Carolina Resende Derisso

Análise de parabenos em amostras de água de rios e de esgoto sanitário da cidade de São Carlos/SP

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química do Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciências.

Área de concentração: Química Analítica e Inorgânica

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eny Maria Vieira

São Carlos

2017

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

Assinatura:

Data: 06/01/2016

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Celso e Linda Mary, e ao meu irmão Celsinho, por todo o apoio, carinho, compreensão e incentivo.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Eny Maria Vieira pela orientação e oportunidade de participar do grupo de pesquisa. Agradeço a amizade, o carinho e a confiança.

Aos meus pais, Celso e Linda Mary por estarem em todos os momentos comigo, sempre com muito amor, palavras de conforto e incentivo.

Ao meu irmão Celsinho, por sempre acreditar e torcer por mim.

Aos meus amigos do Laboratório de Química Analítica Ambiental e Ecotoxicologia. Agradeço pela presença, ajuda e por todos os momentos que passamos juntos.

Ao Prof^o. Dr^o. Eduardo Bessa de Azevedo, pela ajuda com os planejamentos experimentais e sugestões para aprimorar o trabalho.

Aos professores e funcionários do Instituto que sempre estiveram presentes para colaborar.

À CAPES pela bolsa concedida.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

A todos que colaboraram, direta ou indiretamente, para a conclusão deste trabalho.

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação”.

(Simone de Beauvoir)

RESUMO

A presente pesquisa teve como objetivo desenvolver e validar um método analítico utilizando microextração líquido-líquido (LLME) e cromatografia líquida acoplada ao detector por arranjo de diodos (HPLC-DAD) para análise do metil, etil, propil e butilparabeno em amostras de esgoto sanitário provenientes da Estação de Tratamento de Esgoto de São Carlos (ETE Monjolinho) antes e após o tratamento, bem como em amostras de águas superficiais dos córregos Santa Maria Madalena, Tijuco Preto, Gregório e Monjolinho. Por meio de planejamentos experimentais pode-se desenvolver o método analítico, e inicialmente, otimizou-se as condições cromatográficas, selecionando-se a coluna Zorbax SB-C₈ (250 x 4,6 mm, 5 µm), 20 µL de volume de injeção, comprimento de onda de 257 nm, vazão da fase móvel de 1 mLmin⁻¹ e temperatura da coluna cromatográfica de 30°C. A fase móvel com modo de eluição isocrática foi composta por metanol e solução de ácido acético 1% (v/v). No método de extração LLME, o procedimento otimizado utilizou 5 mL de amostra de esgoto, 10 mL de acetato de etila como solvente extrator e 0,4 g de cloreto de sódio (NaCl). Os ensaios de validação demonstraram boa adequação do método desenvolvido, com limites de quantificação de 10 µgL⁻¹ e coeficientes de correlação superiores a 0,99. A recuperação deu-se entre 71 e 99% e a precisão entre 0,4 e 7,4 %, valores estes que estão dentro da faixa de aceite estabelecida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Foram realizadas duas coletas em estações diferentes do ano e em ambas foi possível encontrar e quantificar os parabenos. Na primeira coleta, feita em período de estiagem, a concentração encontrada dos parabenos foi maior do que aquela encontrada na segunda coleta. As maiores concentrações encontradas na primeira coleta foram: 0,98 µgL⁻¹ de metilparabeno no esgoto bruto, 9,7 µgL⁻¹ de etilparabeno na amostra de água do rio Monjolinho, 7,9 µgL⁻¹ de propilparabeno na amostra do córrego do Gregório e 11 µgL⁻¹ de butilparabeno no esgoto bruto. Já na segunda coleta, o metilparabeno pode ser quantificado apenas na amostra de esgoto bruto: 0,03 µgL⁻¹ e a maior concentração encontrada de etilparabeno foi de 2,1 µgL⁻¹ no rio do Monjolinho. O butilparabeno foi detectado em seis dos sete pontos amostrados, sendo a maior concentração encontrada no rio do Monjolinho (6,99 µgL⁻¹). O propilparabeno não foi encontrado em nenhuma das amostras da segunda coleta.

Palavras-chave: Cromatografia líquida de alta eficiência, parabenos, esgoto, microextração líquido-líquido.

ABSTRACT

The present research had the objective of developing and validating an analytical method using liquid-liquid microextraction (LLME) and liquid chromatography coupled to the detector by diode array (HPLC-DAD) for the analysis of methyl, ethyl, propyl, and butylparaben in wastewater samples from the São Carlos wastewater treatment plant (ETE Monjolinho) before and after treatment; it was also accomplished in surface water samples from Santa Maria Madalena, Tijuco Preto, Gregório, and Monjolinho brooks. By means of experimental planning, the analytical method could be developed, and, initially, the chromatographic conditions were optimized by selecting the Zorbax SB-C8 column (250 x 4,6 mm, 5 μ m), injection volume of 20 μ L, 257 nm wavelength, mobile phase flow rate of 1 mLmin⁻¹, and chromatographic column temperature at 30°C. The mobile phase with isocratic elution mode was composed of methanol and 1% (v/v) acetic acid solution. In the LLME extraction method, the optimized procedure used 5 mL of wastewater, 10 mL of ethyl acetate as the extracting solvent, and 0,4 g of sodium chloride (NaCl). The validation tests showed a good fit of the developed method, with quantification limits of 10 μ gL⁻¹ and correlation coefficients higher than 0,99. The recovery was between 71% and 99%. Furthermore, the precision was between 0,4% and 7,4%. Those values are within the acceptable range established by the National Agency of Sanitary Administration (ANVISA). Two samplings were carried out in different seasons of the year and, in both, it was possible to find and to quantify the parabens. In the first sampling, during the dry season, the concentration of parabens was higher than that found in the second sampling. The highest concentrations found in the first sampling were: 0,98 μ gL⁻¹ of methylparaben in the raw wastewater, 9,7 μ gL⁻¹ of ethylparaben in the water sample of Monjolinho river, 7,9 μ gL⁻¹ of propylparaben in the water sample of Gregório brook, and 11 μ gL⁻¹ in the raw wastewater. In the second sampling, methylparaben could be quantified only in the raw wastewater: 0,03 μ gL⁻¹. The highest concentrations of ethylparaben was 2,1 μ gL⁻¹ in the Monjolinho river. Butylparaben could be detected in six of seven points, and the highest concentration was in the water sample of Monjolinho river. Propylparaben could not be found in any of the samples.

Keywords: High performance liquid chromatography, parabens, wastewater, liquid-liquid microextraction.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Bacia hidrográfica do rio Monjolinho e seus afluentes	34
Figura 2 - Locais de amostragem	37
Figura 3 - Espectros de absorbância do metil, etil, propil e butilparabeno nas concentrações de 1 mgL ⁻¹	38
Figura 4 - Cromatograma obtido com o modo de eluição isocrático 60:40 (metanol:solução 1% ácido acético) com fluxo de 1 mLmin ⁻¹ e temperatura de 25°C, sendo mp=metilparabeno, ep=etilparabeno, pp=propilparabeno e bp=butilparabeno	40
Figura 5 - Superfície de resposta e gráfico de pareto para o metilparabeno	42
Figura 6 - Superfície de resposta e gráfico de pareto para o etilparabeno.....	42
Figura 7 - Superfície de resposta e gráfico de pareto para o propilparabeno	43
Figura 8 - Superfície de resposta e gráfico de pareto para o butilparabeno	43
Figura 9 - Cromatograma obtido com as condições cromatográficas otimizadas, sendo mp=metilparabeno, ep=etilparabeno, pp=propilparabeno e bp=butilparabeno	44
Figura 10 - Experimentos 1, 2 e 3 referentes à microextração líquido-líquido, sendo as proporções entre amostra:solvente extrator tidos como: Experimento 1= 1:1; Experimento 2= 2:1 e Experimento 3= 1:2	45
Figura 11 - Testes realizados com diferentes valores de NaCl para obtenção dos maiores valores de área	46
Figura 12 - Cromatograma do extrato do esgoto preparado em laboratório referente ao experimento 3, onde mp=metilparabeno, ep=etilparabeno; pp=propilparabeno; bp=butilparabeno	47
Figura 13 - Teste de seletividade: cromatograma de esgoto sintético sem os analitos de interesse (branco) sobreposto ao cromatograma do extrato fortificado	48
Figura 14 - Curvas analíticas dos analitos estudados	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Propriedades dos principais parabenos acrescidos em cosméticos	19
Tabela 2 - Propriedades dos parabenos que os tornam conservantes ideais	20
Tabela 3 - Estudos de parabenos em diferentes matrizes	25
Tabela 4 - Composição do esgoto sintético	29
Tabela 5 - Primeiros experimentos de extração realizados	30
Tabela 6 - Fatores selecionados, níveis nominal e alternativo e experimentos realizados com o teste de Youden	33
Tabela 7 - Pontos de amostragem da coleta de água	36
Tabela 8 - Primeiros gradientes testados utilizando fase móvel composta por metanol e água	39
Tabela 9 - Níveis escolhidos para fatores estudados	41
Tabela 10 - Planejamento experimental construído para otimizar a vazão da fase móvel e a temperatura da coluna (mp=metilparabeno; ep=etilparabeno; pp=propilparabeno; bp=butilparabeno)	41
Tabela 11 - Condições cromatográficas otimizadas	44
Tabela 12 - Respostas cromatográficas obtidas das condições otimizadas	44
Tabela 13 - Recuperações dos analitos metil, etil, propil e butilparabeno para os testes de extração	47
Tabela 14 - LODs e LOQs obtidos para o método analítico	48
Tabela 15 - Equações da reta e coeficientes de correlação para os analitos estudados, sendo: MP= metilparabeno; EP= etilparabeno; PP= propilparabeno; BP= butilparabeno	50
Tabela 16 - Precisão intra e inter-dias para os analitos estudados, nas concentrações baixa (0,04 mgL ⁻¹), média (0,1 mgL ⁻¹) e alta (1 mgL ⁻¹), sendo: MP= metilparabeno; EP= etilparabeno; PP= propilparabeno; BP= butilparabeno	50
Tabela 17 - Exatidão para os analitos estudados, nas concentrações baixa (0,04 mgL ⁻¹), média (0,1 mgL ⁻¹) e alta (1 mgL ⁻¹), sendo: MP= metilparabeno; EP= etilparabeno; PP= propilparabeno; BP= butilparabeno	51

Tabela 18 – Diferenças e desvio padrão calculados para os valores de áreas dos analitos estudados (os valores considerados significativos são destacados em vermelho), onde: MP= metilparabeno, EP= etilparabeno, PP= propilparabeno, BP= butilparabeno	52
Tabela 19 - Concentração encontrada para os analitos em estudo nos pontos de amostragem, onde mp=metilparabeno; ep=etilparabeno; pp=propilparabeno; bp=butilparabeno. Primeira coleta feita no mês de abril de 2016.....	53
Tabela 20 - Concentração encontrada para os analitos em estudo nos pontos de amostragem, onde mp=metilparabeno; ep=etilparabeno; pp=propilparabeno; bp=butilparabeno. Segunda coleta feita no mês de junho de 2016.	54

LISTA DE EQUAÇÕES

EQUAÇÃO 1	31
EQUAÇÃO 2	31
EQUAÇÃO 3	32
EQUAÇÃO 4	32
EQUAÇÃO 5	33
EQUAÇÃO 6	46
EQUAÇÃO 7	51
EQUAÇÃO 8	51

LISTA DE ABREVIações

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BP: Butilparabeno
CE: Eletroforese Capilar
CONAMA: Conselho Nacional do Meio Ambiente
DAD: Detector por Arranjo de Diodos
DLLME: Microextração Líquido-Líquido Dispersiva
DPR: Desvio Padrão Relativo
DPD: Desvio Padrão da Diferença
EP: Etilparabeno
ETE: Estação de Tratamento de Esgoto
FDA: Food and Drug Administration
GC: Cromatografia Gasosa
HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LC: Cromatografia Líquida
LLE: Extração Líquido-Líquido
LLME: Microextração líquido-líquido
LOD: Limite de Detecção
LOQ: Limite de Quantificação
MEPS: Microextração por Sorvente Empacotado
MMA: Ministério do Meio Ambiente
MP: Metilparabeno
MS: Espectrômetro de Massas
P-HBA: Ácido Para-Hidroxibenzóico
PLE: Extração com Líquido Pressurizado
PP: Propilparabeno
PPCPs: Produtos Farmacêuticos e de Cuidado Pessoal
QTOF: Quadrupolo com tempo de voo
SAAE: Serviço Autônomo de Água e Esgoto
SBSE: Extração Sortiva em Barras
SFE: Extração com Fluido Supercrítico
SNIS: Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento

SPDE: Extração Dinâmica em Fase Sólida

SPE: Extração em Fase Sólida

SPME: Microextração em Fase Sólida

UAE: Extração Assistida por Ultrassom

UV: Ultravioleta

WSU: Washington State University

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Justificativa	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 Produtos Farmacêuticos e de Cuidado Pessoal	17
2.2 Parabenos	18
2.3 Esgoto sanitário	21
2.4 Métodos analíticos para análise de parabenos	23
2.5 Cromatografia líquida de alta eficiência e detector por arranjo de diodos (HPLC-DAD)	25
2.6 Validação	26
3 OBJETIVOS	27
3.1 Objetivos gerais	27
3.2 Objetivos específicos	27
4 Materiais e métodos	27
4.1 Reagentes e soluções	27
4.2 Análises cromatográficas e equipamentos utilizados	28
4.3 Preparo do esgoto em laboratório	29
4.4 Microextração líquido-líquido	30
4.5 Validação do método analítico	31
4.5.1 Seletividade	31
4.5.2 Limite de detecção (LOD)	31
4.5.3 Limite de quantificação (LOQ)	31
4.5.4 Curva analítica e linearidade	32
4.5.5 Precisão	32
4.5.6 Exatidão	33

4.5.7 Robustez	33
4.6 Área de estudo	34
4.6.1 Rios Monjolinho, Gregório, Santa Maria Madalena e Tijuco Preto	34
4.6.2. ETE Monjolinho	35
4.6.3 Amostragem	35
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1 Condições cromatográficas	37
5.2 Desenvolvimento do método de extração	45
5.3 Validação do método desenvolvido	47
5.3.1 Seletividade	47
5.3.2 LOD e LOQ	48
5.3.3 Curva analítica e linearidade	49
5.3.4 Precisão	50
5.3.5 Exatidão	51
5.3.6 Robustez	51
6 APLICAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO	52
7 CONCLUSÕES	55
Referências Bibliográficas	56

1 INTRODUÇÃO

O uso exacerbado de produtos farmacêuticos e de cuidados pessoais (PPCPs) vem chamando a atenção, principalmente quando se trata da introdução desses produtos no meio ambiente. Esta prática pode trazer danos aos organismos aquáticos e terrestres e aos seres humanos (GRACIA-LOR et al., 2012).

Os PPCPs incluem diversas classes de compostos químicos e são representados pelos medicamentos de uso humano e veterinário, produtos de uso agrícola, cosméticos e produtos de higiene em geral (GRACIA-LOR et al., 2012; YU et al., 2012). Essas substâncias são consideradas contaminantes emergentes e têm sido frequentemente encontradas no meio ambiente como águas superficiais, solos, águas costeiras e até mesmo em água potável (SUN et al., 2014).

Os PPCPs e seus metabólitos são continuamente introduzidos no ambiente aquático em concentrações de parte por trilhão (ngL^{-1}) ou parte por bilhão (μgL^{-1}) por meio do esgoto tratado ou não (BOYD et al., 2006). Mesmo que se trate o esgoto, esses compostos geralmente são encontrados em águas superficiais e sedimentos pela ineficiência do tratamento de esgoto (HAMAN et al., 2015).

Os parabenos são compostos muito utilizados em PPCPs, atuando como conservantes em diversos tipos de alimentos, bebidas, cosméticos e medicamentos. Entretanto, esses compostos têm sido alvo de estudos que relataram a relação entre o desenvolvimento de câncer de mama e o uso de desodorantes contendo parabenos. Para essa afirmativa mais estudos a respeito devem ser feitos a fim de se confirmar a carcinogenicidade desses compostos. Com isso, vem surgindo uma nova geração de PPCPs livres de parabenos (GONZÁLEZ-MARIÑO et al., 2011).

1.1 Justificativa

Sabe-se há mais de vinte anos que os PPCPs são dispostos no meio ambiente, mas somente nos últimos dez anos desenvolveu-se os métodos analíticos suficientemente sensíveis para identificá-los e quantificá-los em efluentes de estações de tratamento de esgoto (ETEs), águas superficiais, água potável, sedimentos e águas subterrâneas (KLEYWEGT et al., 2007).

Atualmente, vem crescendo a preocupação com os efeitos dos produtos farmacêuticos e de cuidados pessoais (PPCPs) no ambiente, uma vez que estes

contêm substâncias que podem produzir efeitos adversos aos organismos aquáticos e à saúde humana. Essas substâncias têm sido frequentemente encontradas em diversas matrizes ambientais e são suspeitas de atuarem como desreguladores endócrinos, causando distúrbios na síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação de hormônios endógenos. Interferem, portanto, no metabolismo, na diferenciação sexual e na função reprodutiva, tanto em animais como seres humanos.

Os parabenos são compostos químicos amplamente utilizados nas indústrias cosméticas, farmacêuticas e alimentícias e são apresentados como potenciais desreguladores endócrinos. São considerados contaminantes orgânicos emergentes, contudo não existe regulamentação sobre a presença desses compostos no meio ambiente (HAMAN et al., 2015). Além disso, níveis de concentração que causam efeitos na biota aquática ainda não são bem estabelecidos, mas há estudos que descrevem efeitos adversos em organismos, como peixes e *Daphnia magna* (YAMAMOTO et al., 2011).

Em função da visível necessidade de determinação dos parabenos em matrizes ambientais, o presente estudo visa à análise cromatográfica dos parabenos (metil, etil, propil e butilparabeno) em amostras de esgoto sanitário bruto e tratado, além de águas superficiais de córregos localizados na cidade de São Carlos/SP.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Produtos Farmacêuticos e de Cuidado Pessoal

No Brasil, os cosméticos são controlados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), sendo que a Resolução RDC nº 4, de 30 de janeiro de 2014 dispõe sobre os requisitos técnicos para a regularização de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. A definição oficial de cosméticos adotada por essa agência compreende: “todos os produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes que sejam constituídos por substâncias naturais ou sintéticas para uso externo nas diversas partes do corpo humano, pele, sistema capilar, unhas, lábios, órgãos genitais externos, dentes e membranas mucosas da cavidade oral, com o objetivo exclusivo ou principal de limpá-los, perfumá-los, alterar sua aparência, corrigir odores corporais, protegê-los e mantê-los em bom estado” (ANVISA, 2014). Já os produtos farmacêuticos são basicamente medicamentos que são usados para tratar doenças em seres humanos e animais, entre os quais se incluem: antidepressivos,

tranquilizantes, anti-inflamatórios, antibióticos, analgésicos, anti-hipertensivos, hormônios sintéticos, entre outros (WSU, 2003). No Brasil, os medicamentos são controlados, também, pela ANVISA, a qual é responsável pelo registro de medicamentos e de cosméticos, bem como pela autorização de funcionamento dos laboratórios farmacêuticos, fábricas de cosméticos e demais empresas da cadeia farmacêutica e regulação de ensaios clínicos e de preços.

Pelo fato dos PPCPs encontrarem-se em diversos tipos de ambientes aquáticos (ETEs, água potável, águas superficiais e subterrâneas) a ocorrência e o destino desses compostos têm sido cada vez mais estudados (WANG et al., 2015). Esses contaminantes não são completamente degradados ou eliminados durante o tratamento de esgoto, sendo, portanto devolvidos ao meio ambiente e assim, eles são encontrados em corpos d'água. Um fator importante a ser levado em consideração é a complexidade das amostras que contém os PPCPs. Esse fator aliado ao fato de serem persistentes faz com que exista uma dificuldade na análise desses compostos. Assim, é necessário que o método de extração seja capaz de isolar o analito da amostra e também que se faça a pré-concentração das amostras ambientais (MARUBE et al., 2015).

2.2 Parabenos

Os parabenos são ésteres do ácido para-hidroxibenzóico (p-HBA), sendo que todos possuem a mesma estrutura: um anel benzênico com um grupo hidroxila e um grupo éster na posição para do anel aromático. Os compostos diferem no comprimento da cadeia alquílica, sendo eles: metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno, isopropilparabeno, butilparabeno, isobutilparabeno e benzilparabeno (BŁĘDZKA et al., 2014; PIAO et al., 2014; HAMAN et al., 2015).

Os mais utilizados atualmente são metil, etil, propil e butilparabeno, sendo que o metil é mais hidrofílico e o butil o mais lipossolúvel, propriedades essas que os tornam fáceis e convenientes de serem usados em formulações cosméticas, alimentos e medicamentos (FDA, 2006). As características desses compostos são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Propriedades dos principais parabenos acrescidos em cosméticos

	Metilparabeno	Etilparabeno	Propilparabeno	Butilparabeno
Fórmula estrutural
Fórmula molecular	C ₈ H ₈ O ₃	C ₉ H ₁₀ O ₃	C ₁₀ H ₁₂ O ₃	C ₁₁ H ₁₄ O ₃
Massa molecular (g mol ⁻¹)	152,15	166,18	180,21	194,23
Coefficiente de partição octanol-água (log K _{ow})	1,96	2,47	3,04	3,57
pK _a	8,17	8,22	8,35	8,37
Solubilidade em água a 25°C (mg L ⁻¹)	2500	885	500	207

Fonte: Adaptado de HAMAN, C., 2015 e BŁĘDZKA, D., 2014.

Os parabenos podem ser utilizados em cosméticos para protegê-los contra o crescimento de microrganismos, resultando em proteção aos consumidores e na manutenção da integridade dos produtos. O uso de dois ou mais parabenos é uma prática comum, e com isso a ação antimicrobiana aumenta (FDA, 2006).

Sabe-se que a atividade antimicrobiana aumenta com o aumento do grupo éster da cadeia carbônica. Porém, quanto maior a cadeia desse grupo éster, menor a solubilidade em água, fazendo com que esses parabenos de cadeia longa tenham aplicação limitada. Os parabenos são usados em forma de misturas, e dentre todos os compostos, o metilparabeno e o propilparabeno são os mais utilizados e frequentemente são combinados e utilizados juntos em uma mesma formulação (BŁĘDZKA et al., 2014; PIAO et al., 2014).

Os parabenos são conservantes utilizados desde meados da década de 20, porém apenas em 1996 foram publicados resultados de sua ocorrência em no ambiente aquático. Eles são compostos muito utilizados na indústria cosmética,

alimentícia e farmacêutica devido às características de conservantes ideais que possuem, as quais são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Propriedades dos parabenos que os tornam conservantes ideais

Propriedades dos parabenos
Largo espectro de atividade antimicrobiana
Atividade contra bactérias Gram-positivas, leveduras e bolor
Quimicamente estáveis para uma ampla faixa de pH (4,5 a 7,5) e temperatura
Inertes
Suficientemente solúveis em água
Baixo custo de produção
Relativamente seguros para uso
Incolor, inodoro e insípido
Baixa frequência de sensibilização

Fonte: Adaptado de HAMAN, C., 2015 e BŁĘDZKA, D., 2014.

Os parabenos estão presentes em aproximadamente 80% dos PPCPs e apesar do uso exacerbado e de todas as características apresentadas por eles, estudo feitos por Darbre e Harvey têm mostrado a ligação entre os parabenos e o câncer de mama: parabenos foram encontrados em tecidos tumorais de mama em 2004. Um estudo mais recente confirmou a presença desses compostos em todas as regiões da mama e outros estudos relataram a presença de parabenos em amostras de leite humano, de sangue, de placenta e de urina (DARBRE; HARVEY, 2014).

Diversos estudos têm sugerido atividade estrogênica dos parabenos in vivo e in vitro (YAMAMOTO et al., 2011) e devido ao alto valor do K_{ow} dessas substâncias, sugere-se que esses compostos possam ser bioacumulados. Esse fato é muito preocupante quando se trata de organismos aquáticos, visto que a concentração dos parabenos nos animais aumenta em direção ao topo da cadeia alimentar (DUARTE, 2002).

O aumento da cadeia do grupo éster faz com que a atividade estrogênica dos parabenos aumente. Mesmo em baixas concentrações, os parabenos foram capazes de estimular a proliferação de células mamárias cancerosas (MCF-7) além de células epiteliais mamárias não transformadas (MCF-10A) (WRÓBEL et al., 2013).

De acordo com Li et al. (2007), a preocupação com os efeitos secundários causados pelos parabenos é crescente, sendo motivo de preocupação pelos impactos ecológicos e ambientais. Estes compostos podem ser ativos em concentrações extremamente baixas, podendo interagir com outras moléculas orgânicas presentes no meio ambiente e para tanto não há previsão do que pode acontecer. Podem se concentrar na cadeia alimentar, afetando especialmente os organismos aquáticos e causando impactos, como atraso no desenvolvimento dos peixes, na metamorfose de sapos e rãs, e uma variedade de reações, incluindo alterações de comportamento e reprodução.

Como uma forma de reduzir os riscos à saúde humana, o uso dos parabenos tem sido regulado em todo o mundo (PIAO et al., 2014). No Brasil, de acordo com a RDC 29/2012, os limites para uso dos derivados do ácido para-hidroxibenzóico e seus sais são de 0,4% (expresso como ácido) individual para um éster e 0,8% (expresso como ácido) para mistura dos sais ou ésteres (ANVISA, 2012). Nos países da união europeia além dos Estados Unidos, Canadá e Dinamarca, os valores permitidos são os mesmos que os do Brasil. Porém, em 2011, o governo dinamarquês banuiu o uso do propil, isopropil, butil e isobutilparabeno em produtos para crianças menores de 3 anos. No Japão por sua vez, o limite é de 1% total de parabenos (BLĘDZKA et al., 2014).

2.3 Esgoto sanitário

O saneamento básico é fundamental para que se tenha qualidade de vida, visto que sem esse saneamento a poluição dos recursos hídricos prejudica a saúde da população e aumenta a taxa de mortalidade infantil (IBGE, 2008).

De acordo com o Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgoto do Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento (SNIS), cerca de 56,3% das cidades brasileiras possuem rede de coleta de esgoto, sendo que o grande destaque vem para a região sudeste com média de 82,2%. Quanto ao tratamento dos esgotos, observa-se que o índice médio do país é de 69,4% para os esgotos que são coletados (SNSA, 2013).

Os processos de tratamento de esgoto são formados por uma série de operações unitárias, com eficiências distintas, que são empregadas para remoção de substâncias indesejáveis ou para transformação dessas substâncias em outras de forma que causem menor prejuízo ao meio ambiente (MMA, 2009). Porém,

existem limitações nos procedimentos e uma delas dá-se pelo fato de que muitos compostos orgânicos não são removidos com o tratamento. Dessa forma, torna-se necessário o desenvolvimento de métodos analíticos que identifiquem esses compostos em amostras ambientais, visto que estes podem ser prejudiciais ao meio ambiente e à saúde humana.

O esgoto é composto basicamente de matéria orgânica e mineral em solução e em suspensão, assim como alta quantidade de bactérias e outros organismos patogênicos e não patogênicos. Em termos de porcentagem, o esgoto é constituído de 99,9% de água e 0,1% de sólidos, dentre os quais, 70% são orgânicos (proteínas, carboidratos e gorduras) e 30% são inorgânicos (areia, sais e metais) (DELTA, 2011).

O rio do Monjolinho, parte da bacia do rio Jacaré-Guaçu, principal afluente do rio Tietê, tem quase toda sua extensão no município de São Carlos-SP, cidade esta que tem 100% de seu esgoto sanitário coletado, sendo aproximadamente 85% tratado (DEEPASK, 2013). Dessa forma, o rio Monjolinho recebe efluente tratado e não tratado. Além disso, seus afluentes na área urbana da cidade contribuem para contaminação desse corpo hídrico.

O esgoto sanitário é a principal via de entrada de PPCPs no ambiente aquático (SUN et al., 2014). Dentre os parabenos, o metilparabeno e o propilparabeno são os mais encontrados em esgoto bruto com valores acima de $0,03 \text{ mgL}^{-1}$ e $0,02 \text{ mgL}^{-1}$, respectivamente. O etil e o butilparabeno são encontrados menos frequentemente e em concentrações menores. Diversos estudos mostram que independente do sistema de tratamento utilizado nas ETEs, a eficiência de remoção dos parabenos é maior que 90%, reduzindo assim, significativamente a concentração desses compostos se comparado com aqueles do esgoto bruto, sendo essa remoção feita após o tratamento biológico. Após o tratamento ainda é possível encontrar principalmente o metil e o propilparabeno (HAMAN et al., 2015).

Não se sabe muito sobre o comportamento dos parabenos nas ETEs. Provavelmente, esses compostos ficam aderidos à fração sólida devido a sua hidrofobicidade moderada e facilidade de aderência à matéria orgânica (HAMAN et al., 2015).

Blędzka e colaboradores (2014) afirmam que no processo anaeróbico, um dos primeiros realizados nas ETEs, a concentração de todos os parabenos diminui significativamente e continua a diminuir ao longo do tratamento biológico. E, apesar

da eficiência de remoção ser alta, os parabenos ainda são encontrados no esgoto após tratamento em concentração acima de $0,004 \text{ mgL}^{-1}$, fazendo com que essa eliminação incompleta dos parabenos torne o esgoto a principal via de entrada desses compostos no ambiente aquático.

2.4 Métodos analíticos para análise de parabenos

A cromatografia líquida (LC) é o método mais utilizado para a determinação de parabenos. Os estudos relatam o uso de colunas de C_8 e C_{18} , além de fluxos típicos de 1 mLmin^{-1} e diferentes fases móveis. Com relação aos detectores, são bastante empregados o detector ultravioleta (UV), espectrômetro de massas (MS) e detector por arranjo de diodos (DAD), sendo que o detector UV é o mais utilizado para análise de parabenos. A cromatografia gasosa também pode ser empregada para a análise de parabenos. Contudo, é necessária uma etapa de derivatização, visto que os analitos não são voláteis (PIAO et al., 2014).

Outro método analítico que vem sendo empregado para a análise de parabenos é a eletroforese capilar (CE). Tem como características ser rápida, eficiente além do baixo consumo de solvente empregado. Alguns trabalhos mostram o uso de CE para análise de parabenos, sendo os analitos separados de acordo com sua massa e carga (PIAO et al., 2014).

O preparo de amostra é uma das etapas mais importantes na análise cromatográfica, visto que os analitos são isolados da matriz e pré-concentrados. Essa etapa deve promover seletividade, sensibilidade, confiabilidade, exatidão e reprodutibilidade nas análises.

Diversas técnicas de extração têm sido desenvolvidas e utilizadas. Técnicas como extração em fase sólida (SPE), extração assistida por ultrassom (UAE), extração com fluido supercrítico (SFE), extração com líquido pressurizado (PLE) e extração líquido-líquido (LLE), são técnicas bem conhecidas e difundidas. Entretanto, aparatos especiais ou grandes volumes de solventes são necessários, tornando essas técnicas de custo elevado ou inviáveis do ponto de vista ambiental. Dessa forma, tornou-se necessário o desenvolvimento de técnicas miniaturizadas. Assim, surgiu a extração sortiva em barras (SBSE), microextração em fase sólida (SPME), extração dinâmica em fase sólida (SPDE), microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME), microextração por sorvente empacotado (MEPS), microextração líquido-líquido (LLME), entre outras (LANÇAS, 2009). Dentre estas, a

LLME é caracterizada por ser simples, visto que não existe a necessidade de equipamentos especiais, é rápida, de fácil execução e é de baixo custo.

A LLME baseia-se na LLE, porém mostra-se mais vantajosa, visto que utiliza menores quantidades de solvente. Consiste, portanto, em utilizar duas fases imiscíveis: a amostra que contém o analito de interesse e um solvente orgânico extrator que deve ser adicionado. Através de agitação e centrifugação, ocorre a partição do analito para o solvente extrator. Este pode ser coletado, seco e reconstituído, permitindo que exista pré-concentração dos analitos (RIBEIRO, 2014).

Dentre os métodos de preparo de amostra, a extração em fase sólida (SPE) ainda é a mais empregada para a análise dos parabenos. Estudos relatam diferentes tipos de extração que são empregados nas mais variadas matrizes, sejam elas ambientais, cosméticas e até mesmo biológicas, como leite humano, urina e plasma sanguíneo. Alguns estudos feitos com parabenos estão sumarizados na Tabela 3.

Tabela 3 - Estudos de parabenos em diferentes matrizes

Analitos	Matriz	Preparo de amostra	Método	Condições de operação	Referência
metil, etil, isopropil, propil, isobutil, butil e benzilparabeno	Solo e sedimentos	UAE	HPLC-UV	Gradiente água/acetonitrila/metanol; Coluna Zorbax Eclipse XDB-C8 (150 mm x 4,6mm, 5µm) - Agilent Technologies; Vazão=1,5 mL min ⁻¹ ; λ= 254 nm	Núñez, L et al, 2010
Metil, etil, propil e butilparabeno	Crems, antitranspirantes, protetores solares	SBSE	LC-UV	Isocrático água/metanol; Coluna RP C18 LichroCART (125 mm x 4 mm x 5µm) – Merck; Vazão=1 mL min ⁻¹ ; λ=250 nm	Melo, L e Queiroz, M., 2010
Metil, etil e propilparabeno	Solo	PLE	GC-MS/MS	Coluna capilar ZB-5MS (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm) – Phenomenex; Gás de arraste= He ₂ ; Vazão= 1 mL min ⁻¹	Albero, B. et al., 2012
Metil, etil, butil e benzilparabeno	Águas superficiais	SPE	LC-UV	Gradiente água acidificada/acetonitrila; Coluna Kromasil100Å C18 (250 mm x 4,6 mm) – Teknokroma; Vazão= 1mL min ⁻¹ ; λ=254 nm	Beltran, A. et al., 2010
Metil, etil, propil, n- butil e isobutil	Saliva e pasta de dente	SPE	HPLC-UV	Gradiente água/acetonitrila; Coluna SpeedRod monolítica de fase reversa (50 mm x 4,6 mm) - Merck; Vazão= 3 mL min ⁻¹ ; λ=254 nm	Zotou, A. et al., 2010
Metil, etil, isopropil, n-propil, isobutil, n-butil e benzilparabeno; ClMeP, Cl ₂ MeP e Br ₂ MeP	Esgoto	SPE	LC-QTOF-MS	Gradiente água/metanol; Coluna Halo C18 (100 mm x 2,1 mm, 2,7 µm) – Advanced Materials Technology; Vazão= 0,2 mL min ⁻¹	González-Mariño, I. et al., 2011
Metil, etil, propil e butilparabeno	Shampoo	UAE	CE	Spectra Phoresis 1000 – ThermoQuest; T= 40°C; V= 20 kV; λ= 295 nm	Labat, L. et al., 2000
Metil, etil, propil e butilparabeno	Shampoo	UAE	HPLC-UV	Gradiente água acidificada/metanol; Coluna de fase reversa C18 Lichrospher (125 mm x 4 mm, 5µm) – Merck; Vazão= 1mL min ⁻¹ ; λ= 260 nm	Labat, L. et al., 2000

Fonte: Adaptado de PIAO, C.; CHEN, L.; WANG, Y., 2014; Ocaña-González et al., 2015.

2.5 Cromatografia líquida de alta eficiência e detector por arranjo de diodos (HPLC-DAD)

De acordo com COLLINS (2006) “entre os métodos modernos de análise, um lugar de destaque é ocupado pela cromatografia devido à facilidade com que há a separação, identificação e quantificação de espécies químicas, seja sozinha ou em conjunto com técnicas como espectrofotometria ou espectrometria de massas”.

A técnica cromatográfica consiste em um método físico-químico e fundamenta-se no deslocamento diferencial dos componentes de uma mistura, devido a diferentes interações entre duas fases imiscíveis (fase móvel e

estacionária). Para isso, utiliza-se coluna cromatográfica e uma fase móvel que é bombeada sob altas pressões e irá eluir sobre a fase estacionária, permitindo diferentes graus de migração dos compostos de uma amostra. Diferentes tipos de detectores podem ser utilizados, sendo os detectores ópticos os mais preferidos. Essa classe abrange os detectores de absorvância, índice de refração, fluorescência e espalhamento de luz. Análises em diferentes comprimentos de onda são possíveis com os detectores espectrofotométricos por arranjo de diodos (DAD), na qual toda a luz da fonte passa pela cela do detector. A luz emergente é dispersa por uma grade holográfica, e os comprimentos de onda resultantes são focalizados sobre uma fila de fotodiodos (de 256 a 1024) enfileirados (Collins, C., 2006).

2.6 Validação

A validação deve ser feita para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis. Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (ANVISA, 2003).

Para a validação do método desenvolvido neste estudo foi utilizado o guia de Validação RE N° 899 da Anvisa (ANVISA, 2003). Os parâmetros para a validação definidos pela norma e que estão apresentados a seguir são linearidade, limites de detecção e de quantificação, seletividade, precisão, exatidão e robustez:

- Linearidade: é a capacidade de um método analítico de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração dos analitos na amostra, dentro de um intervalo especificado. Deve conter pelo menos cinco níveis de concentração, sendo o primeiro deles o LOQ. Deve apresentar coeficiente de correlação (r) maior que 0,99;
- Limite de detecção: é considerado como a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, mas não quantificado;
- Limite de quantificação: concentração mais baixa na curva de calibração. Corresponde a menor concentração de um analito que pode ser detectado com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas;
- Seletividade: capacidade de o método medir um composto em presença de outros componentes, como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz;

- Precisão: grau de repetibilidade dos resultados de medições repetidas mantendo-se as mesmas condições. Foram consideradas:
 - Precisão intra-dias: análises realizadas em um curto espaço de tempo;
 - Precisão inter-dias: análises realizadas em dias diferentes;
- Exatidão: proximidade dos resultados obtidos pelo método em relação ao valor verdadeiro;
- Robustez: capacidade de o método permanecer inalterado frente a pequenas modificações. Realizado pelo Teste de Youden.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Análise de parabenos em amostras de esgoto sanitário bruto e tratado da ETE Monjolinho e em amostras de águas superficiais dos córregos Santa Maria Madalena, Monjolinho, Tijuco Preto e Gregório, localizados na cidade de São Carlos/SP.

3.2 Objetivos específicos

- Otimizar as condições cromatográficas para a análise simultânea do metil, etil, propil e do butilparabeno;
- Desenvolver método de preparo de amostra para análise desses parabenos em amostras de esgoto sanitário;
- Otimizar o método de preparo de amostra;
- Validar o método desenvolvido;
- Aplicar o método desenvolvido e validado em amostras de esgoto sanitário bruto e tratado da ETE Monjolinho, na cidade de São Carlos/SP;
- Aplicar o método desenvolvido e validado em amostras de águas superficiais dos córregos Santa Maria Madalena, Monjolinho, Tijuco Preto e Gregório, localizados na cidade de São Carlos/SP.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes e soluções

Os padrões analíticos metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno e butilparabeno, com 99,0% de pureza foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Alemanha). As soluções estoques, na concentração de 500 mgL⁻¹ foram preparadas em metanol

(Panreac, Espanha) a partir dos padrões analíticos e foram renovadas a cada dois meses. As soluções de trabalho foram preparadas pela diluição das soluções estoque em solução 60:40 (metanol:água acidificada com ácido acético 1% (v/v)). As soluções de estoque e de trabalho foram armazenadas a -18 °C.

Outros reagentes utilizados no desenvolvimento do método foram: cloreto de sódio (J. T. Baker, Estados Unidos), acetato de etila (Panreac, Espanha), ácido acético glacial (Qhemis, Brasil) e água isenta de orgânicos (Millipore, Brasil).

4.2 Análises cromatográficas e equipamentos utilizados

Para selecionar os comprimentos de onda a serem monitorados nas análises cromatográficas preparou-se uma solução de cada um dos padrões analíticos na concentração de 1 mgL⁻¹ em metanol e fez-se o espectro de UV. Os comprimentos de onda com maiores absorbâncias foram utilizados nas análises cromatográficas.

Inicialmente para se conhecer o tempo de retenção dos analitos, foram analisadas soluções individuais dos parabenos em concentrações de 1 mgL⁻¹. Depois de conhecido os tempos de retenção dos compostos estudados, uma mistura contendo os quatro parabenos foi analisada e as condições cromatográficas foram otimizadas.

As análises cromatográficas foram feitas com um cromatógrafo à líquido, marca Agilent Technologies, modelo 1200 Series (Estados Unidos), com degaseificador G1322A, bomba quaternária G1311A, amostrador automático ALS G1329A, compartimento da coluna termostatizado G1316A e detector de arranjo de diodos G1315D. Usou-se coluna cromatográfica Zorbax SB C8, 250 x 4,6 mm, 5 µm de tamanho de partícula e 80 Å de tamanho de poro (Agilent, Estados Unidos). O volume de injeção da amostra foi de 20 µL, com temperatura da coluna de 30°C e vazão da fase móvel de 1 mLmin⁻¹. O comprimento de onda selecionado para obtenção dos cromatogramas foi 257 nm. A fase móvel utilizada foi composta por metanol e solução de ácido acético 1% (v/v), em modo isocrático 60:40 (metanol: solução de ácido acético 1% (v/v)).

Outros equipamentos utilizados foram: vórtex tipo orbital (Ika, modelo MS 3 digital, Alemanha) e centrífuga (Eppendorf Centrifuge 5702, Alemanha).

4.3 Preparo do esgoto em laboratório

Para a extração dos analitos decidiu-se utilizar esgoto preparado em laboratório. Seria de grande dificuldade fazer a coleta de esgoto da ETE todos os dias para o desenvolvimento do método, além de que a variação do esgoto a cada dia poderia influenciar nas análises. Além disso, o esgoto coletado não pode ser guardado para outras análises, devido à sua degradação muito rápida. Optou-se, dessa maneira, por esgoto preparado no laboratório, o qual foi preparado a cada extração, de acordo com metodologia descrita por Torres (1992). A composição do esgoto é apresentada na Tabela 4.

Tabela 4 - Composição do esgoto sintético

Substâncias	Concentração (mgL⁻¹)
Sacarose	35
Amido	114
Celulose	34
Extrato de carne	208
Óleo de soja	51
NaCl	250
MgCl ₂ .6H ₂ O	7
CaCl ₂ .6H ₂ O	4,5
NaHCO ₃	200
Detergente comercial	3 gotas

Fonte: Torres, 1992

De acordo com Torres (1992), os componentes orgânicos foram dissolvidos em 1 litro de água do sistema público de abastecimento e depois fervido por 2 horas, com agitação vigorosa e contínua. Após esse período, adicionou-se os sais inorgânicos, o detergente e a sacarose. Após resfriamento a temperatura ambiente, o esgoto sintético foi armazenado em frasco de vidro âmbar e refrigerado a 4°C, sendo utilizado até 24 horas após o seu preparo.

4.4 Microextração líquido-líquido

O desenvolvimento da microextração líquido-líquido deu-se inicialmente com testes de proporções entre amostra de esgoto preparado em laboratório e solvente extrator.

Como primeiro teste (Experimento 1), 7,25 mL de amostra do esgoto preparado em laboratório foi colocado em tubo Falcon, acrescentou-se 0,25 mL de solução padrão contendo os analitos meti, etil, propil e butilparabeno na concentração de 1 mgL⁻¹, resultando na concentração de 0,033 mgL⁻¹ de cada um dos analitos no esgoto e um volume de 7,5 mL. Acrescentou-se 7,5 mL de acetato de etila, sendo o tubo agitado em vórtex a 2000 rpm por um minuto e centrifugado a 4000 rpm por cinco minutos. Recolheu-se o sobrenadante, secou-se sob fluxo suave de nitrogênio e reconstituiu-se em 0,5 mL de solução 60:40 metanol:solução de ácido acético 1% (v/v), resultando, portanto na concentração de 0,5 mg L⁻¹ de cada um dos analitos no extrato, devido ao fator de concentração de 15 vezes. Transferiu-se para um vial do amostrador automático do HPLC para posterior análise cromatográfica.

Os experimentos 2 e 3 foram feitos seguindo a mesma metodologia e são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Primeiros experimentos de extração realizados

Experimento	Amostra:Solvente	Volume esgoto (mL)	Volume padrão 1 mgL ⁻¹ (mL)	Volume inicial total (mL)	Concentração inicial (mgL ⁻¹)	Volume solvente extrator (mL)	Volume final (mL)	Concentração final (mgL ⁻¹)
1	1 : 1	7,25	0,25	7,5	0,033	7,5	0,5	0,5
2	2 : 1	9,75	0,25	10	0,025	5	0,5	0,5
3	1 : 2	4,75	0,25	5	0,05	10	0,5	0,5

O experimento com os maiores valores de área dos analitos (Experimento 3) foi o selecionado para o estudo. Para verificar o efeito salting out foram realizados testes utilizando-se a proporção estabelecida do experimento 3 e variou-se a quantidade de NaCl adicionado. Foram testados os valores de 0; 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1 g.

4.5 Validação do método analítico

Os parâmetros estudados para a validação do método LLME–HPLC-DAD foram: robustez, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ), curva analítica e linearidade, precisão e exatidão. O guia de validação utilizado foi o RE 899 da Anvisa (2003) sendo os parâmetros descritos a seguir.

4.5.1 Seletividade

A seletividade é a capacidade do método de medir um composto na presença de outros. Para isso, pode-se comparar uma amostra fortificada com o analito de interesse com uma amostra isenta do analito.

4.5.2 Limite de detecção (LOD)

O LOD é a menor quantidade de um analito que pode ser detectado em uma matriz, mas que não pode ser quantificado.

Em métodos instrumentais como a cromatografia líquida de alta eficiência, o LOD pode ser dado por:

$$LOD = \frac{DPa \times 3}{IC} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde, DPa = desvio padrão do intercepto com o eixo y de três curvas de calibração;

IC = inclinação/coeficiente angular do gráfico de calibração.

4.5.3 Limite de quantificação (LOQ)

O LOQ pode ser considerado como a menor quantidade de um analito em uma matriz que pode ser determinado com precisão e exatidão aceitáveis.

É o primeiro ponto da curva de calibração e foi determinado por:

$$LOQ = \frac{DPa \times 10}{IC} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde, DPa = desvio padrão do intercepto com o eixo y de três curvas de calibração;

IC = inclinação/coeficiente angular do gráfico de calibração.

4.5.4 Curva analítica e linearidade

A linearidade pode ser definida como a capacidade de um método apresentar resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na matriz, dentro de um intervalo especificado. Pode ser dada por:

$$y = ax + b \quad (\text{Equação 3})$$

Onde: y = área do pico cromatográfico;

a = inclinação da curva de calibração;

x = concentração do analito na matriz de interesse;

b = interseção com o eixo y , quando $x=0$.

Na construção das curvas analíticas foram utilizados dez níveis de concentração, sendo o menor deles o LOQ. Para os quatro analitos em estudo as concentrações utilizadas foram: 0,01; 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75 e 1 mgL^{-1} . A linearidade foi avaliada através do coeficiente de correlação (r).

4.5.5 Precisão

A precisão pode ser considerada como uma avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra.

A precisão foi avaliada em três níveis de concentração: baixa (0,04 mgL^{-1}), média (0,1 mgL^{-1}) e alta (1 mgL^{-1}). Cada um dos níveis foi realizado em triplicata, sendo esse procedimento realizado em mais um dia diferente, com o objetivo de avaliar a precisão intra e inter-dias. A precisão foi expressa em termos do desvio padrão relativo (DPR), conforme a Equação 4.

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad (\text{Equação 4})$$

Onde, DPR = desvio padrão relativo;

DP = desvio padrão;

CMD = concentração média determinada.

4.5.6 Exatidão

A exatidão pode ser considerada como a proximidade dos resultados obtidos do método em estudo em relação ao valor verdadeiro.

Do mesmo modo que a precisão, a exatidão foi avaliada nos níveis de concentração baixo, médio e alto, sendo cada nível realizado em triplicata, resultando, assim, em nove experimentos. O cálculo da exatidão foi feito conforme a Equação 5.

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100 \quad (\text{Equação 5})$$

4.5.7 Robustez

A robustez foi avaliada através do teste de Youden introduzindo-se pequenas variações nas etapas do método analítico para investigar o nível de interferência que essas alterações podem provocar nos resultados. Para isso, incluiu-se fatores do método de extração e da análise cromatográfica. O teste de Youden consiste em um planejamento experimental fracionário com sete fatores, do tipo 2^{7-4} , resultando em oito experimentos (YOUNDEN; STEINER, 1975).

A Tabela 6 apresenta os fatores selecionados, bem como seus valores nominais e alternativos e os experimentos feitos. Foram consideradas como respostas as áreas dos picos cromatográficos.

Tabela 6 - Fatores selecionados, níveis nominal e alternativo e experimentos realizados com o teste de Youden

Fatores	Níveis		Experimentos							
	Nominal (1)	Alternativo (-1)	1	2	3	4	5	6	7	8
Temperatura (°C)	30	28	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1
Volume de injeção (µL)	20	18	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1
Vazão (mL min ⁻¹)	1	0,9	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1
% Ácido Acético na FM (%)	1	1,2	1	-1	-1	1	1	-1	1	1
Massa de NaCl (g)	0,4	0,45	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1
Volume de acetato de etila (mL)	10	9,8	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1
Volume de amostra (mL)	5	4,8	-1	1	1	-1	1	-1	-1	1

4.6 Área de estudo

4.6.1 Rios Monjolinho, Gregório, Santa Maria Madalena e Tijuco Preto

A cidade de São Carlos faz parte da bacia hidrográfica do rio Monjolinho, o qual possui uma área de 275 Km² e está situado na bacia hidrográfica do rio Jacaré-Guaçu.

O rio Monjolinho tem 43,24 Km de extensão, sua nascente localiza-se na zona rural de São Carlos e o rio percorre a área urbanizada da cidade, recebendo diversos afluentes, como os córregos do Tijuco Preto, Gregório e Santa Maria Madalena (BARRETO, 1999). Após passar pela Estação de Tratamento de Esgoto Monjolinho, recebe todo o efluente tratado e não tratado desaguando em sua foz no rio Jacaré-Guaçu.

A Figura 1 apresenta a bacia do Rio Monjolinho e os seus afluentes.

Figura 1 - Bacia hidrográfica do rio Monjolinho e seus afluentes

Fonte: Adaptado de Dornelles, C., 2006.

4.6.2. ETE Monjolinho

O Serviço Autônomo de Água e Esgoto (SAAE) bem como o Comitê de Bacia do rio Jacaré Guaçu e os órgãos responsáveis pelo gerenciamento dos recursos hídricos no âmbito federal e estadual começaram a construção da Estação de Tratamento de Esgoto Monjolinho, ETE Monjolinho, em 2005 na cidade de São Carlos, sendo essa estação localizada na estrada municipal Cônego Washington José Pêra.

Dessa forma, em São Carlos o SAAE é responsável por captar e tratar o esgoto da cidade, sendo utilizado o sistema de tratamento modular, com vazão média de 636 L s^{-1} e vazão máxima de 1050 L s^{-1} .

O processo conta com grades e caixas de areia e gordura, na qual em um tratamento preliminar há a remoção de sólidos grosseiros, remoção de areia e de gordura. Reatores anaeróbicos de manta de lodo (UASB) são responsáveis pela remoção da matéria orgânica, diminuindo a demanda química de oxigênio, e o lodo dos reatores é encaminhado diretamente para unidades de fase sólida. Em um flotador é feita a remoção de fósforo, a separação de partículas sólidas das líquidas e o lodo excedente é encaminhado para desidratação mecânica e em seguida vai para aterro sanitário. É feita a desinfecção por UV e a remoção de coliformes fecais, e por uma escada hidráulica há o aumento da oxigenação (SAAE, 2015).

De acordo com a DEEPASK (2013), 100% do esgoto sanitário gerado na cidade de São Carlos é coletado, entretanto, aproximadamente 85% recebe tratamento. O esgoto tratado atende à legislação vigente (Decreto 8468) e as águas do rio Monjolinho são classificadas como classe 4 (CONAMA 357) (SAAE, 2015).

4.6.3 Amostragem

As coletas foram feitas em 7 pontos de amostragem, ao longo dos córregos Santa Maria Madalena, Tijuco Preto e Gregório, bem como no rio do Monjolinho na área urbanizada. A amostragem de esgoto foi feita antes e após o tratamento realizado pela ETE Monjolinho, localizada no município de São Carlos/SP. Optou-se por realizar a coleta em dois pontos ao longo do córrego do Gregório devido ao forte odor que o mesmo apresentou na cidade ao longo do mês de abril.

Os pontos de amostragem são mostrados na Tabela 7.

Tabela 7 - Pontos de amostragem da coleta de água

Identificação	Ponto de coleta	Coordenadas	
		Latitude	Longitude
P1	Santa Maria Madalena	-22.000.101°	-47.900.044°
P2	Monjolinho	-22.000.511°	-47.899.725°
P3	Tijuco	-22.002.351°	-47.900.221°
P4	Gregório - Ponto 1	-22.018.417°	-47.910.801°
P5	Gregório - Ponto 2	-22.016.721°	-47.899.832°
P6	ETE antes do tratamento	-22.031.298°	-47.925.503°
P7	ETE após o tratamento	-22.031.298°	-47.928.245°

As amostras de águas dos córregos Santa Maria Madalena, Tijuco Preto, Gregório e do rio do Monjolinho foram coletadas superficialmente sendo feitas as coletas nos meses de abril e junho de 2016. As amostras de esgoto foram coletadas antes e após o tratamento realizado pela ETE Monjolinho, sendo as coletas feitas nos meses de abril e junho de 2016. A Figura 2 apresenta fotos dos locais de amostragem.

O mês de abril foi marcado por um período longo de estiagem e tempo quente. Já a coleta realizada no mês de junho foi marcada por ter sido feita em um período chuvoso e tempo frio.

Todas as amostras foram coletadas em frascos de vidro âmbar, previamente lavados com água corrente, água livre de orgânicos, etanol e acetona. Todas as amostras foram mantidas em caixa de isopor durante o transporte até o laboratório, sendo imediatamente filtradas e extraídas de acordo com o método analítico desenvolvido.

Figura 2 - Locais de amostragem

Fonte: Autoria própria

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Condições cromatográficas

A Figura 3 apresenta os espectros de absorvância do metil, etil, propil e do butilparabeno.

Figura 3 - Espectros de absorvância do metil, etil, propil e butilparabeno nas concentrações de 1 mgL⁻¹

A maior absorvância foi observada no comprimento de onda de 257 nm para todos os parabenos em estudo, sendo este o comprimento de onda selecionado para monitoramento pelo detector do cromatógrafo.

Foram testadas as colunas Luna C₁₈ (100x 4,6 mm, 5 µm de tamanho de partícula e 100 Å de tamanho de poro) da Phenomenex, (Estados Unidos), Zorbax ODS (250 x 4,6 mm, 5 µm de tamanho de partícula e 70 Å de tamanho de poro) da Agilent (Estados Unidos) e também a coluna Zorbax SB-C₈ (250 x 4,6 mm, 5 µm de tamanho de partícula e 80 Å de tamanho de poro) da Agilent (Estados Unidos).

Dentre as colunas testadas, optou-se pela Zorbax SB-C₈, que apresentou melhores resultados para os analitos estudados (menores tempos de retenção, maior estabilidade na linha de base e picos mais simétricos). Os resultados obtidos com essa coluna mostraram boa separação analítica dos picos dos compostos em análise, justificando o seu uso para testes posteriores.

Foi preparada uma solução de cada parabeno na concentração de 1 mgL⁻¹. Conhecidos os tempos de retenção de cada composto, preparou-se uma solução de concentração de 1 mgL⁻¹ de todos os parabenos estudados e procedeu-se a análise cromatográfica. Estabeleceu-se como condições iniciais temperatura da coluna de 25°C, volume de injeção de 20 µL e eluição isocrática, com fase móvel composta por metanol:água, conforme os gradientes mostrados na Tabela 8.

Tabela 8 - Primeiros gradientes testados utilizando fase móvel composta por metanol e água

	Tempo (min)	Metanol (%)	Água (%)	Fluxo (mLmin⁻¹)
Teste 1	0	50	50	1
	25	50	50	
Teste 2	0	60	40	1
	15	60	40	
Teste 3	0	65	35	1
	10	65	35	
Teste 4	0	70	30	1
	10	70	30	
Teste 5	0	80	20	1
	10	80	20	

Dentre os testes feitos, o Teste 2 foi o que apresentou melhores resultados. Os picos apresentaram-se com boa resolução e com maiores valores de área, porém um pouco alargados. Na tentativa de eliminar a cauda apresentada, acidificou-se a água com 1% de ácido acético e os padrões analíticos foram preparados na própria fase móvel (60:40 metanol:solução de ácido acético 1%). Com isso, conseguiu-se eliminar as caudas, obtendo-se picos bem simétricos. O cromatograma é apresentado na Figura 4

Figura 4 - Cromatograma obtido com o modo de eluição isocrático 60:40 (metanol:solução 1% ácido acético) com fluxo de 1 mLmin⁻¹ e temperatura de 25°C, sendo mp=metilparabeno, ep=etilparabeno, pp=propilparabeno e bp=butilparabeno

A vazão da fase móvel e a temperatura da coluna cromatográfica foram otimizadas, utilizando um planejamento experimental, que permite a identificação de possíveis interações entre as variáveis, de acordo com recomendações de Teófilo e Ferreira (2006). Na Tabela 9 são descritos os níveis escolhidos para cada um dos fatores estudados e na Tabela 10 encontra-se o planejamento experimental construído, que foi do tipo fatorial completo 2^2 com réplica, resultando em oito experimentos.

A variável considerada como resposta foi a combinação de respostas às quais são consideradas importantes: altura dos picos (H); relação entre a área dos picos e sua largura (A/w) e o tempo de corrida (t). Essas três variáveis são importantes, visto que é desejável obter maior altura dos picos para possibilitar a obtenção de menor limite de detecção e de quantificação; é desejável obter maior valor de área, porém sem que ocorra alargamento dos picos e também deseja-se que a corrida não seja muito longa. Combinando-se as três respostas importantes, chega-se na relação de resposta estudada: (Altura x (Área/largura) / tempo).

Tabela 9 - Níveis escolhidos para fatores estudados

Número dos fatores	Fatores	Níveis	
		-1	1
1	Vazão (mLmin ⁻¹)	0,6	1
2	Temperatura (°C)	20	30

Tabela 10 - Planejamento experimental construído para otimizar a vazão da fase móvel e a temperatura da coluna (mp=metilparabeno; ep=etilparabeno; pp=propilparabeno; bp=butilparabeno)

Ordem	Experimento	Fatores		Respostas			
				mp	ep	pp	bp
		1	2	H x (A/w) / t	H x (A/w) / t	H x (A/w) / t	H x (A/w) / t
5º	1	-1	-1	1215,63	638,35	284,57	113,00
4º	2	1	-1	1852,90	881,90	388,17	159,68
3º	3	-1	1	1571,40	762,38	342,23	144,09
1º	4	1	1	2132,79	1035,97	470,83	204,45
7º	5	-1	-1	1344,46	634,46	255,20	113,41
8º	6	1	-1	1831,88	868,94	389,97	162,08
6º	7	-1	1	1590,26	761,84	343,66	143,18
2º	8	1	1	2123,67	1046,27	467,99	205,44

H=altura; A=área; w=largura; t=tempo

Através das superfícies de resposta e do gráfico de pareto para cada analito (Figuras 5 a 8), pode-se observar que todas as respostas obtidas para a vazão e para a temperatura foram consideradas significativas. Tanto a vazão quanto a temperatura apresentaram valores positivos. Isso resulta que maiores vazões e maiores temperaturas produzem melhores respostas para o método empregado.

Dessa forma, tem-se na Tabela 11 as condições cromatográficas selecionadas no presente estudo. A Tabela 12 apresenta as respostas cromatográficas para os analitos em estudo. A Figura 9 apresenta o cromatograma obtido com as condições finais otimizadas.

Figura 5 - Superfície de resposta e gráfico de pareto para o metilparabeno

Figura 6 - Superfície de resposta e gráfico de pareto para o etilparabeno

Figura 7 - Superfície de resposta e gráfico de pareto para o propilparabeno

Figura 8 - Superfície de resposta e gráfico de pareto para o butilparabeno

Tabela 11 - Condições cromatográficas otimizadas

Tempo (min)	Metanol (%)	Solução 1% Ácido Acético (v/v) (%)	Fluxo (mLmin ⁻¹)	Temperatura (°C)
0	60	40	1	30
15	60	40		

Tabela 12 - Respostas cromatográficas obtidas das condições otimizadas

Respostas	Metilparabeno	Etilparabeno	Propilparabeno	Butilparabeno
Tempo de retenção	4,770	6,065	8,503	12,864
Área	155,20628	132,26724	119,90176	115,34237
Altura	23,06569	16,06689	10,85521	7,16161
Largura	0,1013	0,1213	0,1644	0,2433
Simetria	0,83	0,85	0,88	0,89

Figura 9 - Cromatograma obtido com as condições cromatográficas otimizadas, sendo mp=metilparabeno, ep=etilparabeno, pp=propilparabeno e bp=butilparabeno

5.2 Desenvolvimento do método de extração

Os resultados obtidos referentes aos Experimentos 1, 2 e 3 podem ser vistos na Figura 10.

Figura 10 - Experimentos 1, 2 e 3 referentes à microextração líquido-líquido, sendo as proporções entre amostra:solvente extrator tidos como: Experimento 1= 1:1; Experimento 2= 2:1 e Experimento 3= 1:2

Conforme pode-se observar na Figura 10, o experimento 3 resultou em maiores valores de áreas para os analitos em estudo. Como mostrado no item 4.4 (Tabela 5), esse experimento refere-se à proporção de 1:2 (amostra:solvente extrator). Portanto, utilizou-se 5 mL de amostra de esgoto preparado em laboratório e 10 mL de acetato de etila.

Dessa forma, fixou-se essa proporção de amostra e solvente extrator diferindo-se a quantidade de NaCl adicionado. As massas de NaCl utilizadas para o estudo foram: 0; 0,5; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1 g. Os resultados podem ser vistos na Figura 11.

Figura 11 - Testes realizados com diferentes valores de NaCl para obtenção dos maiores valores de área

Conforme pode-se observar, os maiores valores de área foram obtidos quando adicionou-se 0,4 g de NaCl. Sendo assim, estabeleceu-se o método de extração.

Para o cálculo de recuperação do método foram levadas em conta a média das áreas dos extratos e a média das áreas dos brancos fortificados (fortificado apenas no final da extração, antes da análise cromatográfica, de modo que não há efeito de perdas de concentração durante o procedimento de extração). A recuperação pode ser calculada conforme a Equação 6.

Optou-se por utilizar a área do branco fortificado ao invés da área do padrão analítico, visto que a amostra, por ser esgoto, é uma matriz complexa e pode produzir o efeito matriz.

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{área do analito na matriz após extração}}{\text{área do analito do branco fortificado}} \times 100 \quad (\text{Equação 6})$$

A recuperação apresentada pelos analitos está de acordo com dados da literatura e com as recomendações da Anvisa, sendo mostrada na Tabela 13.

Tabela 13 - Recuperação dos analitos metil, etil, propil e butilparabeno para os testes de extração

	Recuperação (%)			
	Metilparabeno	Etilparabeno	Propilparabeno	Butilparabeno
Experimento 1	90,11	86,54	81,90	99,81
Experimento 2	69,85	74,26	78,62	81,12
Experimento 3	93,17	87,19	84,66	93,50

O cromatograma do extrato referente ao experimento 3 é apresentado na Figura 12.

Figura 12 - Cromatograma do extrato do esgoto preparado em laboratório referente ao experimento 3, onde mp=metilparabeno, ep=etilparabeno; pp=propilparabeno; bp=butilparabeno

5.3 Validação do método desenvolvido

5.3.1 Seletividade

O método analítico mostrou-se seletivo para o metil, etil, propil e butilparabeno. Através da Figura 13, pode-se ver o cromatograma do esgoto

preparado em laboratório isento dos analitos de interesse (branco) sobreposto ao cromatograma de um extrato fortificado com os parabenos. Pode-se observar que não existem interferentes no tempo de retenção de cada um dos analitos.

Figura 13 - Teste de seletividade: cromatograma de esgoto sintético sem os analitos de interesse (branco) sobreposto ao cromatograma do extrato fortificado

5.3.2 LOD e LOQ

Os valores de LOD e LOQ obtidos para os analitos são apresentados na Tabela 14. Dessa forma, o valor obtido de LOQ foi utilizado como o primeiro ponto da curva analítica.

Tabela 14 - LODs e LOQs obtidos para o método analítico

Analitos	LOD (mgL ⁻¹)	LOQ (mgL ⁻¹)
Metil e butilparabeno	0,003	0,01
Etilparabeno	0,004	0,01
Propilparabeno	0,002	0,01

5.3.3 Curva analítica e linearidade

As curvas analíticas obtidas para os analitos podem ser vistos na Figura 14.

Figura 14 - Curvas analíticas dos analitos estudados

Na Tabela 15 encontram-se as equações das retas e os coeficientes de correlação dos analitos.

Tabela 15 - Equações da reta e coeficientes de correlação para os analitos estudados, sendo: MP= metilparabeno; EP= etilparabeno; PP= propilparabeno; BP= butilparabeno

Parâmetros	Analitos			
	MP	EP	PP	BP
Equação	$y=140,26x + 2,0673$	$y=199,99x + 5,5975$	$y=114,78x + 1,2497$	$y=82,019x - 0,3082$
R	0,99827	0,099673	0,99838	0,99969

Os gráficos de calibração obtidos para os quatro analitos foram lineares, apresentando coeficientes de correlação (r) maiores que 0,99, que é o recomendado pela Anvisa (2003) para a validação de métodos analíticos.

5.3.4 Precisão

A Tabela 16 apresenta os resultados obtidos nos experimentos realizados intra e inter-dias. Segundo a ANVISA (2003) para amostras complexas são aceitos valores de até 15%. Pode-se observar (Tabela 16) que todos os valores apresentados estão dentro da faixa de aceite proposto pelo guia de validação utilizado.

Tabela 16 - Precisão intra e inter-dias para os analitos estudados, nas concentrações baixa (0,04 mgL⁻¹), média (0,1 mgL⁻¹) e alta (1 mgL⁻¹), sendo: MP= metilparabeno; EP= etilparabeno; PP= propilparabeno; BP= butilparabeno

Concentração	MP		EP		PP		BP	
	Precisão intra-dia	Precisão inter-dia	Precisão intra-dia	Precisão inter-dia	Precisão intra-dia	Precisão inter-dia	Precisão intra-dia	Precisão inter-dia
Baixa	7,47	9,63	5,56	7,90	3,12	5,74	1,71	5,49
Média	2,28	5,12	2,54	3,59	4,86	3,19	3,71	2,20
Alta	0,55	1,17	0,44	1,96	0,87	1,61	0,76	1,37

5.3.5 Exatidão

A exatidão é calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra. A Tabela 17 apresenta os resultados de exatidão do método desenvolvido.

Tabela 17 - Exatidão para os analitos estudados, nas concentrações baixa (0,04 mgL⁻¹), média (0,1 mgL⁻¹) e alta (1 mgL⁻¹), sendo: MP= metilparabeno; EP= etilparabeno; PP= propilparabeno; BP= butilparabeno

Concentração	MP	EP	PP	BP
Baixa	74,08	99,01	95,31	77,82
Média	69,87	71,28	90,19	93,51
Alta	74,60	83,39	84,72	81,34

Os valores obtidos estão dentro da faixa de aceite do guia de validação da ANVISA (2003), que estabelece que a exatidão deva ser entre 70% e 120%.

5.3.6 Robustez

Avaliou-se a robustez do método utilizando a metodologia proposta pela União Européia (COMMISSION DECISION 2002/657/EC, 2002) e para isso, calculou-se os efeitos do planejamento experimental proposto. Através da Equação 7, pode-se observar que foi feita a diferença entre os níveis nominal (1) e alternativo (-1) para cada um dos fatores estudados. A variável considerada como resposta foi a área dos picos cromatográficos.

$$D_{(r)} = \frac{\sum f_{(1)}}{4} - \frac{\sum f_{(-1)}}{4} \quad (\text{Equação 7})$$

Outra forma utilizada para a avaliação da robustez foi através do cálculo do desvio padrão das diferenças (DP_D), conforme mostrado na Equação 8.

$$DP_D = \sqrt{2 \times \sum D(f)^2 \div 7} \quad (\text{Equação 8})$$

Avaliou-se, também, a significância dos efeitos. Dessa forma, fez-se a variância de uma extração em triplicata utilizando-se os valores nominais e utilizou-se o teste t com 95% de confiança.

Todos os fatores que apresentem efeitos com valores em módulo maiores do que $t_{2;95\%} \times S_{\text{efeito}}$ podem ser considerados significativos. Além disso, valores elevados de DP_D , e maiores que o desvio padrão do método nos mostram que todos os fatores juntos tem efeito sobre as respostas, mesmo que os fatores individuais não tenham demonstrado influencia no método.

Na Tabela 18 encontram-se os valores de $D_{(f)}$, $t_{2;95\%} \times S_{\text{efeito}}$ e DP_D calculados considerando como respostas as áreas dos picos cromatográficos.

Tabela 18 – Diferenças e desvio padrão calculados para os valores de áreas dos analitos estudados (os valores considerados significativos são destacados em vermelho), onde: MP= metilparabeno, EP= etilparabeno, PP= propilparabeno, BP= butilparabeno

Respostas		Diferenças e desvios padrões								
		$D_{(A)}$	$D_{(B)}$	$D_{(C)}$	$D_{(D)}$	$D_{(E)}$	$D_{(F)}$	$D_{(G)}$	$t_{2;95\%} \times dp_{efeito}$	DP_D
Área	MP	73,40	72,05	77,06	75,47	1,97	0,25	0,50	1,45	0,64
	EP	66,25	65,53	71,11	69,29	3,24	0,40	0,64	1,86	0,73
	PP	61,17	62,28	63,79	64,05	3,13	0,39	0,63	1,83	0,72
	BP	39,50	39,60	41,09	40,63	0,38	0,05	0,22	0,63	0,43

6 APLICAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO

Após a validação, o método foi aplicado em águas superficiais de córregos da cidade de São Carlos, além do esgoto bruto e tratado da ETE Monjolinho, conforme mostrado no item 4.6.3, a fim de determinar a concentração dos compostos metil, etil, propil e butilparabeno.

As Tabelas 19 e 20 apresentam a concentração dos analitos metil, etil, propil e butilparabeno determinada nas amostras coletadas nos córregos Santa Maria Madalena, Gregório, Tijuco Preto, rio do Monjolinho e esgoto bruto e tratado pela ETE Monjolinho.

A Tabela 19 refere-se à primeira coleta, feita no mês de abril do ano de 2016, período marcado por forte estiagem e tempo muito quente. A Tabela 20 refere-se à

segunda coleta, a qual foi feita no mês de junho do mesmo ano, mês esse que apresentou baixas temperaturas e muita chuva. Os cromatogramas estão em anexo.

Tabela 19 - Concentração encontrada para os analitos em estudo nos pontos de amostragem, onde mp=metilparabeno; ep=etilparabeno; pp=propilparabeno; bp=butilparabeno. Primeira coleta feita no mês de abril de 2016

Ponto amostrado		Concentração (μgL^{-1})
Santa Maria Madalena	mp	0,28
	ep	6,40
	bp	5,40
Monjolinho	mp	0,19
	ep	9,70
	bp	4,90
Tijuco	ep	0,38
	bp	5,70
Gregório ponto 1	mp	< LOQ
	ep	2,00
	pp	0,70
	bp	2,50
Gregório ponto 2	mp	0,11
	ep	1,40
	pp	7,90
	bp	8,20
ETE antes do tratamento	mp	0,98
	ep	2,40
	bp	11,00
ETE após o tratamento	mp	0,89
	ep	0,44
	bp	6,80

Conforme pode ser visto na Tabela 19, os córregos Santa Maria Madalena, Monjolinho e o esgoto bruto e tratado apresentaram picos cromatográficos no mesmo tempo de retenção do metil, do etil e do butilparabeno, sendo possível a sua quantificação. Houve redução parcial na concentração desses analitos após o tratamento realizado pela ETE Monjolinho. No primeiro ponto de amostragem do córrego do Gregório, picos no mesmo tempo de retenção dos analitos foram apresentados, sendo que o metilparabeno foi detectado, porém não pode ser quantificado. Já o etil, propil e butilparabeno foram quantificados. No segundo ponto

de amostragem do mesmo córrego, local este com fortes odores, a concentração encontrada foi superior que no primeiro ponto.

Tabela 20 - Concentração encontrada para os analitos em estudo nos pontos de amostragem, onde mp=metilparabeno; ep=etilparabeno; pp=propilparabeno; bp=butilparabeno. Segunda coleta feita no mês de junho de 2016.

Ponto amostrado		Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Santa Maria Madalena	mp	< LOQ
	ep	1,10
	bp	6,60
Monjolinho	mp	<LOQ
	ep	2,10
	bp	6,99
Tijuco	mp	< LOQ
	ep	1,85
	bp	2,62
Gregório ponto 1	mp	< LOQ
	ep	1,90
Gregório ponto 2	mp	< LOQ
	ep	< LOQ
	bp	5,10
ETE antes do tratamento	mp	0,03
	ep	< LOQ
	bp	5,88
ETE após o tratamento	mp	< LOQ
	bp	2,65

A segunda coleta (Tabela 20) foi marcada por um período de temperaturas baixas e tempo chuvoso. Observa-se que picos cromatográficos com o mesmo tempo de retenção do metilparabeno puderam ser observados em todos os pontos de coleta, porém só pode ser quantificado no esgoto bruto. Por sua vez, o etilparabeno só não foi detectado na amostra de esgoto tratado e sua quantificação só foi possível em quatro dos sete locais de coleta. O butilparabeno foi detectado em seis dos sete pontos amostrados, sendo a maior concentração encontrada no rio do Monjolinho. O outro analito, propilparabeno, não foi encontrado em nenhuma das amostras da segunda coleta.

A concentração encontrada dos parabenos nas amostras coletadas no mês de junho, no geral, foi menor do que a concentração encontrada nas amostras coletadas no mês de abril. Porém, observou-se que a concentração do butilparabeno foi maior nas amostras da segunda coleta no córrego Santa Maria Madalena e no rio do Monjolinho.

7 CONCLUSÕES

Por meio de planejamentos experimentais, no desenvolvimento do método analítico, conseguiu-se estabelecer um método no qual os picos cromatográficos do metil, etil, propil e do butilparabeno puderam ser separados com boa área, altura, largura e simetria.

O método de extração desenvolvido permitiu a extração dos compostos em estudo utilizando-se de simplicidade na operação e baixo custo além de recuperações elevadas.

A validação do método analítico desenvolvido apresentou bom desempenho, sendo possível obter um método seletivo, com boa precisão, exatidão, recuperação e linearidade. Os ensaios de robustez mostraram que torna-se necessário manter o procedimento tal qual foi estabelecido.

As coletas feitas nos córregos Santa Maria Madalena, Gregório, Tijuco Preto, além do rio do Monjolinho e do esgoto bruto e tratado pela ETE Monjolinho em São Carlos/SP apresentaram diferenças devido às condições ambientais do período da coleta. A primeira coleta, feita em abril do ano de 2016, foi marcada por grande estiagem e elevadas temperaturas. Os parabenos foram detectados e quantificados. Já a segunda coleta, a qual foi realizada no mês de junho do mesmo ano, período este marcado por baixas temperaturas e chuva foi possível observar a detecção apenas de metil, etil e butilparabeno, sendo quantificados, onde possível, em concentrações muito menores do que na primeira coleta, com exceção do butilparabeno no córrego Santa Maria Madalena e o rio do Monjolinho. Esse fato pode ser atribuído às diferenças climáticas, sendo que os córregos apresentaram-se com volumes menores de água no período de estiagem, permitindo a concentração maior dos analitos em estudo.

Referências Bibliográficas

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003**. Brasília, 29 de maio de 2003. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RE_899_2003.pdf/10773d22-ab7f-473c-ab4e-6827dd5f4d42> Acesso em: setembro de 2015.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Lista de substâncias de ação conservante permitidas para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. **Resolução RDC nº 29 de 25 de maio de 2012**. Brasília, 2012. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/2569e7004c58f11fb8e7f8dc39d59d3e/Resolu%C3%A7%C3%A3o+RDC+N%C2%BA+29,+de+1%C2%BA+de+junho+de++2012.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: setembro de 2015.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Regularização de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. **Resolução RDC Nº4 de 30 de janeiro de 2014**. Brasília, 2014. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/e321990042cf06e79b57dfafbc188c8f/Resolu%C3%A7%C3%A3o+RDC+n%C2%BA+4+de+30+de+janeiro+de+2014.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: setembro de 2015.

ALBERO, B.; SÁNCHEZ-BRUNETE, C.; MIGUEL, E.; PÉREZ, R.; TADEO, J. Determination of selected organic contaminants in soil by pressurized liquid extraction and gas chromatography tandem mass spectrometry with in situ derivatization. **Journal of Chromatography A.**, v. 1248, p. 9-17, 2012.

BARRETO, A. **Estudo da distribuição de metais em ambiente lótico, com ênfase na assimilação pelas comunidades biológicas e na sua quantificação no sedimento e água**. 1999. Tese (Doutorado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1999.

BELTRAN, A.; CORMACK, P.; BORRULL, F. Synthetic approaches to parabens molecular imprinted polymers and their application to the solid-phase extraction of river water samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 677, p. 72-78, 2010.

BŁĘDZKA, D.; GROMADZIŃSKA, J.; WĄSOWICZ, W. Parabens: from environmental studies to human health. **Environment international**, v. 67, p. 27-42, 2014.

BOYD, G. R., GRIMM, D. A. Occurrence of pharmaceutical contaminants and screening of treatment alternatives for southeastern Louisiana. **Environmental Hormones: the scientific basis of endocrine disruption**, v. 948, p. 80–89, 2001.

COLLINS, C. H., BRAGA, G. L., BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas: Editora Unicamp, 2006.

COMMISSION DECISION 2002/657/EC of 12 August 2002. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. **Official Journal of European Community**, v. 221, p. 8-36, 2002.

DARBRE, P.; HARVEY, P. Parabens can enable hallmarks and characteristics of cancer in human breast epithelial cells: a review of the literature with reference to new exposure data and regulatory status. **Journal of Applied Toxicology**, v. 34, p. 925-938, 2014.

DEEPASK. O mundo e as cidades através de gráficos e mapas: índice de tratamento de esgoto. Disponível em: < <http://www.deepask.com/goes?page=sao-carlos/SP-Indice-de-tratamento-de-esgoto:-Veja-o-percentual-tratado-em-relacao-ao-total-coletado-na-sua-cidade> > . Acesso em: outubro de 2016.

DELTA SANEAMENTO AMBIENTAL. Notícias: composição do esgoto, 2011. Disponível em: <<http://www.deltasaneamento.com.br/noticia/2/composicao-do-esgoto#.U0rR-VVdXXU>>. Acesso em: agosto de 2015.

DORNELLES, Claudio. **Percepção ambiental: uma análise na bacia hidrográfica do Rio Monjolinho, São Carlos, Sp**. 2006. 177 f. Tese (Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

DUARTE, M. A. I. **Poluentes orgânicos persistentes**. 2002. 40f. Tese (Mestrado em Gestão Ambiental) – Escola Politécnica da Universidade do Brasil, Rio de Janeiro, 2002.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Parabens, USA, 2006. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Cosmetics/ProductandIngredientSafety/SelectedCosmeticIngredients/ucm128042.htm>>. Acesso em: setembro de 2015.

GONZÁLEZ-MARIÑO, I.; QUINTANA, J. B.; RODRÍGUEZ, I. CELA, R.. Evaluation of the occurrence and biodegradation of parabens and halogenated by-products in wastewater by accurate-mass liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight-mass spectrometry (LC-QTOF-MS). **Water research**, v. 45, p. 6770-6780, 2011.

GRACIA-LOR, E.; MARTÍNEZ, M.; SANCHO, J. V.; PEÑUELA, G.; HERNÁNDEZ, F. Multi-class determination of personal care products and pharmaceuticals in

environmental and wastewater samples by ultra-high performance liquid-chromatography-tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 99, p. 1011-1023, 2012.

HAMAN, C., DAUCHY, X., ROSIN, C., MUNOZ, J. F. Occurrence, fate and behavior of parabens in aquatic environments: a review. **Water Research**, v. 68, p. 1-11, 2015.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Pesquisa Nacional de saneamento básico**. 2008. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em julho de 2015.

KLEYWEGT, S., SMYTH, S-A., PARROTT, J., SCHAEFER, K., LAGACÉ, E., PAYNE, M., TOPP, E., BECK, A., MCLAUGHLIN, A. AND K. OSTAPYK (eds). Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Canadian Environment: Research and Policy Directions. **Workshop** Proceedings; Queen's Landing Inn, Niagara-on-the-Lake, Ontario, Canada. Environment Canada, 2007.

LABAT, L.; KUMMER, E.; DALLET, P.; DUBOST, J. Comparison of high-performance liquid chromatography and capillary zone electrophoresis for the determination of parabens in a cosmetic product. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 23, p. 763-769, 2000.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia líquida moderna : HPLC/CLAE**. Campinas: Editora Átomo, 2009. 382 p.

LI, W., MA, Y., GUO, C., HU, W., LIU, K., WANG, Y., ZHU, T. Occurrence and behavior of four of the most used sunscreen UV filters in a wastewater reclamation plant. **Water Research**, v. 41, p. 3506-3512, 2007.

MARUBE, L. C.; CALDAS, S. S.; SOARES, K. L; PRIMEL, E. G. Dispersive liquid-liquid microextraction with solidification of floating organic droplets for simultaneous extraction of pesticides, pharmaceuticals and personal care products. **Microchimica Acta**, v. 182, p. 1-10, 2015.

MELO, L.; QUEIROZ, M. Simultaneous analysis of parabens in cosmetic products by stir bar sorptive extraction and liquid chromatography. **Journal of separation Science**, v. 33, p. 1849-1855, 2010.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (MMA). **Programa Nacional de Capacitação de Gestores Ambientais: Módulo Específico Licenciamento Ambiental de estações de Tratamento de Esgoto e Aterros Sanitários**. Brasília, 2009.

Disponível em:

<http://www.mma.gov.br/estruturas/dai_pnc/_publicacao/76_publicacao19042011110356.pdf>. Acesso em setembro de 2015.

NÚÑEZ, L.; TURIEL, E.; MARTIN-ESTEBAN, A.; TADEO, J. Molecularly imprinted polymer for the extraction of parabens from environmental solid samples prior to their determination by high performance liquid chromatography-ultraviolet detection. **Talanta**, v. 80, p. 1782-1788, 2010.

OCAÑA-GONZÁLEZ, J. A.; VILLAR-NAVARRO, M.; RAMOS-PAYÁN, M.; FERNÁNDEZ-TORRES, R.; BELLO-LÓPEZ, M. A. New developments in the extraction and determination of parabens in cosmetics and environmental samples. A review. **Analytica chimica acta**, v. 858, p. 1-15, 2015.

PIAO, C.; CHEN, L.; WANG, Y. A review of the extraction and chromatographic determination methods for the analysis of parabens. **Journal of Chromatography B**, v. 969, p. 139-148, 2014.

RIBEIRO, G. L. O. **Desenvolvimento e validação de método analítico para análise de parabenos em tecido de peixes**. 2014. 65f. Tese (Mestrado em Química Analítica e Inorgânica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

SECRETARIA NACIONAL DE SANEAMENTO AMBIENTAL (SNSA). **Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgoto**. Brasília, 2013. Disponível em:< <http://www.snis.gov.br/diagnostico-agua-e-esgotos/diagnostico-ae-2013>>. Acesso em: setembro de 2015.

SERVIÇO AUTÔNOMO DE ÁGUA E ESGOTO DE SÃO CARLOS (SAAE SÃO CARLOS). Disponível em:< <http://www.saaesaocarlos.com.br/>>. Acesso em setembro de 2015.

SUN, Q.; LV, M.; HU, A.; YANG, X.; YU, C. Seasonal variation in the occurrence and removal of pharmaceuticals and personal care products in a wastewater treatment plant in Xiamen, China. **Journal of Hazardous Materials**, v. 277, p. 69-75, 2014.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, p. 338-350, 2006.

TORRES, Patrícia. **Desempenho de um reator anaeróbico de manta de Lodo (UASB) de bancada no tratamento de substrato sintético simulando esgotos**

sanitários. 1992. Tese de mestrado – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1992.

Wang, Z.; Zhang, X. H.; Huang, Y.; Wang, H. Comprehensive evaluation of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in typical highly urbanized regions across China. **Environmental Pollution**, v. 204, p. 223-232, 2015.

WASHINGTON STATE UNIVERSITY (WSU) - LIFE DOWN THE DRAIN - Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment. **Whashington State University**. 2003. Disponível em: <http://www.campusecology.wsu.edu/page_055.htm>. Acesso em julho de 2015.

WRÓBEL, A.; GREGORASZCZUK, E. Ł. Effects of single and repeated in vitro exposure of three forms of parabens, methyl-, butyl- and propylparabens on the proliferation and estradiol secretion in MCF-7 and MCF-10A cells. **Pharmacological Reports**, v. 65, n. 2, p. 484-493, 2013.

YAMAMOTO, H.; TAMURA, I.; HIRATA, Y.; KATO, J.; KAGOTA, K.; KATSUKI, S.; YAMAMOTO, A.; KAGAMI, Y.; TATARAZAKO, N. Aquatic toxicity and ecological risk assessment of seven parabens: individual and additive approach. **Science of the Total Environment**, v. 410, p. 102-111, 2011.

YOUNG, W. J., STEINER, E. H. Statistical manual of the Association of Official Analytical Chemists. **AOAC**: Arlington, p.88, 1975.

YU, K.; LI, B.; ZHANG, T. 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.

ZOTOU, A.; SAKLA, I.; TZANAVARAS, P. LC-determination of five paraben preservatives in saliva and toothpaste samples using UV detection and a short monolithic column. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 53, p. 785-789, 2010.

Anexos

Cromatogramas referentes às amostras coletadas nos córregos Santa Maria Madalena, Tijuco Preto, Gregório, rio do Monjolinho e esgoto sanitário antes e após tratamento realizado pela ETE Monjolinho. (Item 6 – Aplicação do método desenvolvido).

Primeira coleta:

Segunda coleta: