UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

Desenvolvimento e validação de método analítico para análise de parabenos em tecido de peixes.

Gabriela Lemos de Oliveira Ribeiro

Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se em
acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP

São Carlos
2014

GABRIELA LEMOS DE OLIVEIRA RIBEIRO

Desenvolvimento e validação de método analítico para análise de parabenos em tecido de peixes.

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

Aos meus pais, Lucia Lemos da Silveira, Antônio Ribeiro de Oliveira ao meu irmão Henrique e a toda minha família que sempre me incentivaram nesta jornada e me deram muito apoio.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Eny Maria Vieira que me acolheu, acreditou em meu trabalho e sempre esteve disposta a me orientar.

Aos colegas e amigos do Grupo de Química Analítica Aplicada a Medicamentos e a Ecossistemas Aquáticos e Terrestres (IQSC-USP) pelos auxílios prestados e bons momentos do grupo.

Ao Instituto de Química de São Carlos (USP) pela oportunidade, auxílio e colaboração.

“Se a educação sozinha não pode transformar a sociedade, tampouco sem ela a sociedade muda.”
Paulo Freire

RESUMO

A presença de contaminantes em alimentos é uma das grandes preocupações atualmente, especialmente a de contaminantes como os parabenos, que são compostos utilizados como conservantes em bebidas e alimentos. Estudos mostram que a frequente exposição a estes contaminantes está trazendo graves consequências a saúde humana e ao ambiente. A utilização de método analíticos rápidos, com poucas etapas analíticas, que utilizam poucos reagentes e em baixas quantidades, específico e sensível, é fundamental para análise e monitoramento de parabenos em alimentos. A microextração líquido-líquido (LLME) é uma técnica adequada para a análise de contaminantes, por ser rápida, de baixo custo, fácil e eficaz. Este estudo tem como objetivo desenvolver e validar a LLME acoplada com um detector de arranjo de fotodiodos (HPLC-DAD) para a determinação de parabenos em tecido de peixe. Utilizou-se um HPLC-DAD com uma coluna Nucleodur C8 (4,6 x 250 mm, 5 μ m), com injeção de 20 μ L, fluxo de 1 mL min⁻¹, temperatura de 25 °C, comprimento de onda 258nm e fase móvel composta por solução aquosa com 1% de ácido acético e metanol em modo gradiente na proporção de 60% de metanol até 8 minutos e de 65% até 20 minutos. A recuperação do método ficou entre 74-112%, que está dentro do limite estabelecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Os limites de detecção variaram de 0,0007 a 0,0221 mgL⁻¹ e os de quantificação de 0,0021 a 0,0738 mgL⁻¹. Os coeficientes de correlação ficaram entre 0,9837 a 0,9906 dentro do limite estabelecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária para matrizes biológicas. O método foi aplicado em três amostra de peixes adquiridos no comércio de São Carlos – SP. Em 50% das amostras analisadas encontrou-se picos cromatográficos nos mesmos tempos de retenção dos padrões dos parabenos. A concentração do etilparabeno foi de 0,0438 mgg⁻¹, para o propilparabeno a concentração foi de 0,0365 a 0,0564 mgg⁻¹ e para o butilparabeno a concentração foi de 0,0322 a 0,0678 mgg⁻¹. O metilparabeno foi o único que não foi encontrado nas amostras de tecido dos peixes analisadas. O método proposto é rápido, de baixo custo e utiliza pouco volume de solvente orgânico, podendo ser utilizado para análises de metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno e butilparabeno em tecido de peixes.

Palavras chave: Cromatografia líquida de alta eficiência. Microextração líquido-líquido. Parabenos. Tecido de peixe.

ABSTRACT

The presence of chemical contaminants in food is a major concern worldwide, especially of parabens used in beverages and as food additives. Recently studies verify that the frequently exposition with those contaminants can affect public health and environmental. Methods for monitoring contaminants should be rapid, have small number of analytical steps, use few reagents in small amounts, be specific, and be sensitive enough to enable detection at low levels. The liquid-liquid microextraction has as an appropriate analytical technique in analysis of residues of contaminants, because it is fast, inexpensive, easy and effective. The aim of this study was to evaluate liquid-liquid microextraction in combination with high performance liquid chromatography-diode array detector (HPLC-DAD) for the determination of paraben residues in fish tissue. A HPLC-DAD was employed with a Nucleodur C8 ec column (250 x 4.6 mm, 5 μ m), injection volume of 20 μ L, wavelength of 258 nm, flow rate of 1 mL min⁻¹, temperature of 25 °C and gradient mode, using 1% of acetic acid diluted in water and methanol, in the proportion of 60% of methanol until 8 minutes and 65% within 20 minutes. The methods resulted in extracts that contained the target analytes, with recovery ranged from 74-112%, values within the Brazilian legislation requirements, The method detection limits (MDLs) ranged from 0.0007 a 0.0221 mgL⁻¹ and the method quatification limists (MQLs) ranged from 0.0021 a 0.0738 mgL⁻¹. The correlation coefficients ranged from 0.9837 to 0.9906 not further than the limits established by the Brazilian Health Surveillance Agency for complex samples. The method LLME/HPLC-DAD was applied to the analysis of three samples from the market of São Carlos–SP. In 50% of the samples analysed, chromatographic peaks were found at the same retention times of parabens. The ethylparaben concentrations founded was 0.0438 mgg⁻¹, for propylparaben concentration ranged from 0.0365 to 0.0564 mgg⁻¹ and for butylparaben concentration ranged from 0.0322 to 0.0678 mgg⁻¹. The methylparaben was not found in the fish tissue sample analyzed. The proposed method is rapid and inexpensive, and reduces consumption of organic solvents, which are toxic to health and to the environment. The method may be used as a screening procedure for analysis methylparaben, ethylparaben, propylparaben, butylparaben residues in fish tissue.

Keywords: High performance liquid chromatography. Microextration liquid-liquid. Parabens. Fish tissue.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Faixa de aplicação da HPLC e GC para a análise de poluentes orgânicos emergentes através de suas propriedades físico-químicas de polaridade e volatilidade.	12
Figura 2 - Esquema de um detector com arranjo de diodos.	13
Figura 3- Fluxograma representativo do método QuEChERS original.	15
Figura 4 - Ilustração do Peixe Tilápia.	21
Figura 5- Ilustração do Peixe Merluza.	21
Figura 6- Ilustração do Peixe Pangasius.	22
Figura 7- Ilustração da microextração líquido-líquido para análise de parabenos em tecido de peixe.	25
Figura 8- Cromatograma dos parabenos na concentração de $1,0 \text{ mgL}^{-1}$, fase móvel metanol/ 1% de ácido acético em água (60:30, v/v). 1-metilparabeno, 2 - etilparabeno, 3 - propilparabeno e 4 - butilparabeno.	30
Figura 9 – Cromatogramas das análises MELL/HPLC-DAD. (a) amostra tecido de peixe branco de referência sem adição de parabenos (b) amostra de tecido de peixe enriquecida com os parabenos, 1- metilparabeno, 2 - etilparabeno, 3-propilparabeno, 4-butilparabeno($1,0 \text{ mgL}^{-1}$)	31
Figura 10- Curvas analíticas obtidas das análises MELL/HPLC-DAD em amostras de tecido de peixe (branco de referência) enriquecidas com os parabenos (a) metilparabeno, (b) etilparabeno, (c) propilparabeno e (d) butilparabeno.....	32
Figura 11– Curva de linearidade do metilparabeno variando de $0,05 - 1,0 \text{ mgg}^{-1}$	33
Figura 12– Curva de linearidade do etilparabeno variando de $0,05 - 1,0 \text{ mgg}^{-1}$	34
Figura 13– Curva de linearidade dos propilparabeno variando de $0,05 - 1,0 \text{ mgg}^{-1}$	34
Figura 14– Curva de linearidade dos butilparabeno variando de $0,05 - 1,0 \text{ mgg}^{-1}$	34
Figura 15– Cromatogramas das amostras de tecido de peixe tilápia (a) amostra de tecido de peixe tilápia (T2) (b) extrato da amostra de tecido de peixe tilápia (T2) fortificada com solução padrão de metilparabeno (1), etilparabeno (2), propilparabeno (3) e butilparabeno (4) na concentração de 200 mgL^{-1}	43
Figura 16– Cromatogramas das amostras de tecido de peixe merluza (a) amostra de tecido de peixe merluza (M2) (b) extrato de tecido de peixe merluza (M2) fortificado com solução padrão de metilparabeno, etilparabeno (1), propilparabeno (2) e butilparabeno (3) na concentração de 200 mgL^{-1}	44
Figura 17- Cromatograma da amostra de tecido de peixe merluza M2.	45

Figura 18 Cromatogramas das amostras de tecido de peixe merluza (a) amostra de tecido de peixe merluza (M3) (b) extrato de tecido de peixe merluza (M3) fortificado com solução de metilparabeno, etilparabeno (1), propilparabeno (2) e butilparabeno (3) na concentra na concentração de 200 mgL ⁻¹	45
Figura 19- Cromatogramas das amostras de tecido de peixe pangasius (a) amostra de tecido de peixe pangasius (P1) (b) extrato de tecido de peixe pangasius (P1) fortificado com solução solução padrão de metilparabeno (1), etilparabeno (2), propilparabeno (3) e butilparabeno (4) na concentração de 200 mgL ⁻¹	46
Figura 20-Cromatogramas das amostras de tecido de peixe pangasius (a) amostra de tecido de peixe pangasius (P2) (b) extrato de tecido de peixe pangasius (P2) fortificado com solução padrão de metilparabeno (1), etilparabeno (2), propilparabeno (3) e butilparabeno (4) na concentração de 200 mgL ⁻¹	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais classes de poluentes emergentes	6
Tabela 2 - Características físico-química dos parabenos.	8
Tabela 3 - Concentrações de parabenos em diferentes matrizes biológicas humanas.....	9
Tabela 4 - Concentração máxima permitida para parabenos em cosméticos.....	11
Tabela 5 -Gradiente da fase móvel para análise dos parabenos.	29
Tabela 6 – Variáveis testadas para a otimização da microextração líquido-líquido de parabenos em tecido de peixe.	30
Tabela 7-Resultados do limite de detecção, limite de quantificação e sensibilidade do método para a análise de parabenos em tecido de peixe.	35
Tabela 8 – Resultado da recuperação e exatidão do método para detecção de parabenos nas concentrações de 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 0,8 e 1,0 mgg ⁻¹	37
Tabela 9 – Resultados de extrações em tecido de peixe disponíveis na literatura.	38
Tabela 10- Avaliação da precisão (repetibilidade e precisão interdias) do método cromatográfico para determinação de parabenos	39
Tabela 11– Concentração de parabenos nos tecidos de peixe adquiridos no comércio.....	40
Tabela 12- Comparação da área dos picos referente aos parabenos detectados nos tecidos de peixes adquiridos no comércio da cidade de São Carlos- SP, com a área do mesmo extrato da amostra fortificado com solução padrão de parabenos (200 mgL ⁻¹)	41

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO.....	3
2.0 REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1 A Água e a População.....	4
2.2 Poluentes Ambientais	5
2.3 Parabenos	7
2.4 Métodos Analíticos	11
2.4.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada com Detector de Fotodiodo ..	13
2.5 Preparo de Amostras de Tecido de Peixe para as Análises de Parabenos.....	14
2.6 Microextração Líquido - Líquido (LLME)	16
2.7 Validação de Métodos Analíticos	16
2.7.1 Seletividade/ Especificidade	17
2.7.2 Limite de Detecção (LD)	17
2.7.3 Limite de Quantificação (LQ)	17
2.7.4 Linearidade.....	18
2.7.5 Precisão	19
2.7.6 Exatidão	19
2.7.7 Robustez.....	19
2.8 Teste de Huber	20
2.9 Aplicação da Microextração Líquido-Líquido para Análise de Parabenos em Tecido de Peixes	20
3.0 OBJETIVOS	22
3.1 Objetivos Específicos.....	22
4.0 MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1 Padrões Analíticos	23
4.2 Reagentes, Solventes e Materiais para a Análise Cromatográfica	23
4.3 Instrumentação.....	23
4.4 Condições Cromatográficas para Análise de Parabenos em Tecido de Peixe.....	24

4.5 Microextração Líquido-Líquido (LLME) de Parabenos em Tecido de Peixe.....	24
4.6 Validação do Método Desenvolvido.....	25
4.6.1 Seletividade.....	26
4.6.2 Linearidade.....	26
4.6.3 Precisão	26
4.6.4 Exatidão	27
4.6.5 Limite de Detecção e de Quantificação	28
4.7 Aplicação do Teste de Huber	28
4.8 Aplicação do Método Desenvolvido em Amostras de Peixes Adquiridos no Comércio de São Carlos- SP	28
5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5.1 Condições Cromatográfica para Análise de Parabenos.....	29
5.2 Resultados de Validação do Método Analítico Desenvolvido para Análise de Parabenos em Tecido de Peixe.....	32
5.2.1 Sensibilidade, linearidade e robustez.....	32
5.2.2 Limites de Detecção e de Quantificação.....	35
5.2.3 Exatidão e Precisão.....	36
5.3 Análise de Parabenos em Tecido de Peixe Adquiridos no Comércio de São Carlos- SP.	39
6.0 CONCLUSÃO	48
7.0 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	49
REFERÊNCIAS.....	50

1.0 INTRODUÇÃO

Os parabenos são compostos orgânicos que atuam como antimicrobianos e bactericidas e por isso são muito utilizados como conservantes em fármacos, cosméticos, bebidas e alimentos. Entretanto as ações destes compostos sobre a biota acarretam disfunções reprodutivas e estudos apontam que também podem ser indutores de cânceres (DOBBINS, et al., 2009; REIS FILHO, LUVIZOTTO-SANTOS. VIEIRA, 2007). Apesar de ser amplamente utilizado em produtos industriais pouco se sabe sobre a presença dos parabenos em matrizes ambientais e biológicas (RAMASWAMY, 2011). Assim sendo é de grande relevância o estudo da ocorrência desses compostos no meio ambiente.

A cromatografia líquida de alta eficiência é uma técnica de separação frequentemente empregada para a análise de compostos orgânicos. Em razão da complexidade da maioria das matrizes, estas não podem ser introduzidas em sistemas cromatográficos em sua forma bruta, pois apresentam compostos interferentes que podem coeluir com os analitos de interesse, durante a separação cromatográfica (MELO, 2012).

Atualmente na química analítica predomina o desenvolvimento de métodos de extração miniaturizados para a análise de compostos em matrizes complexas. Os métodos de extração miniaturizados utilizam baixo volume de solvente orgânico e isolam o analito de interesse eliminando em grande parte os interferentes da matriz. Desse modo o presente estudo descreve o desenvolvimento e validação da microextração líquido-líquido para a análise de parabenos em tecido de peixe, utilizando cromatógrafo a líquido acoplado com detector de arranjo de diodos.

2.0 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A Água e a População

Desde os primórdios da vida no planeta Terra e da história da espécie humana, a água sempre foi essencial. Qualquer forma de vida depende da água para sua sobrevivência e para seu desenvolvimento. Não por acaso a água é uma das substâncias mais abundantes na Terra, cobrindo aproximadamente 70% da superfície terrestre, porém, somente 3% da água do planeta é disponível como água doce. Destes 3%, cerca de 75% estão congelados nas calotas polares e cerca de 10% estão reservados nos aquíferos. Portanto somente 15% dos 3% de água doce do planeta estão disponíveis para o consumo humano (TUNDISI,2003).

Embora a sociedade dependa da água para a sobrevivência e para o desenvolvimento econômico, a má utilização deste recurso (através do despejo de resíduos líquidos e sólidos em rios, lagos e represas e a destruição das áreas alagadas) tem produzido contínua e sistemática deterioração e perdas extremamente elevadas em quantidade e qualidade da água (TUNDISI,2003; MUCELIN; BELLINI,2008). No entanto, a escassez de água tem alertado a população, os cientistas e o governo devido aos impactos que podem ser causados na economia, no ambiente e na sociedade de um país. Por isso a preservação dos recursos hídricos tornou-se um assunto eminente no cotidiano.

A poluição aquática é causada geralmente por detritos orgânicos, lançados indevidamente por esgotos sanitários e industriais nos corpos hídricos além de fertilizantes e pesticidas utilizados na agricultura (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SÃO PAULO, 2008). Um dos agravantes dessa contaminação é a ausência de tratamento de esgotos. Segundo o IBGE (2011), no Brasil 55,1% dos municípios possuem rede coletora de esgoto, e apenas 38% de todo o esgoto produzido recebe algum tipo de tratamento antes de ser lançado nos rios e mares.

Os contaminantes ambientais são classificados em biodegradáveis ou persistentes, sendo que a primeira segundo o dicionário define-se como “o que pode ser decomposto ou degradado pela ação de agentes biológicos (microrganismos, bactérias etc.); e a segunda, as substâncias presentes no ambiente permanecem por um tempo indeterminado. Os poluentes persistentes são os que trazem maiores consequências ao ambiente, por serem transportados a longas distâncias e acumularem-se ao longo da cadeia trófica. Também, considera-se como contaminantes persistentes aqueles que são lançados continuamente nos corpos hídricos (AMÉRICO et al., 2012).

2.2 Poluentes Ambientais

Uns dos poluentes presentes nos corpos hídricos que vêm ganhando grande destaque são os contaminantes emergentes. Poluentes orgânicos emergentes (POE) ou simplesmente contaminantes emergentes, referem-se a qualquer composto químico presente em uma variedade de produtos comerciais como medicamentos, produtos de uso veterinário, embalagens de alimentos, produtos de higiene, alguns agrotóxicos e outros (SILVA; COLLINS,2011).

A Tabela 1 apresenta alguns exemplos de poluentes emergentes. Ao contrário dos poluentes orgânicos persistentes (POP), os contaminantes emergentes, não necessitam ser persistentes para causar efeitos negativos devido à entrada contínua desses compostos no ambiente, como resultado de processos industriais, descarte de produtos comerciais ou ainda por sua excreção na forma não metabolizada ou metabolizada, sendo lançados diretamente nos corpos d'água ou por meio da rede de esgotos. Também podem ser descartados no solo, o que leva à contaminação de mananciais superficiais por escoamento e aquíferos por infiltração (SILVA; COLLINS,2011; AMÉRICO et al., 2012).

Tabela 1 - Principais classes de poluentes emergentes

CLASSE	EXEMPLOS
Produtos Farmacêuticos	
Antibióticos (uso humano ou veterinário)	clorotetraciclina, eritromicina, sulfametoxazol, lincomicina, trimetoprim
Analgésicos e anti-inflamatórios	ácido acetilsalicílico, diclofenaco, paracetamol, cetoprofeno, acetoaminofeno, ibuprofeno
Medicamentos de uso psiquiátrico	diazepam, fluoxetina, carbamazepina, paroxetina
Reguladores lipídicos e seus metabólitos	benzafibrato, ácido clofíbrico, ácido fenofíbrico
β -Bloqueadores	atenolol, propranolol, metoprolol, betaxolol
Meio de contrastes de raio-X	iopamidol, diatrizoato, Iopromida, Iomeprol
Contraceptivos	etinilestradiol, desogestrel, mestranol
Produtos de Higiene Pessoal	
Fragrâncias	almíscaresnitrados, policíclicos e macrocíclicos
Protetores solares	benzofenonas, parabenos
Repelentes de insetos	N, N-dietiltoluamida
Antissépticos	triclosano, clorofeno
Interferentes Endócrinos	
Retardantes de chama	difenil éteres polibromados (PBDE)
Aditivos industriais	ácidoetilendiaminotetra-acético (EDTA), ácido nitriloacético (NTA)
Surfactantes (não iônicos)	alquilfenóis lineares, carboxilados (SPC) e etoxilados (APEO), compostosperfluorados
Aditivos de gasolina	metil- <i>t</i> -butiléter (MTBE)
Inibidores de corrosão	benzotriazóis, benzotiazóis
Hormônios naturais	17 β -estradiol, progesterona, testosterona, estrona
Pesticidas	atrazina, clordano, dieldrin, hexaclorobenzeno
Hidrocarbonetos poliaromáticos (PAH)	benzo[a]pireno, fluoranteno, antraceno, naftaleno, dietilftalato, dibutilftalato
Bifenilaspolicloradas (PCB)	3,3',4,4'- tetraclorobifenil (PCB 77), 3,4,4',5-tetraclorobifenil (PCB 81)
Ftalatos	dietilftalato, dibutilftalato
Dioxinas e Furanos	2,3,7,8-tetracloro- <i>p</i> -dioxina (2,3,7,8-TCDD)
Drogas de abuso	anfetaminas, cocaína, tetra-hidrocanabinol, 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA)

Fonte: SILVA; COLLINS, 2011.

Nos últimos anos, devido à grande variedade de poluentes emergentes, aumentou-se o interesse e a preocupação em estudar as consequências que estas substâncias podem trazer para a saúde humana e ao ambiente, quando presentes em matrizes ambientais e biológicas. Muitos desses compostos têm como característica o fato de serem carcinogênicas e/ou atuarem como desreguladores endócrinos (DE). Algumas substâncias químicas têm demonstrado potencial para serem classificadas como interferentes endócrinos, por causarem efeitos adversos sobre um organismo e sua descendência (GHISELLI; JARDIM, 2007; LINTELMANN et al., 2003).

Os desreguladores endócrinos podem ser divididos em dois grupos: esteróides naturais que são formados pelo colesterol e os xenobióticos, que são esteróides sintéticos, eliminados através de produtos químicos tais como fármacos, pesticidas (JAKIMSKA et al., 2013).

Um dos xenobióticos comumente encontrado no ambiente são os parabenos. Atualmente na literatura encontram-se diversos estudos que têm como objetivo a análise de parabenos, para isso é necessário o desenvolvimento de métodos analíticos confiáveis.

2.3 Parabenos

Os parabenos são utilizados como conservantes desde 1930, em cosméticos, fármacos, alimentos e bebidas, atuando como antimicrobianos e bactericidas. São compostos considerados emergentes pela falta de conhecimento dos reais impactos que estes podem trazer a saúde humana e ao meio ambiente com o passar do tempo (CABALEIRO et al., 2014; BRUCHET et al., 2002).

Para melhor compreensão do destino desses compostos no meio ambiente, se torna necessário o estudo das suas propriedades físico química mais relevante, tais como solubilidade em água, coeficiente de partição octanol/ água (K_{ow}), hidrofobicidade, biomagnificação e toxicidade.

Os ésteres do ácido 4-hidroxibenzoico (parabenos), são compostos polares, lipossolúveis e extremamente estáveis. Algumas de suas propriedades estão listadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Características físico-química dos parabenos.

Compostos	Metilparabeno	Etilparabeno	Propilparabeno	Butilparabeno
Estrutura
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
CAS	99-76-3	120-47-8	94-13-3	94-26-8
Peso molecular (g mol ⁻¹)	152,15	166,17	180,08	194,23
Relação massa/ carga (m/z)	151	165	179	193
P.F (°C)	131	116–118	96–98	68–69
P.E (°C)	270–280	297–298	---	---
pKa	8,17	8,22	8,35	8,37
logKow	1,66	2,19	2,71	3,24
Solubilidade em água a 25°C (g 100mL ⁻¹)	2,00	0,86	0,30	0,15

Fonte: WANG et al., 2013; SONI; CARABIN; BURDOCK, 2005; BŁĘDZKA; GROMADZIŃSKA; WĄSOWICZ, 2014.

As várias propriedades dos parabenos faz com que essas substâncias tornem-se os conservantes de maior uso. Tais características são: amplo espectro de atividade contra leveduras, bolores e bactérias; estabilidade química por um intervalo amplo de temperaturas e pHs variando de 4 a 7,5; boa estabilidade; baixo grau de toxicidade sistêmica; baixa frequência de sensibilização; alta solubilidade em água (permitindo obter concentração efetiva); uso relativamente seguro; baixos custos de produção; nenhum odor perceptível ou gosto; não provocando alterações na consistência ou coloração dos produtos (BŁĘDZKA; GROMADZIŃSKA; WĄSOWICZ, 2014).

Apesar de ter baixo grau de toxicidade sistêmica (BŁĘDZKA; GROMADZIŃSKA; WĄSOWICZ, 2014) e não ser mutagênico, muitos ensaios biológicos in vitro e in vivo estão sendo realizados para melhor esclarecimento sobre a toxicidade dos parabenos (SANDANGER et al., 2011; YE et al., 2006), pois o alto valor do coeficiente de partição octanol-água (K_{o/w}), Tabela 2, acarreta na bioacumulação dos parabenos (DUARTE, 2002).

A atividade antimicrobiana dos parabenos aumenta com o aumento da cadeia carbônica substituinte do éster, porém o mecanismo de ação antimicrobiana dos parabenos ainda é

desconhecido, por ser bastante complexo. Estudos da literatura descrevem a ação dos parabenos sobre a síntese de DNA e RNA, sobre enzimas-chave como ATPases e fosfotransferases ou, ainda, sobre os mecanismos de transporte pelas membranas (FERNANDES et al.,2013).

Recentemente, estudos realizados com animais têm mostrado que os parabenos são rapidamente absorvidos pelo trato gastrointestinal e chegam à corrente sanguínea onde são hidrolisados a ácido *p*-hidroxibenzóico, conjugado e, finalmente, excretados pela urina. A excreção de parabenos é rápida e não se acumulam no corpo. A maior parte de uma dose administrada de parabenos pode ser recuperada de 5 a 72 horas como ácido *p*-hidroxibenzóico ou o seu conjugado (CARREIRA,2008; SONI; CARABIN; BURDOCK, 2005). Entretanto apesar da excreção dos parabenos ser rápida, pouco se sabe sobre os riscos que essas substâncias podem causar devido a alta exposição do homem com produtos que contém parabenos em sua composição (ROUTLEDGE, 1998).

Em 2004 pesquisadores britânicos encontraram baixas concentrações de parabenos na forma não hidrolisada, em amostras de tecidos coletados de tumores de câncer de mama (MELO,2012). A Tabela 3 apresenta a concentração de parabenos em diferentes tipos de matrizes biológicas.

Tabela 3 - Concentrações de parabenos em diferentes matrizes biológicas humanas.

Matriz Biológica Humana	Metilparabeno	Etilparabeno	Propilparabeno	Butilparabeno	TOTAL
Urina (ng mL ⁻¹)	6,58 - 64,6	0,49 - 5,35	0,85 - 14,0	0,09 - 1,01	0,09 - 64,6
Plasma (ng mL ⁻¹)	0,99 - 2,31	0,14 - 0,33	0,39 - 1,45	0,06 - 0,22	0,06 - 2,31
Soro (ng mL ⁻¹)	0,89 - 3,64	0,44	0,23 - 0,63	-	0,23 - 3,64
Leite (ng mL ⁻¹)	0,32 - 3,04	-	0,33	-	0,32 - 3,04
Saliva (ng mL ⁻¹)	-	-	-	-	0.2 - 0.3
Tecidos de placenta (ng g ⁻¹)	0,2 - 10,0	0,2 - 5,3	0,2 - 2,2	0,2 - 0,6	0,2 - 10,0
Tecidos de câncer de mama (ng. g ⁻¹)	-	-	-	-	1.05 - 3.75

Fonte: MELO, L.P.,2012.

A atividade estrogênica dos parabenos aumenta com o aumento do comprimento da cadeia lateral com ramificações no grupo alquil éster, sendo a ordem de atividade do receptor estrogênico a seguinte: benzil>butil>propil = etil> metil. O aumento da cadeia lateral diminui a solubilidade dos parabenos em água e, por isso, alguns destes compostos podem ser acumulados nos tecidos de maneira similar a outros contaminantes lipofílicos, que são considerados bioacumulativos (CARREIRA,2008). A bioacumulação dos parabenos nos tecidos lipofílicos é também nociva para os organismos aquáticos, pois a concentração dos parabenos nos animais aumenta em direção ao topo da cadeia alimentar (DUARTE,2002).

Alguns estudos vêm confirmando a presença de parabenos nas águas de rios e em esgoto sanitário em concentração média de 15 a 400 ngL⁻¹ (BILA, DEZOTTI, 2007). Em outros estudos, desenvolvido por Pérez e colaboradores (2012), por exemplo, foram encontrados parabenos em amostras de solos em concentrações de 8,04 ngg⁻¹, 1,23 ngg⁻¹ e 1 ngg⁻¹ em peso seco de metilparabeno (MePB), etilparabeno (EtPB) e duas formas de butilparabeno (BuPB) respectivamente. Já nos estudos de Liao, Chen e Kannan, (2013) encontrou-se parabenos na concentração média de 39,3 ng g⁻¹ em 99% das amostras de alimentos analisadas.

De acordo com Bila e Dezotti, (2007) a exposição frequente a estes compostos faz com que haja uma diminuição na eclosão de ovos de pássaros, peixes e tartarugas; feminização de peixes machos; problemas no sistema reprodutivo em peixes, répteis, pássaros e mamíferos e alterações no sistema imunológico de mamíferos marinhos. Por isso, apesar de existir estudos recente sobre parabenos, faz-se necessário maiores fundamentações científicas que comprovem a relação dos parabenos agindo como desregulador endócrino e carcinogênico. A ausência de comprovação dos efeitos dos parabenos faz com que poucos países possuam legislações que restrinjam o uso destes compostos.

A Tabela 4 apresenta dados sobre limites máximos de concentrações de parabenos em cosméticos nos países da União Europeia, Dinamarca, Estados Unidos e Japão. Em contraste, outros países, como o Canadá não impõe nenhuma limitação (CABALEIRO et al.,2014).

Tabela 4 - Concentração máxima permitida para parabenos em cosméticos.

NAÇÕES E PAÍSES	ORGÃO	CONCENTRAÇÃO MÁXIMA PERMITIDA
União Européia	Regulamentação Européia (EC) N°1223/2009	0,4% (ácido) apenas um éster; 0,8% (ácido) para uma mistura de ésteres
Dinamarca	Ministério do Meio Ambiente Dinamarques	0,4% (ácido) apenas éster 0,8% (ácido) para uma mistura de ésteres Propilparabeno, butilparabeno, isopropilparabeno, isobutilparabeno e esses sais não devem ser usados em produtos para crianças menores de 3 anos.
Estados Unidos	Federação de Medicamentos, Alimentos e Cosméticos.	0,4% apenas um parabeno 0,8% para uma mistura de parabenos
Japão	Legislação Japonesa de Medicamentos	1% apenas um parabeno 1% para uma mistura de parabenos
Canadá	Legislação de Alimentos e Medicamentos	Sem restrição

Fonte: CABALEIRO et al., 2014.

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) liberou uma lista de conservantes permitidos através da Resolução RDC nº 162 de 11 de setembro de 2001, republicada no D.O. de 02/10/2001, que estabelece concentração máxima permitida para o ácido 4-hidroxibenzóico de 0,4 % expresso como ácido individual e de 0,8 % expresso como ácido para misturas (ANVISA, 2001). Essa resolução é baseada na diretiva 76/768/EEC, anexo VI, parte 1, referência 12 da Comunidade Européia (1976) (CARREIRA, 2008).

Contudo, apesar de alguns países possuírem restrições, alguns inconvenientes são encontrados em relação a sua fiscalização. Métodos para análises de parabenos em matrizes aquosas e sólidas, ainda precisam ser desenvolvidos e otimizados em função da sua robustez e precisão. Estudos nessa área são considerados essenciais para o estabelecimento de legislações e sua devida fiscalização. Dada a relevância do estudo dos parabenos é de suma importância o desenvolvimento e aplicação de métodos analíticos confiáveis para a análise desses compostos em matrizes ambientais e biológicas.

2.4 Métodos Analíticos

Estudos recentes relatam a importância do desenvolvimento de novos métodos com o propósito de analisar parabenos, mesmo que em baixas concentrações, em matriz biológica tal

como, o peixe e com isso obter dados relevantes que possam relatar níveis de contaminação dos rios e oceanos (JAKIMSKA et al., 2013; SUBEDIA et al., 2011; KIM et al., 2011).

Com base na literatura, a técnica mais empregada para a análise de parabenos é a cromatográfica. A cromatografia é uma técnica de separação de constituintes de diversas misturas. De acordo com o diagrama apresentado na Figura 1, feito por Silva e Collins (2011), pode-se de forma simples, após estudar algumas características do analito em questão, escolher a melhor técnica a ser empregada para análise.

Figura 1- Faixa de aplicação da HPLC e GC para a análise de poluentes orgânicos emergentes através de suas propriedades físico-químicas de polaridade e volatilidade.

Fonte: SILVA; COLLINS, 2011.

A Figura 1 pode ser interpretada da seguinte forma: poluentes voláteis e semi-voláteis, não polares/lipofílicos são frequentemente separados por cromatografia gasosa, já a cromatografia líquida é adequada para uma variedade de compostos orgânicos que apresentam polaridade mais alta e volatilidade mais baixa ou ainda elevada instabilidade térmica, características de alguns POE (SILVA; COLLINS, 2011). Considerando a Figura 1, a técnica ideal para análise de parabenos é a cromatografia líquida de alta eficiência.

Vários são os detectores cromatográficos oferecidos no mercado, os mais populares atualmente são: UV/VIS, DAD, MS/MS, isto se deve ao fato de seus detectores proporcionarem boa seletividade, linearidade, baixo limite de detecção e de quantificação. O fator de maior

relevância em análises cromatográficas pode ser considerado seus detectores, pois é onde de fato ocorre a detecção e quantificação do analito (LANÇAS,2009).

2.4.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada com Detector de Fotodiodo

Os detectores de arranjo de fotodiodo são detectores que detectam na região do UV-VIS, porém possuem uma varredura mais completa, pois possuem a capacidade de escolher o melhor comprimento de onda, aumentando a sensibilidade, conforme apresentado na Figura 2.

Figura 2 - Esquema de um detector com arranjo de diodos.

Fonte: LANÇAS, 2009.

Verifica-se pela Figura 2 que uma série de fotodiodos posicionados lado a lado num cristal de silício faz com que cada comprimento de onda difratado pela grade atinja um diodo, com isso a absorbância de uma amostra pode ser determinada em todos os comprimentos de onda de modo simultâneo (LANÇAS,2009).

O detector com arranjo de diodos é um detector amplamente utilizado na cromatografia líquida atualmente, por ser considerado seletivo, uma vez que a substância precisa absorver luz; possuem mecanismos de operação bem estabelecidos, limites de detecção apropriados, são compatíveis com gradientes de eluição, pouco sensíveis a mudanças na temperatura e possuem boa sensibilidade (LANÇAS,2009).

2.5 Preparo de Amostras de Tecido de Peixe para as Análises de Parabenos

A cromatografia é a técnica mais sensíveis atualmente, no entanto, uma etapa, prévia, de preparo da amostra deve ser feita com o intuito de eliminar os interferentes da matriz e isolar o analito. Para isso métodos de extração são desenvolvidos, otimizados e ajustados de acordo com cada matriz e analito a ser analisado. A preocupação com o meio ambiente fez com que métodos clássicos tais como, a extração líquido-líquido (LLE) se tornasse obsoleto e desse lugar a técnicas miniaturizadas que utilizam pequenos volumes de solventes.

Os métodos convencionais empregados no preparo de amostras para análises cromatográficas de parabenos têm sido a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME), extração em fase sólida (SPE), microextração em fase sólida (SPME), microextração sortiva em barra (SBSE), extração de solventes em alta velocidade (HSSE) que também pode ser classificada como extração líquida pressurizada (PLE) e o QuEChERS que é descrito como um método rápido, fácil, de baixo custo, efetivo, robusto e seguro. Contudo os métodos adequados para extrações de parabenos em matriz sólida, como tecido de peixe, são mais restritos, na literatura frequentemente utiliza-se PLE e QuEChERS (GONZALEZ-MARINO et al., 2011; TERASAKI; MAKINO, 2009; ALBERO et al., 2012; MELO, 2010; KIM et al., 2011; SUBEDI, 2011; JAKIMSKA 2013)

A extração com líquido pressurizado (PLE, do inglês *pressurized liquid extraction*) é um método de extração que utiliza solventes convencionais em elevada temperatura e pressão (LUZ, 2010). Subedi et al. (2011) e Kim, et al. (2011) utilizaram PLE seguida por etapa de clean up utilizando permeação em gel para a extração de parabenos, cosméticos e fármacos em tecido de peixe. Entretanto em estudo mais recente, Jakimska, et al. (2013) comparou três métodos de extração para análise de parabenos, e outros poluentes orgânicos em tecido de peixe. O primeiro método usado foi o QuEChERS, o segundo método foi a extração com líquido pressurizado utilizando cromatografia de permeação em gel (GPC) na etapa de clean up e o terceiro foi a extração com líquido pressurizado utilizando florisil para clean up. O método que apresentou melhor resultado para análise dos desreguladores endócrinos em tecido de peixe foi o QuEChERS.

O QuEChERS é um método de extração mais recente que a PLE, ele foi desenvolvido em 2003 por Anastassiades et al. com o objetivo de superar limitações práticas dos métodos de extração disponíveis.

O fluxograma da Figura 3 apresenta as etapas da extração QuEChERS originalmente usado para análises de pesticidas em alimentos.

Figura 3- Fluxograma representativo do método QuEChERS original.

Fonte: PRESTES et al., 2009

A mistura do solvente orgânico acetonitrila (MeCN) com os sais de sulfato de magnésio e cloreto de sódio após a centrifugação faz com que ocorra uma partição líquido-líquido entre a água presente na amostra e a acetonitrila; a presença dos sais ocasiona o efeito salting-out. A segunda etapa, na qual adiciona-se sulfato de magnésio (MgSO_4) e amina primária e secundária (PSA), envolve um procedimento chamado de SPE dispersiva, que consiste na remoção da água residual e atua também na etapa de clean up da amostra, removendo muitos componentes polares da matriz (MACEDO, 2012).

Atualmente o QuEChERS é um método de extração utilizado para análises em matrizes sólidas, podendo adequar-se de acordo com a matriz e analitos a serem analisados. A otimização do método inclui alterações: na massa da amostra, tipo de solvente extrator, volume do solvente extrator, quantidade de sais para clean up, efeito salting out entre outros. Todavia, considerando que gasta-se o maior tempo no preparo de amostras e que é nesta etapa onde ocorre grande parte dos erros, a eliminação de etapas e reagentes na extração se torna relevante (RICHTER et al., 1996). A microextração líquido-líquido é um método de extração que elimina a adição dos três sais da etapa de clean up (PSA, C18 e MgSO_4) no processo de preparo de amostra de tecido de peixe implementado por Jakimska, et al. (2013).

2.6 Microextração Líquido - Líquido (LLME)

O método de microextração líquido-líquido tem como origem o método de extração com solvente (LLE), método clássico na cromatografia, que consiste na separação de analitos e matriz concomitante pela partição da amostra entre dois líquidos imiscíveis ou fases. Este método também tem características de separação próximas a do QuEChERS em razão da adição dos sais (NaCl e MgSO_4) (MIOR, 2009).

Apesar de possuir os mesmos princípios de separação da extração com solvente, a micro extração líquido-líquido se torna um método viável por utilizar pouco solvente orgânico, minimizando o descarte de resíduos no meio ambiente, além de conter poucas etapas. Na primeira etapa é separado o solvente de extração da amostra através da centrifugação, na segunda etapa é feito a secagem do solvente extrator e na terceira etapa é feita a filtração que é indicada para evitar obstruções na coluna devido à adição de sais como o sulfato de magnésio que tem como finalidade particionar a água do solvente orgânico e o cloreto de sódio que ao dissolver na fase aquosa, deixa o analito mais disponível para interagir com o solvente orgânico extrator.

Tais vantagens, como diminuição na quantidade de solventes utilizado, simplicidade de operação, poucas etapas, baixo custo e consumo de tempo fizeram com que o método de microextração líquido-líquido se tornasse aplicável e acessível para análise de amostras ambientais.

Apesar de eliminar diversas desvantagens que são encontradas em outros métodos tais como: uso de grande quantidade de solvente orgânico no caso da LLE; alto custo e baixa robustez para as microtécnicas que necessitam de fibras e/ou barras para atuarem como adsorventes; exaustiva para análises SPE que necessitam de adsorventes específicos; este método ainda é pouco difundido no meio acadêmico.

2.7 Validação de Métodos Analíticos

Segundo as normas da ANVISA (2003) a validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para isso faz-se necessário à avaliação dos seguintes parâmetros: seletividade, o limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), linearidade, precisão, exatidão, robustez e recuperação.

2.7.1 Seletividade/ Especificidade

Os termos especificidade e seletividade são frequentemente utilizados indistintamente ou com diferentes interpretações, porém define-se um método como seletivo quando ele produz respostas para vários analitos, mas que pode distinguir a resposta de um analito da de outros; e específico quando o método produz resposta para apenas um analito. Em suma, este parâmetro mede a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz. Em métodos cromatográficos, por exemplo, utiliza-se detector de arranjo de fotodiodos ou espectrometria de massas para demonstrar que o pico cromatográfico é atribuído a um só componente (ANVISA,2003).

2.7.2 Limite de Detecção (LD)

O limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. No caso de métodos instrumentais (HPLC, CG, absorção atômica), a estimativa do limite de detecção pode ser feita com base na relação de 3 vezes o ruído da linha de base ou a partir da curva de calibração proveniente da análise de um número apropriado de amostras do branco, como apresentado na equação a seguir:

$$LD = 3,3 \times \frac{DP}{S} \quad \text{Eq. (1)}$$

Na qual: DP = desvio-padrão da resposta; S = o coeficiente angular do gráfico de calibração (sensibilidade do aparelho) (ANVISA,2003; BRITO et al., 2003).

2.7.3 Limite de Quantificação (LQ)

É a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. O limite de quantificação é um parâmetro determinado, principalmente, para ensaios quantitativos e é

expresso como concentração do analito (por exemplo, porcentagem p/p ou p/v, partes por milhão) na amostra. O limite de quantificação pode ser calculado pela equação

$$LQ = 10 \times \frac{DP}{S} \quad \text{Eq. (2)}$$

Na qual: DP = desvio-padrão da resposta; S = o coeficiente angular do gráfico de calibração (sensibilidade do método) (ANVISA,2003; BRITO et al., 2003).

2.7.4 Linearidade

Linearidade é a habilidade de um método analítico em produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito em amostras, em uma dada faixa de concentração. A quantificação requer que se conheça a dependência entre a resposta medida e a concentração do analito. A linearidade é obtida por padronização interna ou externa e formulada como expressão matemática usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra (INMETRO,2007).

A equação da reta que relaciona as duas variáveis é:

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

Onde:

y = resposta medida (absorbância, altura ou área do pico, etc.);

x = concentração;

a = inclinação da curva de calibração = sensibilidade;

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

Além dos coeficientes de regressão a e b, também é possível calcular, a partir dos pontos experimentais, o coeficiente de correlação r. Este parâmetro permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (MELO,2012).

2.7.5 Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. A precisão de um método analítico pode ser expressa como o desvio padrão ou desvio padrão relativo (coeficiente de variação) de uma série de medidas, segundo a fórmula,

$$DPR = \frac{DP}{CMDS} \times 100 \quad \text{Eq. (4)}$$

em que, DP é o desvio padrão e CMD, a concentração média determinada. O valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método (ANVISA,2003).

2.7.6 Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. A exatidão do método deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade do mesmo, sendo verificada a partir de, no mínimo, 9 (nove) determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada. A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente (ANVISA,2003). Como apresentado na equação a seguir:

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

2.7.7 Robustez

A avaliação da robustez deve ser considerada durante a fase de desenvolvimento do método. Constatando-se suscetibilidade a variações nas condições analíticas, estas deverão ser adequadamente controladas ou precauções deverão ser incluídas no procedimento (ANVISA,2003).

2.8 Teste de Huber

A curva analítica é obtida com dados experimentais, que sempre estão sujeitos a erros e desvios. Por isto, os dados costumam oscilar e pode ser difícil obter uma equação que os represente com confiabilidade. Um recurso para contornar esta dificuldade – além do cuidado com operações experimentais tecnicamente corretas – é trabalhar com dados em replicatas (VALENTE; AUGUSTO; RIEDO,2003). É comum após obter as triplicatas calcular as médias das áreas correspondentes a cada concentração, para se aplicar a regressão linear sobre estas médias e concentrações. Porém alguns valores anômalos, oriundos dos erros e desvios, interferem no cálculo descaracterizando o significado da média. Para desconsiderar esses valores anômalos aplica-se o Teste de Huber.

O Teste de Huber parte do princípio que o quociente entre as áreas medidas e as correspondentes concentrações (A/C) são constantes. Sabendo disso, é necessário estabelecer um intervalo de confiança que define quais dados são aceitáveis, ou seja, que estão dentro do intervalo de confiança. Portanto um valor central é estabelecido de forma que ele não dependa dos dados anômalos. Isso é feito pelo cálculo da mediana (med) dos valores obtidos pelo quociente área por concentração (A/C). A mediana é então usada para calcular as diferenças absolutas entre cada valor de A/C e med a partir dessa diferença é calculado o desvio absoluto da mediana (mad) dos valores $|A/C - med|$. Com esses valores é possível calcular o intervalo de confiança (IC) (VALENTE; AUGUSTO; RIEDO,2003; OLIVEIRA,2012), como apresentado na equação a seguir:

$$IC = med \pm k.mad \quad (Eq. 6)$$

Onde k é um valor que varia entre 2 e 8 e é definido pelo analista. Na prática, quanto maior for o valor de k mais permissivo é o critério de linearidade adotado, uma vez que amplia o intervalo de confiança (OLIVEIRA,2012).

2.9 Aplicação da Microextração Líquido-Líquido para Análise de Parabenos em Tecido de Peixes

Dentre os peixes mais consumidos no Brasil estão o *Oreochromis niloticus*, o *Merluccius hubbsi* e o *Pangasius hypophthalmus* que são mais conhecidos respectivamente por tilápia, merluza e pangásio. A tilápia, Figura 4, é um peixe de água doce e sua espécie é

disseminada em todas as Bacias Hidrográficas do Brasil (CENTRO DE PRODUÇÕES TÉCNICAS (CPT), 2013). Nativo da África, esse peixe “invasor” foi trazido para o Brasil na década de 70. O animal, de carne suave e firme, se adaptou tão bem em nossas águas que, atualmente, representa mais de 60% do cultivo de pescados em viveiro em todo o país (Barbosa, 2014). Por ser um peixe omnívoro, herbívoro ou fitoplactófago, ou seja, peixe que alimenta-se de insetos, microcrustáceos, sementes, frutos, raízes, algas, plâncton e pequenos peixes (CPT, 2013) a tilápia possui grande resistência em ambientes poluídos e/ou eutrofizados.

Figura 4 - Ilustração do Peixe Tilápia.

Fonte: (CPT, 2013)

A merluza, Figura 5, é um peixe de água salgada, nativo da Argentina, têm como hábito realizar migrações sazonais e migrações verticais ao longo do dia, provavelmente em função da sua alimentação, a qual ocorre principalmente à noite. Alimenta-se de invertebrados, peixes e lulas e se tornou um peixe de grande consumo no Brasil devido à sua carne saborosa e ao baixo custo (VIVATERRA, 2013).

Figura 5- Ilustração do Peixe Merluza.

Fonte: (VIVATERRA, 2013).

O Pangasius, Figura 6, é um peixe cultivado há mais de mil anos no Rio Mekong, no Vietnã, um dos maiores rios do mundo, localizado no sudeste asiático. Há muitos anos, é exportado para diversos países (SISTEMA MPA, 2012). Espécie também considerada resistente por ser rasteira e omnívoro (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF

THE UNITED NATIONS (FAO), 2009). Se tornou uma opção excelente para o consumidor devido ao seu custo-benefício (25% mais barato que outras espécies, como a Merluza), além de sua carne possuir textura firme, cor branca, sabor suave e sem espinhas (SISTEMA MPA, 2012).

Figura 6– Ilustração do Peixe Pangasius.

Fonte: FAO, 2009

Em razão do alto consumo dessas espécies e com o intuito de abranger várias regiões, torna-se relevante o estudo de parabenos nos tecidos da tilápia, merluza e pangasius, considerando o fato que esses compostos influenciam de forma direta na reprodutividade de tais peixes, além de resultar em um estudo ambiental sobre a poluição e contaminação do meio aquático.

3.0 OBJETIVOS

Desenvolver método analítico para análise do metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno e butilparabeno em tecido de peixes.

3.1 Objetivos Específicos

- ✓ Desenvolver o método de preparo de amostra LLME/HPLC-DAD para análises de parabenos em tecido de peixe.
- ✓ Otimizar as condições cromatográficas (HPLC-DAD) para análise simultânea dos parabenos;
- ✓ Otimizar as variáveis LLME;
- ✓ Validação analítica do método LLME / HPLC-DAD desenvolvido;
- ✓ Aplicar método desenvolvido e validado em amostras de peixes adquiridos no município de São Carlos – SP.

4.0 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Padrões Analíticos

As soluções-estoque metilparabeno (MP), etilparabeno (EP), propilparabeno (PP) e butilparabeno(BP), adquiridos da Sigma–Aldrich, foram preparadas individualmente, sendo dissolvidas em metanol grau HPLC, em concentração de 100 mgL⁻¹ e armazenadas em refrigerador a 4 °C, onde apresentaram-se estáveis a essa temperatura durante 45 dias. Solução mista dos parabenos foi preparada a partir das soluções-estoque na concentração 1 mgL⁻¹ para se determinar as condições cromatográficas ideais para análise dos parabenos.

4.2 Reagentes, Solventes e Materiais para a Análise Cromatográfica

Os solventes utilizados nas análises cromatográficas foram metanol grau HPLC de pureza superior a 99,8% fornecido pela Panreac AppliChem (Damstadt - Germany) e ácido acético glacial PA fornecido pela Quemis (Indaiatuba-SP, Brasil). A água ultrapura utilizada foi purificada em sistema Milli-Q, (Millipore, São Paulo - SP, Brasil).

Na preparação das amostras foi utilizado como solvente extrator a acetonitrila fornecido pela Panreac AppliChem (Damstadt - Germany) e os sais sulfato de magnésio e cloreto de sódio do fornecedor J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA) com pureza maior que 98,9%. Na secagem das amostras, utilizou-se gás nitrogênio (N₂) da Linde (Sertãozinho-SP, Brasil) com grau de pureza 99,999%. O filtro utilizado na extração foi o ChromafilXtra PA 20/25 de nylon com diâmetro de 0,20µm da Macherey-Nagel (Düren - Germany).

4.3 Instrumentação

Utilizou-se para a análise de parabenos em tecido de peixe um cromatógrafo à líquido da Shimadzu modelo CBM – 20 A UFLC equipado com bomba de alta pressão binária (LC - 10AD), injetor manual com loop de 20 µL, detector espectrofotométrico por arranjo de diodos DAD (SPD – M 10) e software LC Solution para aquisição e processamento dos dados.

Também foi utilizado uma balança analítica (Denver Instrument – U.S) modelo APX-200 com faixa de 10mg a 200g, agitador Vortex, tipo orbital da Ika modelo MS 3 Digital (Germany) e centrífuga Ependorf Centrifuge, modelo 5720 (Hamburg - Germany), a amostra secou sob um aquecedor IKA modelo C- MAG HS7 (China).

4.4 Condições Cromatográficas para Análise de Parabenos em Tecido de Peixe

Utilizou-se cromatografia líquida de alta eficiência acoplada com detector de fotodiodo com varredura de 190-300nm e comprimento de onda de 248 nm. Os parabenos foram separados em coluna Nucleodur C8 ec, 4,6 x 250 mm, 5 µm de tamanho de partícula da Macherey-Nagel (Düren, Germany). Tendo como referência Melo, (2010) e Shen (2007) a fase móvel selecionada para análise dos parabenos foi metanol/ 1% ácido acético em água (60:30, v/v), com vazão de 1,0 mL min⁻¹, tempo de corrida 24 minutos em modo gradiente de acordo com a Tabela 5. O volume de amostra injetado foi de 20 µL.

4.5 Microextração Líquido-Líquido (LLME) de Parabenos em Tecido de Peixe

Para o desenvolvimento do método de extração adquiriu-se os peixes em uma piscicultura a fim de minimizar que as amostras não estivessem contaminadas com parabenos. O material foi refrigerado a 4° C para melhor conservação. Ressalta-se que a piscicultura utiliza água de nascente, portanto isenta de esgoto sanitário e industrial.

As condições de extração foram baseadas no método QuEChERS desenvolvido por Jakimska e colaboradores (2013) com algumas modificações. As variáveis utilizadas no estabelecimento das condições de extração foram: massa da amostra, sais para clean up (PSA, C18), sais para efeito salting out (MgSO₄.NaCl), solvente acetonitrila (ACN), acetonitrila e água, diclorometano (DCM), volume do solvente (4, 5 e 8mL).

Os ensaios foram realizados em duplicata e avaliados pela porcentagem de recuperação, robustez e linearidade. De todos os 7 ensaios apresentados na Tabela 6 o 6° ensaio foi que apresentou a melhor extração pois correspondeu aos três requisitos, recuperação, linearidade e robustez. Pesou-se um grama de tecido de peixe (em um tubo de centrífuga de 50 mL) adicionou-se 8mL de solvente extrator (acetonitrila), 0,1g de NaCl e 0,4 de MgSO₄. Em seguida a amostra foi agitada durante um minuto no vortex e centrifugada por cinco minutos sob uma rotação de 4.000 rpm. A adição do NaCl faz com que ocorra uma saturação na fase aquosa e os parabenos, que são polares, ficam mais disponíveis para interagir com o solvente extrator (acetonitrila). O sal MgSO₄ foi selecionado devido sua maior capacidade de absorção de água em relação a outros sais, como LiCl, MgCl₂, NaNO₃, Na₂SO₄, apresentando também a vantagem de liberar calor no processo de hidratação, que aumenta a velocidade de extração (ANASTASSIADES; MAŠTOVSKÁ; LEHOTAY,2003).

Após ocorrer a partição líquido - líquido, o sobrenadante foi transferido para um vidro âmbar de 10 mL e secou-se o extrato com gás nitrogênio sob aquecimento controlado a 40 °C, utilizando um aquecedor digital. Ao fim da secagem, o extrato foi reconstituído em metanol e filtrado, eliminando assim impurezas que pudessem causar obstrução na coluna cromatográfica de separação, Figura 7.

Figura 7– Ilustração da microextração líquido-líquido para análise de parabenos em tecido de peixe.

Apesar do método de extração ter sido baseado no método QuEChERS desenvolvido por Jakimska, et al (2013), esta extração foi classificada como microextração líquido-líquido, devido à ausência da etapa de clean up (PSA, C18 e $MgSO_4$). Após definido o melhor método de extração para a análise de parabenos em tecido de peixe, fez-se a validação do método de microextração líquido-líquido (LLME) utilizando amostras de tecido de peixes adquiridas em piscicultura.

4.6 Validação do Método Desenvolvido

Para validação do método analítico foram avaliados os seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação, tendo como base as recomendações da ANVISA (2003).

4.6.1 Seletividade

A seletividade foi avaliada comparando-se cromatogramas dos extratos das amostras de tecido de peixe isento de parabenos (amostra branco) com os extratos das amostras de tecido de peixe fortificadas com solução padrão de metil, etil, propil e butilparabeno na concentração de 1 mgL^{-1} . Mediante a comparação dos cromatogramas é possível observar se há presença de picos interferentes na região do tempo de retenção do analito de interesse.

4.6.2 Linearidade

A linearidade foi avaliada por meio do coeficiente de correlação da curva analítica. A curva analítica de cada parabeno foi feita com amostras de tecido de peixe fortificada com solução padrão de parabenos. O intervalo de trabalho foi feito com concentração de 0,05 a $1,0 \text{ mgg}^{-1}$. A equação da reta foi calculada relacionado duas variáveis, a área do pico dos parabenos com as concentrações dos parabenos. Conforme apresentado na equação a seguir:

$$y = ax + b \quad \text{Eq.(7)}$$

Onde:

y = resposta medida (absorbância, altura ou área do pico, etc.);

x = concentração;

a = inclinação da curva de calibração = sensibilidade;

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

Além dos coeficientes de regressão a e b, também foi possível calcular, a partir dos pontos experimentais, o coeficiente de correlação r. De acordo com a ANVISA (2003) coeficientes de correlação próximo de 1 indica uma menor dispersão dos dados experimentais e conseqüentemente uma boa linearidade.

4.6.3 Precisão

A avaliação da precisão do método foi feita utilizando-se ensaios de repetibilidade e de precisão interdiárias. As amostras de tecido de peixe fortificadas com solução padrão de parabenos nas concentrações 0,1; 0,5; $1,0 \text{ mgg}^{-1}$ foram analisadas em triplicata e a precisão foi avaliada por meio do cálculo do desvio padrão relativo (DPR), como apresentado na seguinte equação:

$$DPR = \frac{DP}{CMDS} \times 100 \quad \text{Eq. (8)}$$

em que, DP é o desvio padrão e CMD, a concentração média determinada.

Verificou-se a concordância dos dados frente à análise de amostras submetidas às mesmas condições de análise: analista, equipamento, mesmo laboratório e num espaço de cinco dias para os ensaios de repetibilidade. Os ensaios intradias também foram feitos em triplicata nas concentrações, 0,1; 0,5; 1,0 mgg⁻¹. Foram analisados os extratos das amostras fortificadas em dias diferentes e os resultados foram avaliados pelos cálculos do desvio padrão relativo. De acordo com a ANVISA a precisão do método deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade do mesmo, sendo verificada a partir de, no mínimo, 9 (nove) determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada.

Como critério de aceitação foi adotado um desvio padrão relativo máximo de 15%, para amostras complexas, conforme preconizado pela ANVISA (2003).

4.6.4 Exatidão

A exatidão do método analítico foi avaliada por meio do cálculo da recuperação, no qual verifica-se a proximidade dos resultados obtidos pelo método estudado em relação ao valor verdadeiro. Avaliou-se as amostras de tecido de peixe em triplicata nas concentrações 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 0,8; 1,0 mgg⁻¹, utilizando a média das recuperações das três concentrações para o cálculo da exatidão, Equação 9.

$$\text{Concentração média Exatidão} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração média teórica}} \times 100 \quad \text{Eq. (9)}$$

Adotou-se como critério de aceitação o intervalo de exatidão de 80-120%, conforme foi estabelecido pela ANVISA (2003).

4.6.5 Limite de Detecção e de Quantificação

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) do instrumento para cada uma dos parabenos foram determinados usando o método baseado em parâmetros da curva analítica. Nas equações 10 e 11 são mostrados os cálculos de LD e LQ:

$$LD = 3,3 \times \frac{DP}{S} \quad \text{Eq. (10)}$$

$$LQ = 10 \times \frac{DP}{S} \quad \text{Eq. (11)}$$

Na qual: DP = desvio-padrão da resposta; S = o coeficiente angular do gráfico de calibração da menor concentração utilizada na construção da curva analítica (BRITO et al., 2003).

4.7 Aplicação do Teste de Huber

Aplicou-se o teste de Huber em todos os dados experimentais obtidos para a plotagem da curva analítica. Alguns dados anômalos foram eliminados e com isso obteve-se uma otimização dos elementos da regressão linear. Definiu-se o valor do coeficiente k como sendo 2, valor este mais rígido, pois estreita o intervalo de confiança (BRITO et al., 2003). Utilizou-se os intervalos de confiança e as medianas calculados por meio do teste Huber para a construção do gráfico de linearidade, com isso pode-se observar quantos foram os pontos anômalos de cada parabeno.

4.8 Aplicação do Método Desenvolvido em Amostras de Tecidos de Peixes Adquiridos no Comércio de São Carlos- SP

Após a validação do método analisou-se amostras de três espécies de peixes (tilápia, merluza, pangasius) de quatro peixarias da cidade de São Carlos – SP, em uma das peixarias adquiriu-se apenas tilápia, pois o peixe merluza e o pangasius não estavam disponíveis, totalizando 10 amostras. A extração dos analitos de interesse foi feita seguindo o procedimento da microextração líquido-líquido (LLME) descrito no tópico 3.5 e em duplicata para maior confiabilidade dos resultados. Os extratos foram armazenados em refrigerador a 4 °C, por no máximo uma semana. Todas as amostras foram analisadas no mesmo dia usando as condições cromatográficas citados na Tabela 5.

5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Condições Cromatográfica para Análise de Parabenos

Para a determinação simultânea dos compostos metil, etil, propil e butilparabenos, a otimização das condições cromatográficas foi uma etapa importante para obter uma boa separação dos picos cromatográficos em menor tempo de análise. A fase móvel para separação cromatográfica dos parabenos, consistiu de metanol/ 1% ácido acético em água (60:30, v/v), com vazão de 1,0 mL min⁻¹, tempo de corrida 24 minutos em modo gradiente, Tabela 5.

Tabela 5 -Gradiente da fase móvel para análise dos parabenos.

Tempo (min)	A (%)	B (%)	Fluxo (mL min ⁻¹)
8	40	60	1,0
14	35	65	1,0
18	35	65	1,0
20	35	65	1,0
20	0	100	1,0

A: Ácido Acético 1% em água

B: Metanol

Após a otimização das condições cromatográficas, fez-se a análise, em HPLC-DAD empregando-se solução padrão dos parabenos na concentração 1,0 mgL⁻¹, Figura 8.

Figura 8- Cromatograma dos parabenos na concentração de $1,0 \text{ mgL}^{-1}$, fase móvel metanol/ 1% de ácido acético em água (60:30, v/v). 1 - metilparabeno, 2 - etilparabeno, 3 - propilparabeno e 4 - butilparabeno.

O método empregado neste estudo seguiu as normas da ANVISA (2003). O método foi considerado seletivo por produzir resposta para os quatro analitos. Observa-se que os picos cromatográficos estão bem separados e bem resolvidos. O tempo de retenção para cada composto foi de 6,108; 8,092; 11,674 e 16,500 minutos respectivamente para metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno e butilparabeno, respectivamente.

Após determinação da seletividade do método e condições cromatográficas otimizadas, desenvolveu-se o método de extração para análise de parabenos no tecido de peixe. A Tabela 6 apresenta as variáveis que foram analisadas para a extração.

Tabela 6 – Variáveis testadas para a otimização da microextração líquido-líquido de parabenos em tecido de peixe.

Ensaio	Tecido de peixe (g)	MgSO ₄ (g)	NaCl (g)	PSA (g)	C18 (g)	ACN* (mL)	DCM** (mL)	Água (mL)
1	2	0,80;	0,2	0,50	0,50	4	-	1
2	2	0,8; 0,15	0,2	0,50	0,50	4	-	2
3	2	1,2; 0,15	0,2	0,50	0,50	4	-	2
4	2	1,5; 0,15	0,2	0,50	0,50	4	-	2
5	2	1,2; 0,15	0,2	0,50	0,50	5	-	2
6	1	0,40	0,1	-	-	8	-	-
7	1	0,40	0,1	-	-	--	8	-

*Acetonitrila

**Diclorometano

Dos sete ensaios feitos, o que apresentou melhor recuperação, linearidade e robustez foi o 6º ensaio. O sexto ensaio foi o que empregou menor quantidade de amostra (1g), menor quantidade de sais MgSO_4 e NaCl e apenas acetonitrila como solvente extrator, Figura 7. A ausência da etapa de clean up, ou seja, ausência da adição de PSA, C18 e MgSO_4 , faz com que o método seja mais simples, rápido e econômico, quando comparado com o desenvolvido por Jakimska, et al. (2013).

Estabelecido e otimizado o método de extração, analisou-se o efeito matriz e o quanto poderia influenciar nas análises. A Figura 9 apresenta por meio de comparação entre cromatogramas de amostras de tecido de peixe enriquecidas com solução padrão de parabenos na concentração de $1,0 \text{ mgL}^{-1}$, com cromatograma do extrato da amostra de tecido de peixes sem adição de solução padrão. Não foram observados picos cromatográficos interferentes provenientes da amostra de tecido de peixe nos tempos de retenção dos quatro parabenos analisados, Figura 9 (a) e 9 (b).

Figura 9 – Cromatogramas das análises MELL/HPLC-DAD. (a) amostra tecido de peixe branco de referência sem adição de parabenos (b) amostra de tecido de peixe enriquecida com os parabenos, 1- metilparabeno, 2 - etilparabeno, 3-propilparabeno, 4-butilparabeno($1,0 \text{ mgL}^{-1}$)

5.2 Resultados de Validação do Método Analítico Desenvolvido para Análise de Parabenos em Tecido de Peixe

Para a validação do método, avaliou-se primeiramente os parâmetros sensibilidade e linearidade.

5.2.1 Sensibilidade, linearidade e robustez

Para a análise dos parâmetros da validação do método, traçou-se as curvas analíticas nas seguintes concentrações (0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 0,8 e 1,0 mg g^{-1}) com seus respectivos desvios padrão, como apresentado na Figura 10. As curvas analíticas foram confeccionadas com os extratos das amostras de tecido de peixe adquirido na piscicultura da região de São Carlos - SP. Foi feito dessa maneira para eliminar possíveis interferentes da matriz.

Figura 10- Curvas analíticas obtidas das análises MELL/HPLC-DAD em amostras de tecido de peixe (branco de referência) enriquecidas com os parabenos (a) metilparabeno, (b) etilparabeno, (c) propilparabeno e (d) butilparabeno.

A robustez de um método analítico é medido por meio da sensibilidade que este apresenta face a pequenas variações. Considera-se que um método é sensível quando uma pequena diferença na concentração do analito causa grande variação no valor do sinal analítico medido. Os altos valores dos coeficientes angulares indicam que, com pequenas variações na concentração obtêm-se grandes variações nos sinais medidos, garantindo a diferenciação de picos cromatográficos oriundos de duas concentrações bastante próximas. O coeficiente de correlação (r^2) próximo de 1 aponta para uma boa linearidade da resposta dos analitos (BRITO et al., 2003).

Além das curvas analíticas avaliou-se a linearidade por meio das curvas de linearidades baseadas no Teste de Huber. Pelo teste foi possível a rejeição de dados anômalos que resultariam em erros nos resultados das análises. As Figuras 11-14 apresentam as curvas de linearidade dos parabenos, feitos em triplicata (Área 1, Área 2 e Área 3).

Figura 11– Curva de linearidade do metilparabeno variando de 0,05 – 1,0 mgg⁻¹.

Figura 12– Curva de linearidade do etilparabeno variando de 0,05 – 1,0 mgg⁻¹.

Figura 13– Curva de linearidade dos propilparabeno variando de 0,05 – 1,0 mgg⁻¹.

Figura 14– Curva de linearidade dos butilparabeno variando de 0,05 – 1,0 mgg⁻¹.

Observa-se por meio das Figuras 11-14 que a aplicação do Teste de Huber nos dados experimentais dos quatro parabenos fez com que houvesse rejeição de alguns resultados. No caso do metilparabeno pelo o Teste de Huber não rejeitou nenhum dado experimental, já com o propilparabeno, Figura 13, rejeitou-se apenas dois dados. Para o etilparabeno, Figura 12, rejeitou quatro dados experimentais e para o butilparabeno, Figura 14, rejeitou cinco dados dos dezoitos analisados. Quanto maior a rejeição de dados experimentais (resíduos), menor é sua linearidade. Contudo de acordo com Valente, Augusto e Riedo (2003) os resíduos das curvas de linearidade dos parabenos estão dentro do grau de confiabilidade.

5.2.2 Limites de Detecção e de Quantificação

Calculou-se o limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) através da regressão linear e do desvio padrão da resposta de cada analito. Por meio dos ajustes dos parâmetros cromatográficos obteve-se baixos limites de detecção e de quantificação conforme apresentado na Tabela 7.

Tabela 7-Resultados do limite de detecção, limite de quantificação e sensibilidade do método para a análise de parabenos em tecido de peixe.

Parabenos	Regressão linear ($y = ax + b$)	r^2	LD (mgg^{-1})	LQ (mgg^{-1})	Sensibilidade ($\mu\text{au mgg}^{-1}$)
Metilparabeno	$y = 159683x + 6219,9$	0,9884	0,0221	0,0738	159683
Etilparabeno	$y = 105995x + 4448,8$	0,9875	0,0012	0,0042	105995
Propilparabeno	$y = 87436x + 1418,9$	0,9906	0,0107	0,0324	87436
Butilparabeno	$y = 89055x + 3191,7$	0,9837	0,0007	0,0021	89055

Verifica-se pelos dados da Tabela 7 baixos limites de detecção e de quantificação, que são necessários para a análise de parabenos em amostras ambientais e biológicas, pois estes são considerados poluentes emergentes, ocorrendo normalmente em baixas concentrações.

Admite-se coeficiente de correlação linear igual ou superior a 0,98 para validação de métodos empregando amostras biológicas. Isso se deve ao fato da curva analítica ser produzida com dados obtidos com amostras de tecido de peixe fortificadas e não apenas com soluções padrões de parabenos diluídas em solvente orgânico. Com isso, mesmo após a extração, alguns

compostos presentes na matriz ainda persistem no extrato devido à complexidade da amostra, interferindo assim na linearidade da curva analítica.

5.2.3 Exatidão e Precisão

A exatidão do método LLME/HPLC-DAD foi avaliada com amostras de tecido de peixe enriquecidas com padrões analíticos de parabenos nas concentrações de 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 0,8 e 1,0 mgg^{-1} ($n = 3$). A exatidão é calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra.

A Tabela 8 apresenta os resultados de recuperação as concentrações de 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 0,8 e 1,0 mgg^{-1} as quais contemplam o intervalo linear, sendo três repetições por concentração.

Tabela 8 – Resultado da recuperação e exatidão do método para detecção de parabenos nas concentrações de 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 0,8 e 1,0 mgg⁻¹

Parabenos	Concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Recuperação (%) (n=3)	RSD*(n=3)
Metil	0,05	94,0	7,0
	0,1	95,0	0,5
	0,25	89,0	3,2
	0,5	83,0	10,0
	0,8	100,0	5,2
	1,0	74,0	2,9
Etil	0,05	107,0	7,4
	0,1	103,0	4,1
	0,25	80,0	12,2
	0,5	89,0	3,2
	0,8	89,0	7,7
	1,0	88,0	3,6
Propil	0,05	106,0	14,2
	0,1	96,0	8,6
	0,25	94,0	14,9
	0,5	97,0	4,0
	0,8	100,0	7,9
	1,0	76,0	2,6
Butil	0,05	102,0	7,7
	0,1	74,0	4,0
	0,25	96,0	9,1
	0,5	79,0	5,5
	0,8	112,0	2,0
	1,0	78,0	4,2

RSD*= Desvio padrão relativo das recuperações

Obteve-se valores recuperação variando de 74 a 112 % nas análises do extrato do metil, etil, propil e butilparabenos. Segundo a ANVISA (2003), taxas de recuperação do analito próximo a 100% são desejáveis, porém, para amostras complexas, admitem-se valores maiores

e menores desde que o desvio padrão relativo não exceda 15%. O desvio padrão relativo foi menor que 14,9%, Tabela 8.

Baixos valores de exatidão, geralmente, são ocasionados por erros sistemáticos que provocam desvios ou tendências nos resultados (LANÇAS 2004). No presente estudo tal erro sistemático pode ter sido ocasionado porque o modo de injeção foi o manual. Outro fato que pode ter colaborado para o erro sistemático é porque a coluna cromatográfica usada no estudo ficou exposta e assim não houve controle rígido da temperatura. Contudo o presente estudo apresentou resultados que estão de acordo com a ANVISA (2003) além de apresentar também recuperações maiores do que alguns estudos disponíveis na literatura (KIM et al., 2011; SUBEDI et al., 2011; SUBEDI et al., 2011) e coeficiente de determinação compatível com o detector utilizado, como apresentado na Tabela 9.

Tabela 9 – Resultados de extrações em tecido de peixe disponíveis na literatura.

Referência	Presente estudo	Kim, et al. (2011)	Subedi, et al. (2011)	Jakimska et al. (2013)
Analitos	Parabenos	Parabenos	Triclosan, Diazepam	Parabenos
Matriz	tecido de peixe	tecido de peixe	tecido de peixe	tecido de peixe
Técnica de extração	MLLE*	HSSE*	PLE*	QuEChERS*
Detector	HPLC DAD*	UFLC MS/MS*	GC MS/MS*	LC MS/MS*
Coeficiente de determinação (r)	0,98 - 0,99	0,99 - 1,0	0,99	0,99
Precisão (RSD) %	<15	<17	< 17	< 13
Recuperação (%)	74-112	86-90	64 - 131	40 -103
LD*	0,7 - 22,1 ngg ⁻¹	0,1-15,0 ngg ⁻¹	1.2 - 38 ngg ⁻¹	0.002- 3.09 ngg ⁻¹

*Microextração líquido-líquido (MLLE); Extração de solventes em alta velocidade (HSSE); Extração Líquida Pressurizada (PLE); Quick, easy, cheap, effective, rugged and safe (QuEChERS); Cromatografia Líquida de Alta Pressão acoplado com detector de fotodiodo (HPLC-DAD); Ultra fast liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (UFLC-MS/MS); Cromatografia gasosa acoplado com espectômetro de massas (GC MS/MS); Ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS); Limite de detecção (LD).

Na determinação da precisão interdias do método MELL/HPLC-DAD foram utilizadas amostras de tecido de peixe enriquecidas com solução padrão dos parabenos. A Tabela 10 apresenta os resultados de precisão para três concentrações 0,1; 0,5; 1,0 mgg⁻¹. Este estudo foi feito com três repetições para cada concentração. A precisão foi calculada por meio do

coeficiente de variação (CV) e as condições de repetibilidade foram: o mesmo método, para a mesma amostra, no mesmo laboratório, pelo mesmo operador, no mesmo equipamento, porém em um curto intervalo de tempo de 5 dias.

Tabela 10- Avaliação da precisão (repetibilidade e precisão interdias) do método cromatográfico para determinação de parabenos

Parabenos	Concentração (mgg ⁻¹)	Repetibilidade		Precisão interdias	
		n	CV(%)	n	CV(%)
Metil	0,1	3	1,9	3	11,1
	0,5	3	7,5	3	3,6
	1,0	3	1,0	3	2,1
Etil	0,1	3	7,6	3	10,8
	0,5	3	1,7	3	3,3
	1,0	3	0,7	3	2,7
Propil	0,1	3	5,3	3	1,7
	0,5	3	1,1	3	5,2
	1,0	3	2,5	3	4,8
Butil	0,1	3	4,4	3	14,6
	0,5	3	2,5	3	2,5
	1,0	3	1,1	3	1,5

Dentro das normas estabelecidas pela ANVISA (2003), é aceitável uma precisão de até 15% para matrizes complexas, como por exemplo matriz biológica, sendo assim, o método apresenta boa precisão, em termos de repetibilidade, pois a precisão ficou na faixa de 1,5 a 14,6%.

5.3 Análise de Parabenos em Tecido de Peixe Adquiridos no Comércio de São Carlos-SP.

Cinco das dez amostras de tecido de peixe adquirido no comércio apresentaram picos cromatográficos com os mesmos tempos de retenção dos parabenos, Verifica-se que a faixa de concentração dos parabenos presentes nas amostras estavam em torno de 0,05 mgL⁻¹, conforme apresentado na Tabela 11.

Tabela 11– Concentração de parabenos nos extratos de tecidos de peixe adquiridos no comércio.

Peixes	Metilparabeno mgg ⁻¹	Etilparabeno mgg ⁻¹	Propilparabeno mgg ⁻¹	Butilparabeno mgg ⁻¹
T1	ND*	ND*	ND*	ND*
T2	ND*	NQ**	0,0365	0,0678
T3	ND*	ND*	ND*	ND*
T4	ND*	ND*	ND*	ND*
M1	ND*	ND*	ND*	ND*
M2	ND*	ND*	0,0386	0,0322
M3	ND*	0,0438	ND*	ND*
P1	ND*	ND*	0,0530	NQ**
P2	ND*	ND*	0,0564	0,0355
P3	ND*	ND*	ND*	ND*

*Não detectado

**Não quantificado

A Tabela 11 apresenta os parabenos que foram encontrados em cada amostra de peixe analisada. Não foi detectado metilparabeno em nenhuma das amostras de peixe analisadas, isso se deve ao fato de o metilparabeno ser o composto que apresentou o maior limite de detecção. Entretanto em 30% das amostras analisadas foram encontrados o propilparabeno e o butilparabeno. Observa-se a presença do etilparabeno em 10% das amostras analisadas. A presença do propilparabeno e butilparabeno em 30% das amostras analisadas é um fato preocupante, considerando que não se sabe qual é o efeito desses compostos nas matrizes ambiental e para os seres humanos. Considerando que a maior concentração do propilparabeno encontrada nas amostras de tecido de peixe foi de 0,0564 mgg⁻¹ e do butilparabeno foi de 0,0678 mgg⁻¹. A fim de certificar-se que os picos referentes aos tempos de retenção de cada parabeno fossem realmente destes compostos, fortificou-se os extratos das amostras de tecido de peixe analisadas previamente com uma solução padrão de parabenos na concentração de 200 mgL⁻¹. Ao analisar os extratos das amostras de tecido de peixe fortificadas, observou-se que a área de alguns picos triplicou ou quadriplicou, conforme apresentado na Tabela 12. Entretanto não é possível afirmar que os parabenos estavam presentes nas amostras de tecido de peixe estudados sem análise das amostras em um cromatógrafo a líquido acoplado a um espectrômetro de massas.

Tabela 12- Comparação da área dos picos referente aos parabenos detectados nos tecidos de peixes adquiridos no comércio da cidade de São Carlos- SP, com a área do mesmo extrato da amostra fortificado com solução padrão de parabenos (200 mgL⁻¹)

Tilapia 2				
Parabenos	Tr* (min)	Área	Tr (f) (min)*	Área (f)*
Metilparabeno				
Etilparabeno	7.539	4849	7.514	23639
Propilparabeno	10.814	4613	10.793	21015
Butilparabeno	15.667	9226	15.602	26247

Merluza 2					Merluza 3			
Parabenos	Tr* (min)	Área	Tr (f) (min)*	Área (f)*	Tr* (min)	Área	Tr (f) (min)*	Área (f)*
Metilparabeno								
Etilparabeno					7.814	9089	7.531	25890
Propilparabeno	10.981	4791	10.810	22662				
Butilparabeno	15.920	6061	15.631	21732				

Pangasius 1					Pangasius 2			
Parabenos	Tr* (min)	Área	Tr (f) (min)*	Área (f)*	Tr* (min)	Área	Tr (f) (min)*	Área (f)*
Metilparabeno								
Etilparabeno								
Propilparabeno	10.863	6056	10.799	18604	11.423	6347	10.766	21019
Butilparabeno					16.321	6357	15.586	18207

*Tempo de retenção em minutos (Tr); Tempo de retenção da amostra fortificada em minutos (Tr (f)); Área da amostra fortificada (Área (f)).

A Tabela 12 apresenta os dados dos cromatogramas dos extratos das amostras de tecido de peixe adquiridas no comércio de São Carlos – SP que apresentaram picos cromatográficos com os mesmos tempos de retenção dos parabenos. Das quatro amostras de tilápia analisadas (T1, T2, T3 e T4) apenas a segunda (T2) apresentou picos cromatográficos nos mesmos tempos de retenção dos parabenos. Após a fortificação dos extratos das amostras de tecido de peixe tilápia com solução padrão na concentração de 200 mgL⁻¹, observou-se que houve um aumento proporcional da área de cada pico cromatográfico referente aos parabenos. Das três amostras de merluza analisadas (M1, M2 e M3), encontrou-se em duas amostras (M2 e M3), picos cromatográficos com os mesmos tempos de retenção dos parabenos. Na segunda amostra de tecido de peixe merluza (M2) dois picos cromatográficos apresentaram os mesmos tempos de retenção dos compostos propil e butilparabeno. Já na terceira amostra de tecido de peixe merluza (M3) apenas um pico cromatográfico apresentou o mesmo tempo de retenção do composto etilparabeno. As fortificações dos extratos das amostras de tecido de peixe merluza

com solução padrão na concentração de 200 mgL^{-1} fez com que as áreas dos picos cromatográficos com os mesmos tempos de retenção dos parabenos aumentassem.

Das três amostras de pangasius analisadas (P1, P2 e P3) a amostra P1 apresentou um pico cromatográfico com o mesmo tempo de retenção do propilparabeno e a amostra P2 apresentou dois picos cromatográficos com os mesmos tempos de retenção dos compostos propilparabeno e o butilparabeno. Após a fortificação dos extratos das amostras de tecido de peixe pangasius com solução padrão na concentração de 200 mgL^{-1} , observou-se que houve um aumento proporcional da área de cada pico cromatográfico referente aos parabenos.

As Figuras 15-20 apresentam os cromatogramas referentes a análise dos extratos das amostras de peixes adquiridas no comércio de São Carlos – SP nas quais encontrou-se picos cromatográficos com os mesmos tempos de retenção que os padrões de parabenos. Os cromatogramas da fortificação dos extratos das amostras de tecido de peixe analisadas estão logo após os respectivos cromatogramas das amostras de tecido de peixe sem a fortificação.

A Figura 15 apresenta os cromatogramas da análise os extratos das amostras de tecido de peixe tilápia T2 no qual apresentou picos cromatográficos com os mesmos tempos de retenção dos compostos etil, propil e butilparabeno. Em seguida está apresentado o cromatograma do extrato do tecido de peixe fortificado com solução padrão do metil, etil, propil e butilparabeno na concentração de 200 mgL^{-1} .

Figura 15– Cromatogramas das amostras de tecido de peixe tilápia (a) amostra de tecido de peixe tilápia (T2) (b) extrato da amostra de tecido de peixe tilápia (T2) fortificada com solução padrão de metilparabeno (1), etilparabeno (2), propilparabeno (3) e butilparabeno (4) na concentração de 200 mgL^{-1} .

Comparando os dois cromatogramas da Figura 15 pode-se observar que os picos dois, três e quatro da Figura 15 (a) apresentaram os mesmos tempos de retenção dos compostos etilparabeno, propilparabeno e butilparabeno, conforme apresentado na Figura 15 (b), em que os picos do metil, etil, propil e butilparabeno estão presentes devido a fortificação.

As Figuras 16 e 17 apresentam os cromatogramas dos extratos das amostras de tecido de peixe merluza. Os cromatogramas dos extratos de tecido de peixe merluza fortificados com solução padrão de metil, etil, propil e butilparabeno na concentração de 200 mgL^{-1} também estão presentes nas Figuras 16 e 17 para melhor visualização.

Figura 16– Cromatogramas das amostras de tecido de peixe merluza (a) amostra de tecido de peixe merluza (M2) (b) extrato de tecido de peixe merluza (M2) fortificado com solução padrão de metilparabeno, etilparabeno (1), propilparabeno (2) e butilparabeno (3) na concentração de 200 mgL^{-1} .

Os picos cromatográficos três e quatro da Figura 16 (a) podem ser referentes ao propilparabeno e ao butilparabeno respectivamente, pois apresentam os mesmos tempos de retenção dos compostos propil e butilparabeno. No tempo de retenção do metilparabeno o pico cromatográfico de número dois, Figura 17, apresenta uma área aproximadamente duas mil vezes maior do que a dos outros picos, por isso a área deste pico na Figura 16 (b) não foi alterada após a adição da solução padrão do metilparabeno na concentração de 200 mgL^{-1} no extrato. Contudo para confirmar a presença de metilparabeno na amostra de tecido de peixe M2 seria necessário análise em um cromatógrafo a líquido acoplado a um espectrômetro de massas.

Figura 17- Cromatograma da amostra de tecido de peixe merluza M2.

A Figura 18 (a) apresenta o cromatograma da análise dos extratos das amostras de tecido de peixe merluza M3 e a Figura 18 (b) apresenta o cromatograma da análise do extrato fortificado da amostra de tecido de peixe M3.

Figura 18 Cromatogramas das amostras de tecido de peixe merluza (a) amostra de tecido de peixe merluza (M3) (b) extrato de tecido de peixe merluza (M3) fortificado com solução de metilparabeno, etilparabeno (1), propilparabeno (2) e butilparabeno (3) na concentração de 200 mgL⁻¹.

O pico cromatográfico de número dois da Figura 18 (a) pode ser referente ao composto etilparabeno por possuir o mesmo tempo de retenção que o composto etilparabeno e por ter sua área triplicada após a fortificação do extrato de tecido de peixe merluza M3 com solução padrão dos parabenos na concentração de 200 mgL⁻¹, Figura 18 (b).

As Figuras 19 e 20 são referentes aos cromatogramas da análise dos tecidos do peixe pangasius. Em sequência estão os cromatogramas dos extratos de tecido de peixe pangasius fortificados com solução padrão do metil, etil, propil e butilparabeno na concentração de 200 mgL⁻¹.

Figura 19- Cromatogramas das amostras de tecido de peixe pangasius (a) amostra de tecido de peixe pangasius (P1) (b) extrato de tecido de peixe pangasius (P1) fortificado com solução padrão de metilparabeno (1), etilparabeno (2), propilparabeno (3) e butilparabeno (4) na concentração de 200 mgL⁻¹.

O pico cromatográfico de número três, Figura 19 (a), pode ser referente ao propilparabeno por apresentar o mesmo tempo de retenção do composto propilparabeno. Na Figura 20 (a) os picos cromatográficos de números três e cinco apresentaram os mesmos tempos de retenção que os compostos propilparabeno e butilparabeno, Figura 20 (b).

Figura 20-Cromatogramas das amostras de tecido de peixe pangasius (a) amostra de tecido de peixe pangasius (P2) (b) extrato de tecido de peixe pangasius (P2) fortificado com solução padrão de metilparabeno (1), etilparabeno (2), propilparabeno (3) e butilparabeno (4) na concentração de 200 mgL⁻¹.

Contudo apesar de algumas amostras de tecido de peixe adquiridos no comércio de São Carlos - SP terem apresentado, após as análises de LLME/HPLC-DAD, cromatogramas com picos nos mesmo tempo de retenção dos parabenos ainda se faz necessário a análises dessas amostras em um cromatógrafo a líquido acoplado a um espectrômetro de massas a fim de certificar que tais compostos realmente estão presentes nas amostras.

Deve-se ressaltar que a possibilidade de contaminantes, tais como parabenos, estarem presentes nos tecidos de peixes que são altamente consumidos pela sociedade é um fator preocupante. A presença de parabenos nos tecidos dos peixes trazem consequências nocivas tanto para o peixe, quanto para o homem que consome o peixe, pois os parabenos possuem características lipofícas, ou seja, ocorre a bioacumulação desses compostos nos tecidos. Entretanto ainda é necessário estudo mais profundo sobre as consequências que os parabenos podem trazer para o ser humano considerando a alta exposição do homem a produtos que contém parabenos.

6.0 CONCLUSÃO

- Segundo os parâmetros de validação analítica avaliados, o método LLME/HPLC-DAD apresentou linearidade, seletividade, precisão e exatidão adequado para análises de parabenos em amostras de tecido de peixes.
- A recuperação do método para o metilparabeno nas concentrações 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 0,8 e 1,0 mgg^{-1} foi de 94; 95; 89; 83; 100 e 74% respectivamente e o desvio padrão relativo foi de 7,0; 0,5; 3,2; 10,0; 5,2 e 2,9 % para as seis concentrações.
- A recuperação do etilparabeno foi de 107; 103; 80; 89; 89 e 88% para as seguintes concentrações 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 0,8 e 1,0 mgg^{-1} e o desvio padrão foi de 7,4; 4,1; 12,2; 3,2; 7,7 e 3,6 % respectivamente.
- A recuperação do propilparabeno foi de 106; 96; 94; 97; 100 e 76 % para as seguintes concentrações 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 0,8 e 1,0 mgg^{-1} e o desvio padrão foi de 14,2; 8,6; 14,9; 4,0; 7,9 e 2,6 % respectivamente.
- A recuperação do butilparabeno foi de 102; 74; 96; 79; 112 e 78 % para as seguintes concentrações 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 0,8 e 1,0 mgg^{-1} e o desvio padrão foi de 7,7; 4,0; 9,1; 5,5; 2,0 e 4,2 % respectivamente.
- Os limites de detecção variaram de 0,0007 a 0,0221 mg L^{-1} e os de quantificação de 0,0021 a 0,0738 mg L^{-1} . Os coeficientes de correlação ficaram entre 0,9837 a 0,9906 dentro do limite estabelecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária para amostras complexas.
- Em 50% dos cromatogramas dos extratos das amostras de tecido de peixe analisados apresentaram picos cromatográficos com os mesmos tempos de retenção do etil, propil e butilparabeno. Sendo o propilparabeno e o butilparabeno encontrado em 40% das amostras de tecido de peixe, já o etilparabeno foi encontrado em apenas 10% das amostras de tecido de peixe analisadas.

7.0 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Utilização de detectores mais sensíveis, como o de espectrometria de massas;
- Análise da água do rio Monjolinho de São Carlos-SP para verificar a presença de parabenos e a análise do tecido de peixes capturados no rio Monjolinho.

REFERÊNCIAS

- ALBERO, B.; PÉREZ, R.A.; SÁNCHEZ-BRUNETE, C.; TADEO, J.L. Occurrence and analysis of parabens in municipal sewage sludge from wastewater treatment plants in Madrid (Spain). **J. Hazard. Mater.**, v. 239, p. 48-55, 2012.
- ALSLEV, B.; KORSGAARD, B.; BJERREGAARD, P. Estrogenicity of butylparaben in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* exposed via food and water. **Aquat. Toxicol.**, v. 72, p. 295-304, 2005.
- AMÉRICO, J.H.P.; MESSIAS, T.G.; TORRES, N.H.; AMÉRICO, G.H.P. Desreguladores endócrinos no ambiente e seus efeitos na biota e saúde humana. **Pesticidas: Ecotoxicol. Meio Amb.**, v. 22, p. 17-34, 2012.
- ANASTASSIADES, M.; MAŠTOVSKÁ, K.; LEHOTAY, S. J. Fast and easy multiresidue employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid – phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. **J. Chromatogr. A**, v. 86, n. 2, p. 412-431, 2003.
- BARBOSA, V. Por que os ambientalistas odeiam a tilápia. **Exame**, 17 jul. 2012. Disponível em: <<http://planetasustentavel.abril.com.br/noticia/ambiente/ambientalistas-odeiam-tilapia-693444.shtml>> Acesso em: 18 set. 2014.
- BILA, D.M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. **Quim. Nova**, v. 30, p. 651, 2007.
- BŁĘDZKA, D.; GROMADZIŃSKA, J.; WĄSOWICZ, W. Parabens. From environmental studies to human health. **Environ. Int.**, v. 67, p. 27-42, 2014.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. Resolução nº. 899 de 19 de março de 2002. **Diário Oficial da União**, Brasília, 29 de maio de 2003. Seção 1, p. 15.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. Resolução nº. 162, de 16 de abril de 1999. **Diário Oficial da União**, Brasília, 11 de setembro de 2001. Seção 1, p.11.
- BRUCHET, A.; PROMPSY, C.; FILLIPPI, G.; SOUALI, A. A broad spectrum analytical scheme for the screening of endocrine disruptors (EDs), pharmaceuticals and personal care products in wastewaters and natural waters. **Water Sci. Technol.**, v. 46, p. 97-104, 2002.
- BRITO, N. M.; AMARANTE JUNIOR, O. P. A.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Ecotoxicol. Meio Amb.**, v. 13, p. 129-146, 2003.
- CABALEIRO, N.; DE LA CALLE, I.; BENDICHO, C.; LAVILLA, I. An overview of sample preparation for the determination of parabens in cosmetics. **TrAC, Trends Anal. Chem.**, v. 57, p. 34-46, 2014.

CARREIRA, F.C. **Determinação de parabenos em antitranspirantes empregando voltametria sob eletrodo de diamante e cromatografia líquida de alta eficiência.** 2008. 114 f. Tese (Mestrado em Química Analítica) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

CENTRO DE PRODUÇÕES TÉCNICAS (CPT). **Cursos de piscicultura.** 2013. Disponível em: <<http://www.cpt.com.br/cursos-criacaodepeixes/artigos/peixes-de-agua-doce-do-brasil-tilapia-tilapia-rendalli>> Acesso em: 18 set. 2014.

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

DOBBINS, L.L.; USENKO, S.; BRAIN, R.A.; BROOKS, B.W. Probabilistic ecological hazard assessment of parabens using daphnia magna and pimephales promelas. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 28, n. 12, p. 2744–2753, 2009

ESDRAS, P. Peixe Panga – do rio mais poluído do Vietnã para a mesa dos campistas. **Folha da Manhã**, Divinópolis, 25 jun. 2011. Disponível em: <<http://fmanha.com.br/blogs/esdras/2011/06/25/peixe-panga-do-rio-mais-poluido-do-vietnam-para-a-mesa-dos-campistas/>> Acesso em: 17 set. 2014.

FERNANDES, J.P.S.; SAVINO, G.; AMARANTE, A.C.G.; SOUSA, M.R.; SILVA, G.R.; CIANCIULLI, M.E.; CORRÊA, M.F. Estudo das relações entre estrutura e atividade de parabenos: uma aula prática. **Quim. Nova**, v. 36, n 6, p. 890-893, 2013.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Pangasius hypophthalmus (Sauvage, 1878).** 2009. Disponível em: <http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Pangasius_hypophthalmus/en> Acesso em: 17 set. 2014.

GHISELLI, G.; JARDIM, W.F. Interferentes endócrinos no ambiente. **Quim. Nova**, v. 30, n 3, p. 695-706, 2007.

GONZALEZ-MARINO, I.; QUINTANA, J.B.; RODRIGUEZ, I.; CELA, R. Evaluation of the occurrence and biodegradation of parabens and halogenated by-products in wastewater by accuratemass liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight-mass spectrometry (LC-QTOF-MS). **Water Res.**, v. 45, p. 6770-66780, 2011.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Censo demográfico 2010. **Características da população e dos domicílios.** Rio de Janeiro, IBGE, 2011. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2010/caracteristicas_da_populacao/resultados_do_universo.pdf>. Acesso em: 28 mar. 2014.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO). **Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos.** Rio de Janeiro, 2007. p. 25.

JAKIMSKA, A.; HUERTA, B.; BARGAÑSKA, Ž.; KOT-WASIK, A.; RODRÍGUEZ-MOZAZ, S.; BARCELÓ, D. Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry procedure for determination of endocrine disrupting compounds in fish from editerranean rivers. **J. Chromatogr. A**, v. 1306, p. 44–58, 2013.

KIM, J.W.; RAMASWAMY, B. R.; CHANG, K.H.; ISOBE, T.; TANABE, S. Multiresidue analytical method for the determination of antimicrobials, preservatives, benzotriazole UV stabilizers, flame retardants and plasticizers in fish using ultra high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, v. 1218, p. 3511-3520, 2011.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia líquida moderna**. Campinas: Atomo, 2009. 382p.

LANÇAS, F. M. Extração com fluido supercrítico. **Rev. Anal.**, n. 2, 2002. Disponível em: <http://www.revistaanalytica.com.br/ed_anteriores/02/Art%20Extracao%20Fluido.pdf> Acesso em: 11 ago. 2014.

LANÇAS, F. M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. São Carlos: RiMa, 2004. 62p.

LIAO, C.; CHEN, L.; KANNAN, K. Occurrence of parabens in foodstuffs from China and its implications for human dietary exposure. **Environ. Inter.**, v. 57-58, p. 68-74, 2013.

LINTELMANN, J.; KATAYAMA, A.; KURIHARA, N.; SHORE, L.; WENZEL, A. Endocrine disruptors in the environment. **Pure Appl. Chem.** v. 75, p. 631-681, 2003.

LUZ, L. P. **Estudo da viabilidade de uso da técnica de cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GC×GC) no estudo de hidrocarbonetos poliaromáticos (HPA) em sedimentos**. 2010. 130 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

MACEDO, A. N. **Desenvolvimento de métodos analíticos visando atender aos princípios da química verde na análise de resíduos de medicamentos veterinários em leite bovino**. 2012. 113 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

MARTY, J.L. Contaminantes Emergentes. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 2003, São Luís. **Livro de resumos...** São Paulo: Associação Brasileira de Química, 2013. ref. 51º CBQ.

MELO, L.P. **Desenvolvimento de métodos cromatográficos para análises de antimicrobianos em amostras complexas**. 2012. 190 f. Tese (Doutorado em Química) - Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

MELO, L.P.; QUEIROZ, M.E.C. Simultaneous analysis of parabens in cosmetic products by stir bar sorptive extraction and liquid chromatography. **J. Sep. Sci.**, v. 33, p. 1849–1855, 2010.

MICHAELIS Moderno Dicionário da Língua Portuguesa. 5. ed. São Paulo: VOLP, 2009. Disponível em: <<http://michaelis.uol.com.br/moderno/portugues/>> Acesso em: 10 abr. 2014.

MIOR.R. **Desenvolvimento de metodologia analítica para pré-concentração de cromo usando microextração líquido-líquido e determinação por espectrometria de absorção atômica em chama.** Santa Catarina: Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 2009. 30 f. (Relatório de estágio).

MOHAMMAD, M. A.; SASCHA USENKO, S.; O'DONNELLD, J.G.; RAMIREZA, A.J.; BROOKS, B.W.; CHAMBLISSA, K.C. Gas chromatography–mass spectrometry screening methods for select UV filters, synthetic musks, alkylphenols, an antimicrobial agent, and an insect repellent in fish. **J. Chromatography. A**, v. 1216, n. 5, p. 815-823, 2009.

MUCELIN, C.A.; BELLINI, M. Lixo e impactos ambientais perceptíveis no ecossistema urbano. **Soc. Nat.** v. 20, n. 1, p. 111-124, 2008.

OLIVEIRA, T.M.A. **Otimização e validação de método analítico para preparo da amostra e determinação simultânea de sulfonamidas em mel.** 2012. 113 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2012.

PECK, A. M. Analytical methods for the determination of persistente ingredients of personal care products in environmental matrices. **Anal.Bioanal. Chem.**, v. 386, p. 907- 939, 2006.

PENG, L.; FARKA, S.F. Analysis of basic compounds by reversed-phase liquid chromatography–electrospray mass spectrometry in high-pH mobile phases. **J. Chromatogr. A**, v. 1179, p. 131–144, 2008.

PRESTES, O.P.; FRIGGI, C.A.; ADAIME, M.B.; ZANELLA, R. QuEChERS – um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Quim. Nova**, v. 32, n. 6, p. 1620-1634, 2009.

RAMASWAMY, B.R.; KIM, J.W.; ISOBE. T.; CHANG. K.H.; AMANO. A.; MILLER. T.W.; SIRINGAN.F.P.; SHINSUKE,T. Determination of preservative and antimicrobial compounds in fish from Manila Bay, Philippines using ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, and assessment of human dietary exposure. **J. Hazard Mater.**, v. 192, p. 1739–45, 2011a.

RAMASWAMY, B.R.; SHANMUGAM, G.; VELU, G.; RENGARAJAN, B.; LARSSON, D.G.J. GC–MS analysis and ecotoxicological risk assessment of triclosan, carbamazepine and parabens in Indian rivers. **J. Hazard Mater.**, v. 186, p. 1586–93, 2011b.

REIS FILHO, R. W.; LUVIZOTTO-SANTOS.R.; VIEIRA, E. M. Poluentes emergentes como desreguladores endócrinos. **J. Braz. Soc. Ecotoxicol.**, v. 2, n. 3, p. 283-288, 2007.

ROUTLEDGE, E.J.; PARKER, J.; ODUM, J.; ASHBY, J.; SUMPTER, J.P. Some alkyl hydroxy benzoate preservatives (Parabens) are estrogenic. **Toxicol. Appl. Pharm.**, v. 153, p. 12–19, 1998.

SANDANGER, T.M.; HUBER, S.; MOE, M.K.; TONJE BRAATHEN, T.; LEKNES, H.; LUND, E. Plasma concentrations of parabens in postmenopausal women and self-reported use of personal care products: the NOWAC postgenome study. **J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.** v. 21, n. 7, p. 595-600, 2011.

SHEN, H.Y.; JIANG, H.L.; MAO, H.L.; PAN, G.; ZHOU, L.; CAO, Y.F. Simultaneous determination of seven phthalates and four parabens in cosmetic products using HPLC-DAD and GC-MS methods. **J. Sep. Sci.** v. 30. p. 48–54, 2007.

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

SISTEMA MPA. **ANVISA nega que consumo de Peixe Panga ofereça riscos à saúde**, 2012. Disponível em: <<http://www.sistemampa.com.br/bom-dia-divinopolis/anvisa-nega-que-consumo-de-peixe-panga-ofereca-riscos-a-saude/>> . Acesso em: 17 set. 2014.

SONI, M. G.; BURDOCK, G. A.; TAYLOR, S. L.; GREENBERG, N. A. Safety assessment of propyl paraben: a review of the published literature. **Food Chem. Toxicol.**, v. 39, p. 513-532, 2001.

SONI, M.G.; CARABIN, I.G.; BURDOCK, G.A. Safety assessment of esters of p - hydroxybenzoic acid (parabens). **Food Chem.Toxicol.**, v. 43, n 7, p. 985–1015, 2005.

SOUZA, A.B.2011. **Avaliação da qualidade ambiental nas nascentes do rio monjolinho na porção à montante da estação de captação de água do espraído, São Carlos – SP**. 2001. 185 f. Tese (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

SUBEDI, B.; MOHAMMAD, M. A.; CHAMBLISSA, K.C.; USENKO, S. Simultaneous analysis of select pharmaceuticals and personal care products in fish tissue using pressurized liquid extraction combined with silica gel cleanup. **J. Chromatogr. A**, v. 1218, n. 37, p. 6278-84, 2011.

TAVARES, A.T.; PEDRIALI, C.A. Relação do uso de parabenos em cosméticos e a sua ação estrogênica na indução do câncer no tecido mamário. **Rev. Mult. Saúde**, v. 3, n. 6, p 61-74, 2011.

TERASAKI, M.; MAKINO, M. Disinfection by-products of para-hydroxybenzoate esters (Parabens): synthesis and mass spectrometric study. **J. Health Sci.**, v. 55, n. 4, p. 631-635, 2009

TUNDISI, J. G. **Água no século XXI: enfrentando a escassez**. São Carlos: Rima Artes e Textos, 2003. v. 1.

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SÃO PAULO. Grupo de pesquisa química em verde e ambiental. **Água e saúde**. 2008. Disponível em:<<http://www.usp.br/gpqa/Disciplinas/qfl3201/aguaSaude.pdf>> . Acesso em: 15 mar. 2014.

VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F.; RIEDO, C. R. F. Análise quantitativa por cromatografia. **Chemkeys**. 2003. Disponível em: <<http://chemkeys.com/br/2003/10/17/analise-quantitativa-por-cromatografia/>>. Acesso em: 15 ago. 2014.

VIVATERRA. Sociedade de defesa, pesquisa e educação ambiental. **Peixes de água salgada**. 2013. Disponível em: <http://www.vivaterra.org.br/peixes_salgada_3.htm#merluza>. Acesso em: 17 set. 2014.

WANG, L.; WU, Y.; ZHANG, W.; KANNAN, K. Characteristic profiles of urinary p-hydroxybenzoic acid and its esters (parabens) in children and adults from the United States and China. **Environ. Sci. Technol.**, v. 47, p. 2069-76, 2013.

YE, XIAOYUN.; BISHOP, A M.; REIDY, J.; NEEDHAM, L. L.; CALAFAT, A. M. Parabens as urinary biomarkers of exposure in humans. **Environ. Health Persp.**, v. 14, n. 12, p. 1843-1846, 2006.