrP]=520-2800 [BuP]=39-270

*ND- Não detectado

Diversos estudos relataram sobre a capacidade de alteração endócrina dos parabenos. Canosa et al. (2006) mostram que os parabenos possuem estrogenicidade menor que o efeito do β-estradiol. Peng et al. (2008) discutiram sobre as disfunções sexuais, feminização de peixes, impotência e diminuição da fecundidade, resultantes dos efeitos dos parabenos nos organismos. Foi relatado, também, que o propilparabeno pode estar associado com o mecanismo chave de falha mitocondrial, inibindo o transporte mitocondrial do ATP celular através de alterações da fosforilização oxidativa [SONI et al., 2002].

1.4 Estratégia analítica para determinação de parabenos em matrizes ambientais

a) Extração de parabenos em matrizes aquosas

Na literatura, existem diversas estratégias analíticas para determinação de parabenos em matrizes aquosas. Na Tabela 4 estão sumarizados alguns destes trabalhos.

Tabela 4 - Métodos de extração e condições cromatográficas descritos na literatura para determinação de parabenos em matrizes aquosas.

Referência	Analitos/ Matriz	Extração	Condições Cromatograficas
Peng et al. (2008)	Estrógenos, fenóis, ácidos farmacêuticos/ água de rio	1L de amostra+ 0,5g de azida de sódio (para suprimir biodegradação) e pH=7 *1)Filtração* *2)SPE (Cartucho Sulpeclean ENVI-18 – 500mg)* Condicionamento: 3x 2mL de AcOEt, MeOH, água ultra pura; Lavagem: 5mL de solução água 5% metanol Eluição: 3x 2mL de MeOH: água (1:1, v/v). Eluato seco em N_2.	*CG-EM* Coluna: DB-5 (30mx32mm i.d., 25µm) Gás de arraste: He; Fluxo: 1mLmin^{-1} Os demais dados não são informados
Rodil et al. (2010)	Antioxidantes fenólicos e seus metábolitos/ água	200mL de amostra pH=2,5 *1)Filtração* *2)SPE (Cartucho Oasis- HBL – 10 e 60mg)* Condicionamento: 1mL de AcOEt, 1mL de MeOH, 1mL de água ultra pura Eluição: 3mL de água ultra pura pH=2,5 Extrato seco em fluxo de N_2 reconstituído em 1mL de AcOEt	*CG-EM* Coluna: HP-5MS (30mx32mm i.d., 25µm) Gás de arraste: He; Fluxo: 1mLmin^{-1} V_{inj}: 2µL T_{inj}: 250°C T_{coluna}: 90°C (1min) até 270°C(10°Cmin^{-1}), até 290°C(25°Cmin^{-1}) mantida por 10 min EI: 70eV; modo SIM
Mariño et al. (2011)	Parabenos e Parabenos Halogenados/ águas residuais	200mL de amostra pH=7.1 *1)Filtração* *2)SPE (Cartucho Oasis-HLB - 200mg/3mL)* Condicionamento: 3mL metanol; 3mL água ultrapura Cartucho seco Eluição: 4mL metanol Eluato condensado em turbovap, reconstituído em água ultrapura	*LC-EM* Solventes de eluição: Água (A), Metanol(B). Ambos com acetato de amônio pH=4.5. Vazão: 0,2mLmin^{-1} Gradiente: 0 min (5% B), 10 min (40% B), 15 min (55% B), 20 min (55% B), 28 min (100% B), 30 min (100%B), 32 min (5% B) and 42 min (5% B).
Ramaswamy et al. (2011)	triclosan, parabenos, carmazepinas / água de rio	2L de amostra de água de rio com pH=7 *1)Filtração* *2)SPE (Cartucho Strata C_{18}-E – 1000mg/6mL)* Condicionamento: 6mL de cada solvente (acetato de etila, metanol e água ultra pura), em fluxo de 5mLmin^{-1} Lavagem: 5mL de solução água 5% metanol Cartucho seco Eluição: 15mL metanol: acetato de etila (1:1, v/v) Eluato condensado em evaporador rotativo, e seco por fluxo de N_2, reconstituído em AcOEt *3)Clean up*	*CG-EM* Coluna: DB-1 (30mx32mm i.d., 25µm) Gás de arraste: He; Fluxo: 2,25mLmin^{-1} V_{inj}: 1µL T_{inj}: 250°C, $T_{interface}$:270°C, T_{trap}:230°C T_{coluna}: 50°C (1min) até 220°C(30°Cmin^{-1}), até 230°C(2°Cmin^{-1}) até 320°C (10 min) EI: 70eV; corrente de emissão 60µA *m/z* 35-500

Como pode ser observado na Tabela 2, os estudos descrevem vários métodos para análise de parabenos em matriz aquosa com a utilização de extração em fase sólida para o tratamento das amostras. Os cartuchos mais utilizados são Oasis-HLB (N-vinilpirrolidona e divinilbenzeno) e C-18, ambos de fase reversa. O primeiro é constituído de matriz polimérica de poli (divinilbenzeno-co-N-vinilpirrolidona) (Oasis-HLB, Waters), um dos mais utilizados para extrair simultaneamente resíduos polares e apolares de matrizes aquosas, já que se trata de um adsorvente de balanço hidrofílico-lipofílico permitindo assim o desenvolvimento de métodos multirresíduos trabalhando com o pH neutro [BECKER, 2012].

Outra fase sólida amplamente utilizada para reter compostos fenólicos é o Strata-X (Phenomenex), constituído, também, de resina polimérica (estireno-divinilbenzeno) que retém tais compostos por interações hidrofóbicas do tipo π-π, pontes de hidrogênio e dipolo-dipolo. Trabalhos da literatura mostram que esta fase sólida apresenta resultados de recuperação comparáveis ao Oasis- HLB, com a vantagem de possuir menor custo e maior área superficial [SIQUEIRA, 2012].

Utilizando Oasis- HLB, RODIL et al. (2010) obtiveram recuperações de 80 a 111% para antioxidantes fenólicos e seus metabólitos, cuja a polaridade é semelhante aos parabenos. MARIÑO et al. 2011 alcançaram limites de detecção de 1,3 – 4,0 ng L^{-1} e 99-125% de recuperação para os parabenos analisados, empregando o mesmo cartucho.

Além dos métodos convencionais de SPE, estudos com microextração em fase sólida (SPME) [CANOSA et al., 2006] e *stir-bar sorptive extraction* (SBSE) vêm ganhando cada vez mais espaço na literatura [FERREIRA et al., 2011].

Outro parâmetro importante a ser estudado na análise dos parabenos é o efeito matriz. YU et al. (2012) relatam a supressão do sinal causada por este efeito no estudo de diversos componentes de PCP realizados em matriz aquosa analisados por LC-EM, apontam que esta diminuição do sinal é ainda mais acentuada em concentrações mais altas em torno de 1000 ng mL^{-1}. Estes autores discutem também a dificuldade de estimar cada componente que causa este efeito e atribuem que a grande quantidade de matéria orgânica dissolvida no afluente e efluente de estações de tratamento de esgoto sanitário pode ser um dos motivos.

CHEN et al. (2012) analisaram biocidas em matrizes ambientais, como afluente e efluente de estações de tratamento de esgoto sanitário e lodo de esgoto, e avaliaram o efeito matriz comparando a resposta obtida de soluções preparadas em solvente com soluções preparadas no

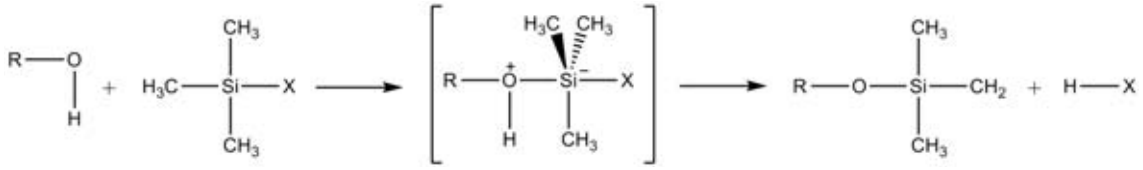
extrato das matrizes estudadas. Concluíram que há efeito matriz para o metil, etil, propil e butilparabeno.

b) Reação de Sililação

Devido aos efeitos supracitados, a presença de parabenos vem sendo cada vez mais estudada em diversas matrizes ambientais. A maioria dos estudos encontrados na literatura analisam os parabenos via cromatografia gasosa (CG), acoplada a espectrometria de massas (EM). As forças intermoleculares para esses compostos, devido a forte interação dos grupos hidroxila, resultam em altas temperaturas de ebulição, dificultando sua análise por CG. Para suprimir essa dificuldade, realiza-se uma derivação com um reagente seletivo que, geralmente, substitui os grupos polares por reação de *sililação, alquilação, ou acilação* [Pietrogrande et al., 2007].

Na reação de sililação, o hidrogênio ácido dos alcoóis, tióis, aminas, amidas ou cetonas enolizadas é substituído por um grupo trimetilsilil (Figura 2). A reação ocorre através de um ataque nucleofílico S_N2, onde é formado um produto volátil e termicamente estável para realização das análises [BECKER, 2012]. Tal técnica é amplamente utilizada quando o intuito é a melhorar a performance da análise por CG de substâncias pouco voláteis ou termicamente instáveis, pois não é necessária uma próxima etapa de purificação e os derivados podem ser injetados diretamente no CG.

Figura 2 - Reação geral de sililação. Onde R-OH é o composto a ser sililado e –X é um grupo que varia de acordo com o agente de sililação.



Contudo, muitas variáveis estão envolvidas na otimização da derivação: o agente derivante, o solvente de derivação, a temperatura de reação e seu tempo de duração [Pietrogrande et al, 2007] gerando assim, vários estudos para o mesmo fim.

SCHUMER et al. (2009), apontam o N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) e o N-Metil-N-(trimetilsil) trifluoroacetanamida (MSTFA) como os principais reagentes utilizados para a sililação de compostos fenólicos. Estes autores concluem que para compostos fenólicos menores, com até dois anéis, a derivação é mais efetiva utilizando-se o MSTFA. Baseando-se nesta informação, SHANMUNGAN et al. (2010), utilizaram o MSTFA para realizar a sililação de parabenos, otimizando o

processo de derivação pelo estudo de outras variáveis, tais como a temperatura do banho, volume de derivante utilizado e tempo de reação.

RICE et al. (2007) otimizaram a derivação alterando os solventes utilizados, apontando a piridina como melhor solvente, já que o acetato de etila, para os compostos estudados, apresentou baixo rendimento reacional, e com o diclorometano não houve linearidade na curva de calibração.

A Tabela 5 sumariza diferentes condições para a realização da reação de sililação.

Tabela 5 - Diferentes procedimentos para a reação de sililação de compostos fenólicos.

Referência	Matriz	Analitos	Método de Derivação
RICE et al. (2007)	Aquosa	Triclosan, 17-β-estradiol, Ibuprofeno, entre outros	Solvente do extrato: Piridina Derivante: BSTFA Temperatura do banho: 70°C Tempo de reação: 20 min Volume: 2:1 (v/v; piridina: BSTFA)
ALVAREZ et al. (2009)	Aquosa	Fármacos com caráter ácido, carmazepinas, e alteradores endócrinos em potencial.	Solvente do estrato: Acetato de etila Derivante: MSTFA Temperatura do banho: 60°C Tempo de reação: 30 min Volume: 1:2 (2550µL acetato de etila; 50µL MSTFA)
RODIL et al. (2010)	Aquosa	Antioxidantes fenólicos sintéticos e seus metabólitos	Solvente do extrato: Acetato de Etila Derivante: MSTFA Temperatura do banho: 80°C Tempo de reação: 90 min Volume: 1:1 (v/v; 50µLacetato de etila: 50µL MSTFA)
SHANMUNGAN et al. (2010)	Células de Câncer Mamário / Aquosa	Parabenos	Solvente do extrato: Acetato de Etila Derivante: MSTFA Temperatura do banho: 70°C Tempo de reação 30 min Volume: 50µL acetato de etila; 20µL MSTFA

Na literatura, existem muitos trabalhos nos quais é utilizada a sililação para análise de compostos fenólicos (micropoluentes) em matrizes aquosas. Todos eles utilizam como método de derivação um dos que aparecem na Tabela 1 (RASMAWANY et al.,2011; PENG et al., 2008).

c) Análise por GC/EM

Para a análise de parabenos via cromatografia o detector mais utilizado é o de espectrometria de massas (EM) [(RAMASWAMY et al., 2011; RODIL et al., 2010; PENG et al., 2008]. PRICHODKO et al. (2009) analisam parabenos via cromatografia gasosa acoplada ao detector de ionização em chama (FID). No entanto a faixa de concentração estudada está na ordem de μg mL^{-1}, maiores que as concentrações encontradas quando utiliza-se EM é de ng mL^{-1}.

Além desta vantagem, quando emprega-se a EM tem-se a oportunidade de utilizar uma ferramenta que alguns sistemas sofisticados de CG-EM possuem que é a análise no modo *tandem* (MS/MS) [CRISTALE et al., 2008]. Nesta técnica as moléculas de interesse são submetidas a sucessivas quebras. Um íon específico é selecionado (isolado), refragmentado e posteriormente é realizada uma varredura dos íons gerados [HOCART, p. 346, (2010)].

Quando utiliza-se o MS/MS são obtidos menores limites de detecção [HOCART, (2010)], além de minimizar os efeitos de possíveis interferentes, já que uma vez otimizada a análise via MS/MS para cada pico obtido no cromatograma existe um respectivo espectro de massas característico da substância estudada, confirmando a identidade do composto, minimizando também a ocorrência de ‘’falsos positivos’’ [OLIVEIRA et al., 2005].

2 Objetivos

Considerando que do ponto de vista ambiental os parabenos são de grande interesse tanto pela sua presença em diversos produtos industrializados de uso intensivo no Brasil (alimentos e produtos de cuidado pessoal), quanto pelo fato de os tratamentos convencionais (primário e secundário) de esgoto sanitário não apresentarem eficiência adequada na sua eliminação. E ainda, que, há necessidade do uso de métodos otimizados e validados para garantir a confiabilidade de estudos ambientais. Este trabalho tem como objetivo geral contribuir para a geração de dados sobre a ocorrência e dispersão de parabenos em recursos hídricos no Brasil, estabelecendo um método otimizado e validado para determinação de parabenos em água superficial, sendo destacados como objetivos específicos:

- Otimizar o processo de sililação de parabenos
- Otimizar o método de análise de parabenos sililados por GC-MS/MS
- Validar o método otimizado, incluindo extração SPE, sililação e análise por GC-MS/MS para determinação de parabenos em água de rio
- Aplicar o método otimizado e validado a amostras provenientes do Ribeirão das Cruzes (Araraquara, SP)

3 PARTE EXPERIMENTAL – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Reagentes, solventes e padrões.

- Os padrões dos parabenos: metilparabeno, metilparabeno-d_4, etilparabeno, propilparabeno, n-butilparabeno e i-butilparabeno foram obtidos através da Dr. Ehrenstorfer (Ausburg, Alemanha), com 99,5% de pureza, exceto o *n*-BuP, com 99%;
- Acetonitrila (grau HPLC, J T Baker);
- Acetato de etila (grau HPLC, Panreac);
- Acetona (grau HPLC, J T Baker);
- Água ultra-pura (Milli-Q, Sistema Millipore);
- Metanol (grau HPLC, J T Baker);
- Extran Alcalino (Merck).

3.1.2. Gás utilizado para pré- concentração das amostras

- Nitrogênio gasoso (N_2), pureza: 99,99%, White Martins.

3.1.3. Coluna Cromatográfica

- ZB-5 MSi, Phenomenex(30 m x 0,25 mm diâmetro interno x 0,25µm espessura do filme de 5%fenil, 95% metilpolissiloxano).

3.1.4. Extração em Fase Sólida

- Cartucho Strata-X, Phenomenex®, de PSDVB (poliestireno- divinilbenzeno), de 200mg de adsorvente e 6mL de reservatório.
- Fita de medição de pH;
- Manifold Waters;
- GC 3800 MS Saturn 2000 com autosampler 8200 VARIAN.

3.2. Métodos

3.2.1. Limpeza da vidraria

Os materiais utilizados foram imersos em solução de Extran 5% (MA-01-alcalino, Merck) e ultrassonificado por uma hora, foram enxaguados exaustivamente com água corrente, água destilada, água deionizada e acetona. A secagem da vidraria não volumétrica e de outros materiais

foi realizada em estufa à temperatura de aproximadamente 90ºC, sendo o material volumétrico seco à temperatura ambiente envolto em papel aluminio.

3.2.2. Preparação das soluções padrão

Foram preparadas soluções individuais em acetato de etila para os compostos: metilparabeno, metilparabeno-d_4, etilparabeno, propilparabeno, *n*-butilparabeno e *i*-butilparabeno. Posteriormente fez-se uma solução mista, também em acetato de etila, considerando as concentrações encontradas na literatura para os cinco analitos. As concentrações das soluções estoque estão apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6 - Concentração de cada parabeno nas soluções individuais (estoque) em acetato de etila.

Padrão	Concentração (µg mL^{-1})
metilparabeno	195
metilparabeno-d_4	200
etilparabeno	222
propilparabeno	100
i-butilparabeno	92
n-butilparabeno	88

A partir dessas soluções foram preparadas soluções de trabalho, individuais e mistas.

3.2.3. Condições Cromatográficas

3.2.3.1. Para os parabenos derivados

Utilizando-se as soluções padrão individuais, 1 µg mL^{-1} de cada analito, primeiramente foram realizados testes de derivação dos compostos individuais conforme a literatura. Shanmungam et al. (2010) otimizaram a derivação dos parabenos utilizando acetato de etila como solvente, e variando o volume do agente de derivação MSTFA (10; 20; 30; 40; 50 µL), o tempo de reação (15; 30; 45; 60; 75; 90 min) a 70°C em banho maria. Os autores concluíram que as melhores condições incluíam: 20 µL de MTSFA e 30 minutos para derivação destes compostos. Na fase inicial deste trabalho optou-se por utilizar as condições de derivação otimizadas no artigo citado anteriormente, sendo que a análise dos derivados foi efetuada pelas condições apresentadas na Tabela 7 e que também estão incluídas no artigo de Shanmungam et al. (2010).

Tabela 7 - Condições cromatográficas inicialmente utilizadas para a análise dos parabenos após a derivação.

	Condição
Coluna	ZB-5, Phenomenex(30 m x 0,25 mm diâmetro interno x 0,25µm espessura do filme de 5%fenil, 95% metilpolissiloxano)
Volume de Injeção	1µL
Modo de Injeção	t=0 split(1:20) t=0.01 splitless t=1.5 split(1:5)
Temperatura do injetor	280°C
Temperatura da interface	300°C
Temperatura do Detector	220°C
Programação do aquecimento da coluna	70°C (1min) (15°Cmin^{-1}) → 180°C (10°Cmin^{-1}) → 220°C (20°Cmin^{-1}) → 280°C (10min)
Gases	Vazão do gás de arraste (He): 1 mL/min^{-1}.
Modo de aquisição dos dados	Scan (*m/z* 40-450) Seguido da extração de íons conforme a Tabela 12.

3.2.3.2. Para os parabenos não derivados

Também avaliou-se o desempenho do sistema CG-EM na análise dos parabenos sem a etapa de derivação, empregando-se para isso soluções padrão de 5 µg mL^{-1}. As condições cromatográficas para a análise dos parabenos não derivados estão apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8 - Condições cromatográficas inicialmente utilizadas para a análise dos parabenos não derivados.

	Condição
Coluna	ZB-5, Phenomenex(30 m x 0,25 mm diâmetro interno x 0,25µm espessura do filme de 5%fenil, 95% metilpolissiloxano)
Volume de Injeção	1µL
Modo de Injeção	t=0 split(1:20) t=0.01 splitless t=1.5 split(1:5)
Temperatura do injetor	280°C
Temperatura da interface	300°C
Temperatura do Detector	220°C
Programação do aquecimento da coluna	60°C (1min) (10°Cmin^{-1}) → 220°C
Gases	Vazão do gás de arraste (He): 1 mL/min^{-1}.
Modo de aquisição dos dados	Scan (*m/z* 40-450) Seguido da extração de íons conforme a Tabela13.

3.2.4. Otimização da análise em MS-MS

Uma ferramenta que o sitema GC-MS utilizado oferece é a análise no modo MS/MS. Nessa técnica, as moléculas de interesse sofrem fragmentação duas vezes. Primeiramente as moléculas são fragmentadas a 70 eV e então o sistema é capaz de isolar e refragmentar um fragmento selecionado (íon pai). Para escolha do íon pai deve ser realizada uma análise no modo GC-MS (SCAN), e a partir do espectro de massas da molécula de interesse, selecionado o íon de maior intensidade e seletividade para ser refragmentado.

Para que a refragmentação resulte em melhor detectabilidade e seletividade, é necessário que a energia de ionização seja otimizada. O sistema Varian Saturno 2000, utilizado neste trabalho, dispõe de um recurso denominado AMD (Desenvolvimento de método automático), que efetua automaticamente uma varredura da energia de ionização no intervalo de 0,10 a 1,00 V, fornecendo 10 cromatogramas (um para cada nível de energia na segunda fragmentação), para cada pico selecionado na primeira fragmentação.

3.2.5. Otimização da Derivação

3.2.5.1. Planejamento Experimental

Para otimizar a reação de sililação utilizou-se o Planejamento Fatorial completo 2^5, totalizando 32 ensaios, sendo as variáveis mostradas na Tabela 9. Para se avaliar a influência de fatores associados às análises instrumentais faz-se uso de técnicas de planejamento experimental fatorial aliado a metodologias de superfície de resposta que determinam quais variáveis são mais influentes nos resultados, e reduzem o número de ensaios sem prejuízo da qualidade da informação separando e demonstrando seus respectivos efeitos [BARROS et al., 2009].

Como já citado anteriormente, as principais variáveis responsáveis pelo processo de derivação são: o agente derivante, o solvente de derivação, a temperatura de reação e seu tempo de duração; com isso estes foram os fatores estudados no referido planejamento. Estes foram analisados em diferentes níveis, mínimo e máximo, com o intuito de chegar ao melhor valor de cada parâmetro.

Tabela 9 - Variáveis utilizadas no Planejamento Fatorial.

Variável	Máximo	Mímimo
Tempo de reação	70min	30min
Volume de solução padrão	1000µL	250 µL
Volume de agente de derivação	100 µL	20 µL
Temperatura do banho	70°C	30°C
Interrupção da reação	Sim	Não

Tabela 10 - Ensaios do Planejamento Experimental.

Ensaio	*Analito(*µL)	*Derivante(*µL)	*Tempo(min)*	*Temperatura (^{o}C)*	*Reação*
1	250	20	30	30	sim
2	1000	20	30	30	sim
3	250	100	30	30	sim
4	1000	100	30	30	sim
5	250	20	75	30	sim
6	1000	20	75	30	sim
7	250	100	75	30	sim
8	1000	100	75	30	sim
9	250	20	30	70	sim
10	1000	20	30	70	sim
11	250	100	30	70	sim
12	1000	100	30	70	sim
13	250	20	75	70	sim
14	1000	20	75	70	sim
15	250	100	75	70	sim
16	1000	100	75	70	sim
17	250	20	30	30	nao
18	1000	20	30	30	nao
19	250	100	30	30	nao
20	1000	100	30	30	nao
21	250	20	75	30	nao
22	1000	20	75	30	nao
23	250	100	75	30	nao
24	1000	100	75	30	nao
25	250	20	30	70	nao
26	1000	20	30	70	nao
27	250	100	30	70	nao
28	1000	100	30	70	nao
29	250	20	75	70	nao
30	1000	20	75	70	nao
31	250	100	75	70	nao
32	1000	100	75	70	nao

As análises foram efetuadas em triplicata e a aquisição dos dados foi feita no modo SCAN (40-450*m/z*), sendo posteriormente utilizado o modo íon extraído para identificação dos picos.

Utilizando-se as áreas obtidas nos cromatogramas no modo íon extraído, calculou-se a média das triplicatas para cada analito. Além disso, para analisar os efeitos em comum para todos os parabenos, fez-se uma média geral dos cinco (Σáreas/5), fazendo com que cada análise possuísse apenas uma resposta.

Os resultados obtidos (médias das áreas) foram tratados utilizando-se o software Statistica 7.0, sendo possível evidenciar as melhores condições de análise.

3.2.6. Faixa de trabalho, linearidade e curva de calibração

Partindo-se da solução estoque, foram preparadas dez soluções de trabalho na faixa de trabalho de 10 a 600 ng mL^{-1}, que foi escolhida de acordo com as concentrações dos parabenos encontradas na literatura. Em seguida todas foram derivadas conforme as condições previamente otimizadas e analisadas em triplicata segundo as condições constantes da Tabela9. Com as áreas obtidas dos cromatogramas no modo íon extraído, foram construídos os gráficos de linearidade utilizando-se o teste de Huber (Valente et al., 2009).

O teste de Huber rejeita os pontos anômalos, estabelecendo um valor central (calculando-se a mediana dos valores de áreas/concentração (A/C) para cada composto em cada nível de concentração – mediana 1), e o intervalo de confiança que define quais os dados aceitáveis. Para o cálculo deste intervalo é necessário realizar o módulo da diferença da mediana acima calculada pela A/C. E em seguida a mediana destes valores (mediana 2). Por fim, o intervalo será igual:

$$Intervalo\ de\ confiança = mediana1 \pm K * mediana2$$

Onde K pode variar ente 2 e 8, sendo o 2 o fator mais restritivo. Neste trabalho, a constante utilizada foi k=5. Após a construção do gráfico de linearidade, os valores fora deste intervalo de confiança foram descartados, pois não faziam parte da linearidade. Com os dados deste gráfico foram construídas as curvas de calibração para cada analito, plotando a área média dos picos (injeções em triplicata) pela concentração de cada parabeno estudado.

A partir das curvas de calibração de cada parabeno, a etapa seguinte foi à realização do teste F para verificar qual o melhor ajuste dos dados obtidos. Ou seja, verificar se realmente os dados obedecem ao ajuste linear, ou o ajuste quadrático. Para o cálculo do valor F é necessário que se faça o cálculo dos desvios padrões obtidos em cada ajuste. O desvio padrão obtido em cada caso pode ser calculados conforme a equação (1) e (2), em que $Sy1$ é o desvio padrão calculado para o ajuste linear, e $Sy2$ é o desvio padrão para o ajuste quadrático.

$$(1)\ Sy1 = \sqrt{\frac{\Sigma(yi - \hat{y}i)^2}{N-2}} \qquad e \qquad (2)\ Sy2 = \sqrt{\frac{\Sigma(yi - \hat{y}i)^2}{N-3}}$$

Onde $yi = área\ obtida\ experimentalmente$; $\hat{y}i = área\ predita\ pela\ curva$ e $\Sigma(yi - \hat{y}i)$ é a soma quadrática dos resíduos. A partir destes desvios, estima-se a diferença entre as somas quadráticas dos dois ajustes (DS^2) segundo a equação (3), em que N é o número de padrões de calibração utilizados na construção da curva, então estima-se a significância desta diferença em relação a $Sy2^2$ com o auxílio do teste F. Na equação (4) F é o ponto de distribuição F no nível de confiança escolhido (95%), com $f1 = 1$ e $f2 = N - 3$ graus de liberdade. Isso significa que se a razão $\frac{\Delta S^2}{Sy2^2} \leq F_{1,n-3}$, realmente o ajuste linear proposto anteriormente, é o mais adequado. Mas, se $\frac{\Delta S^2}{Sy2^2} > F_{1,n-3}$, considera-se o ajuste quadrático mais adequado [Ribeiro et al., (2008)].

$$(3)\ \Delta S^2 = (N-2)Sy1^2 - (N-3)Sy2^2$$

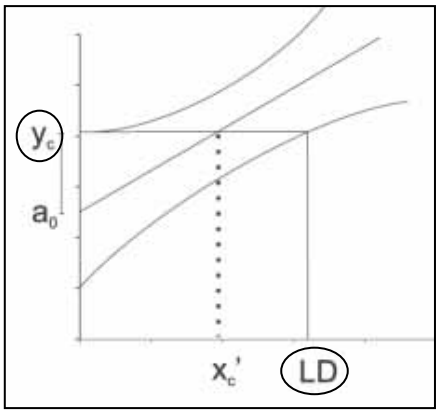
$$(4)\ \frac{\Delta S^2}{Sy2^2} \leq F_{1,n-3}$$

3.2.7. Limites de detecção e quantificação instrumentais

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) instrumentais foram calculados com base nos parâmetros da curva analítica de acordo com a proposta de Ribeiro et al., (2008) apresentados nas Figuras 3 e 4. Sendo o LQ definido como o menor valor de concentração que pode ser medida e informada com 95% de confiança.

O sinal analítico calculado pela regressão da curva e o sinal experimental apresentam um erro padrão, e este valor multiplicado pelo valor apropriado de *t* da distribuição de *Student* permite calcular o intervalo de confiança da curva analítica.

Figura 3 - Curva de calibração com os parâmetros utilizados para o cálculo de LD. Fonte: Ribeiro et al, (2008).



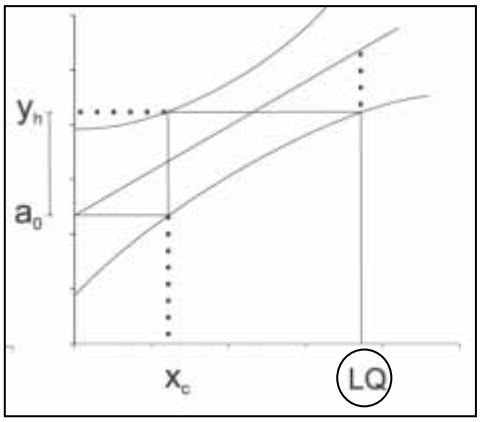
Como pode-se observar no gráfico, o intercepto do limite superior do intervalo de confiança é conhecido por y crítico (y_c) e a sua projeção no limite inferior é uma estimativa da concentração mínima que pode ser medida com um grau de confiança de 95%. Os cálculos para y_c e LD estão descritos nas equações (5) e (6).

$$(5)\ y_c = a_0 + Sy\,.\,t\,.\,\sqrt{\left(\frac{1}{N}\right) + 1 + \frac{(x_{médio})^2}{\sum_{i=1}^{n}(x_i - x_{médio})^2}}$$

$$(6)\ LD = 2\,.\frac{Sy\,.\,t}{a_1}\ \sqrt{\left(\frac{1}{N}\right) + 1 + \frac{(y_c - y_{médio})^2}{{a_1}^2.\ \sum_{i=1}^{n}(x_i - x_{médio})^2}}$$

Já para o cálculo do LQ utiliza-se x_c é o valor da concentração (x) no ponto em que o valor de a_0 intercepta a reta de regressão, e y_h é o valor de y para a projeção de x_c no limite de controle superior.

Figura 4 - Curva de calibração com os parâmetros utilizados para o cálculo de LQ. Fonte: Ribeiro et al, (2008).



As estimativas de x_c, y_c e LD podem ser feitas através das equações (7), (8) e (9) respectivamente.

$$(7)\ y_c = a_0 + 2.Sy\,.t\,.\sqrt{\left(\frac{1}{N}\right) + 1 + \frac{(x_c - x_{médio})^2}{\sum_{i=1}^{n}(x_i - x_{médio})^2}}$$

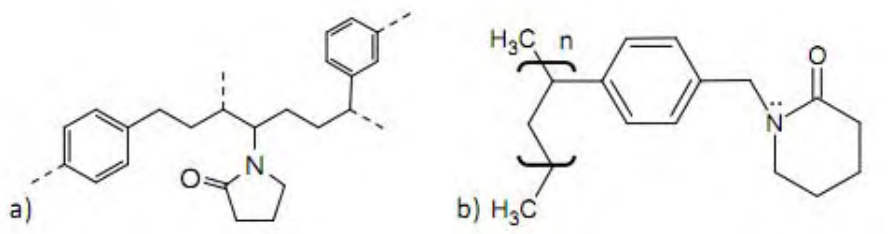
$$(8)\ x_c = \left(\frac{Sy\,.\,t}{a_1}\right).\sqrt{\left(\frac{1}{N}\right) + 1 + \frac{(x_{médio})^2}{\sum_{i=1}^{n}(x_i - x_{médio})^2}}$$

$$(9)\ LQ = \left(\frac{y_h\,.\,a_0}{a_1}\right) + \left(\frac{Sy\,.\,t}{a_1}\right).\sqrt{\left(\frac{1}{N}\right) + 1 + \frac{(y_h - y_{médio})^2}{{a_1}^2.\ \sum_{i=1}^{n}(x_i - x_{médio})^2}}$$

3.2.8. Preparo da Amostra

A pré-concentração de parabenos em matriz aquosa tem sido realizada através de extração em fase sólida e em sua maioria utilizam cartuchos Oasis-HLB (Waters). Tendo em vista seu alto custo e que na literatura são encontrados trabalhos que utilizam Strata-X (Phenomenex) na análise de compostos fenólicos, neste trabalho optou-se por trabalhar com cartuchos Strata-X (200mg de fase sólida com 6mL de reservatório), utilizado com sucesso neste grupo para análise de alquilfenóis (nonil e octilfenol e seus derivados mono e di-etoxilados), estrógenos (estradiol, estriol, estrona, etinilestradiol) e fitoestrógenos (daidzeína e genisteína) em águas naturais. Na Figura 5 estão apresentadas as estruturas dos monômeros que integram as fases estacionarias dos cartucho SPE citados.

Figura 5 - Estruturas (a) Oasis-HLB e (b) Strata-X



Após a escolha da fase estacionária para SPE adaptou-se a metodologia de Ramaswamy et al, 2011 conforme o fluxograma 1 apresentado, onde as etapas com asterisco foram modificadas e estão detalhadas na Tabela 11.

Fluxograma 1 - Método de extração proposto por Ramaswamy et al., (2011). As etapas com asterisco foram modificadas neste trabalho, como consta da Tabela 11.

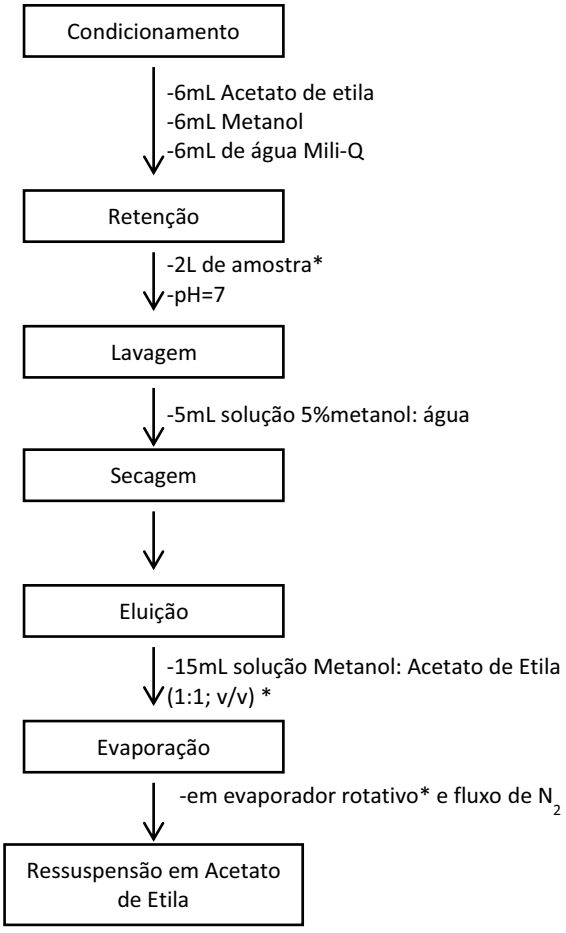


Tabela 11 - Modificações realizadas no método proposto por Ramaswamy et al, 2011.

Método Ramaswamy et al, 2011	Modidicações introduzidas
Strata C18- E (1000 mg, 6 mL)	Strata-X (200 mg, 6 mL)
Volume de amostra= 2 L	Volume de amostra= 0,5 L
Solvente de eluição: MeOH: AcOEt (1:1, v/v)	Solventes de eluição avaliados: 1)MeOH: AcOEt (1:1, v/v) ; 2) Hex:AcOEt (1:1, v/v); 3) MeOH:ACN (1:1, v/v)
Volume de solvente de eluição: 15mL	Volume de solvente de eluição: 6mL
Secagem: evaporador rotativo e Fluxo de N_2	Secagem: Fluxo de N_2

Nesta etapa, o método de extração (SPE) modificado, foi aplicado a amostras em branco (água MilliQ), amostra testemunha (água subterrânea sem enriquecimento com os analitos) e amostra enriquecida (água subterrânea enriquecida com 1 ng mL^{-1} de cada parabeno). A recuperação foi calculada comparando-se as áreas obtidas para o "ponto na matriz", ou seja, o extrato da amostra testemunha reconstituído em uma solução padrão (500 ng mL^{-1}) dos parabenos em acetato de etila.

Após o procedimento de SPE, os extratos em acetato de etila foram submetidos à derivação e análise, sob as condições previamente otimizadas.

3.2.9. Avaliação de efeito matriz

O efeito matriz foi avaliado pela construção de curvas analíticas no extrato da matriz, em comparação com as curvas construídas com os padrões em solvente. O extrato da matriz foi obtido a partir de amostras de água de rio, obtida no Ribeirão das Cruzes (Cachoeira Salto Grande, Araraquara-SP). As soluções padrão foram adicionadas ao extrato final da amostra, e posteriormente derivados com MSTFA (N-Metil-N-(trimetilsil) trifluoroacetanamida) conforme as condições otimizadas anteriormente.

Pode-se utilizar dois métodos para a avaliação desse efeito, como representados na Figura 6:

Figura 6 - Método de avaliação de efeito matriz. Fonte: Cardoso et al., 2008.

$$1)\ \%\, efeito\ matriz = \left(\frac{\delta_{matriz} - \delta_{solvente}}{\delta_{solvente}}\right) * 100\%$$

$$2)\ CV\ (\%) = \left(\frac{\partial_a}{\partial_b}\right) * 100\%$$

Onde: δ são os coeficientes angulares das curvas de calibração; ∂_a o desvio padrão entre a razão área/concentração obtida em cada ponto da curva na matriz e no solvente e ∂_b a média entre a razão área/concentração obtida em cada ponto da curva na matriz e no solvente.

O método 1 utiliza os coeficientes angulares das curvas de calibração do método na matriz e no solvente, podendo ser calculado através da diferença entre eles, sendo aceitável uma diferença até 10%. Já o método 2 avalia se as variâncias residuais das duas curvas são significativamente diferentes, calculando o CV(%) obtido da área/concentração no solvente e na matriz, o qual a diferença deve ser inferior a 20% [IMETRO,2010].

Limite de detecção e quantificação do método

Os limites de detecção e quantificação do método foram calculados da mesma maneira que o LD e LQ do sistema item 2.2.7, mas utilizando as curvas de calibração obtidas no extrato da matriz.

3.2.10. Estudo da Recuperação

A recuperação, ou seja, a eficiência do processo de isolamento dos analitos de interesse da matriz foi avaliada através do uso de *surrogate*: uma substância pura adicionada à amostra que possui propriedades físico- químicas parecidas com as das moléculas de interesse [Ribani et al, 2004]. Neste caso o *surrogate* utilizado foi o metilparabeno- d4 (MeP-d4). O *surrogate* é adicionado no inicio do processo de tratamento da amostra e tem como principal papel a avaliação da recuperação dos analitos, por este motivo também é chamado de "padrão interno de recuperação". Então, a recuperação foi calculada através da equação:

$$Rec(\%) = \frac{Área\ obtida}{Área\ esperada} * 100$$

Todas as amostras foram fortificadas com solução de MeP-d4 com concentração 500 ng mL^{-1}, em contato por duas horas antes das extrações.

Como para os parabenos não existe materiais de referência certificado, no presente trabalho as amostras de água de rio foram enriquecidas com os analitos de interesse, sendo a adição realizada em três níveis de concentração da faixa linear das curvas analíticas (baixo – intermediário – alto) realizados em triplicata. Foram calculados os coeficientes de variação (CV) das triplicatas de cada nível estudado. Os dados considerados adequados para estes valores de concentração são recuperação entre 50-120% e CV de até 20% [BERNARDES et al., 2011].

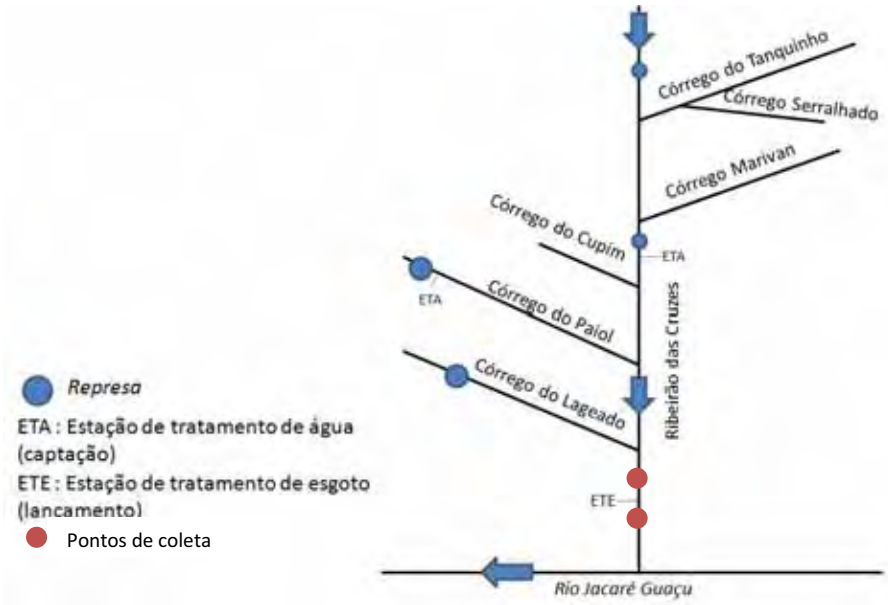
3.2.11. Análise de parabenos em água do rio Ribeirão das Cruzes antes e após o lançamento de efluente de ETE.

Aplicou-se o método validado nas amostras coletadas à montante e à jusante da estação de tratamento de esgoto no Ribeirão das Cruzes- Araraquara- SP. As amostras foram analisadas em triplicata. A busca pelos parabenos deu-se pelo modo íon extraído, e a média das áreas interpoladas nas curvas de calibração anteriormente construídas para o cálculo das concentrações de cada parabeno nesta matriz ambiental.

Aplicação do método a amostras ambientais

As análises de parabenos foram realizadas em água do rio Ribeirão das Cruzes – Araraquara-SP, a montante e a jusante da estação de tratamento de esgoto. Como apresentado no diagrama unifilar da Figura 7.

Figura 7 - Diagrama unifilar do Ribeirão das Cruzes, com a localização dos pontos de amostragem incluídos neste trabalho (fonte: FRANCO, 2013).



Anteriormente à coleta, condicionou-se o frasco coletor bem como o frasco de vidro âmbar de 4L com a amostra a ser coletada. Após o condicionamento dos materiais, coletou-se aproximadamente 4L de água em cada ponto. Como a água de rio contêm razoável quantidade de matéria orgânica sofre rápida degradação, portanto o armazenamento deve ser em baixas temperaturas e a realização do tratamento das amostras necessita ser o mais rápido possível. Tendo

em vista tais considerações, transportou-se a água até o laboratório em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Os tratamentos de filtração e extração foram realizados logo em seguida.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Condições Cromatográficas

4.1.1. Para os parabenos derivados

Primeiramente foram realizadas injeções de cada padrão individualmente após a reação de derivação, segundo condições da literatura, utilizando os m/z também da literatura [Shanmungam et al., 2010], foi analisado o tempo de retenção de cada parabeno, e posteriormente, escolhidos os fragmentos com maior intensidade, para serem utilizados no modo íon extraído (Tabela 12).

Tabela 12 - Analitos de interesse derivados com seus respectivos m/z.

Composto	Massa molar original	Massa molar do derivado	*m/z*(encontrado na literatura)*	*m/z* (escolhido)
MeP-d4	156.0	228.0	-------	226.1; 225.2; 224.2
MeP	152.15	224.15	224.3	224.3; 193.3
EtP	166.18	238.18	223.0	238.4; 195.2; 193.3
PrP	180.20	252.20	252.3	252.3; 210.5; 194.2
i-BuP	194.23	266.23	251.0	210.6; 211.3; 195.2
n-BuP	194.23	266.23	251.0	210.6; 211.3; 195.2

*[Shanmungam et al., 2010]

Os cromatogramas e os fragmentogramas obtidos para as soluções padrão individuais estão apresentados nas Figuras 8 a 12.

Figura 8 - Cromatogramas (CG-EM) e espectro de massas obtidos para solução padrão de metilparabeno(MeP) (1 µg mL^{-1}) em acetato de etila após derivação com MTSFA. (a) Cromatograma do íon total obtido em modo scan; (b) cromatograma obtido em modo íon extraído (*m/z* = 224,3); (c) espectro de massas do pico eluindo em 8,56 min.

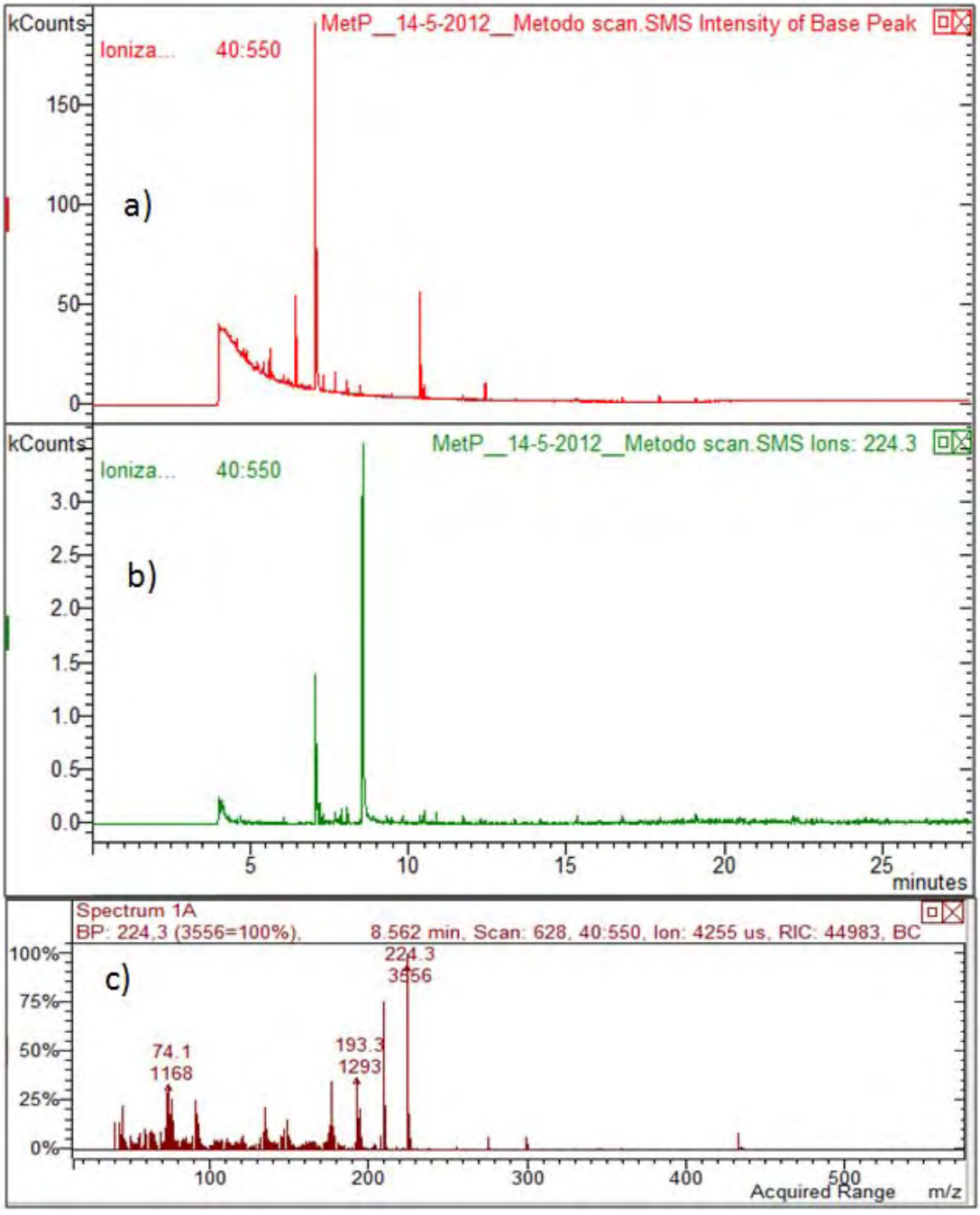


Figura 9 - Cromatogramas (CG-EM) e espectro de massas obtidos para solução padrão de etilparabeno (EtP) (1 µg mL^{-1}) em acetato de etila após derivação com MTSFA. (a) Cromatograma do íon total obtido em modo scan; (b) cromatograma obtido em modo íon extraído (*m/z* = 223); (c) espectro de massas do pico eluindo em 8,99 min.

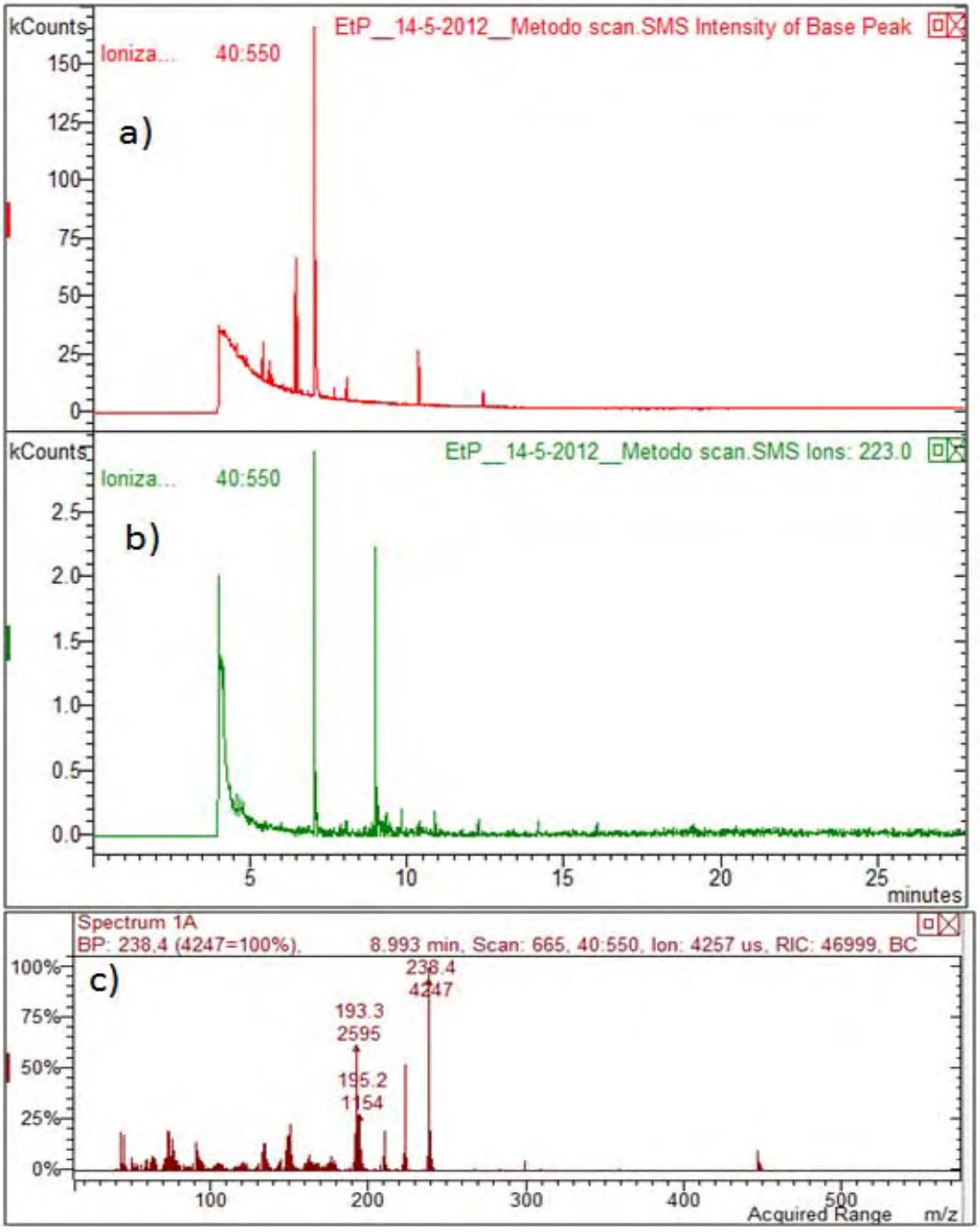


Figura 10 - Cromatogramas (CG-EM) e espectro de massas obtidos para solução padrão de propilparabeno (PrP) (1 µg mL^{-1}) em acetato de etila após derivação com MTSFA. (a) Cromatograma do íon total obtido em modo scan; (b) cromatograma obtido em modo íon extraído (*m/z* = 252.3); (c) espectro de massas do pico eluindo em 9,57 min.

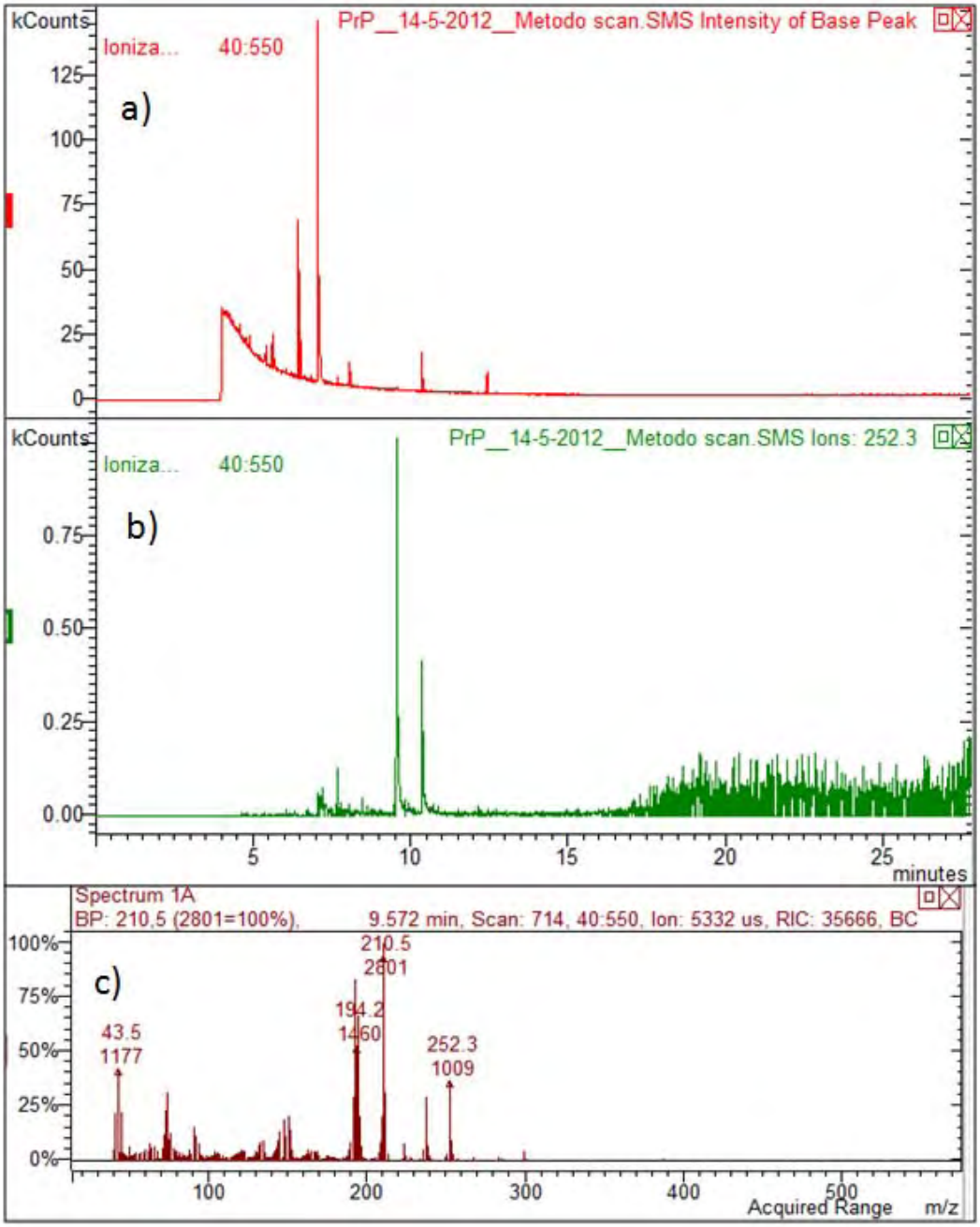


Figura 11 - Cromatogramas (CG-EM) e espectro de massas obtidos para solução padrão de *iso*-butilparabeno (*i*-BuP) (1 µg mL^{-1}) em acetato de etila após derivação com MTSFA. (a) Cromatograma do íon total obtido em modo scan; (b) cromatograma obtido em modo íon extraído (*m/z* = 251); (c) espectro de massas do pico eluindo em 9,92 min.

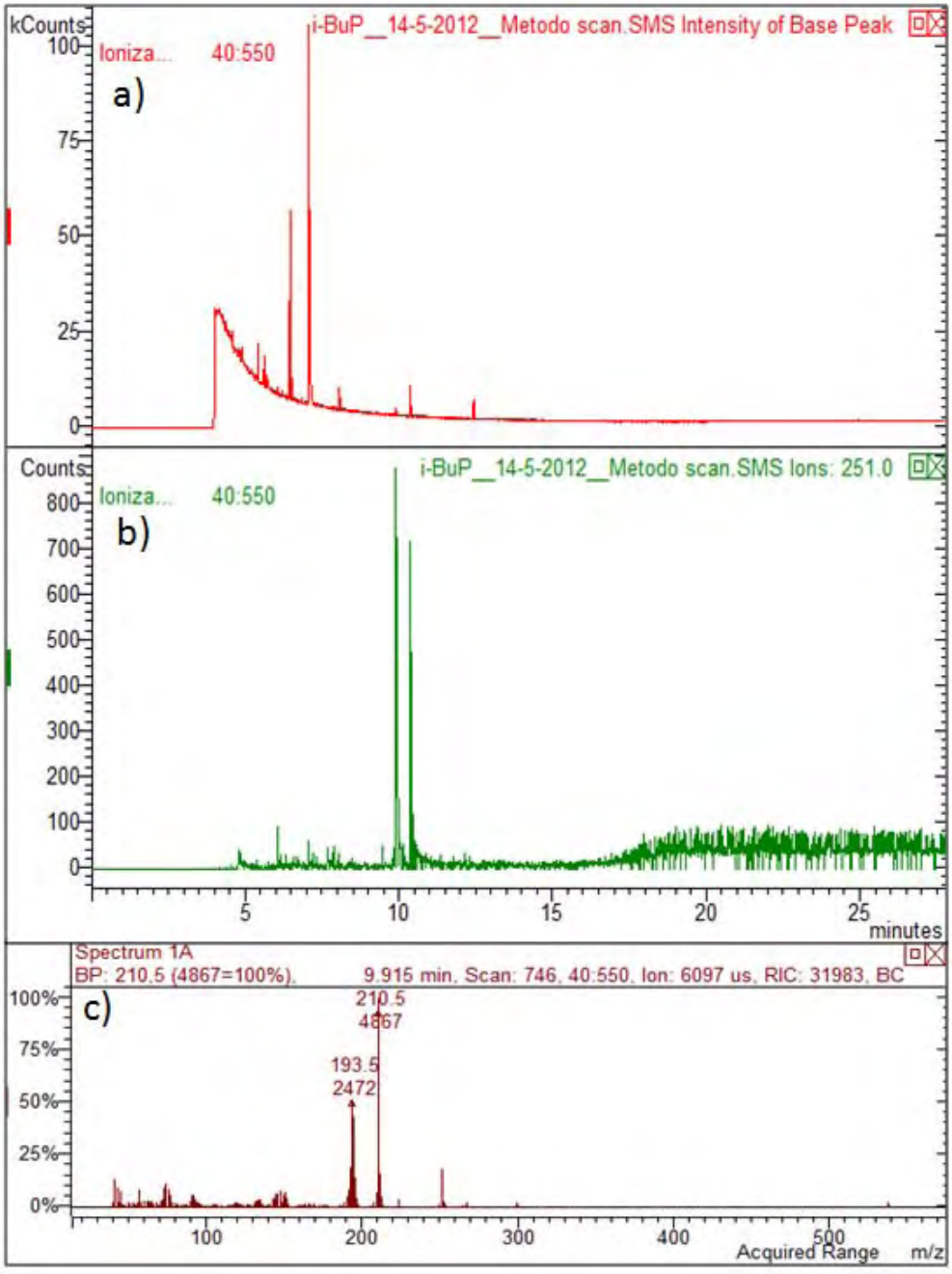
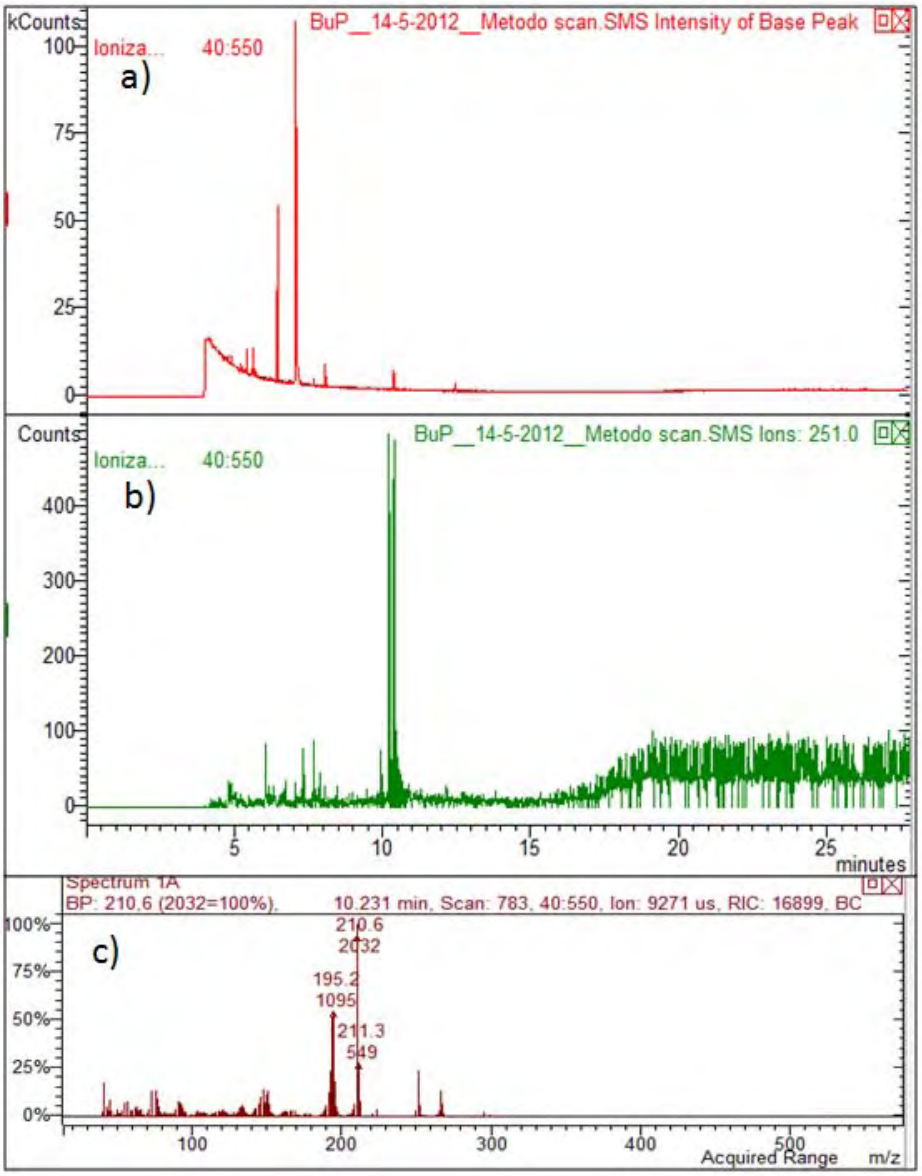


Figura 12 -Cromatogramas (CG-EM) e espectro de massas obtidos para solução padrão de *n*-butilparabeno (*n*-BuP) (1 µg mL^{-1}) em acetato de etila após derivação com MTSFA. (a) Cromatograma do íon total obtido em modo scan; (b) cromatograma obtido em modo íon extraído (*m/z* = 251); (c) espectro de massas do pico eluindo em 10,23 min.



De acordo com as Figuras de 8 a 12, os picos dos analitos de interesse, mesmo após a obtenção do cromatograma em modo íon extraído, possuem baixa intensidade (em torno de 400 counts) em relação os picos referentes aos produtos secundários da reação de derivação (aproximadamente 300 kcounts), além disso, é possível observar que há grande quantidade desses picos referentes aos produtos secundários da derivação, indicando que o rendimento da reação de derivação não foi satisfatório.

4.1.2. Para os parabenos não derivados

Considerando que a reação de derivação além de ser um procedimento a mais para o método de análise dos parabenos, possui inúmeras variáveis que podem interferir no seu rendimento, foram realizados testes de análise sem a reação de derivação.

A partir dos espectros de massa obtidos para cada analito foram analisados os tempos de retenção de cada um, e posteriormente, escolhidos os fragmentos com maior intensidade, para serem utilizados no modo íon extraído (Tabela 13).

Tabela 13 - Analitos de interesse não derivados com seus respectivos m/z.

Composto	Massa molar	*m/z* (escolhido)
MeP-d4	156,0	125.0; 156.0; 69.0
MeP	152,15	121.0; 152.0; 65.0
EtP	166,18	121.0; 166.0; 138.0; 65.0
PrP	180,20	121.0; 138.0; 65.0
i-BuP	194,23	121.0; 138.0; 65.0
n-BuP	194,23	121.0; 138.0; 65.0

Os cromatogramas da solução padrão e os espectros de massa para os parabenos estudados estão apresentados nas Figuras 13 a 18.

Figura 13 - Cromatogramas (CG-EM) e espectro de massas obtidos para solução padrão de metilparabeno-d4 (*MeP-d4*) (1 µg mL^{-1}) em acetato de etila. (a) Cromatograma do íon total obtido em modo scan; (b) cromatograma obtido em modo íon extraído (*m/z* = 125.0); (c) espectro de massas do pico eluindo em 11,84 min.

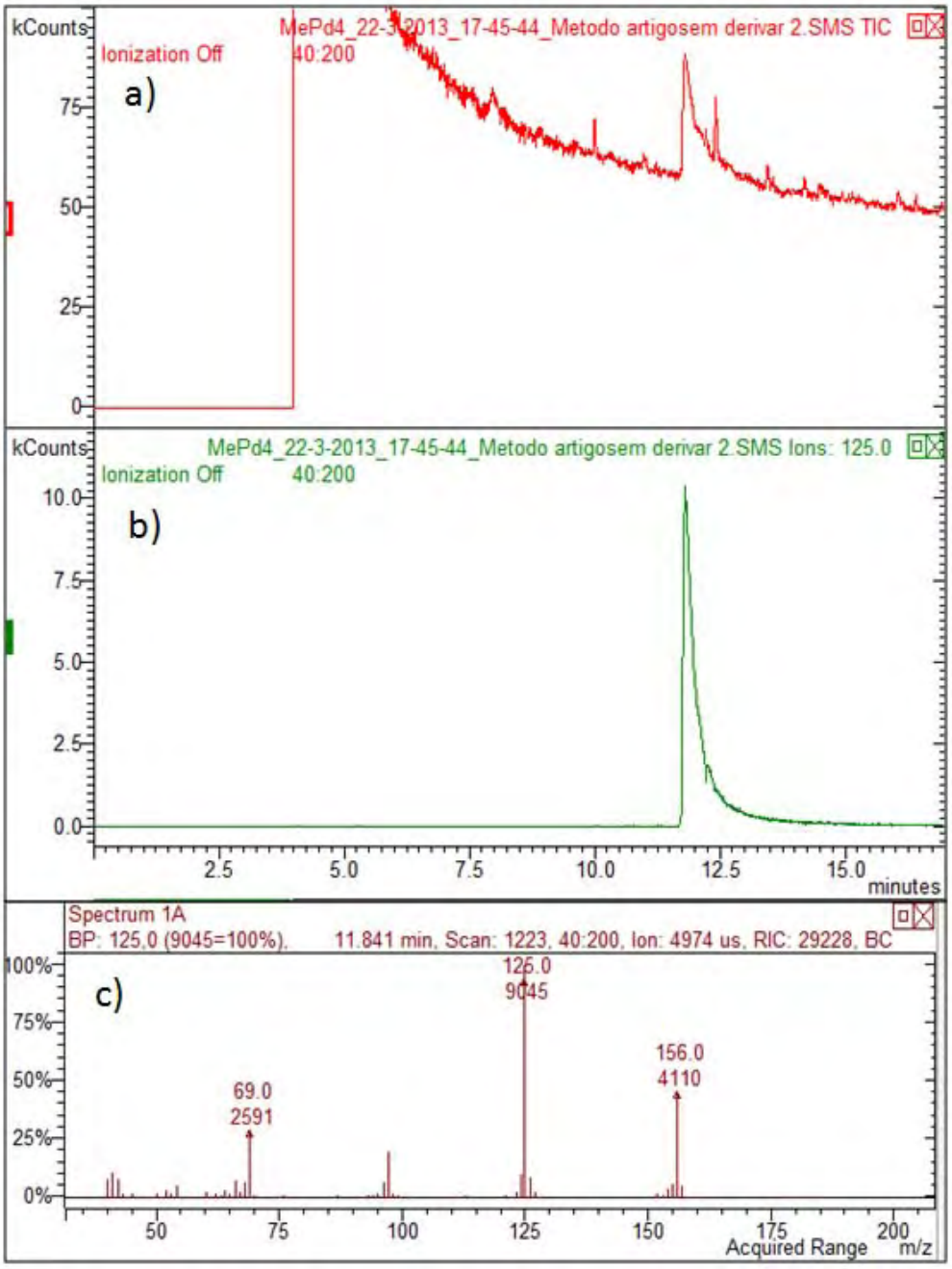


Figura 14 - Cromatogramas (CG-EM) e espectro de massas obtidos para solução padrão de metilparabeno (*MeP*) (5 µg mL^{-1}) em acetato de etila. (a) Cromatograma do íon total obtido em modo scan; (b) cromatograma obtido em modo íon extraído (*m/z* = 121.0); (c) espectro de massas do pico eluindo em 11,84 min.

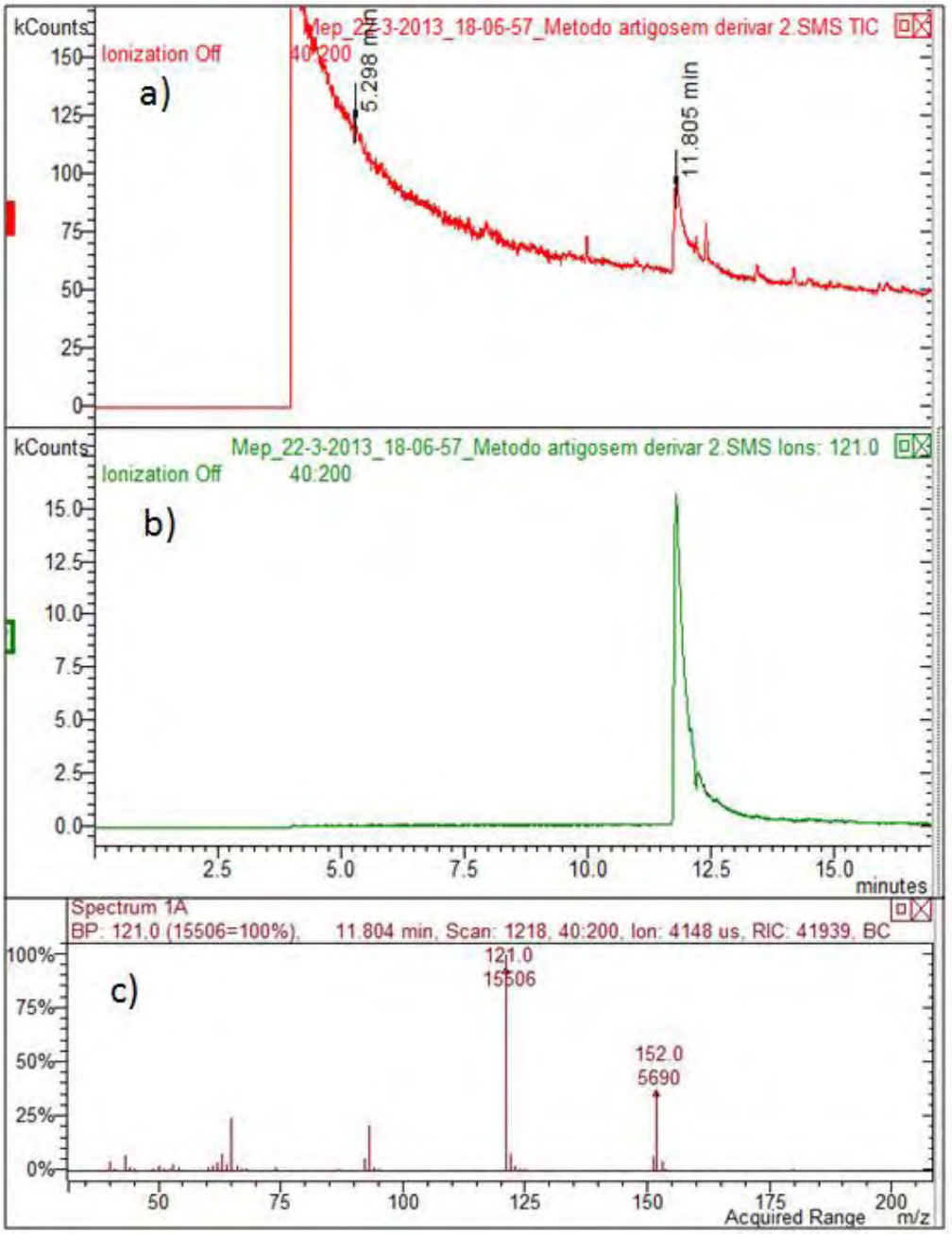


Figura 15 - Cromatogramas (CG-EM) e espectro de massas obtidos para solução padrão de etilparabeno (*EtP*) (5 µg mL^{-1}) em acetato de etila. (a) Cromatograma do íon total obtido em modo scan; (b) cromatograma obtido em modo íon extraído (*m/z* = 121.0); (c) espectro de massas do pico eluindo em 12,66 min.

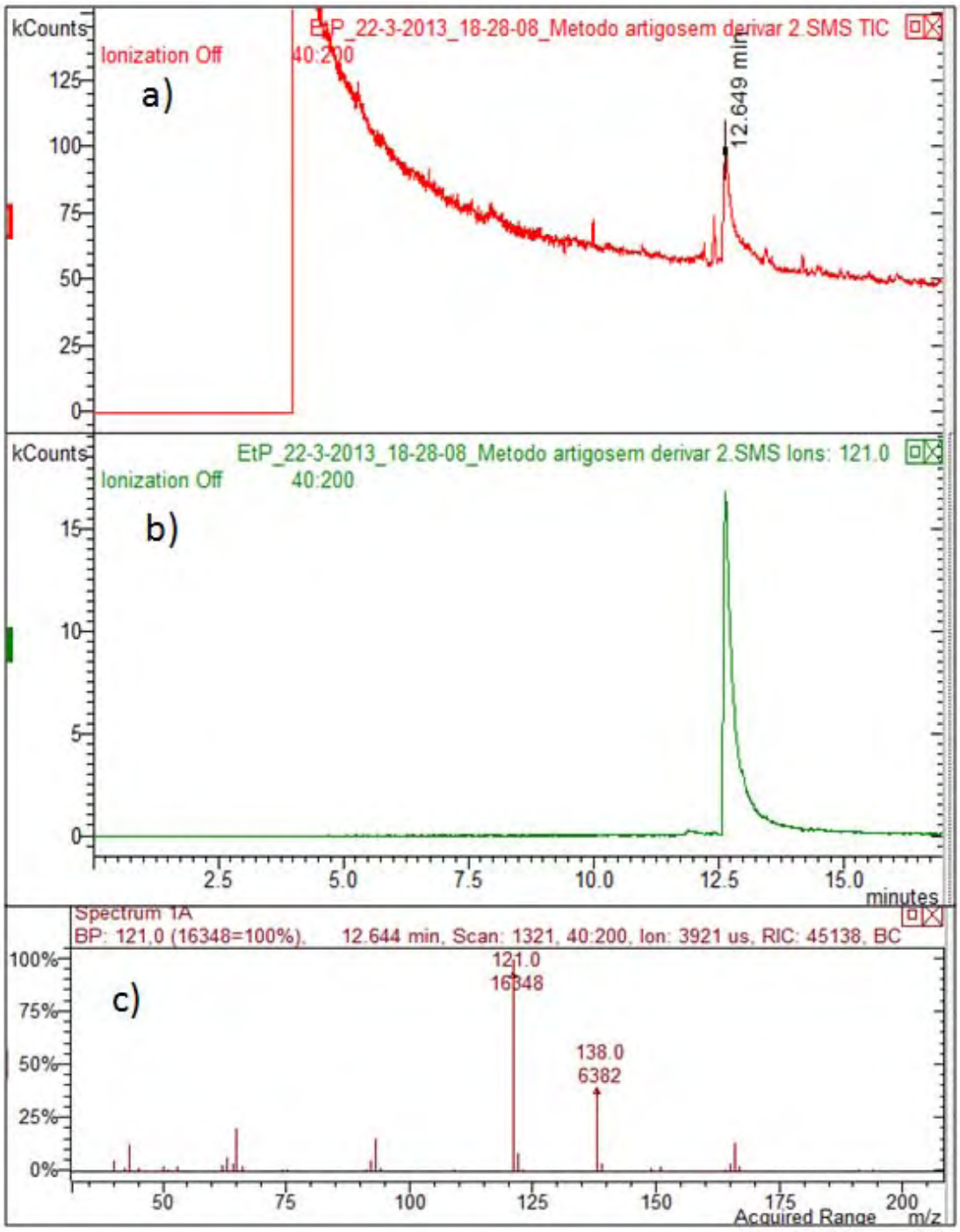


Figura 16 - Cromatogramas (CG-EM) e espectro de massas obtidos para solução padrão de propilparabeno (Pr*P*) (5 µg mL^{-1}) em acetato de etila. (a) Cromatograma do íon total obtido em modo scan; (b) cromatograma obtido em modo íon extraído (*m/z* = 121.0); (c) espectro de massas do pico eluindo em 12,66 min.

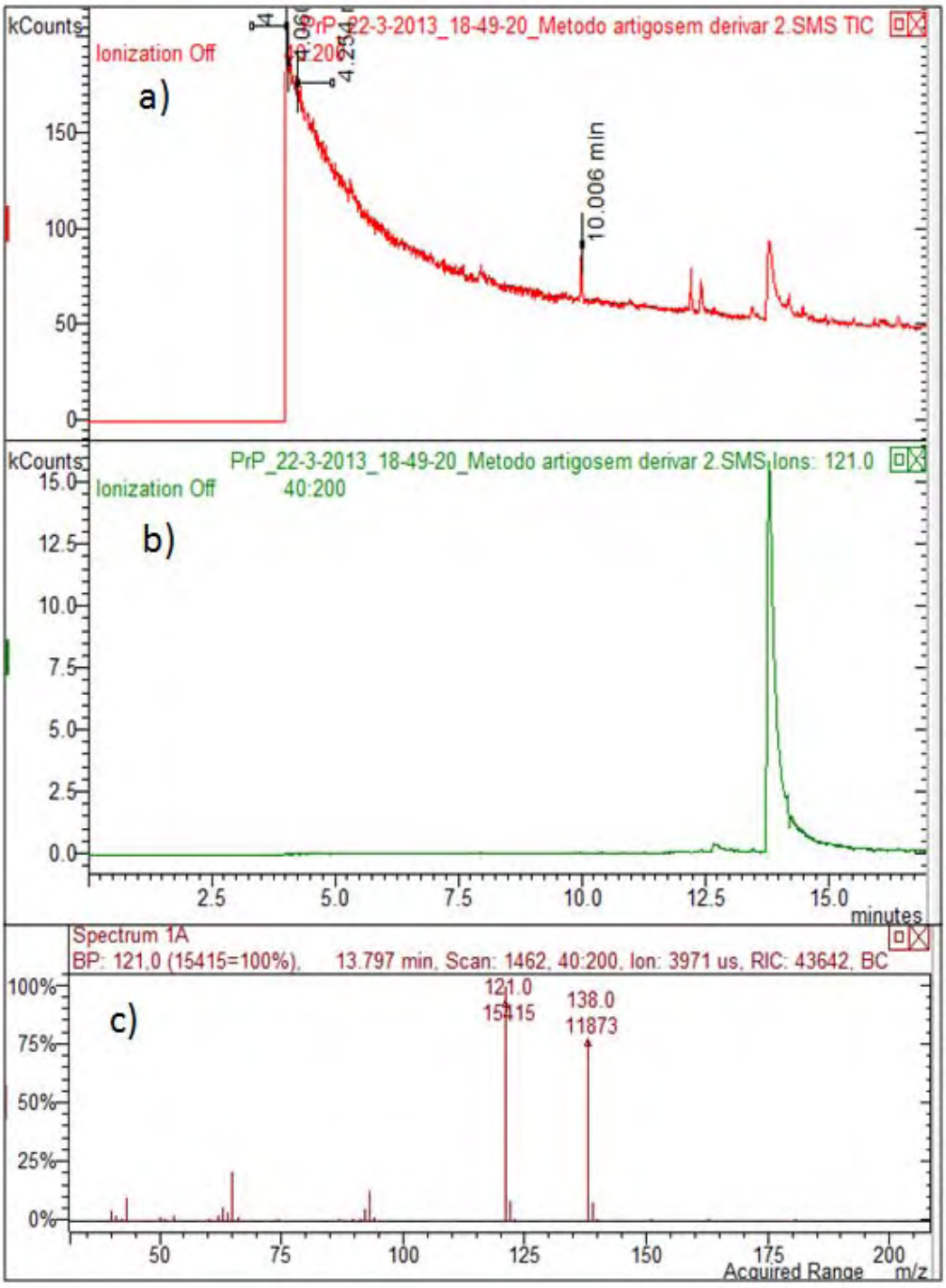


Figura 17 - Cromatogramas (CG-EM) e espectro de massas obtidos para solução padrão de *i*-butilparabeno (*i*-Bu*P*) (5 µg mL^{-1}) em acetato de etila. (a) Cromatograma do íon total obtido em modo scan; (b) cromatograma em modo íon extraído (*m/z* = 121.0); (c) espectro de massas do pico eluindo em 14,42 min.

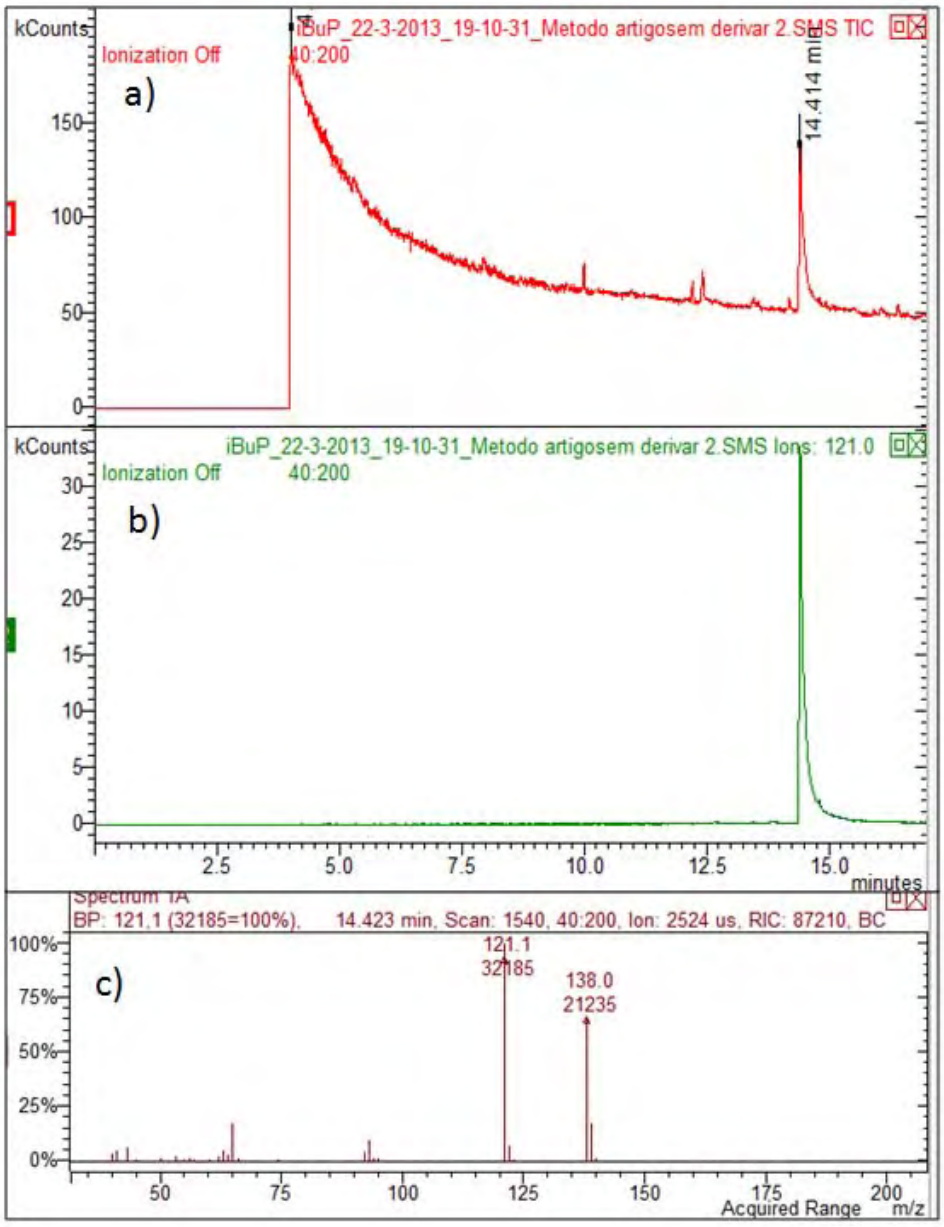
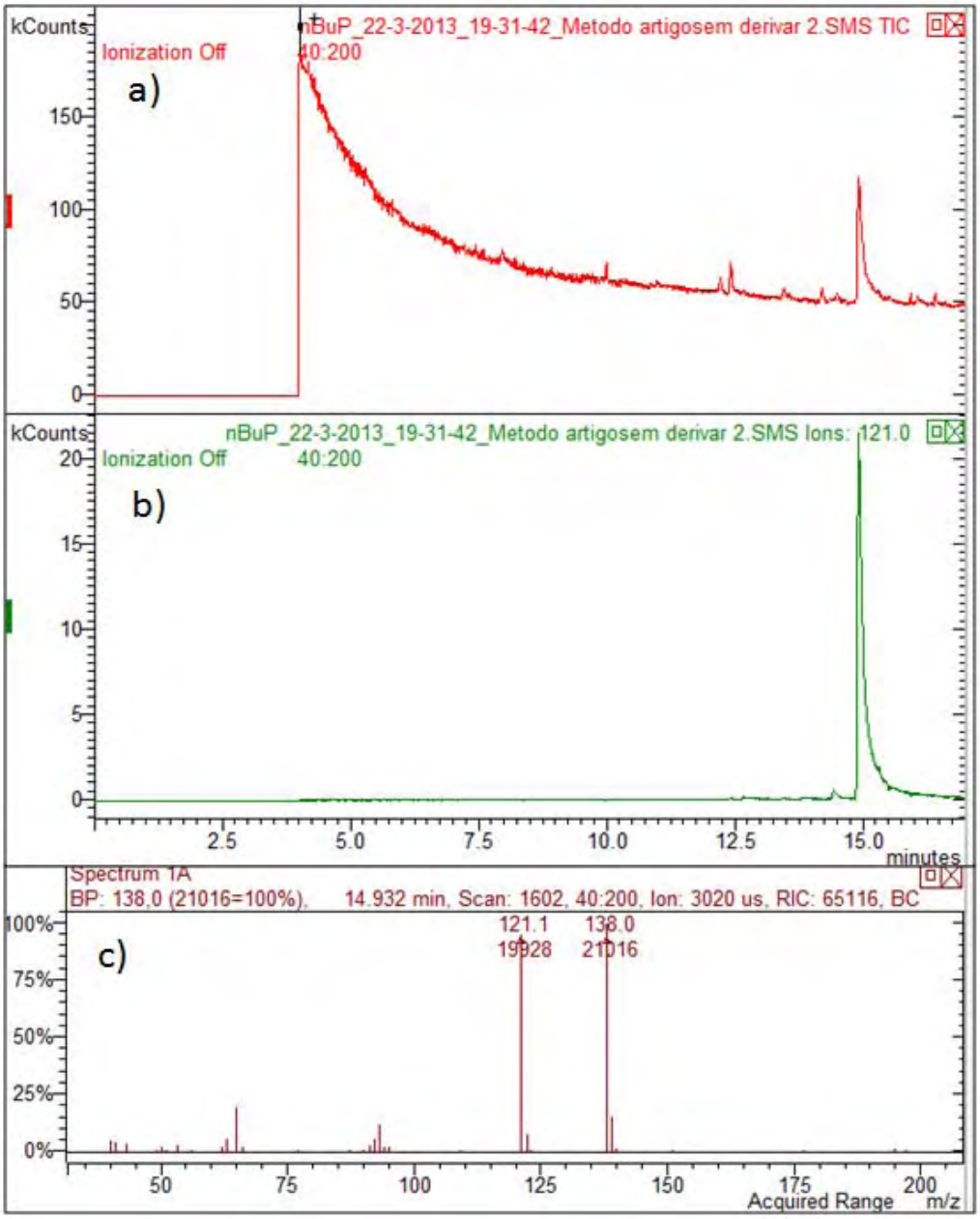
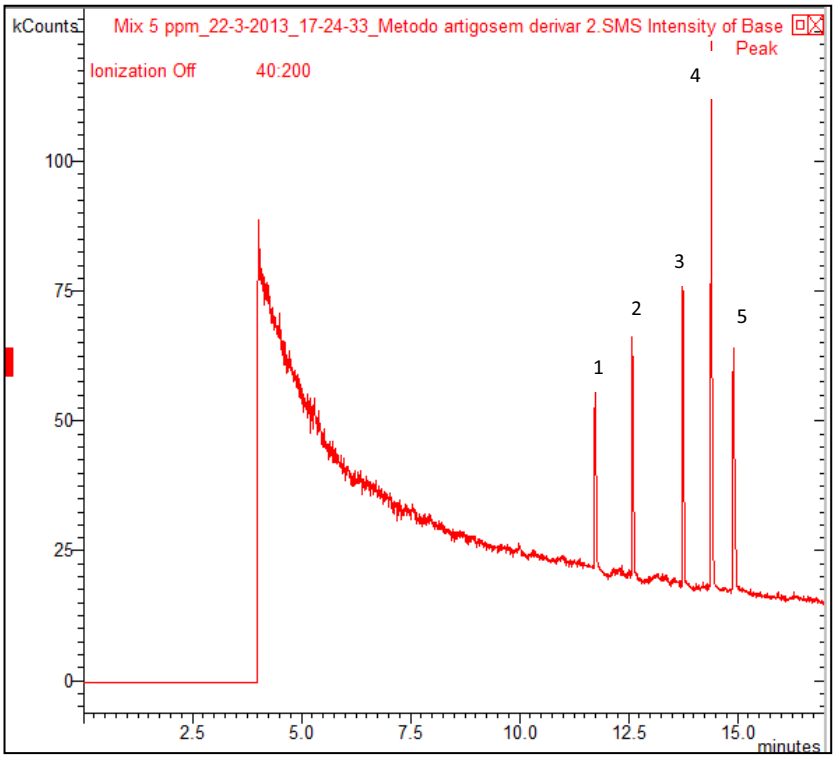


Figura 18 - Cromatogramas (CG-EM) e espectro de massas obtidos para solução padrão de *n*-butilparabeno (*n*-Bu*P*) (5 µg mL^{-1}) em acetato de etila. (a) Cromatograma do íon total obtido em modo scan; (b) cromatograma obtido em modo íon extraído (*m/z* = 121.0); (c) espectro de massas do pico eluindo em 14,93 min.



Posteriormente fez-se a injeção da mistura dos analitos, obtendo-se o cromatograma apresentado na Figura 19.

Figura 19- Cromatograma (GC-MS, SCAN) para uma solução padrão mista contendo os parabenos sem derivação (5 µg mL-1). Onde: (1) MeP e MePd4; (2) EtP; (3) PrP; (4) i-BuP; (5) n-BuP.

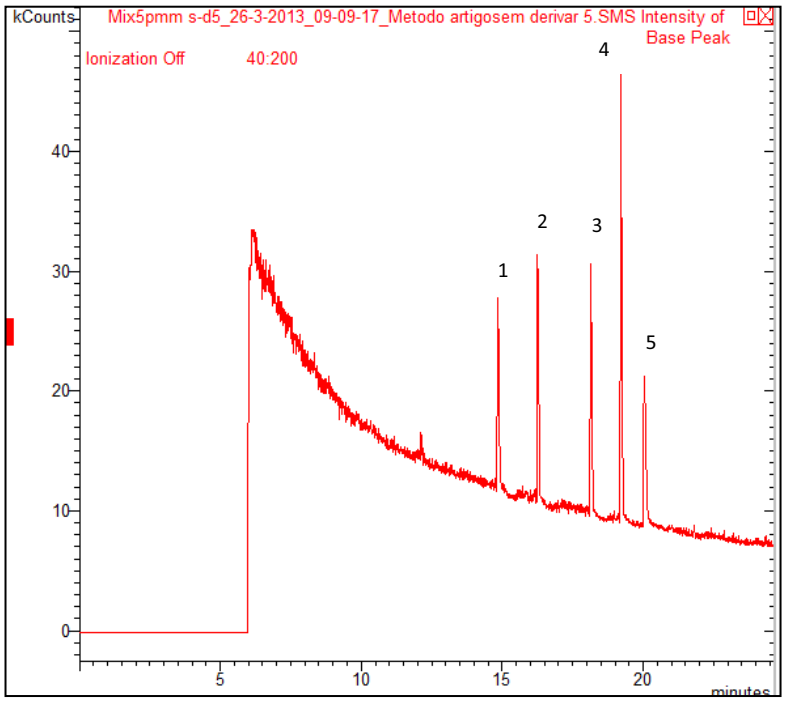


A partir do cromatograma obtido, pode-se observar que houve uma separação satisfatória dos analitos. Considerando este fato modificou-se a programação do aquecimento da coluna (Tabela 14), obtendo-se um novo cromatograma (Figura 20).

Tabela 14 - Condições cromatográficas modificadas.

	Condição
Coluna	ZB-5, Phenomenex(30 m x 0,25 mm diâmetro interno x 0,25µm espessura do filme de 5%fenil, 95% metilpolissiloxano)
Volume de Injeção	1µL
Modo de Injeção	t=0 split(1:20) t=0.01 splitless t=1.5 split(1:5)
Temperatura do injetor	280°C
Temperatura da interface	300°C
Temperatura do Detector	220°C
Programação do aquecimento da coluna	70°C (1min) (6°Cmin^{-1}) → 220°C (25°Cmin^{-1})→ 250°C (1min)
Gases	Vazão do gás de arraste (He): 1 mL/min^{-1}.
Modo de aquisição dos dados	Scan (*m/z* 40-450) Seguido da extração de íons conforme a Tabela13.

Figura 20- Cromatograma (GC-MS, SCAN) para uma solução padrão mista contendo os parabenos sem derivação (5 µg mL^{-1}), programa de temperatura da coluna modificado (Tabela 14). Onde: (1) MeP e MePd4; (2) EtP; (3) PrP; (4) *i*-BuP; (5) *n*-BuP.



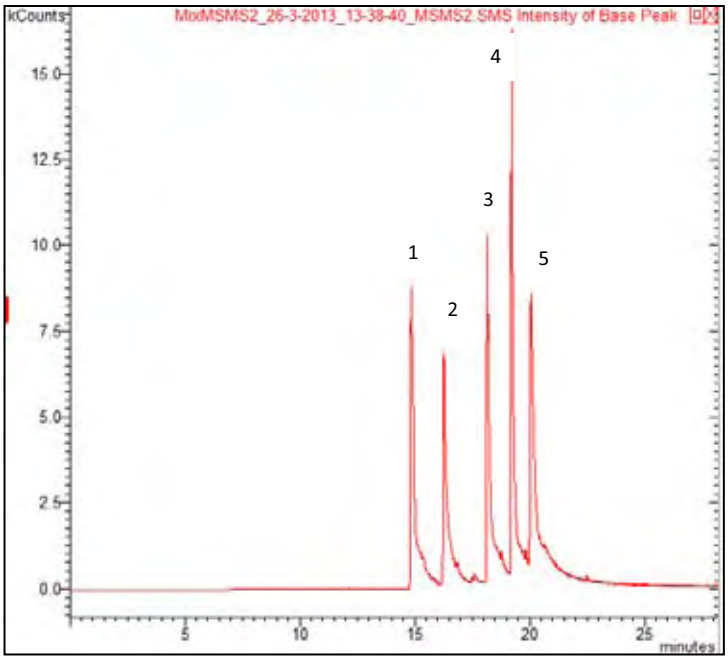
Considerando que na matriz pode haver compostos que interfiram na análise dos parabenos optou-se por utilizar o modo MS/MS. Após o teste do AMD as energias de quebra escolhidas para cada parabeno foram as que resultaram em picos mais intensos. Estas estão sumarizadas na Tabela 15.

Tabela 15 - Condições otimizadas para o método MS-MS para os parabenos não derivados.

Composto	Tempo de Retenção (min)	Janela do TR (min)	Íon de Quantificação e Identificação	Energia de Ionização
MeP-d4	14,86	11,40-15,94	125.0	0,4V
MeP	14,86	11,40-15,94	121.0	0,4V
EtP	16,25	15,94-17,48	92.8	0,7V
PrP	18,16	17,48-18,87	121.0	0,4V
i-BuP	19,22	18,87-19,81	121.0	0,4V
BuP	20,07	19,81-21,45	121.0	0,4V

O cromatograma para a mistura de parabenos em concentração 600 ng mL^{-1} após as condições do MS-MS otimizadas está na Figura 21.

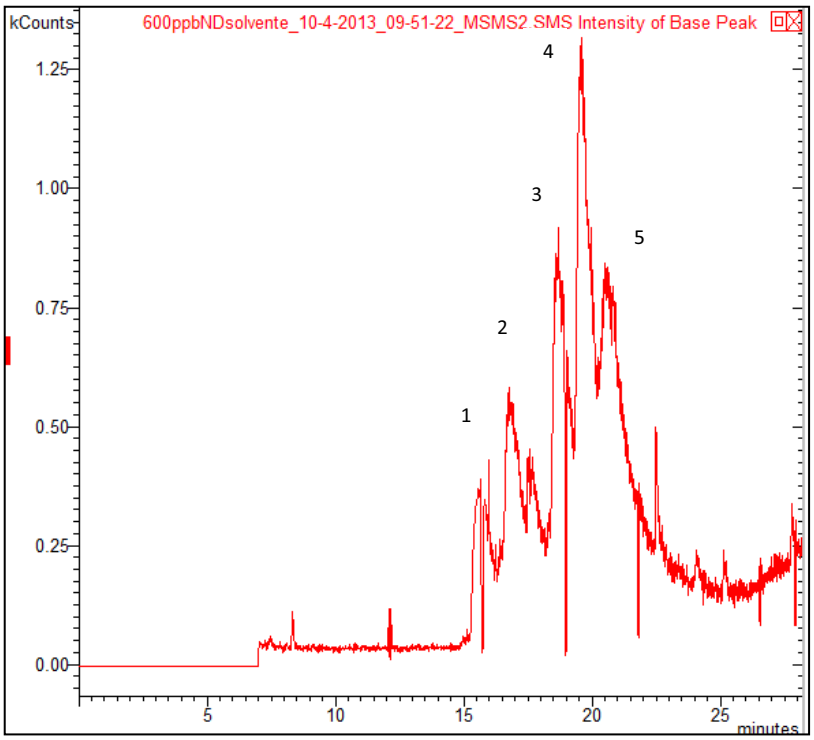
Figura 21 - Cromatograma da mistura de parabenos (600 ng mL^{-1}) obtido em modo MS/MS. Onde: (1) MeP e MePd4; (2) EtP; (3) PrP; (4) *i*-BuP; (5) *n*-BuP.



4.2. Problemas com os parabenos não derivados

Após a otimização do MS/MS para os não derivados a próxima etapa seria a construção da curva de calibração. No entanto, quando injetou-se novamente a mistura de parabenos a 600 ng mL^{-1} em outro momento mas a análise não se mostrou repetitiva. Resultando em um cromatograma com baixa resolução, conforme mostrado na Figura 22.

Figura 22 - Cromatograma da mistura de parabenos (600 ng mL^{-1}) obtidas no modo MS/MS. Onde: (1) MeP e MePd4; (2) EtP; (3) PrP; (4) *i*-BuP; (5) *n*-BuP.



Além da má resolução cromatográfica, pode-se observar também uma diminuição da resposta cromatográfica, que antes era em torno de 10 kCounts e agora por volta de 1kCounts.

Esta falta de repetibilidade nas análises dos parabenos não derivados pode ser explicada devido à polaridade destes compostos, que por possuírem grupos fenólicos, podem interagir com os grupos silanóis do liner (vidro) do injetor ou da parede da coluna (sílica fundida) resultando em comprometimento da resolução cromatográfica bem como menor detecção. Esta interação irreversível faz com que haja dispersão da amostra na coluna, gerando picos não gaussianos (com cauda) [BECKER, 2012].

Considerando a não repetibilidade nas análises cromatográficas dos parabenos não derivados, torna-se inviável a possibilidade de analisá-los sem a etapa de derivação. Então, neste trabalho será utilizada a reação de sililação anterior às injeções dos parabenos no sistema cromatogáfico.

4.3. Otimização da reação de derivação

4.3.1. Planejamento Experimental

Foi realizado um estudo prévio para a otimização da derivação através da análise multivariada dos fatores considerados mais relevantes, que resultou em um Planejamento Fatorial Completo (2^5). Após realizados os experimentos, calculou-se as médias das áreas para os cinco analitos (MeP, EtP, PrP, i-BuP- n-BuP) de cada cromatograma gerado.

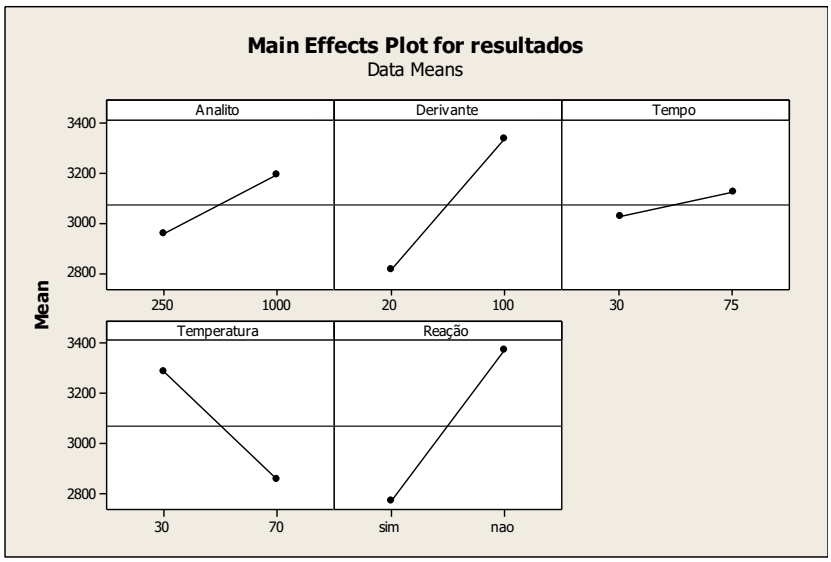
A Tabela 16 apresenta as médias das áreas dos cinco parabenos para cada ensaio realizado.

Tabela 16 - Média das áreas para os cinco parabenos em cada ensaio realizado.

Ensaio	Média das áreas	Ensaio	Média das áreas
1	3988,0	17	3666,5
2	2712,1	18	2628,9
3	3125,8	19	3735,8
4	3271,9	20	3781,3
5	1531,7	21	4478,1
6	3409,9	22	2610,3
7	3032,9	23	3611,0
8	3283,5	24	3757,3
9	1233,4	25	2396,3
10	1965,9	26	3691,6
11	2468,9	27	3034,3
12	2957,3	28	3736,4
13	2800,2	29	1828,9
14	2620,5	30	3400,5
15	2687,0	31	3660,9
16	3262,7	32	3952,7

Os resultados obtidos (médias das áreas) foram tratados utilizando-se o software Statística, sendo possível evidenciar as melhores condições de análise. A Figura 23 apresenta os gráficos de efeitos de cada variável envolvida, quanto maior a inclinação, mais pronunciado é o efeito.

Figura 23- Gráficos de efeitos para cada variável.

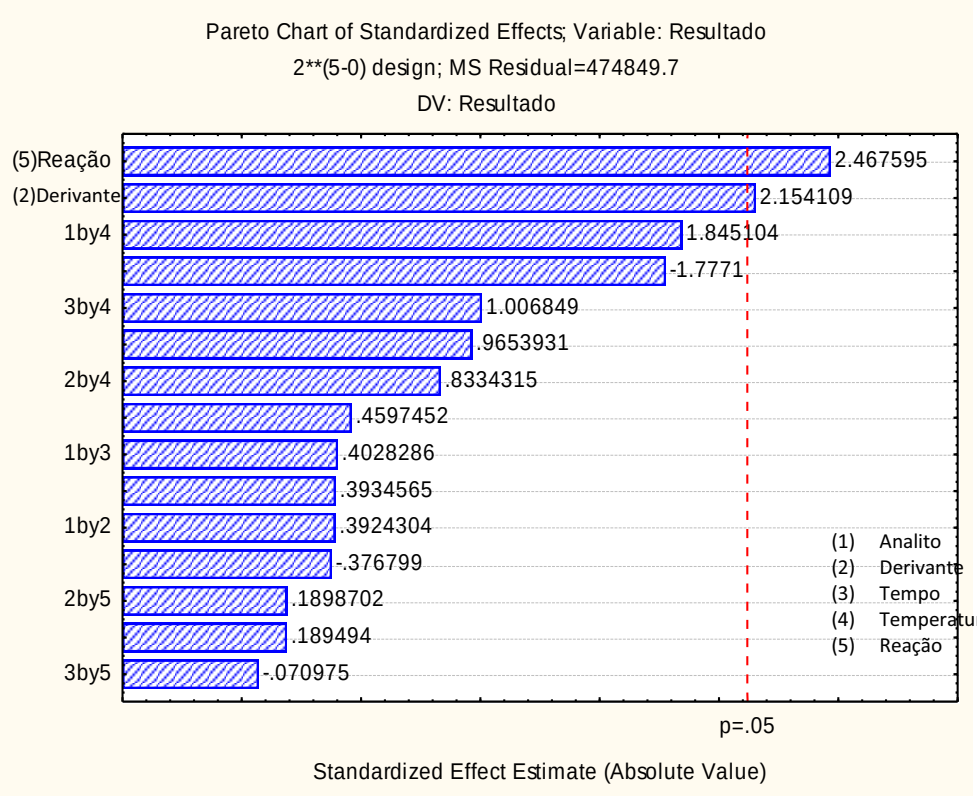


Pode-se observar um aumento da resposta cromatográfica (inclinação positiva) em condições de maiores volumes de analito e derivante, o que era esperado, já que a reação de sililação é uma reação de Substituição Nucleofílica Bimolecular, ou seja, sua constante de equilíbrio e seu rendimento dependem da concentração de ambos reagentes.

Há também alteração positiva na resposta com o aumento do tempo de reação, no entanto este efeito é menos pronunciado do que o apresentado pelo aumento do analito e derivante, ou pelo decréscimo da temperatura. Uma vez verificados os efeitos de cada fator envolvido no planejamento experimental, realizou-se uma análise de variância (ANOVA) para verificação de quais deles apresentam significância estatística nos experimentos.

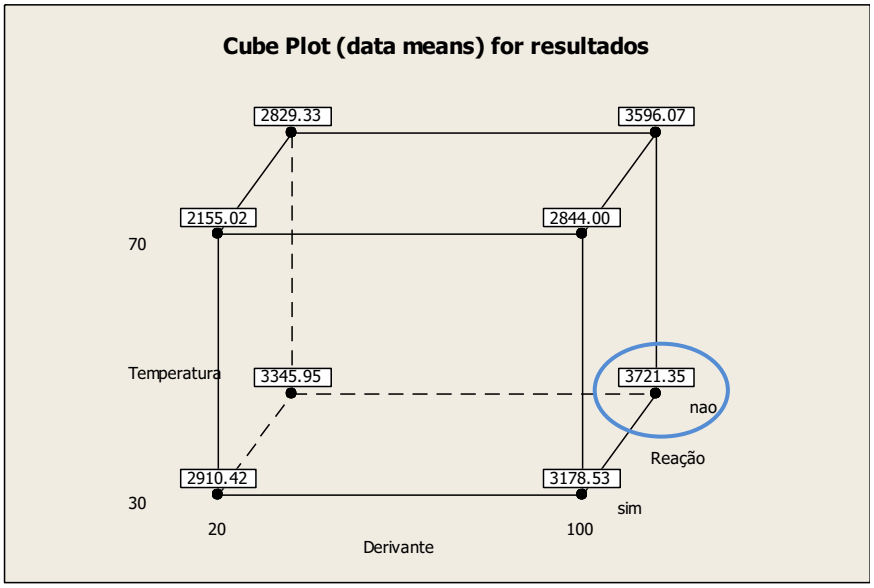
O gráfico de Pareto (Figura 24) sumariza os resultados obtidos na ANOVA. Foram dados como significativos, a 95% de confiança, que a interrupção ou não da reação e o volume de derivante (ambos com p-valor < 0,05) são as variáveis que exercem maior influência (aumento) na resposta instrumental do processo de derivação dos parabenos analisados.

Figura 24 - Gráfico de pareto.



A partir dos resultados dados como significativos pela ANOVA, construiu-se o gráfico tridimensional apresentado na Figura 25, que mostrou as melhores condições para o processo de derivação, considerando-se apenas o universo estudado e que estão representadas na Tabela 17.

Figura 25- Gráfico tridimensional (denominado gráfico de cubo) apresentado a interação entre as variáveis investigadas a condição de ótimo em destaque.



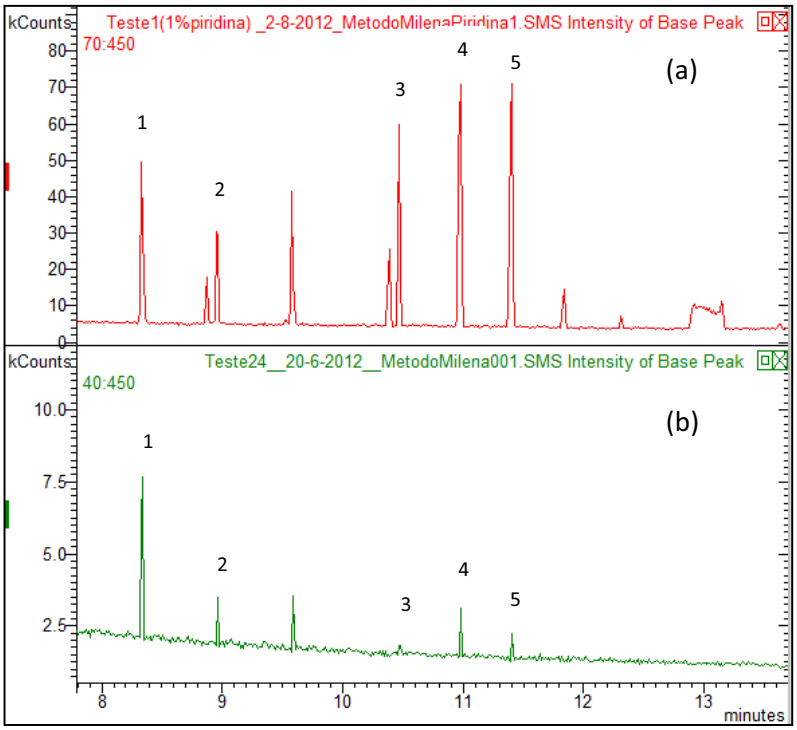
Considerando este estudo estatístico, as condições melhoradas para o processo de derivação, incluem os parâmetros sumarizados na Tabela17.

Tabela 17 - Condições estabelecidas para o processo de derivação.

Parâmetro	Valor
Tempo de reação	70 min
Volume de solução	1000 µL
Volume de agente de derivação	100 µL
Temperatura do banho	30°C
Interrupção da reação	Não

A segunda etapa de melhoria do processo de derivação deu-se através da adição de uma pequena porcentagem de piridina no sistema reacional, considerando que esta substância desloca o equilíbrio químico para a formação dos reagentes. Foi observado um aumento de resposta de até 50% com a adição de 1% piridina no meio reacional (Figura26). Como este trabalho visa à quantificação dos parabenos as próximas derivações realizadas foram com acetato de etila: piridina (99:1; v/v).

Figura 26 - Comatograma obtido através da análise dos parabenos derivados (a) com 1% de piridina, (b) sem piridina no meio reacional. Onde: (1) MeP e MePd4; (2) EtP; (3) PrP; (4) *i*-BuP; (5) *n*-BuP.



Como citado anteriormente espera-se que a reação de derivação possua 100% de rendimento, no entanto outros compostos podem ser formados, e provocar picos múltiplos de uma

mesma substância ou componentes inesperados para a análise de misturas [LITTLE, 1999]. Desta maneira torna-se necessário um método cromatográfico mais seletivo como o modo MS/MS.

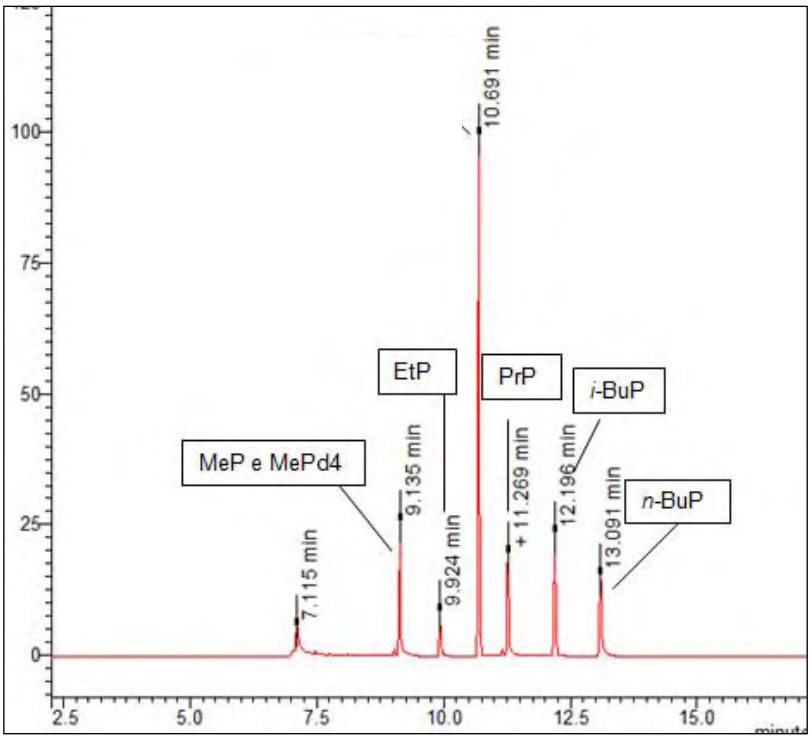
4.4. Otimização da análise no modo MS/MS para os parabenos derivados

Utilizando-se a ferramenta AMD do sistema GC/MS Varian Saturno 2000, as condições de melhor desempenho foram as que estão apresentadas na Tabela18 que resultaram em picos mais intensos (Figura27).

Tabela 18 - Condições otimizadas para o método MS-MS para os parabenos derivados.

Substância	Tempo de Retenção (min)	Janela do t_R (min)	Íon de Quantificação e Identificação	Energia de Ionização
MeP-d4	9,1	0,00-7,00	213.1	0,4V
MeP	9,1	7,00-9,50	209.1	0,3V
EtP	9,9	9,50-10,20	238.0	0,1V
AcPHBz	10,6	10,20-10,75	271.1	0,1V
PrP	11,2	10,75-11,20	210.0	0,1V
i-BuP	12,1	11,20-12,25	209.9	0,1V
BuP	13,0	12,25-13,50	195.0	0,5V

Figura 27 - Cromatograma (GC-MS/MS) para os parabenos derivados na condições de derivação e ionização otimizadas .

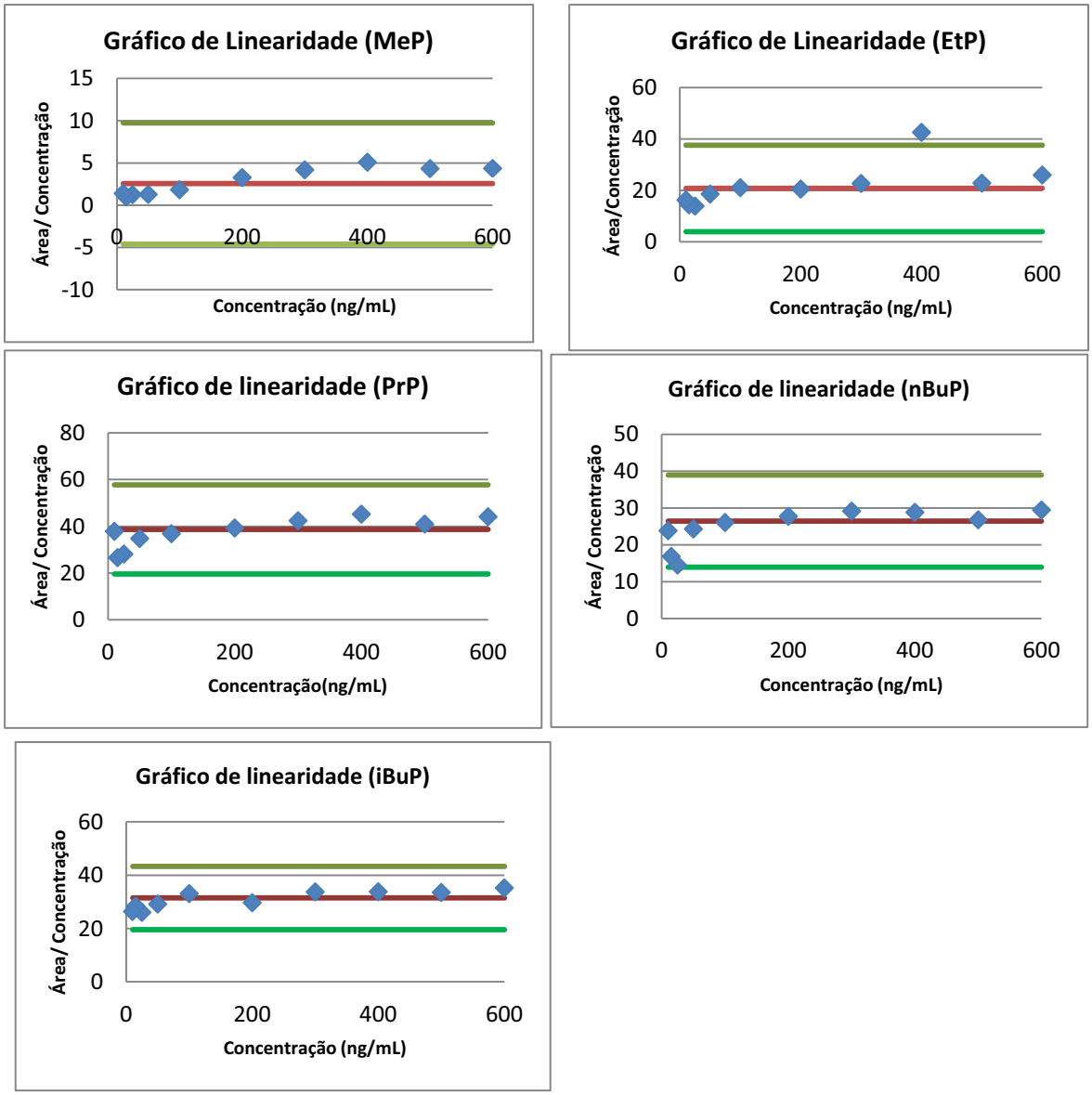


A reação de sililação diminui a polaridade dos analitos consequentemente estes estão sujeitos a menor adsorção no sistema cromatográfico, o que melhora a separação, aumenta a sensibilidade e a simetria dos picos, além de tornar as análises mais repetitivas. Apesar de ser uma etapa a mais no processo de análise e necessitar de estudo prévio para sua otimização, as vantagens superam as desvantagens desta etapa.

4.5 Faixa de trabalho, linearidade, curva de calibração e limites de detecção e de quantificação do sitema cromatográfico

Utilizando-se as áreas obtidas nos cromatogramas do modo íon extraído, calculou-se a média das triplicatas para cada analito, o desvio padrão assim como o coeficiente de variação (CV). Os gráficos de linearidade construídos conforme descrito na seção 2.2.6, estão na Figura 28.

Figura 28 - Graficos de linearidade para cada um dos parabenos estudados. Soluções padrão em acetato de etila (Verde claro: limite inferior; Vermelho: mediana; Verde Escuro: limite superior).



A partir das curvas de linearidade pode-se observar um comportamento diferente para concentrações menores quando comparados aos pontos de maior concentração. Os pontos de concentração de 10 a 100 ng mL^{-1} encontram-se em sua maioria, abaixo da mediana. Enquanto os pontos de 200 a 600 ng mL^{-1} estão melhores distribuídos em torno deste valor. Considerando este fato, optou-se por dividir as curvas analíticas em dois intervalos lineares, sendo um com concentrações de 10 a 100 ng mL^{-1} e outro de 200 a 600 ng mL^{-1}. As curvas obtidas estão apontadas na Tabela 19.

Tabela 19 - Curvas analíticas obtidas para as soluções padrão em acetato de etila em concentrações de 10 a 100 ng mL-1 e outro de 200 a 600 ng mL-1.

Composto	Curva no solvente 10 - 100 ng mL^{-1}	Curva no solvente 200 - 600 ng mL^{-1}
metilparabeno	y = 1,91x – 14,75 r = 0,99	y = 4,91x – 286,01 r = 0,99
etilparabeno	y = 22,09x – 129,00 r = 0,99	y = 26,37x – 948,38 r = 0,99
propilparabeno	y = 37,99x – 135,08 r = 0,99	y = 45,00x – 831,31 r = 0,99
i-butilparabeno	y = 72,02x – 965,11 r = 0,97	y = 32,57x + 832,60 r = 0,97
n-butilparabeno	y = 27,47x – 162,52 r = 0,99	y = 27,59x + 97,00 r = 0,98

Após a construção da curva de calibração, através do teste F a 95% de confiança, verificou-se que o melhor ajuste para os dados da curva era realmente o ajuste linear.

Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) do sistema

A partir dos parâmetros da curva de calibração de 10 - 100 ng mL^{-1} obtidas no solvente foram calculados o LD e LQ do sistema conforme o descrito na parte experimental. E, obteve os valores apontados na Tabela 20 para cada um dos compostos.

Tabela 20 - Limites de detecção e de quantificação do sistema analítico.

Composto	LD (ng mL^{-1})	LQ (ng mL^{-1})
MeP	16	24
EtP	14	20
PrP	14	20
i-BuP	44	64
n-BuP	25	36

4.6 Preparo da Amostra – Otimização SPE

As Figuras 29 a 31 apresentam os cromatogramas obtidos para extração dos analitos para cada eluente estudado.

Figura 29 - Cromatogramas obtidos pela eluição com metanol: acetato de etila (1:1; v/v). Pico (1) MeP e MePd4, (2)EtP, (3) PrP, (4)*i*-BuP, (5)*n*-BuP.

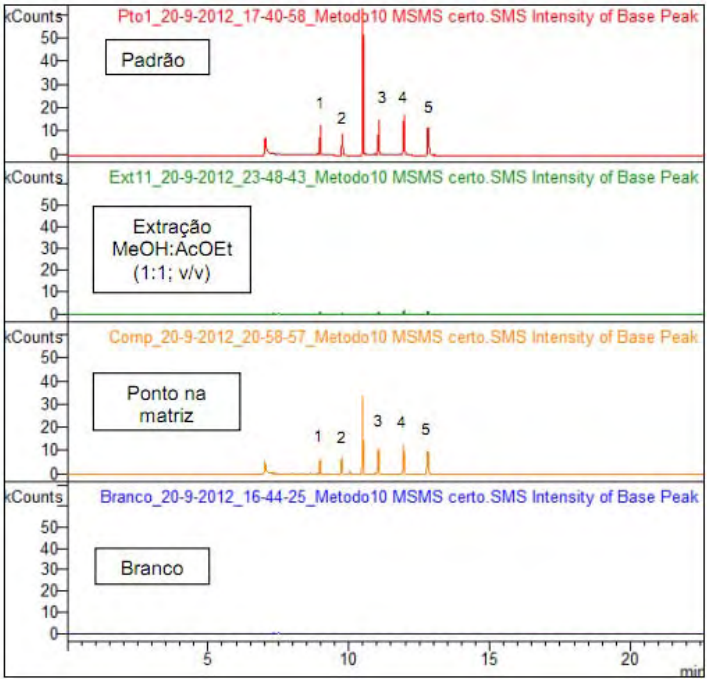


Figura 30 - Cromatogramas obtidos pela eluição com hexano: acetato de etila (1:1; v/v). Pico (1) MeP e MePd4, (2)EtP, (3) PrP, (4)*i*-BuP, (5)*n*-BuP**.**

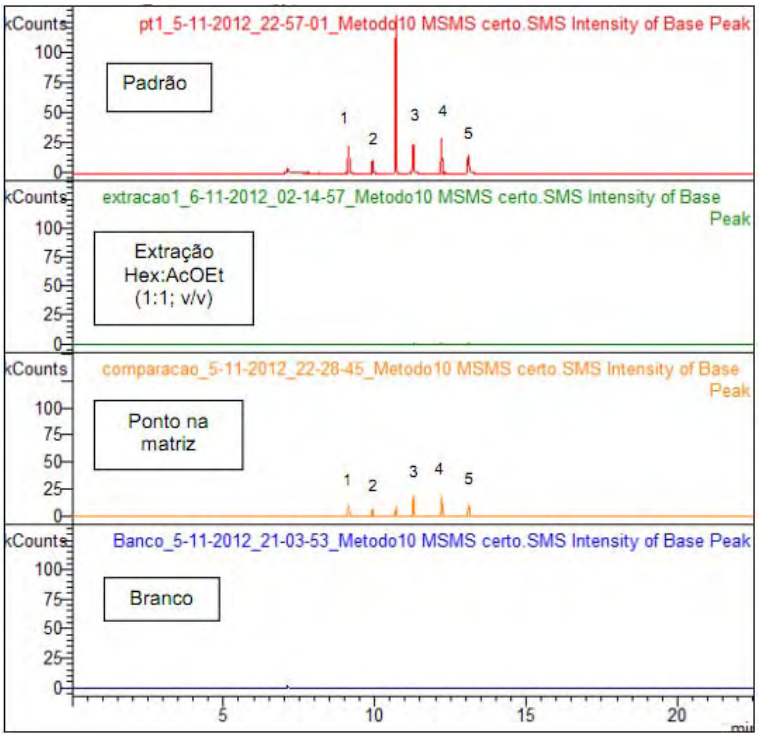
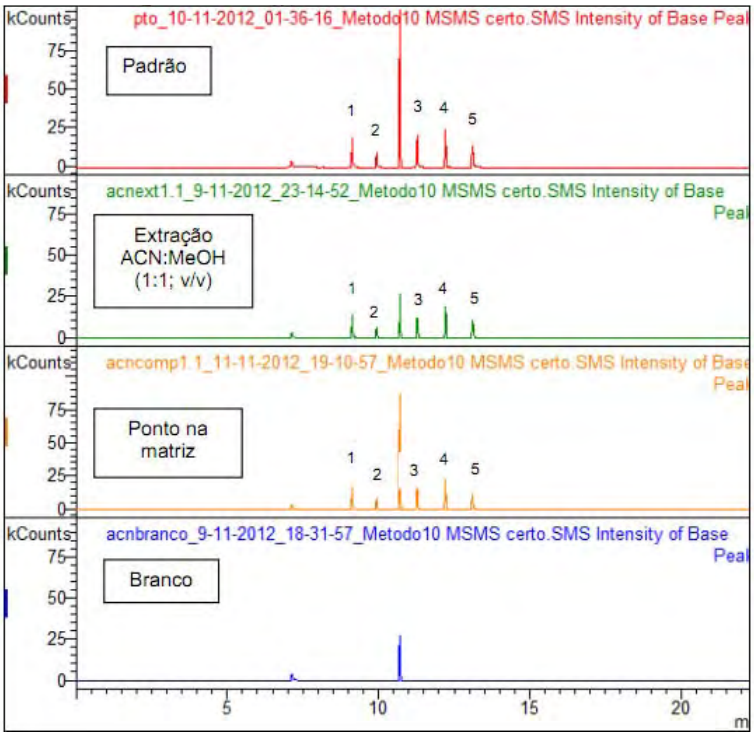


Figura 31 - Cromatogramas obtidos pela eluição com acetonitrila: acetato de etila (1:1; v/v). Pico (1) MeP e MePd4, (2)EtP, (3) PrP, (4)*i*-BuP, (5)*n*-BuP.



A Tabela 21 apresenta as médias da porcentagem das recuperações destes três métodos.

Tabela 21 - Recuperação média (R%) e CV (%) para o estudo para escolha do melhor eluente na extração em fase sólida (n =3).

Analito	Método 1 (MeOH: AcOEt)		Método 2 (Hex: AcOEt)		Método 3 (ACN:MeOH)	
	R%	CV(%)	R%	CV(%)	R%	CV(%)
MetilParabeno	103	67	465	84	97	31
EtilParabeno	108	5	313	21	102	26
PropilParabeno	150	33	332	32	99	26
i-ButilParabeno	164	36	371	33	93	26
n-ButilParabeno	164	30	485	23	97	24

É possível observar que o melhor método de extração é o que utiliza como eluente a mistura de acetonitrila: metanol (1:1; v/v); pois nos fornece recuperações entre 50-120% para todos os analito, que conforme a literatura é o intervalo de recuperação aceito para análise de resíduos [BERNARDES et al., 2011].

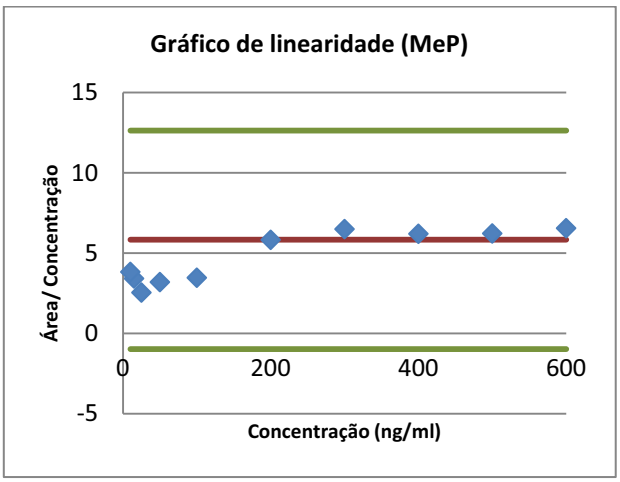
Considerando que a acetonitrila, assim como o anel aromático, possui elétrons π, e o metanol interage com o grupo hidroxila da molécula; conclui-se que a mistura acetonitrila: metanol possui força de eluição suficiente para quebrar as interações dos analitos com a fase estacionária do Strata-X, proporcionando seletividade adequada para os parabenos estudados.

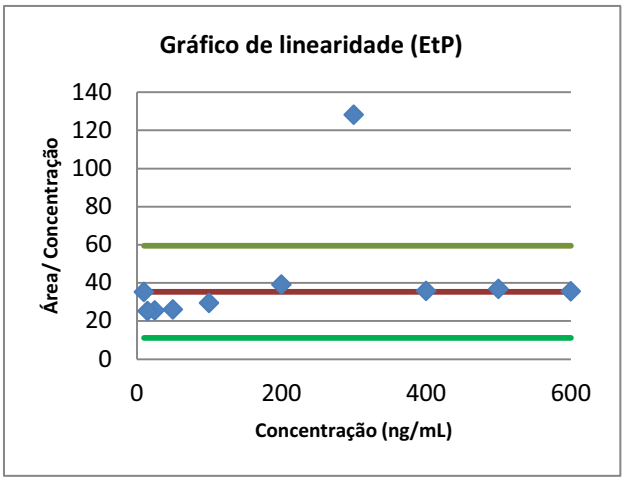
4.7 Curva de calibração construídas a partir do extrato da matriz

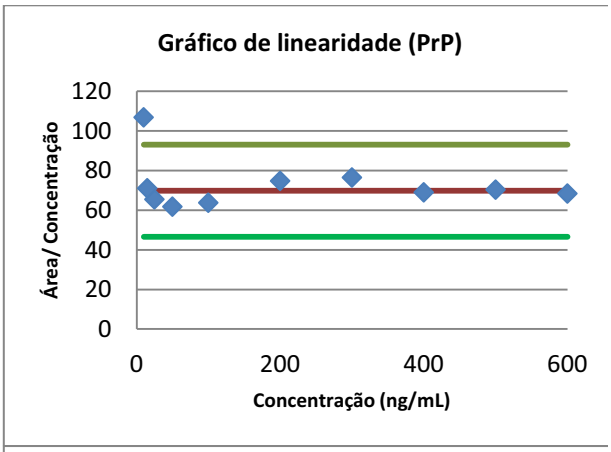
As curvas de calibração realizadas no extrato da matriz foram construídas a partir dos mesmos princípios utilizados para a construção das curvas realizadas no solvente. A Figura 32 mostra os gráficos de linearidade para cada analito no extrato da matriz.

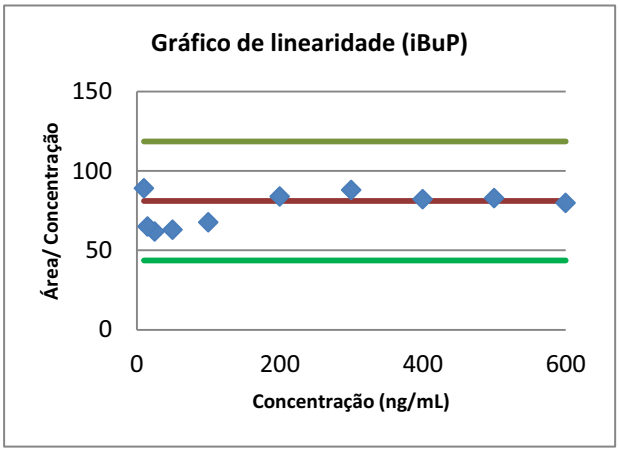
A partir das curvas de linearidade pode-se observar um comportamento diferente para concentrações menores quando comparados aos pontos de maior concentração. Os pontos de concentração de 10 a 100 ng mL^{-1} encontram-se em sua maioria, abaixo da mediana. Enquanto os pontos de 200 a 600 ng mL^{-1} estão melhores distribuídos em torno deste valor. Considerando este fato, optou-se por dividir as curvas analíticas em dois intervalos lineares, sendo um com concentrações de 10 a 100 ng mL^{-1} e outro de 200 a 600 ng mL^{-1}. As curvas obtidas estão apontadas na Tabela 22.

Figura 32 - Graficos de linearidade para cada um dos parabenos estudos. Soluções padrão no extrato (acetato de etila) da matriz (água de rio) (Verde claro: limite inferior; Vermelho: mediana; Verde Escuro: limite superior).









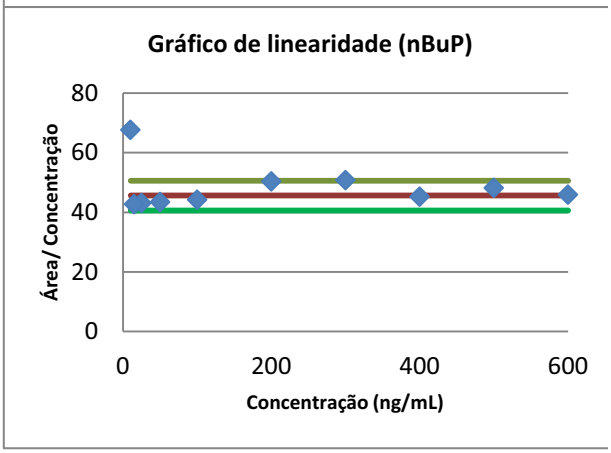


Tabela 22 - Curvas analíticas obtidas para as soluções padrão no extrato da matriz em concentrações de 10 a 100 ng mL-1 e outro de 200 a 600 ng mL-1.

Composto	Curva no solvente 10 - 100 ng mL^{-1}	Curva no solvente 200 - 600 ng mL^{-1}
metilparabeno	y = 3,49x – 7,61 r = 0,99	y = 6,94x – 265,42 r = 0,99
etilparabeno	y = 29,35x – 52,15 r = 0,99	y = 36,07x + 110,57 r = 0,99
propilparabeno	y = 62,73x + 65,79 r = 0,99	y = 68,73x + 817,86 r = 0,99
i-butilparabeno	y = 66,69x + 0,06 r = 0,99	y = 81,83x + 76,55 r = 0,99
n-butilparabeno	y = 43,05x + 76,78 r = 0,99	y = 45,89x + 521,93 r = 0,99

Após a construção da curva de calibração, através do teste F a 95% de confiança, verificou-se que o melhor ajuste para os dados da curva era realmente o ajuste linear.

A partir dos parâmetros da curva de calibração de menores concentrações (10 - 100 ng mL^{-1}) obtidas no extrato da matriz foram calculados o LD e LQ do método conforme o descrito na parte experimental. E, obteve os valores apontados na Tabela 23 para cada um dos compostos.

Tabela 23 - Limites de detecção e de quantificação do método proposto, considerando-se o fator de concentração de 500 vezes.

Composto	LD (ng L^{-1})	LQ (ng L^{-1})
MeP	50	74
EtP	32	48
PrP	28	40
i-BuP	30	44
n-BuP	28	42

Avaliação de efeito matriz

Após as construções das curvas analíticas, foi avaliado o efeito matriz de acordo com os métodos supracitados. A Figura 33 apresenta a porcentagem do efeito matriz para cada composto de acordo com o método 1 (Figura 33), com base na diferença entre os coeficientes angulares das curvas no solvente e no extrato da matriz. Por outro lado, a Figura 34 mostra o efeito matriz de acordo com o método 2, com base nas diferenças ponto-a-ponto para ambas as curvas.

Figura 33 - Porcentagem do efeito matriz para cada compostos, considerando a diferença dos coeficientes angulares das curvas analíticas construidas no solvente e no extrato da matriz [THOMPSON et al., 2002]. Diferenças maiores que 10%, indicam presença de efeito matriz.

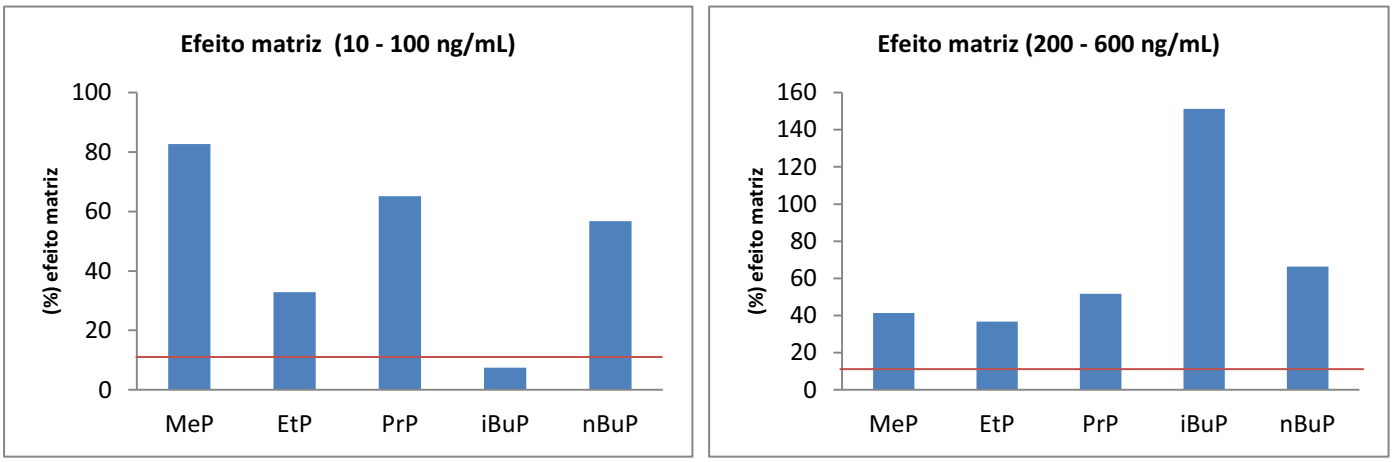
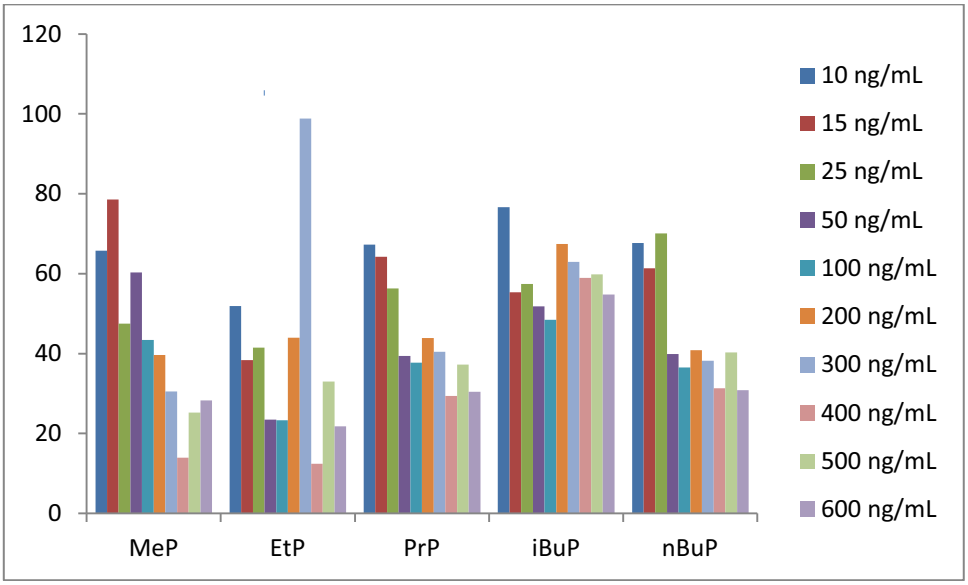


Figura 34 - Porcentagem de efeito matriz para cada composto, considerando a diferença para cada ponto da curva analítica construida no solvente e no extrato da matriz [NUNES, 2010]. Diferenças maiores que 20% siguinificam que há presença de efieto matriz.



Em primeiro lugar, verificou-se a diferença entre as inclinações das linhas curvas (de acordo com o método 1, mostrado na Figura 3, sob esta abordagem, no primeiro intervalo de concentrações (10 – 100 ng mL^{-1}) exceto o i-BuP não apresenta efeito matriz, entretanto no segundo intervalo (200 – 600 ng mL^{-1}) todos os parabenos estudados mostraram efeito de matriz, com CV superior a 10%. Usando o segundo método para a avaliação do efeito da matriz (INMETRO, 2010) indica que a comparação ponto-a-ponto para cada concentração em solvente e extrato da matriz, também todos os parabenos apresentaram todas ou a maioria das concentrações com CV> 20%, como mostrado na

Figura 4. Assim, para a matriz considerada (água do rio para esta região do Brasil) e o intervalo de concentrações estudado sob as condições analíticas utilizadas, é recomendado o uso de curvas analíticas construídas no extrato da matriz.

4.8 Estudo de Recuperação

Foram realizados estudos de recuperação em três níveis de fortificação da amostra (alto: 1 μg L^{-1}; intermediário: 0,6 μg L^{-1}; baixo: 0,2 μg L^{-1}) resultando em extratos com concentrações dentro da faixa linear de trabalho, sendo o maior nível: 500 ng mL^{-1}, o intermediário: 300 ng mL^{-1}, e o menor: 100 ng mL^{-1}. As recuperações médias obtidas para cada um dos parabenos e os respectivos coeficientes de variação das triplicatas das extrações estão apontadas na Tabela 24.

Tabela 24 - Recuperação média (R%) e CV (%) para o estudo em três níveis de fortificação para extração em fase sólida (n =3).

	1,0 μg L^{-1}		0,6 μg L^{-1}		0,2 μg L^{-1}	
Composto	R(%)	CV(%)	R (%)	CV(%)	R (%)	CV(%)
MeP	65	9	56	11	97	8
EtP	82	4	66	10	92	10
PrP	84	4	71	10	92	8
i-BuP	84	4	72	9	100	11
n-BuP	79	5	68	7	94	8

A partir destes dados, pode-se concluir que o método está validado. Já que as recuperações estão dentro da faixa de 56 – 100%, e os coeficientes de variação menores do que 11%.

4.9 Análise de parabenos em água do rio Ribeirão das Cruzes antes e após o lançamento de efluente de ETE.

Todas as amostras foram fortificadas por duas horas antes da extração com metilparabeno-d4, para verificar a recuperação do método utilizado. As médias das recuperações para as análises antes e após o lançamento estão apontadas na Tabela 25.

Tabela 25 - Recuperação média (R%) e CV (%) do metilparabeno-d4 nas análises antes e após o lançamento de esgoto tratado (n=3).

Antes do lançamento		Após o lançamento	
R (%)	CV(%)	R(%)	CV(%)
88	5	82	4

Pode-se observar que as recuperações foram aceitáveis para o surrogate, consequentemente espera-se que a recuperação para os demais parabenos também tenha sido boa. Após a análise de recuperação do surrogate, calculou-se as concentrações para cada parabeno utilizando as curvas de calibração construídas no extrato da matriz. A Tabela 26 aponta que somente para as amostras após o lançamento foi possível à quantificação do metilparabeno, e a detecção do etilparabeno, sendo a concentração deste maior que o LD e menor que o LQ.

Tabela 26 - Análise de parabenos em água do Ribeirão das Cruzes (Araraquara, SP) a montante a jusante da Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) de Araraquara.

	Concentração (ng L^{-1})	
Substância	A montante da ETE	A jusante da ETE
MeP	<50	206
EtP	<32	<48
PrP	<28	<28
iBuP	<30	<30
nBuP	<28	<28

Pode- se concluir que para o metil e etilparabeno o processo de tratamento de esgoto na cidade de Araraquara é ineficiente para a degradação destes compostos. Tais substâncias, mesmo encontradas em pequenas quantidades podem causar impacto para a biota aquática. Isso aponta a necessidade de monitoramento destas substâncias em águas residuais na cidade de Araraquara e em outras cidades da Bacia Tietê- Jacaré.

Cabe salientar que as principais fontes de contaminação de parabenos são: o esgoto sanitário e indústrias, como na cidade de Araraquara as indústrias são pouco presentes, é muito provável que a principal fonte de contaminação seja o esgoto sanitário.

5 Conclusões e perspectivas futuras

Neste trabalho, empregou-se o planejamento experimental multivariado para a otimização das condições para determinação de parabenos, incluindo sililação e análise por GC-MS/MS. Nas condições otimizadas, os limites de detecção e quantificação foram da ordem de dezenas de pg.

O método de extração em fase sólida também foi otimizado, empregando-se amostras de água de rio fortificadas com os analitos. O método apresentou limites de quantificação da ordem de dezenas de ng/L, com CV < 20%, sendo compatível com os estudos em que será aplicado, ou seja, de ocorrência e dispersão de parabenos em água de rio. No estudo de desempenho do método, concluiu-se que o uso de curvas construídas na matriz é imprescindível para assegura a confiabilidade dos resultados analíticos.

Como perspectivas futuras, do ponto de vista analítico, indica-se a necessidade de estudar detalhadamente a possibilidade da análise dos parabenos sem derivação, uma vez que os testes iniciais feitos neste trabalho indicam a possibilidade de esta análise ser adequada também para a aplicação que se pretende. Do ponto de vista ambiental, as análises de água do Ribeirão das Cruzes(Araraquara,SP), indicou que a jusante da estação de tratamento de esgoto os parabenos estão presentes, sendo possível a quantificação de metilparabeno (206 ng/L), indicando que há necessidade de um estudo de ocorrência e dispersão detalhado.

Referências

AGÊNCIA NACIONAL DAS ÁGUAS. **Cuidando das águas**: soluções para melhorar a qualidade dos resursos hídricos. Brasília, DF, 2011.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia para qualidade em química analítica**: uma assistência a acreditação. Brasília, DF, 2004.

BARROS NETO, B. et al. **Como fazer experimentos**: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. 4. ed. Campinas: Ed. UNICAMP, 2010.

BECKER, W. R. **Determinação de anti-inflamatórios em efluente urbano na região de Porto Alegre-RS por SPE, derivatização e GC-MS**. 2012. 167 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Departamento de Química Analítica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

BENIJTIS, T. et al. Analysis of multiple endocrine disruptors in environmental waters via wide-spectrum solid-phase extraction and dual-polarity ionization LC-Ion Trap-MS/MS. **Analytical Chemistry**, v. 76, p. 704-711, 2004.

BRAUSCH, J. M. et al. A review of personal care products in the aquatic environment: environmental concentrations and toxicity. **Chemosphere**, v. 82, p. 1518-1532, 2011.

CALAFAT, A. M. et al. Urinary concentrations of four parabens in the u.s. population Nhanes 2005-2006. **Environmental Health Perspectives**, v. 118, p. 679- 685, 2010.

CANOSA, I. P. et al. Optimisation of a solid-phase microextraction method for the determination of parabens in water samples at the low ng per litre level. **Journal of Chromatography A**, v. 1124, p. 3-10, 2006.

CARDOSO, F. D. et al. Prevalência de enteroparasitoses em escolares de 06 a 14 anos no município de Araguaína - Tocantins. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 7, p. 54-64, 2010.

CHEN, F. Z. et al. Determination of biocides in different environmental matrices by use of ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 404, p. 3175-3188, 2012.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Relatório de qualidade das águas superficiais do estado de São Paulo**. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/agua/aguas-superficiais/35-publicacoes-/-relatorios>. Acesso em: 22 maio 2012.

CRISTALE, J. et al. Desenvolvimento e aplicação de método GC-MS/MS para análise simultânea de 17 HPAs em material particulado atmosférico. **Eclética Química**, v. 33, p. 69-78, 2008.

DEPARTAMENTO DE ÁGUAS E ENERGIA ELÉTRICA. **Situação das UGRHIs**. Disponível em: <http://www.daee.sp.gov.br/acervoepesquisa/perh2204_2207/perh08.pdf>. Acesso em: 22 maio 2011.

DOCOL METAIS SANITÁRIOS. **Os desafios do saneamento básico no Brasil**. Disponível em: <http://www.docol.com.br/planetaagua/os-desafios-do-saneamento-basico-no-brasil/>. Acesso em: 03 ago. 2011.

FERREIRA, A. M. et al. GC-MS determination of parabens, triclosan and methyl triclosan in water by *in situ* derivatisation and stir-bar sorptive extraction. **Analylical and Bioanalytical Chemistry**, v. 399, p. 945-953, 2011.

HOCART, H. C. Mass spectrometry: an essential tool for trace identification and quantification. In: MANDER, L.; LUI, H-W. (Ed). **Comprehensive natural products II**: chemistry and biology. Oxford: Elsevier, 2010. v. 9, cap. 10, p. 327-388.

JONKERS, N. et al. Occurrence and sources of selected phenolic endocrine disruptors in Ria de Aveiro, Portugal. ***Environmental Science* and *Pollution* Research**, v. 17, p. 834-843, 2010.

JONKERS, N. et al. Mass flows of endocrine disruptors in the Glatt River during varying weather conditions. **Environmental Pollution**, v. 157, p. 714-723, 2009.

NUNES, A. M. **Validação de métodos analíticos**. 2010. Disponível em: <www.cpact.embrapa.br/eventos/2010.met.palestras/26/261010_PALESTRA3_ADRIANE_NUNES.pdf >. Acesso em: 23 maio 2013.

OS OBJETIVOS do milênio. Disponível em: <http://www.objetivosdomilenio.org.br/objetivos/>. Acesso em: 22 maio 2011.

OLIVEIRA, F. M. et al. Otimização de método analítico para determinação de pcbs por CG-MS-MS em amostras de biota. **Revista Analytica**, n. 14, p. 45-53, 2005.

PENG, X. et al. Occurrence of steroid estrogens, endocrine-disrupting phenols, and acid pharmaceutical residues in urban riverine water of the Pearl River Delta, South China. **Science of the Total Environment**, v. 397, p. 158-166, 2008.

PIETROGRANDE, C. M. et al. GC-MS analytical methods for the determination of personal-care products in water matrices. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, p. 1086-1094, 2007

PHILIP, W. H. et al. Parabens detection in different zones of the human breast: consideration of source and implications of findings. **Journal of Applied Toxicology**, v. 32, p. 305-309, 2012.

PRICHODKO, A. et al. Hollow fibre liquid phase microextraction of parabens. **Central European Journal of Chemistry**, v. 7, p. 285-289, 2009.

RAMASWAMY, R. B. et al. GC–MS analysis and ecotoxicological risk assessment of triclosan, carbamazepine and parabens in Indian rivers. **Journal of Hazardous Materials**, v. 186, p. 1586-1593, 2011.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

RIBEIRO, l. A. F. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v. 31, p. 164-171, 2008.

RICE et al. Microwave-assisted solvent extraction of solid matrices and subsequent detection of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) using gas chromatography–mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 589, p. 125–132, 2007.

RODIL, R. et al. Determination of synthetic phenolic antioxidants and their metabolites in water samples by downscaled solid-phase extraction, silylation and gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 6428–6435, 2010.

SANTOS, D. M. **Compostos butílicos de estanho em tecidos de bagre bagres estuarinos (Siluriformes, Ariidae) da costa sul e sudeste brasileira**: monitoramento e toxicidade. 2012. 231 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto Oceonográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria de Saneamento e Recursos Hídricos. Sistema de informações para o gerenciamento de recursos hídricos do estado de São Paulo. **Comitê da bacia hidrográfica do Tiête-Jacaré**. Disponível em: <http://www.sigrh.sp.gov.br/cgi-bin/sigrh_home_colegiado.exe?TEMA=APRESENTACAO&COLEGIADO=CRH/CBH-TJ&lwgactw=464222>. Acesso em: 29 nov. 2012.

SCHUMMER, C. et al. Comparison of MTBSTFA and BSTFA in derivatization reactions of polar compounds prior to GC/MS analysis. **Talanta**, v. 77, p. 1473-1482, 2009.

SHANMUGAM, G. et al. GC–MS method for the determination of paraben reservatives in the human breast cancerous tissue. **Microchemical Journal**, v. 96, p. 391-396, 2010.

SIQUEIRA, R. R. **Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação de poluentes orgânicos persistentes na água do Rio dos Sinos**. 2012. 102 f. Dissertação (Mestrado em Qualidade Ambiental) - Universidade Feevale, Novo Hamburgo, 2012.

SONI, M. G. et al. Evaluation of the health aspects of methyl paraben: a review of the published literature. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 1335-1373, 2002.

TUNDISI, G. J. A bacia hidrográfica do Tiête/ Jacaré: estudo de caso em pesquisa e gerenciamento. **Estudos Avançados**, v. 22, p. 159-172, 2008.

VALENTE, P. L. A. **Análise quantitativa por cromatografia**. Disponível em: <http:www.zeus.qui.ufmg.br/~valmir/Analise_Quantitativa_Cromatografia_Gasosa.pdf>. Acesso em: 23 maio 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World health statistics**. Disponível em: <http://www.who.int/whosis/whostat/en/index.html>. Acesso em: 22 maio. 2011.

YU, K. et al. Direct rapid analysis of multiple PPCPs in municipal wastewater using ultrahigh performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry without SPE pre-concentration. **Analytica Chimica Acta**, v. 738, p. 59-68, 2012.