UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

FRANCISCO EDVAN RODRIGUES GOMES

Análise do propilparabeno e do butilparabeno em amostras de água da Bacia do Rio Pardo e estudos da sua degradação por fotólise e fotoeletrocatalise e avaliação da toxicidade e atividade estrogênica.

Orientador: Prof. Dr. Germano Tremiliosi-Filho

SÃO CARLOS

2016

Análise do propilparabeno e do butilparabeno em amostras de água da Bacia do Rio Pardo e estudos da sua degradação por fotólise e fotoeletrocatalise e avaliação da toxicidade atividade estrogênica.

Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Química

Área de Concentração: Química Analítica e Inorgânica

Orientador: Prof. Dr. Germano Tremiliosi Filho

SÃO CARLOS

2016

GOMES, F. E. R. Análise do propilparabeno e do butilparabeno em amostras de água da Bacia do Rio Pardo e estudos da sua degradação por fotólise e fotoeletrocatalise e avaliação da toxicidade e atividade estrogênica. Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Química.

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

À minha avó, Joana Maria (In memoriam) por me ensinar desde cedo o valor e a importância da educação. À minha família, por simplesmente tudo.

Agradecimentos

A Deus, pela vida e pela graça de ter chegado até aqui.

À minha linda e maravilhosa família pelo amor, carinho, ajuda e compreensão. Ao meu Pai Pedro, minha Mãe Edinê, às minhas irmãs Sid, Wal, Neide, Caco (Claudia) e aos meus lindos e maravilhosos sobrinhos, beijos, amuuuuuu todos vocês.

A Leila pelo amor, carinho e companheirismo.

Ao melhor jogador do mundo, o meu querido amigo e irmão Rogerinho pela ajuda e apoio em todos os momentos. Deus te abençoe cada vez mais e muuuuittíssimo obrigado por tudo mano. Ao seu Assis, dona Maria dos Santos e toda à família (que também é minha) pelo apoio, ajuda e orações.

Ao Professor Germano Tremiliosi pela oportunidade e orientação.

Ao Professor Andrei Leitão e a Dra Patrícia L. S. Bergo pelos ensaios de toxicidade e atividade estrogênica, agradeço de coração aos dois.

Ao meu amigo Dr. Carlos Galinaro pela disponibilidade em ajudar sempre que o procurei.

Ao Laboratório de Química Ambiental, em especial a Diva pelos experimentos de TOC.

Aos técnicos do Laboratório de Eletroquímica Gabriel, Mauro, Jonas e Waldecir pela ajuda e boa convivência ao longo do desenvolvimento desse trabalho.

Aos meus colegas do Laboratório de Eletroquímica (Q1) Adriana (Gisele Bündchen), Anieli, Amaury (Pop Star), Jairo (Tipão) Luisa, Wanderson, Pino, Júlia, Rafael, Emerson (Enrolado), Bottinho, Nyccolas, Drielly, Larissa, Renato, Ricardo, Tairo, Pedrinho, Ulisses, Loren, Rashida, Elenice, Vanessa, Carlos (Pai da Sarinha), Dodói (Anderson),

Quero agradecer também aos amigos que fiz no IQSC e em São Carlos Karen, Odilon, Fabi Cellenza, Carol, Washington, Sabrina, Mariana (esposa do Rafael), Jaisa (esposa do Wanderson) Janilson, Tiaguinho, Jonas (índio), Marcio e Ivan (vigilantes que trabalham no IQSC)),e aos demais colegas que tive a oportunidade de conhecer nessa cidade maravilhosa (São Carlos) e que ajudaram a tornar os dias e as noites mais agradáveis. Quero agradecer também aos amigos que fiz na graduação, David Anderson e Lécia Maria; e aos amigos de Bacabal, Anderson Trigueiro, João da Asdebal, Minervina, Michael e Rodolfo. Por fim agradeço à Capes pela bolsa concedida. Muuuuito obrigado a todos vocês.

**A palavra é o princípio de
qualquer obra e antes de agir é
preciso refletir.**

(Pedro Oliveira Gomes)

RESUMO

GOMES, F.E. R. 1995. 107f. Tese (Doutorado – Química Analítica e Inorgânica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

Baseado na técnica de Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME) desenvolveu-se um método de extração para analisar, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector ultravioleta (HPLC-UV), a presença do propilparabeno (PrP) e do butilparabeno (BuP) nas águas da Bacia do Rio Pardo. O método proposto apresentou um limite de detecção e de quantificação de 62,60 e 187,60 µg/L para o Prp e de 58,40 e 175,20 µg/L para o BuP. A análise das amostras coletadas (18 amostras) apresentou um teor de 2,2 a 6,8 µg/L para o PrP e de 1,9 a 4,9 µg/L para o Bup. Além de analisar a presença dos parabenos nas águas do Rio Pardo, estudou-se também a degradação do PrP, do BuP e da mistura PrP mais BuP (PrP + BuP) pelas técnicas de fotólise e fotoeletrocatalise em solução de água deionizada e em água de rio (Rio Pardo) em diferentes concentrações (5, 10, 20 e 30 mg/L) e pH (4, 7 e 10). A remoção dos parabenos por meio de ambas as técnicas foi superior a 99%. Na fotólise, o tempo de degradação da menor para a maior concentração variou de 25 a 85 minutos enquanto na fotoeletrocatalise ele foi de 12 a 55 minutos, sendo as melhores condições em água deionizada e em meio ácido e neutro (pH 4 e 7). A análise do Carbono Orgânico Total (TOC) das soluções fotolisadas em água deionizada e em diferentes pH's (4, 7 e 10) revelou, para o PrP, uma remoção de 16,3 a 25,3 %. Para o BuP, na mesma sequência de pH, a remoção foi de 15 a 23,6%. Na fotoeletrocatalise a remoção de TOC para o PrP nos pH 4, 7 e 10 variou de 33,3 a 36,5 % enquanto para o BuP ela foi de 35,2 a 38,3 %. O teste de citotoxicidade mostrou que o PrP, BuP e a mistura PrP-BuP são atóxicos para as células de fibroblastos Balb/c 3T3 clone A31 antes e após as degradações, todavia são estrogênicos para as células de adenocarcinoma mamário MCF-7. Para o PrP, após ambos os processos de degradação, a estrogenicidade foi completamente abolida, enquanto que para o BuP e para mistura (PrP+BuP) ela foi reduzida, porém não totalmente eliminada.

Palavras-chave: Fotólise, fotoeletrocatalise e parabenos.

ABSTRACT

GOMES, F.E. R. 1995. 102 s. Thesis (PhD) – Sao Carlos Chemistry Institute, Sao Paulo University, Sao Carlos, 2016.

Based on the dispersive Liquid-Liquid Microextraction technique (DLLME) developed an extraction method to analyze by High Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet detection (HPLC-UV), the presence of propylparaben (PrP) and butylparaben (BuP) in the waters of the Pardo River Basin. The proposed method has a limit of detection and quantification of 62,60 and 187,60 $\mu\text{g} / \text{L}$ of PrP and 58.40 and 175.20 $\mu\text{g} / \text{L}$ for BuP. Analysis of the samples (18 samples) showed a content of 2.2 to 6.8 $\mu\text{g} / \text{L}$ for the PrP and 1.9 to 4.9 $\mu\text{g} / \text{L}$ for the BuP. In addition to analyzing the presence of parabens in the waters of the Pardo River, studied also the degradation of PrP, BuP and mixture PrP more BuP (PrP + BuP) for photolysis and photoelectrocatalysis techniques in deionized water solution and river water (Pardo River) at different concentrations (5, 10, 20 and 30 mg / L) and pH (4, 7 and 10). Removal of parabens in both techniques was greater than 98%. The degradation time in the photolysis ranged from 25 to 85 minutes while in photoelectrocatalysis was of 12 to 55 minutes, being the best conditions in deionized water and in acidic and neutral medium (pH 4 and 7). Analysis of Total Organic Carbon (TOC) of the solution photolysed in deionized water at different pHs (4, 7 and 10) showed to PrP, a removal of 16.3 to 25.25%. For BuP in the same sequence pH, the removal was 15 to 23.55%. In photoelectrocatalysis TOC removal for PrP in pH 4, 7 and 10 ranged from 33.3 to 36.5% whereas for BuP it was 35.2 to 38.3%. Cytotoxicity test showed that PrP, BuP and PrP-BuP mixture is nontoxic to the cells fibroblasts Balb / c 3T3 clone A31 before and after degradation, however are estrogenic for breast adenocarcinoma cells MCF-7. For the PrP, after photolysis and photoelectrocatalysis, it was completely abolished whereas for BuP and mixture (PrP + BuP), it was reduced but not completely eliminated.

Keywords: Photolysis, photoelectrocatalysis and paraben.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química do 17 β – estradiol	16
Figura 2 – Diagrama do processo de fotoexcitação de um semicondutor por radiação UV. Adaptado de Nakata e Fujishima, 2012	28
Figura 3 – Diagrama do processo fotoeletrocatalítico sobre eletrodo de Ti/TiO ₂ e redução simultânea no contra eletrodo de Pt. Adaptado de Qiu; Zhang e Zhao, (2012)	31
Figura 4 – Espectro de absorção do propil e do butil parabenos na região do UV-Vis	41
Figura 5 – Cromatograma da solução padrão dos parabenos à 100 μ g/L nas condições cromatográfica otimizada. 1 – PrP e 2 – BuP	42
Figura 6 – Curva de linearidade do propilparabeno	43
Figura 7 – Curva de linearidade do butilparabeno	43
Figura 8 – Curva analítica dos parabenos. A – propilparabeno e B – butilparabeno	44
Figura 9 – Cromatograma de uma amostra de água coletada na bacia do Rio Pardo após extração por DLLME.....	49
Figura 10 – Esquema do reator fotoquímico.....	55
Figura 11 – Espectro da lâmpada de Hg e dos parabenos em diferentes pH e na concentração de 10mg/L: (A) propilparabeno e (B) butilparabeno	59
Figura 12 – Estimativa do pKa do – (A) propilparabeno e do (B) butilparabeno.....	59
Figura 13 – Absorbância do (A) propilparabeno e do (B) butilparabeno em diferentes concentrações e pH	60
Figura 14 – MEV da superfície do eletrodo de Ti/TiO ₂ após anodização em 20 V por 30 minutos	62
Figura 15 – MEV da superfície do eletrodo de Ti/TiO ₂ após anodização em 20 V por 120 minutos	62
Figura 16 – MEV da superfície do eletrodo de Ti/TiO ₂ após anodização em 20 V por 180 minutos	62
Figura 17 – MEV da superfície do eletrodo de Ti/TiO ₂ após anodização em 20 V por 240 minutos	63

Figura 18 – Raio-X do Ti/TiO ₂ após anodização em 20 V por 180 minutos e tratamento térmico a 450 °C em 120 minutos	64
Figura 19 – Curvas de fotocorrente-potencial obtidas para eletrodo de Ti/TiO ₂ em Na ₂ SO ₄ a 0,1M. sem radiação UV (Curva a), com radiação UV (Curva b) e com radiação UV e os parabenos, propil (curva c) e butil (curva d) parabeno, na concentração 10 mgL ⁻¹	65
Figura 20 – Degradações por fotólise do propilparabeno e do butilparabeno. A) propilparabeno, B) butilparabeno, C) propilparabeno na mistura e D) butilparabeno na mistura	67
Figura 21 – Degradações fotoeletrocatalítica do propilparabeno e do butilparabeno. A) propilparabeno, B) butilparabeno, C) propilparabeno na mistura e D) butilparabeno na mistura.....	68
Figura 22 – Degradação por fotólise e fotoeletrocatalise do propilparabeno e do butilparabeno. A) fotólise do propilparabeno, B) fotólise butilparabeno, C) fotólise propilparabeno na mistura e D) fotólise do butilparabeno na mistura, E) , fotoeletrocatalise do propilparabeno, F) fotoeletrocatalise do butilparabeno, G) fotoeletrocatalise propilparabeno na mistura e H) fotoeletrocatalise butilparabeno ..	72
Figura 23 – Degradação por fotólise e fotoeletrocatalise do propilparabeno e do butilparabeno em diferentes pH's. A) fotólise do propilparabeno, B) fotólise butilparabeno, C) fotoeletrocatalise do propilparabeno e D) fotoeletrocatalise do butilparabeno	76
Figura 24 – Taxa de remoção do carbono orgânico total. A) fotólise do PrP, B) fotólise do BuP, C) fotoeletrocatalise do PrP e D) fotoeletrocatalise do BuP.....	80
Figura 25 – Fragmentação e produtos de formação dos parabenos.....	82
Figura 26 – Espectro de UV: ácido Butil para-hidroxi benzóico (BuP); Produtos de degradação do Butil para-hidroxi benzóico (BuP') ácido Propil para-hidroxi benzóico (PrP); produtos de degradação do ácido para-hidroxi benzóico (PrP')	83
Figura 27 – Estudos de atividade estrogênica e citotóxica do propilparabeno, butiparabeno e de sua mistura	84
Figura 28 – Estudos de atividade estrogênica e citotóxica do propilparabeno, butiparabeno e de sua mistura	85
Figura 29 – Estudos de atividade estrogênica e citotóxica do propilparabeno, butilparabeno e de sua mistura	86

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1 – Características físico-química dos parabenos	17
Tabela 2 – Reagentes e solventes utilizados	36
Tabela 3 – Limites de detecção e de quantificação do PrP e do BuP	44
Tabela 4 – Taxa de recuperação do PrP e do BuP em diferentes solventes extrador/dispersor em Água deionizada fortificada (N=3)*	46
Tabela 5 – Taxa de recuperação do PrP e do BuP nos solventes decanol/acetona Água deionizada fortificada (N=3)*	46
Tabela 6 – Taxa de recuperação do PrP e do BuP em diferentes pH's nos solventes decanol/acetona em água deionizada fortificada (N=3)*	47
Tabela 7 – Taxa de recuperação do PrP e do BuP em diferentes concentrações de NaCl nos solventes decanol/acetona da solução de parabeno a 2µg/L (N=3)*	48
Tabela 8 – Teores de PrP e de BuP encontrado em amostras de água da bacia do Rio Pardo coletada nos meses de agosto e dezembro de 2014	49
Tabela 9 – Comparação do método proposto por DLLME-HPLC-UV com outros métodos descritos para a análise de parabenos	50
Tabela 10 – Reagentes, solventes e materiais utilizados	52
Tabela 11 – Amostras preparadas para a análise nos ensaios celulares	57
Tabela 12 – Coeficiente de absorção do PrP e do BuP em diferentes pH's	61
Tabela 13 – Dados cinéticos obtidos da degradação do propilparabeno e do butilparabeno em diferentes concentrações em água deionizada pelas técnicas de fotólise e fotoeletrocatalise	70
Tabela 14 – Dados cinéticos obtidos da degradação do propilparabeno e do butilparabeno em diferentes concentrações em água de rio pelas técnicas de fotólise e fotoeletrocatalise	74
Tabela 15 – Dados cinéticos obtidos da degradação do propilparabeno e do butilparabeno em diferentes pH's em água deionizada pelas técnicas de fotólise e fotoeletrocatalise	78
Tabela 16 – Resumo dos dados de espectrometria de massa (MS e MS / MS)	81

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	12
1 – INTRODUÇÃO	13
1.1 – Apresentação	13
1.1.1 – Desreguladores endócrinos.....	14
1.1.2 – Parabenos.....	16
1.1.3 – Toxicologia do Propil e do Butil-parabeno	17
1.1.4 – Contaminação ambiental.....	19
1.2 – A Bacia do Rio Pardo	21
1.3 – Estratégias para o monitoramento de xenoestrogênios.....	21
1.4 – Parâmetros de desempenho analítico	23
1.4.1 – Seletividade.....	23
1.4.2 – Linearidade	24
1.4.3 – Exatidão	24
1.4.4 – Precisão	24
1.4.5 – Limite de detecção	24
1.4.6 – Limite de quantificação.....	25
1.5 – Remediação de áreas impactadas por micropoluentes orgânicos.....	25
1.5.1 – Processos Oxidativos Avançados (POA'S)	25
1.5.1.1 – Fotólise	26
1.5.1.2 – Fotocatálise heterogênea	27
1.5.1.3 – Fotoeletrocatalise	30
CAPÍTULO 2.....	33
2 – OBJETIVOS.....	34
2.1 – Geral	34
2.2 – Específicos.....	34

CAPÍTULO 3.....	35
3 – DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA ANÁLISE DE PROPIL E DE BUTIL- PARABENO NA BACIA DO RIO PARDO	35
3.1 – Materiais e métodos	36
3.1.1 – Padrões analíticos.....	36
3.1.2 – Reagentes e solventes	36
3.1.3 – Instrumentação e condições de trabalho	37
3.1.4 – Amostras.....	37
3.1.5 – Microextração líquido-líquido dispersiva aplicada a parabenos	38
3.1.6 – Linearidade	38
3.1.7 – Exatidão	39
3.1.8 – Precisão	39
3.1.9 – Limites de detecção e quantificação.....	40
3.2 – Resultados e discussão	40
3.2.1 – Análise no espectrofotômetro (UV-Vis).....	40
3.2.2 – Condições cromatográficas	41
3.2.3 – Linearidade do método cromatográfico	42
3.2.4 – Limites de detecção e de quantificação	44
3.3 – Validação do método.....	45
3.3.1 – Estudos de recuperação	45
3.3.2 – Seleção do solvente extrator e dispersor.....	45
3.3.3 – Efeito do pH da amostra.....	47
3.3.4 – Efeito da força iônica.....	48
3.3.5 – Aplicação do método.....	48
CAPÍTULO 4.....	51
4 – DEGRADAÇÃO FOTOLÍTICA E FOTOELETROCATALÍTICA DO PROPIL, DO BUTIL E DA MISTURA PROPIL-BUTIL PARABENO E AVALIAÇÃO DA SUA ATIVIDADE ESTROGÊNICA E CITOTÓXICA	51

4.1 – Materiais e métodos	52
4.1.1 – Reagentes utilizados	52
4.1.2 – Preparo de soluções	52
4.1.3 – Medidas de pH	53
4.1.4 – Medidas Espectrofotométricas	53
4.1.5 – Preparação do eletrodo de Ti/TiO ₂	53
4.1.6 – Caracterização dos eletrodos de Ti/TiO ₂	53
4.1.7 – Comportamento eletroquímico do fotoânodo de Ti/TiO ₂	54
4.1.8 – Experimentos de fotólise e fotoeletrocatalise	54
4.1.9 – Eficiência de remoção	55
4.1.9.1 – Análise cromatográfica	55
4.1.9.2 – Carbono Orgânico Total (COT)	56
4.1.10 – Identificação dos produtos de degradação	56
4.1.11 – Ensaio de estrogénicidade e citotoxicidade	56
4.1.11.1 – Preparação das amostras	56
4.1.11.2 – Ensaio celular	57
4.2 – Resultados e Discussões	58
4.2.1 – Avaliação Espectrofotométrica	58
4.2.2 – Caracterização dos eletrodos de nanotubos de Ti/TiO ₂	61
4.2.2.1 – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	61
4.2.2.2 – Difração de Raio-X (DRX)	64
4.2.3 – Comportamento eletroquímico do fotoeletrodo	65
4.2.4 – A influência de diferentes parâmetros sobre a cinética de degradação dos parabenos	66
4.2.5 – A influência da concentração inicial do PP, do BP e da mistura Prp-But na degradação por fotólise e fotoeletrocatalise em água deionizada	66
4.2.6 – A influência da concentração inicial do Prp, do Bup e da mistura Prp-But na degradação por fotólise e na fotoeletrocatalise em água de rio	71

4.2.7 – Influência do pH sobre a degradação dos parabenos por fotólise e fotoeletrocatalise	76
4.2.8 – Determinação de Carbono Orgânico Total (TOC)	79
4.2.9 – Identificação dos produtos de degradação dos Parabenos	80
4.2.10 – Estrogenicidade e citotoxicidade dos parabenos	83
CAPÍTULO 5	87
5 – CONCLUSÕES	87
5.1 – Análise do propil e do butil parabeno na Bacia do Rio Pardo	88
5.2 – Degradação e avaliação da atividade estrogênica do propil e do butil parabeno	88
6. REFERÊNCIAS	90

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Apresentação

O desenvolvimento econômico e o crescimento populacional vêm, inevitavelmente, causando vários casos de deterioração do meio ambiente com sérias consequências para o ar, a água e o solo. Discussões envolvendo a contaminação da água bem como as consequências do seu uso vêm sendo objeto de discussão em todo o mundo haja vista que os recursos hídricos são um bem limitado e indispensável para a manutenção da vida e para um largo espectro de atividades humana (MELO, S. A. S.; TROVÓ, A. G.; BAUTITZ, I. R.; NOGUEIRA, 2009).

A preocupação com a presença de substâncias químicas no meio ambiente vem de longe e datam do início do século XX quando surgiram as primeiras hipóteses dos efeitos nocivos causados pela exposição aos subprodutos industriais ((ALLEN, E., DOISY, 1923; DODDS, E. C., GOLDBERG, L., LAWSON, 1938). Um caso bastante conhecido na história da contaminação ambiental é o do agrotóxico DDT (dicloro-difenil-tricloroetano) que foi bastante utilizado na última parte da segunda guerra mundial para o controle da malária e da tifo entre os militares e a população civil e posteriormente para o controle de pragas e insetos na produção agrícola e pecuária expondo dessa forma não apenas o homem mas diversos organismos e ambientes a ação nefasta dessa substância. Contudo, seu uso foi banido dos Estados Unidos no início da década de 70 depois que a bióloga americana Rachel Carson publicou o livro *Silent Spring* em 1962 sugerindo que o DDT pode causar efeitos ambientais diversos e potenciais riscos à saúde humana (U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2006). Quanto aos fármacos, os primeiros estudos relatando sua presença no ambiente aquático é mais recente, porém não menos preocupante, e datam da década de 70 e início dos anos 80 quando foi detectado ácido salicílico e o ácido clofíbrico em efluentes de estações de tratamento de esgoto (ETE) em cidades dos Estados Unidos e em amostras de água de rio do Reino Unido e da Alemanha na faixa de concentração de $\mu\text{g L}^{-1}$ (GARRISON A.W. , POPE J. D., 1976; HIGAITÉ; AZARNOFF, 1977; WAGGOT, 1981).

Desde então vários trabalhos têm sido realizados e estes revelam a presença de uma enorme variedade de agrotóxicos, fármacos de várias classes terapêuticas, hormônios, conservantes químicos e hidrocarbonetos poliaromáticos em rios, lagos, mares e inclusive em águas potável e da chuva o que tem despertado a atenção da comunidade científica, da mídia e da sociedade em geral uma vez que tais produtos, mesmo que em níveis de traços, podem causar distúrbios na síntese e na ação de diferentes hormônios e prejudicar a saúde de diversos organismos, inclusive humanos e aquáticos, das suas descendências ou de toda uma (sub) população (TERNES, 1998; WENZEL et al., 2003; BŁEDZKA et al., 2009).

1.1.1 – Desreguladores endócrinos

As substâncias químicas que interagem com os receptores hormonais, seja de ocorrência natural ou antropogênica, são chamadas de desreguladores endócrinos (DEs) ou disruptores químicos endócrinos (EDCs). Segundo a Comissão das Comunidades Europeias (1999), EDCs “*são substâncias ou compostos exógenos que alteram uma ou várias funções do sistema endócrino e tem, conseqüentemente, efeitos adversos sobre a saúde num organismo intacto, sua descendência, ou (sub)populações*”. Já a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) define um EDC como um “*agente exógeno que interfere na síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação de hormônio natural no corpo que são responsáveis pela manutenção, reprodução, desenvolvimento e/ou comportamento dos organismos*” (U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, EPA, 2006).

Os disruptores químicos endócrinos podem prejudicar o funcionamento normal do sistema endócrino de três maneiras diferentes:

1. Eles podem mimetizar a ação de um hormônio natural e/ou bloquear um receptor no interior da célula. Os EDCs podem ainda dar um sinal mais forte do que o hormônio natural ou um sinal no momento "errado".
2. Podem se ligar a um receptor na célula e, assim, evitar que o hormônio correto se ligue, fazendo com que o sinal normal não ocorra e o corpo não responda corretamente.

3. Os disruptores podem ainda afetar a síntese, o metabolismo e a excreção dos hormônios naturais, alterando dessa forma a concentração destes no corpo.

Nas mulheres, exposição aos EDCs tem sido apontando com um dos principais fatores de risco para câncer de mama, câncer de útero e ovário, endometriose além de outros problemas relacionados a desordem hormonal. Nos homens, a exposição às substâncias estrogênicas pode resultar na diminuição dos hormônios androgênicos no sangue podendo ocasionar câncer de próstata, ginecomastia, diminuição do libido, da quantidade e mobilidade dos espermatozoides além da interferência no funcionamento do sistema glandular associado ao hipotálamo-hipófise-gônadas (SONNENSCHIN; SOTO, 1998).

Nos animais, vários estudos sugerem que os desreguladores endócrinos causam alterações fisiológicas e histológicas, incluindo alterações nos níveis de vitelogenina (VTG) no plasma sanguíneo de peixe, tartaruga e mexilhões (*Elliptio complanata*), o que pode causar a feminização dos machos, inibição no desenvolvimento das gônadas e declínio na reprodução dessas espécies (GAGNÉ et al., 2001; MAIA; DEZOTTI, 2007).

A interação dos desreguladores endócrinos com os receptores hormonais e a resposta desencadeada por essa interação é denominado de atividade biológica ou atividade estrogênica e a potência relativa de cada um dos disruptores é comparada com o 17 β -estradiol, que representa o padrão pela qual atividade estrogênica é medida (BILA, 2005). A principal razão é que o 17 β -estradiol é o estrogênio feminino primário e o mais ativo dentro da classe estrogênica. Sua interação com os receptores estrogênicos se dá principalmente via ponte de hidrogênio através da hidroxila presente no anel aromático A (HAMBLETON et al., 2003). Assim, os compostos que apresentam estrutura análoga ao anel fenólico do 17 β -estradiol, Figura 1, pode apresentar atividade estrogênica, como é o caso por exemplos dos parabenos que são amplamente utilizados como conservantes químicos em diversos produtos de consumo humano.

Figura 1. Estrutura química do 17 β - estradiol.

1.1.2 – Parabenos

Os parabenos são ésteres derivados do ácido p-hidroxibenzóico amplamente utilizados como conservantes químicos em milhares de produtos usados pelo homem tais como industriais, alimentício, cosméticos e farmacêuticos (ELDER, 1984). Seu uso como conservante se deve ao seu largo espectro de atividades contra fungos, levedura e bactérias; e ainda, não endurecem e nem descolorem formulações, são incolores, inodoros, baratos e estáveis em uma ampla faixa de pH e temperatura (ROUTLEDGE, E J et al., 1998; HANDA et al., 2006).

Como conservantes, os parabenos foram utilizados pela primeira vez na década de 20 em produtos farmacêuticos, e desde então seu uso tem sido ampliado e diversificado (SABALITSCHKA, 1930; ROUTLEDGE, EDWIN J et al., 1998). Em 1981 os parabenos já tinham sido usados em mais de 13.200 formulações farmacêuticas (ELDER, 1984). Em 1995 à análise de 215 amostras de cosméticos revelou a presença de parabenos em 99% das loções corporais e em 77% dos produtos de enxague (RASTOGI, S. C., SCHOUTEN, A., DE KRUIJF, N., AND WEIJLAND, 1995). Recentemente (2013), uma pesquisa realizada com 282 amostras de alimentos representando 13 categorias diferentes (cereal, carne, peixe, frutos do mar, ovos, produtos lácteos, produtos de feijão, frutas, legumes, biscoitos, bebidas, óleos de cozinha, condimentos e outros) mostrou que quase todas as amostras (99%) continham parabenos (LIAO; CHEN; et al., 2013).

Dentre os parabenos, os mais utilizados são metilparabeno (MeP), etilparabeno (EtP), propilparabeno (PrP) e butilparabeno (BuP) que diferem entre si pelo tamanho do radical alquil e conseqüentemente pela solubilidade e atividade antimicrobial, sendo o PrP e BuP os de maior intensidade conservativa dentre os 4

apresentados (GOLDEN et al., 2005). A Tabela 1 apresenta algumas de suas características físico-químicas.

Tabela 1. Características físico-químicas dos parabenos.

Composto	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)	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	---	---
Coeficiente de partição (Octanol/água)	1,66	2,19	2,71	3,24
Solubilidade em água a 25°C (g /100mL)	2,00	0,86	0,30	0,15

Fonte: (LIEBERT, 1984; SONI et al., 2005; BŁEDZKA et al., 2009; BOBERG et al., 2010).

O imenso uso dessas substâncias nos diversos produtos de consumo humano faz com que seu lançamento no meio ambiente seja um processo contínuo o que leva à contaminação de rios e lagos e coloca, conseqüentemente, diversos organismos a uma exposição crônica a esses compostos e aos seus metabólitos (LIN et al., 2011).

1.1.3 – Toxicologia do propil e do butil- parabeno

Por muitos anos, os parabenos foram considerados conservantes químicos ideais para uso nos diversos produtos industriais em função do largo espectro de

atividade antimicrobial, estabilidade, não alterar a cor e nem conferir odor, além de suficientemente solúveis em água para produzir a concentração desejada na fase aquosa (SONI et al., 2005). Contudo, vários estudos realizados nos últimos anos sugerem que eles podem ser prejudiciais à saúde dos organismos que a eles são expostos continuamente. ROUTLEDGE et al., (1998) estudaram o potencial estrogênico dos parabenos em um ensaio E-screen com levedura e observaram que atividade estrogênica dos mesmos aumenta com o tamanho da cadeia lateral. Os autores também constataram que MeP é 2.500.000 vezes menos potente do que o 17 β -estradiol enquanto que EtP, PrP e BuP são respectivamente 150.000, 30.000 e 10.000 vezes menos potente. No mesmo trabalho, foi realizado também ensaio de equivalência de atividade estrogênica com o 4-nonilfenol, um conhecido desregulador estrogênico, sendo constatado que o PrP é similar a este enquanto o BuP é três vezes mais potente. Vários outros estudos, in vivo e in vitro, têm sido realizados a fim de demonstrar os efeitos negativos que a exposição a esses conservantes pode causar (OISHI, 2001; KANG et al., 2002; CANOSA et al., 2006; BOBERG et al., 2010).

KANG et al., (2002) administrou BuP a ratos durante o período de gestação e lactação e observou que os testículos, a vesícula seminal e as glândulas prostáticas dos filhotes masculinos da primeira geração foram significativamente reduzidas e que a produção e a mobilidade dos espermatozoides foram seriamente afetadas. OISHI, (2001; 2002) expôs ratos e camundongos ao PrP e BuP e observou que estas substâncias causaram uma diminuição significativa na concentração de testosterona e no nível de espermatozoides nos testículos e no epidídimo dos animais.

Exposição de peixes machos ao PrP e ao BuP induziu a expressão da vitelogenina, uma importante glico-fosfo-proteína que só é encontrada nas fêmeas ou em peixes machos expostos a ambientes contaminados com substâncias estrogênicas (PEDERSEN et al., 2000; BJERREGAARD et al., 2003). Esses resultados reforçam ainda mais o potencial estrogênico dos parabenos.

No homem, a influência dos parabenos não é totalmente clara e é motivo de controvérsia entre os pesquisadores. DARBRE et al., (2004) encontrou parabenos livres em 20 amostras de células mamárias neoplásicas sugerindo que os mesmos podem ser carcinogênicos. Contudo, alguns autores contestam a validade dessa hipótese argumentando que a mera presença de parabenos em tecido de mama cancerígeno não fornece prova suficiente que comprove o caráter oncológico dessas

substâncias, GOLDEN et al., (2005). Em um artigo de revisão SONI et al., (2005) relata a administração do antibiótico aureomicina com PrP e sem PrP em pacientes com candidíase e destaca que aqueles que receberam o antibiótico com PrP tiveram, além da cura, a inibição de fungos nas fezes. O mesmo artigo relata ainda que os parabenos administrados sob diferentes formas (ingestão, absorção ou inalação) foram rapidamente absorvido, metabolizado e excretados. Outros trabalhos, entretanto, mostram que parabenos livres foram encontradas em tecido de placenta, no líquido amniótico, no leite, no soro e no plasma humano e que os mesmos podem ser prejudiciais (WU et al., 2008; MARGRET SCHLUMPFA, KARIN KYPKEB, MATTHIAS WITTASSEKC, JUERGEN ANGERERC, HERMANN MASCHERD, DANIEL MASCHERD, CORA VÖKTE, MONIKA BIRCHLERE, 2010; FREDERIKSEN H, JØRGENSEN N, 2011; I. JIMÉNEZ-DÍAZA, F. VELA-SORIA, A. ZAFRA-GÓMEZA, A. NAVALÓNA, O. BALLESTEROS; M.F. FERNÁNDEZ, N. OLEA, 2011). Diante da falta de um consenso entre os especialistas, as autoridades dinamarquesas sob argumento de uma ação preventiva e da falta de um estudo mais consistente em humanos, resolveu proibir em 2011 a adição de PrP, BuP e seus sais em produtos para crianças abaixo de 3 anos de idade (SCIENTIFIC COMMITTEE ON CONSUMER SAFETY, 2011).

1.1.4 – Contaminação ambiental

A presença dos parabenos em diversos produtos de consumo humano (alimentício, cosméticos e farmacêuticos) faz com que seu lançamento no ambiente seja um processo contínuo o que acaba favorecendo a contaminação de diferentes meios. Assim, diferentes métodos têm sido reportados para determinar a concentração de parabenos em diferentes matrizes ambientais, tais como solo (NÚÑEZ et al., 2008), ar e poeira (RUTHANN A. RUDEL, DAVID E. CAMANN, JOHN D. SPENGLER, LEO R. KORN, 2003; WANG et al., 2012), águas de esgoto (TERNES, 1998; ALBERO et al., 2012) e água de superfície (REGUEIRO et al., 2009; GALINARO et al., 2015).

NÚÑEZ et al., (2008) analisaram solos agrícolas e sedimentos em diferentes áreas da Espanha e encontraram, além de metil e etilparabenos, 4,03 ng/g de PrP e 0,71 ng/g de BuP para a amostra já seca. O BuP foi encontrado também, em alta

concentração (377 ng/g), em amostras de sedimento marinho coletado em Tenerife (DELGADO et al., 2012). Os parabenos foram ainda encontrados em concentração relativamente alta, 15-23 ng/g para EtP, PrP e BuP, em amostras de solo e sedimentos coletadas em diferentes áreas da província de Quebec no Canadá (VIGLINO et al., 2011).

Outros trabalhos focaram na ocorrência de parabenos no lodo e na lama das estações de tratamento de águas residuais. ALBERO et al., (2012), por exemplo, analisaram 19 estações de tratamento de Madrid (Espanha) de diferentes localidades (rural, urbana e industrial) e identificaram em 74% delas a ocorrência de PrP a uma concentração de até 44ng/g. VIGLINO et al., (2011) analisaram a lama da estação de tratamento de Montreal (Quebec – Canadá) e encontraram, além de vários outros EDCs, PrP e BuP nas concentrações de 1,9 e 1,6 ng/g, respectivamente.

No ambiente aquático a ocorrência de parabenos é comumente relatada em diferentes países. No Brasil GALINARO et al., (2015) analisaram 56 amostras de águas coletas no rio Mogi Guaçu (Estado de São Paulo) e detectaram uma média de 8,0; 5,8; 13,1 e 15,1 µg/L para o MeP, EtP, PrP e BuP, respectivamente. No País de Gales (Reino Unido), KASPRZYK-HORDERN et al., (2008) analisaram águas residuais e revelaram a presença de PrP e BuP na concentração de 24 µg L⁻¹ e 52 µg L⁻¹, respectivamente. Na China, PENG et al., (2008) analisaram as águas do rio Major Pearl e de três córregos urbanos ((Shahe, Liede e Shijin) e observaram que a contaminação por MeP e PrP alcançaram, nessa ordem, valores de 1062 e 2142 ng/L. Em Portugal JONKERS et al., (2010) encontraram PrP e BuP nas águas do Rio de Aveiro com suas concentrações variando de 0,6ng L⁻¹ a 15,6ng L⁻¹ e de 0,2 ng L⁻¹ a 11,1 ng L⁻¹. CASAS FERREIRA et al., (2011) relatou também a ocorrência de parabenos em água de torneira e em água residual tratada. A literatura relata ainda vários outros trabalhos que evidenciam a ocorrência de parabenos em diferentes tipos de matrizes (CANOSA et al., 2006; CHANG et al., 2009; LIAO; LIU; et al., 2013; LIAO; KANNAN, 2014; CAMPBELL et al., 2015).

1.2 – A Bacia do Rio Pardo

O rio Pardo nasce no município de Ipuiúna, região centro-sul de Minas Gerais, e desce passando entre a Serra do Cervo e o município de Poços de Caldas até chegar ao estado de São Paulo pelo município de Caconde. No estado paulista, depois de Caconde, o rio migra para a cidade de São José do Rio Pardo e avança rumo noroeste, atravessando a rica região cafeeira conhecida como *Califórnia Paulista*. Na região, o Pardo passa por importantes municípios como Cajuru, Serrana/Altinópolis, Ribeirão Preto, Jardinópolis, Cruz das Posses, Pontal, Viradouro, Barretos entre outras, até desaguar no Rio Grande, na divisa entre São Paulo e Minas Gerais. Seu curso total é de 573 km e tem grande aproveitamento hidroelétrico, formando as represas Euclides da Cunha, Limoeiro e Caconde. A bacia do Rio Pardo fornece também 56% da água utilizada na agricultura, indústria e abastecimento na região. Ele é também um dos rios que abastece o Aquífero Guarani, a segunda maior reserva de água doce do mundo, que fornece somente para a cidade de Ribeirão Preto água para aproximadamente 650 mil habitantes (ROVARON, 1997).

O Rio Pardo e toda a sua importância está seriamente ameaçada, isso porque em grande parte da sua extensão ele se encontra criticamente assoreado e sem matas ciliares. E ainda, segundo a CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental) das 23 cidades que integram sua bacia, mais da metade (onze) jogam parte do seu esgoto in natura nele (por exemplo, São José do Rio Pardo joga 96%, São Sebastião da Gramma 70%, Divinolândia 12%, Tambaú 5%, Casa Branca 4%, Ribeirão Preto 3% e Vargem Grande 2%) e outras quatro (Serrana, São Simão, Caconde e Jardinópolis) despejam 100% do seu esgoto sem tratamento (CETESB, 2014).

1.3 – Estratégias para o monitoramento de xenoestrogênios

A contaminação do ambiente aquático, sobretudo nos últimos anos, por substâncias de natureza orgânica e inorgânica vem colocando em risco não apenas fauna e flora desses ambiente mas principalmente a do ser humano que depende da água para viver (BOUWER, 2000). Nesse sentido, torna-se imperativo o acompanhamento da qualidade das águas dos nossos rios uma vez que

dependemos diretamente deles para nossa sobrevivência. Para isso diferentes técnicas e métodos de análise vêm sendo propostos. Nesse sentido, as amostras de águas devem ser adequadamente preparadas para então serem analisadas por uma técnica analítica confiável (WARDENCKI et al., 2007).

A preparação de amostras é um procedimento analítico que consiste tipicamente no isolamento e concentração de um componente a partir de um fragmento da matriz. Dependendo do método utilizado a extração pode variar em grau de seletividade, velocidade e conveniência. Os métodos de extração convencionais como a extração líquido-líquido (liquid-liquid extraction, LLE) e a extração em fase sólida (solid-phase extraction, SPE) requerem tempo e o consumo de uma grande quantidade de solventes orgânicos o que as tornam, além de caras, mais impactantes ao meio ambiente (HERRERA-HERRERA et al., 2010).

Nos últimos anos vêm surgindo métodos de preparação de amostras miniaturizados que se caracterizam por serem rápidos, práticos e eficientes. Dentre estes destacam-se a microextração em fase sólida (solid phase microextraction, SPME) e a microextração em fase líquida (liquid-phase microextraction, LPME). Comparado com a LLE, a SPME dispensa o uso de solventes extratores e se caracteriza pela extração e pré-concentração do analito que é feito pelo modo direto ou por *headspace*. As desvantagens da SPME são o elevado custo, fragilidade (fibra) e com tempo de vida limitado. A LPME é uma técnica barata que faz uso de uma quantidade mínima de solvente o que a torna um procedimento ambientalmente correto. Entretanto, sua extração tende a ser demorada e a recuperação dos analitos baixa, pois o equilíbrio de fases nem sempre é alcançado (PROSEN; ZUPANČIČ-KRALJ, 1999; LAMBROPOULOU; ALBANIS, 2005; PENA et al., 2009; SARAFRAZ-YAZDI; AMIRI, 2010).

Em 2006 uma nova técnica de extração, denominada microextração líquido-líquido dispersiva (dispersive liquid-liquid microextraction, DLLME) foi desenvolvida por Rezaee e colaboradores para a determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em água. Ela se baseia no equilíbrio de distribuição do analito entre as fases doadora (amostra) e receptora (solvente orgânico) em um sistema ternário de solventes. Nesse método, uma mistura apropriada (previamente testada) de um solvente extrator (imiscível em água) e um solvente dispersor (miscível em água) são injetados, por meio de uma seringa, rapidamente na amostra aquosa. Nesse processo, o solvente extrator em forma de gotículas se difunde por toda a solução e

interage com as moléculas dos analitos de interesse. Posteriormente a amostra é centrifugada e o solvente extrator de menor densidade fica no sobrenadante onde então é coletado para análise posterior (REZAEE et al., 2006, 2010; MARTINS et al., 2012).

Atualmente a DLLME tem sido aplicada na extração de vários poluentes orgânicos e inorgânicos de diferentes amostras ambientais. Entre os analitos analisados, pode se destacar: hormônios, herbicidas (fenilureias), disruptores endócrinos, aldeídos, mononitrotoluenos, estatinas, triclosan, fluoroquinolonas, analgésicos, sulfonamidas, carbamatos, pesticidas, metabólitos, cobre, zinco, entre outros (REZAEE et al., 2010; HERRERA-HERRERA et al., 2010). Além destes, os parabenos também podem ser extraídos utilizando-se esta técnica (GALINARO et al., 2015).

A DLLME é um método simples e de fácil operação, possui um alto fator de recuperação, é rápido, barato e ambientalmente correto (PENA et al., 2009). Assim sendo, essa técnica foi escolhida como base para a proposição de um método de extração para análise de PrP e de BuP nas águas do Rio Pardo.

1.4 – Parâmetros de desempenho analítico

A validação de um método passa primeiro pelo desempenho dos parâmetros analíticos. Nesse processo, parâmetros como seletividade, linearidade, exatidão, precisão, limite de detecção e quantificação devem ser adequadamente ajustados para um bom êxito do método analítico.

1.4.1 – Seletividade

É a capacidade que o método tem de distinguir os analitos de interesse de substâncias homólogas ou de contaminantes passíveis de estarem presentes na amostra. Em métodos cromatográficos em que se analisam dois ou mais analitos, a seletividade pode ser atribuída a boa separação e resolução dos picos (ANVISA, 2008).

1.4.2 – Linearidade

A Linearidade refere-se à capacidade do método de produzir resultados linearmente proporcionais à concentração do analito dentro de certo intervalo de confiança. Essa linearidade é observada por meio de uma curva de calibração que é construída a partir da média de valores obtidos em triplicata. Contudo, alguns valores anômalos oriundos dos erros e desvios interferem no cálculo da média comprometendo, consequentemente, a linearidade da curva analítica. Para contornar esse problema e eliminar possíveis erros, aplica-se o teste de Huber, que baseado em teste estatístico, elimina os valores anômalos (VALENTE et al., 2003).

1.4.3 – Exatidão

Exatidão é a concordância entre os resultados obtidos pelo método e o valor tido como verdadeiro. A validação desse parâmetro deve ser verificado através de no mínimo de 9 (nove) determinações que contemple 3 (três) concentrações (baixa, média e alta em triplicata cada uma) dentro da faixa linear previamente estabelecida.

1.4.4 – Precisão

A precisão representa o grau de concordância entre os resultados obtidos por replicatas de uma mesma amostra em condições idênticas de teste. Sua determinação deve ser feita após estabelecimento da linearidade e partir de um mínimo de nove determinações (ex: três níveis, três repetições cada um) dentro do intervalo linear previamente determinado.

1.4.5 – Limite de detecção

Segundo a ANVISA (2003), o limite de detecção (LD) diz respeito a menor quantidade do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. O LD pode ser determinado de 3 maneiras diferentes: método visual, relação sinal-ruído (normalmente 3 vezes) e o método baseado em parâmetros da curva analítica.

1.4.6 – Limite de quantificação

O limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito que pode ser determinada na amostra com exatidão e precisão aceitáveis dentro das condições adotadas. Assim como o LD, o LQ pode ser determinado através do método visual, relação sinal ruído e através da curva analítica (ANVISA, 2003).

1.5 – Remediação de áreas impactadas por micropoluentes orgânicos

A remediação ambiental pode ser entendida como uma técnica e/ou conjunto de técnicas que visa eliminar os efeitos nocivos dos elementos e/ou substâncias que afetam os seres humanos ou a fauna e a flora de um determinado sítio ou região (EPA, 2006). No que diz respeito à remediação de água contaminadas por poluentes orgânicos, a literatura lista diversos estudos (VALKOVA et al., 2001; CHEN, 2004; MARTÍNEZ-HUITLE; FERRO, 2006; SANTIAGO ESPLUGASA, DANIELE M. BILAB, LUIZ GUSTAVO T. KRAUSEC, 2007; TAY et al., 2010; DAGHRIR et al., 2014; VELEGRAKI et al., 2014) que englobam diferentes técnicas e procedimentos que aplicados sozinhos ou em conjunto são apontados como promissores para a solução desse tipo de problema. Assim, dentre essas técnicas destacam-se os Processos Oxidativos Avançados (POA'S), representado neste trabalho pela fotólise e a fotoeletrocatalise. A fotólise destaca-se por ser uma tecnologia simples, limpa, de baixo custo e com amplo espectro de aplicações, que pode ser usada tanto na degradação de contaminantes ambientais como na eliminação de microorganismos patogênicos (BŁĘDZKA et al., 2009). A fotoeletroquímica pode ser mais cara, entretanto tem se mostrado bem mais eficiente uma vez que existe a combinação da fotólise com um sistema eletroquímico que pode acelerar a velocidade do processo e ao mesmo tempo aumentar a taxa de degradação e eliminação dos contaminantes (KRUTHIKA et al., 2014). No item 1.5.1 é apresentada uma descrição mais detalhada dos processos oxidativos avançados.

1.5.1 – Processos Oxidativos Avançados (POA'S)

Os processos oxidativos avançados são, por definição, aqueles que fazem uso de espécies oxidantes fortes tal como o ozônio (O_3) e o cloro (Cl_2), por exemplo, e que têm como objetivo oxidar uma determinada substância. O primeiro uso desse procedimento visando o tratamento da água foi feito em 1886 por De Meritens quando este usou o ozônio como agente desinfetante. Contudo, somente em 1973 foi cunhada a expressão “Tecnologias de Oxidação Avançada” durante o primeiro Simpósio Internacional em Ozônio para o Tratamento de Águas e Efluentes. Antes porém, em 1972, Fujishima e Honda descreveram a eletrólise da água em suspensão de TiO_2 irradiado em uma célula fotoeletroquímica, gerando hidrogênio e oxigênio. A partir dessa época muitas pesquisas foram dedicadas ao entendimento dos processos fotocatalíticos e em 1976 foi publicado o primeiro trabalho de remoção de contaminantes em água (TEIXEIRA et al. 2004). A partir de então a técnica foi difundida e vários outros trabalhos foram sendo publicados.

Atualmente vários estudos mostram que os radicais hidroxila, cujo potencial de oxidação é de 2,8 V, são eficientes na descontaminação de diferentes matrizes aquáticas, gasosas e até mesmo do solo (TEIXEIRA et al., 2004). A obtenção de tais radicais pode se dar por diferentes formas a partir dos processos homogêneos (por exemplo, O_3/UV , H_2O_2/UV) e/ou heterogêneos (por exemplo, $TiO_2/O_2/UV$, $TiO_2/H_2O_2/UV$). Neste trabalho, contudo, será dada ênfase ao processo heterogêneo e a fotólise que é uma técnica de larga aplicação e com históricos de êxitos em vários processos remediativo e que também, segundo alguns pesquisadores, gera radicais hidroxila a partir da fotólise da água (HEIT et al., 1998; KIM et al., 2009; DAGHRIR et al., 2012, 2014).

1.5.1.1 – Fotólise

A fotólise é frequentemente apontada como uma alternativa na remoção de micropoluentes orgânicos presentes na água, isso porque a maioria dos contaminantes são fotossensíveis e absorvem com certa facilidade o espectro de luz incidente (PRADOS-JOYA et al., 2011). Além da quebra da matéria orgânica, a luz pode, segundo Kim et al., (2009), hidrolisar a água e gerar os radicais $HO\bullet$ que podem atuar indiretamente na eliminação dos orgânicos.

O primeiro uso da fotólise como agente de desinfecção da água foi realizado em Marselha (na França) em 1910 após o desenvolvimento da lâmpada de vapor de mercúrio (HENRY et. al., 1910). Na época, sua aplicação foi prejudicada pelo alto custo do processo, falta de confiabilidade e advento da cloração (mais barato e confiável). Entretanto, com as informações acerca da toxicidade dos produtos da cloração, seu uso foi suscitado na Europa na década de 80 e desde então vários estudos vem sendo divulgados com o uso desta técnica (HIJNEN et al., 2006).

PEREIRA et al., (2007) mostraram que os contaminantes cetoprofeno e ciprofloxacina foram removidos com sucesso pela radiação UV; e KIM et al., (2009) estudaram a degradação de 30 produtos farmacêuticos (analgésicos, antibióticos, agentes anti-arrítmicos, anti-convulsivos, anti-neoplásicos, repelentes de insetos e bronco dilatadores) e observaram que o ceftiofur (antibiótico), diclofenaco (analgésico), sulfametoxazol (antibacteriano), sulfamonometoxina (antibiótico veterinário) foram facilmente degradados enquanto os demais tiveram uma taxa de remoção variada; e (GOMATHI DEVI et al., 2009) estudaram a remoção do corante metil-laranja e observaram que a degradação do mesmo varia conforme o pH mostrando assim a importância de se conhecer essa variável quando se utiliza a fotólise como técnica de remediação.

Como se observa a fotólise pode ser empregada para remediação de micropoluentes orgânicos uma vez que a maioria desses contaminantes são fotoativos, entretanto fatores como o pH devem ser observados afim de se obter o resultado desejado.

1.5.1.2 – Fotocatálise heterogênea

A fotocatálise heterogênea diferencia-se da homogênea por utilizar catalisadores sólidos (semicondutores). Os semicondutores possuem uma banda de valência (de baixa energia, BV) cheia de elétrons onde os mesmos não possuem movimento livre e uma banda de condução (de energia mais alta, BC) desocupada onde os elétrons são livres para se moverem. Entre essas duas bandas existe uma diferença de energia, chamada de band gap (E_{bg}) (HOFFMANN et al., 1995). O processo de fotocatálise heterogênea acontece quando um elétron absorve um fóton com energia igual ou superior a energia do band gap e então é promovido da BV

para BC gerando um elétron livre (e^- – na banda de condução) e uma lacuna (h^+ – na banda de valência) que se difunde por todo sólido (BESSEGATO et al., 2014). A Figura 2 ilustra um exemplo desse processo com os respectivos níveis energéticos do semiconductor.

Figura 2. Diagrama do processo de fotoexcitação de um semiconductor por radiação UV. Adaptado de NAKATA e FUJISHIMA, 2012.

Muitos semicondutores, tais como TiO_2 , ZnO , Fe_2O_3 , ZnS , WO_3 , ZrO_2 , têm sido investigados com relação as propriedades catalíticas e degradações fotocatalíticas de contaminantes ambientais (HOFFMANN, 1995; ROLOFF, 2007). Destes, o mais utilizado é o de dióxido de titânio (TiO_2), isso porque ele não apresenta risco humano e nem ambiental, possui boa estabilidade fotoquímica, é de baixo custo e de fácil obtenção e promove com certa facilidade a produção dos radicais hidroxila ($\text{OH}\bullet$) (CARP, 2004).

O dióxido de titânio pode ser encontrado na natureza em três formas cristalográficas, sendo estas a anatase, a rutila e a brookita. Entre as três a brookita é a forma menos utilizada, enquanto a anatase é a forma mais fotoativa e mais amplamente utilizada, embora alguns estudos citam o uso das duas (anatase e rutila) em áreas multidisciplinares como ciência de superfície, eletroquímica e física do estado sólido (MO; CHING, 1995). As reações de formação dos radicais hidroxila e oxidação de substratos (orgânicos), em um semiconductor do tipo TiO_2 , são

representadas nas reações abaixo de acordo com AKPAN e HAMEED, (2009) e descrito conforme MARQUES, (2014).

O semicondutor TiO_2 ao receber a energia da luz UV, gera um elétron na banda de condução e um buraco na banda de valência (equação 1). O buraco (h_{VB}^+) formado pode oxidar a molécula de H_2O formando cátion H^+ e o radical hidroxila $\text{OH}\bullet$ (equação 2), esse mesmo buraco (h_{VB}^+) pode oxidar ânion o hidroxila OH^- em radical hidroxila (equação 3). O elétron gerado em contato com o oxigênio dissolvido em H_2O ou adsorvido na superfície TiO_2 , o reduz para ânion radical superóxido $\text{O}_2^{\bullet -}$ (equação 4), e ao reagir com um cátion H^+ , forma o radical hidroperoxila $\text{HO}_2\bullet$ que possui um potencial de redução de 1,70 V contra o eletrodo normal de hidrogênio (ENH) (equação 5), esses radicais formados tem grande potencial para a degradação do substrato principalmente o radical hidroxila com um alto potencial de redução de 2,80 V vs ENH (equação 6). O buraco e o elétron gerados podem respectivamente oxidar (equação 7) e reduzir (equação 8) o substrato.

Convém salientar, contudo que, embora a luz de excitação possua energia igual ou superior ao band gap e o par elétron–lacuna seja formado, nem sempre o processo de formação dos radicais hidroxila e degradação dos contaminantes por

essa via acontece, isso porque a concentração de oxigênio dissolvido na solução ou adsorvido no semiconductor pode não ser suficiente para capturar os elétrons gerados da banda de condução e assim a partícula negativa pode voltar rapidamente (nanossegundos) para a banda de valência fechando a lacuna e liberar a energia recebida na forma de luz e/ou calor (conforme equação 9), prejudicando assim o sucesso do processo fotocatalítico (AKPAN; HAMEED 2009; CHONG et al., 2010).

Para evitar a recombinação do par elétron-lacuna e minimizar os problemas da fotocatalise uma alternativa é a fotoeletrocatalise.

1.5.1.3. – Fotoeletrocatalise

A oxidação fotoeletrocatalítica é combinação das tecnologias eletroquímica e fotocatalítica que se caracteriza pela combinação de um sistema de três eletrodos, sendo esses o eletrodo de trabalho, o de referência e o auxiliar – cátodo – (BESSEGATO et al., 2014). Esta configuração permite uma separação mais efetiva das cargas fotogeradas, isso porque o semiconductor de Ti/TiO₂ funciona como eletrodo de trabalho (fotoânodo) e quando nele é aplicado um potencial de energia adequada ocorre a separação entre as fotocargas e os elétrons formados, de modo que as cargas negativas são forçadas a migrarem para um circuito externo onde são levados até ao eletrodo auxiliar para então reduzirem as espécies em solução e não apenas interagir com o O₂ do sistema como na fotocatalise, Figura 3 (QIU et al., 2012). A preservação das lacunas e dos elétrons favorece a continua formação dos radicais hidroxila e consequentemente a degradação dos contaminantes. Na prática, contudo, o mecanismo de degradação é mais complexo e envolve o sinergismo de vários processos (reações diretas e indiretas) que no final acabam por produzir efeitos de extrema relevância (PELEGRINI et al., 1999).

Figura 3. Diagrama do processo fotoeletrocatalítico sobre eletrodo de Ti/TiO₂ e redução simultânea no contra eletrodo de Pt. Adaptado de Qiu; Zhang e Zhao, (2012).

Vários trabalhos evidenciam as potencialidades do processo fotoeletrocatalítico na remediação de sistemas aquáticas em relação às outras técnicas. OSUGI et al., (2009) compararam a eficiência de remoção dos corantes azóicos Laranja Disperso 1, Vermelho Disperso 1 e Vermelho Disperso 13 entre as técnicas química (cloração), eletroquímica e fotoeletroquímica e observaram, após 1 hora de tratamento, 100% de descoloração em todos os métodos. Contudo, a remoção do TOC para as duas primeiras técnicas foram desprezíveis enquanto que para a fotoeletrocatalise ele foi de aproximadamente 60%. Teste de resposta mutagênica para os três corantes, mostraram que a fotoeletrocatalise possibilitou uma redução completa da atividade enquanto que para as outras técnicas ela não só permaneceu ativa como também foi observado um aumento para a atividade do vermelho disperso 13 após tratamento com a cloração. QUAN et al., (2007) compararam a eficiência da eletroquímica, fotólise, fotocatalise e fotoeletrocatalise na degradação do pentaclorofenol em solução aquosa. Os resultados mostraram que após duas horas de tratamento quase nenhuma remoção aconteceu para o processo eletroquímico enquanto que para a fotólise ela foi de 44%. Para a fotocatalise, num mesmo intervalo de tempo, a eliminação foi de 62% e na fotoeletrocatalise a porcentagem obtida foi de 82%. Como se observa, a fotoeletrocatalise vem se apresentando como um bom método de remoção não somente da matéria orgânica, mas também da toxicidade desses produtos. Assim,

nesse trabalho estudar-se-á a remoção dos conservantes químicos propil e butilparabeno por meio das técnicas de fotólise e fotoeletrocatalise bem como avaliar-se-á suas toxicidades antes e após os respectivos tratamentos.

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

O presente trabalho visa analisar a presença do PrP e do BuP na Bacia do Rio Pardo e o processo de degradação dos mesmos mediante as técnicas de fotólise e fotoeletrocatalise bem como avaliar suas respectivas atividades estrogênicas e tóxicas em células de adenocarcinoma mamário MCF-7 e de fibroblastos Balb/c 3T3 clone A31 respectivamente.

2.2 Específicos

- ✓ Otimizar as condições cromatográficas (HPLC–UV) para análise simultânea do PrP e do BuP;
- ✓ Desenvolver o método de preparo de amostras baseado na DLLME/HPLC-UV para análise do PrP e do BuP em água de superfície;
- ✓ Aplicar o método desenvolvido para analisar amostras de água do Rio Pardo quanto a presença do PrP e do BuP;
- ✓ Degradar o PrP e o BuP em diferentes concentrações (5, 10, 20 e 30 mg/L) e pH (4, 7 e 10) em solução de água deionizada e em água de rio pela técnica de fotólise;
- ✓ Desenvolver via anodização um fotoânodo de dióxido de titânio para realizar as degradações fotoeletrocatalítica;
- ✓ Degradar o PrP e o BuP em diferentes concentrações (5, 10, 20 e 30 mg/L) e pH (4, 7 e 10) em solução de água deionizada e em água de rio pela técnica de fotoeletrocatalise;
- ✓ Avaliar a atividade estrogênica e a toxicidade dos parabenos antes e após as degradações.

Para fins didáticos, os estudos referentes à análise do PrP e do BuP na Bacia do Rio Pardo e os estudos relacionados às degradações e a avaliação da atividade estrogênica e toxicidade foram divididos em capítulos, 3 e 4 respectivamente.

CAPÍTULO 3

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA ANÁLISE DE PROPILPARABENO E DE BUTILPARABENO NA BACIA DO RIO PARDO

3.1 – Materiais e métodos

3.1.1 – Padrões analíticos

Os padrões analíticos PrP) e BuP foram obtidos da Sigma-Aldrich Co (Steinheim, Germany). As soluções-estoque foram preparadas individualmente em metanol HPLC na concentração de 100 mg/L. Uma solução mista dos parabenos foi preparada a partir das soluções-estoque na concentração de 1mg/L e a partir desta foram determinadas as condições cromatográficas para a análise dos parabenos.

3.1.2 – Reagentes e solventes

Os principais reagentes e solventes utilizados estão descritos na Tabela 2 abaixo

Tabela 2. Reagentes e solventes utilizados

Reagentes/Solventes	Procedência
Água deionizada (18,2 MΩ. cm a 25 °C)	Sistema Milli-Q (Milipore)
Ácido Acético Gracial PA	Synth
Ácido clorídrico	Synth
Acetona	Panreac
Acetonitrila	Panreac
Butilparabeno	Sigma Aldrich
Cloreto de sódio	Synth
1 - Decanol	Sigma Aldrich
Hidróxido de sódio	Synth
Metanol	Panreac
1 – Octanol	Synth
Propanol	Panreac

3.1.3 – Instrumentação e condições de trabalho

Os espectros de absorção das soluções de PrP e de BuP foram obtidos por meio do uso de um espectrofotômetro V-630 (Jasco Co. Japan) com auxílio de uma cubeta de quartzo de 1cm de caminho ótico com intervalo de varredura de 200 a 400 nm a uma velocidade de 400nm/min.

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foi realizada em um cromatógrafo equipado com um detector UV– PD-20A (256 nm), forno CTO-20A (30 °C), bomba LC 20AD, degasificador DGU-20A5, um módulo de interface CBM-20A (Shimadzu, Japão) e injetor manual com loop de 20 µL. A fase móvel foi uma mistura de etanol e água (70:30) com 1 % de ácido acético em fluxo de 1ml/min em uma coluna de fase reversa C18 (4.6 mm × 250 mm x 5 µm) shim-pack CLC-ODS(M) (Shimadzu, Japão).

Também foi utilizada uma balança analítica modelo (Mettler AT261 DeltaRange), um agitador vortex, tipo orbital da Ika modelo MS 3 digital (Germany), centrífuga Ependorf Centrifuge, modelo 5720 (Hamburg–Germany) e um pHmetro digital Marconi–Ma 522 (Londrina–Paraná).

3.1.4 Amostras

As amostras foram coletadas ao longo da Bacia do Rio Pardo nas cidades e/ou micro-regiões de Cajuru, Serrana, Ribeirão Preto, Cruz das Posses, Jardinópolis e Pontal (estado de São Paulo) nos meses de agosto e dezembro de 2014.

Os pontos de coleta estão localizados em zonas urbanas e/ou rurais, onde se evitou a amostragem nas proximidades de pontos de descarga de esgoto doméstico ou industrial. As amostras de água foram coletadas em frascos de vidro âmbar (250mL) volume, às quais se adicionou 0,5 mL de metanol (para evitar atividade microbiana) e posteriormente transportadas para o laboratório. Estas foram, primeiramente, filtradas com papel qualitativo (Unifil, 80g m⁻²) e em seguida com membrana filtrante em nylon (Millipore, 0,45µm x 47mm). Posteriormente foram colocadas em frascos de vidro âmbar e armazenadas sob refrigeração a -4°C e tão logo quanto possível foi realizada a extração por DLLME.

3.1.5 Microextração líquido-líquido dispersiva aplicada a parabenos

Na microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) dez mililitros (10 mL) de solução padrão (contendo 2, 4 e 6 µ/L de PrP e BuP) ou amostras de água coletadas na Bacia do Rio Pardo foram transferidas para um tubo Falcon de 15mL. Posteriormente, foram adicionados 1,0 g de NaCl, e o tubo agitado no Vortex tipo orbital até a completa dissolução do sal. Em seguida, a este tubo, com o auxílio de uma seringa (BD, Becton, Dickinson and Company, São Paulo, Brasil), foram adicionados rapidamente uma solução de acetona (900 µL, solvente dispersor) e decanol (100 µL, solvente extrator). Posteriormente, a mistura foi novamente agitada no Vortex, por 2,5 minutos (2500 rpm) e então centrifugada por 5 minutos a 4000 rpm. Após esta etapa, 1-decanol (de densidade 0,829 g/mL) permaneceu na superfície da solução aquosa/amostra e foi então cuidadosamente recolhido (sucessivamente) com o auxílio de uma microseringa de vidro de 25 µL (Hamilton, Nevada, USA) e transferido para um tubo de polipropileno (insert de 250 µL, Agilent). Deste insert, coletou-se com a microseringa apenas a fase orgânica (1-octanol) que depois foi injetada no HPLC.

3.1.6 Linearidade

A linearidade é demonstrada pelo coeficiente de correlação que é obtido a partir da equação (10) de uma curva analítica de calibração (BRITO, 2003).

$$y = ax + b \quad (10)$$

em que:

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

a = coeficiente angular

x = concentração;

b = coeficiente linear.

Considera-se que o coeficiente de correlação satisfaz o critério de linearidade da curva quando o seu valor tende ser o mais próximo possível de 1 (BRITO, 2003).

O Teste de Huber parte do princípio de que a razão entre as áreas medidas e as correspondentes concentrações (A/C) são constantes. A partir disso, é estabelecido um valor central que não dependa dos dados anômalos. Esse valor central é a mediana (med), e ele é obtido a partir do ordenamento dos valores obtidos na razão A/C. Em seguida é calculada a diferença entre cada valor de A/C e a med obtida. Com esses novos dados é calculado o desvio absoluto da mediana (mad) que é então usado no cálculo do intervalo de confiança (IC) pela equação 11:

$$IC = k \times mad \quad (11)$$

k é um fator que varia entre 2 e 8 e é definido pelo analista (VALENTE et al., 2003). Para este trabalho foi adotado um valor de k igual a 3.

3.1.7 – Exatidão

A exatidão é determinada pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente (ANVISA, 2003). Como representado na equação 12:

$$Exatidão = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração média teórica}} \times 100 \quad (12)$$

3.1.8 – Precisão

Normalmente a precisão é expressa através do coeficiente de variação (CV) que é determinado através da equação 13:

$$CV (\%) = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad (13)$$

Em que:

DP = desvio padrão;

CMD = concentração média determinada.

Quanto menor o valor de CV maior será a precisão, contudo o valor aceitável é definido de acordo com a metodologia, o tipo de matriz e a finalidade do método(ANVISA, 2013; MAPA, 2011).

3.1.9 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) do método foram determinados conforme método recomendado pela International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), de acordo com as equações 14 e 15.

$$LD = 3 \times Sd/a \quad (14)$$

$$LQ = 3 \times LD \quad (15)$$

Em que:

Sd = desvio padrão da curva analítica

a = Coeficiente angular da curva analítica

3.2 – Resultados e discussão

3.2.1 Análise no espectrofotômetro (UV-Vis)

Antes de estabelecer as condições cromatográficas, foi determinado o comprimento de onda de absorção do PrP e do BuP a partir de uma solução padrão de 10 mg/L. Em vista do resultado apresentado na Figura 4, considerou-se o comprimento de onda de 256 nm como o mais adequado para análise de ambos os parabenos.

Figura 4. Espectro de absorção do PrP e do BuP na região do UV-Vis.

3.2.2 Condições cromatográficas

A partir do resultado obtido no UV-Vis, o comprimento de onda foi fixado em 256 nm e as condições cromatográficas foram otimizadas, objetivando separação e tempo de análise adequados. Depois de vários testes, a fase móvel selecionada consistiu de uma mistura de metanol e água (70:30 v/v) contendo 1% de ácido acético. A corrida cromatográfica foi realizada no modo isocrático, com fluxo de 1mL/min, a temperatura do forno foi de 30°C em um tempo aproximado de 8 minutos, conforme Figura 5.

Figura 5. Cromatograma da solução padrão dos parabenos selecionados à 100 µg/L nas condições cromatográfica otimizadas. 1 – PrP e 2 – BuP.

Como observado na figura 5, as condições cromatográficas mostraram-se adequadas para análise dos parabenos.

3.2.3 Linearidade do método cromatográfico

Segundo BRITO et al., (2003), a linearidade da curva tende a ser ideal quando o coeficiente de correlação (R^2) da mesma se aproxima de 1. Buscando essa idealidade, antes de construir a curva foi feito o teste de Huber com base nos dados das medidas feito em triplicada.

Para o PrP os valores calculados para a mediana (med) e para o desvio absoluto da mediana (mad) foram respectivamente 115 e 5,67. A partir desses valores e considerando um valor de k igual a 3, determinou se o intervalo de confiança (IC = 17) e os limites superior (LM = 132) e inferior (LM = 98), conforme os resultados apresentados na Figura 6.

Figura 6. Curva de linearidade do propilparabeno.

Em relação ao BuP, o valor determinado para a mediana foi de 100 enquanto o desvio absoluto foi de 6,3. Para um valor de k igual a 3, o IC calculado foi igual a 18,8 com os limites superior e inferior indo de 81,1 a 118,8 respectivamente, conforme Figura 7.

Figura 7. Curva de linearidade do butilparabeno

O Teste de Huber apontou a existência de dois dados anômalos para o PrP e de 3 dados para o BuP. Assim, estes foram eliminados e as curvas analíticas para ambos os parabenos foram construídas conforme se pode observar nas Figuras 8 A-B.

Figura 8. Curva analítica dos parabenos. A – propilparabeno e B – butilparabeno.

Baseado no teste de Huber e a partir dos valores dos coeficientes de correlação (0,9949 para o PrP e 0,9956 para BuP) pode se dizer que as curvas cromatográficas apresentam uma boa linearidade.

3.2.4 Limites de detecção e de quantificação

A tabela 3 apresenta os valores dos LD e de LQ do PrP e do BuP, obtidos a partir dos dados das curvas analíticas construídas pelo método do padrão externo. O procedimento para a determinação desses parâmetros foi descrito na secção experimental no item 3.1.9.

Tabela 3. Limites de detecção e de quantificação do PrP e do BuP.

Analito	LD (µg/L)	LQ (µg/L)
propilparabeno	62,6	187,6
butilparabeno	58,4	175,2

3.3. Validação do método

3.3.1 Estudos de recuperação

Diferentes fatores podem afetar o processo de extração. Alguns deles são o solvente extrator e dispersor, pH, força iônica e tempo de extração. O tempo de extração é definido como o intervalo entre a injeção da mistura de solventes (dispersor/extrator) e a centrifugação (MARTINS et al., 2012). GALINARO et al., (2015), analisaram diferentes tempos de extração na análise de parabenos em amostras de água e concluiu que a eficiência de extração não muda significativamente a partir de 2 minutos. Assim, neste trabalho, escolheu-se o tempo de 150 segundos e avaliou-se apenas a influência dos demais fatores na análise do PrP e do BuP.

3.3.2 Seleção do solvente extrator e dispersor

O solvente extrator e o dispersor são os principais fatores que afetam a eficiência da DLLME. Assim, estes devem ser selecionados levando em conta as características da matriz (amostra aquosa) e da técnica analítica a ser empregada. Dessa forma, parâmetros como pressão de vapor, densidade e solubilidade devem ser adequadamente observados. No caso do dispersor, ele deve ser solúvel na água e ter boa miscibilidade com o solvente extrator. Já este último deve ser miscível apenas com o dispersor e formar na água microgotas que se dispersa na solução para extração dos analitos. Contudo, cabe ressaltar que a maioria das aplicações envolve o uso de solventes extratores clorados de alta densidade como tetracloreto de carbono ($1,59 \text{ g.cm}^{-3}$) e o clorofórmio ($1,47 \text{ g.cm}^{-3}$) que se sedimentam juntamente com o/os analito(s) de interesse. Entretanto, o emprego de tais solventes é bastante criticado haja vista sua elevada toxicidade (REZAEI et al., 2006; TABRIZI, 2010; KRYLOV et al., 2011; GALINARO et al., 2015). Dessa forma, solventes de menor densidade que a água têm sido propostos para esse método de extração, como sugeriu RODRÍGUEZ-CABO et al., (2011) na análise de fungicidas em vinho, em que usou o 1-undecanol como solvente de extração. Assim sendo, foram utilizados o octanol e o decanol como solventes extratores bem como a acetona, acetonitrila e o propanol como solventes dispersores em um teste de

extração do PrP e do BuP a partir de 10 mL de uma solução fortificada com 2 µg/L para um fator de concentração de 100µL. Os resultados desses testes são apresentados na tabela 4.

Tabela 4. Taxa de recuperação do PrP e do BuP em diferentes solventes extrator/dispersor em água deionizada fortificada (n=3)*.

Solventes	R* (%)	
	PrP	BuP
Decanol/Acetona	64,60	72,20
Decanol/Acetonitrila	62,80	69,20
Decanol/Propanol	60,25	65,9
Octanol/Acetona	61,20	70,00
Octanol/Acetonitrila	60,15	67,50
Octanol/Propanol	59,80	64,70

N = número de teste para cada amostra, R = Recuperação.

Os resultados mostram que dos binômios extrator/dispersor testado, a maior taxa de extração foi para a combinação acetona/decanol. Assim, prosseguiu-se a validação com essa combinação em mais dois níveis de fortificação (4 e 6 µg/L) obtendo-se níveis de recuperação de 62,8% e de 63,7% para a primeira (4 µg/L) e segunda (6 µg/L) amostra do PrP e de 72,5% e 71,1% para o BuP na primeira e na segunda fortificação. O CV das concentrações recuperadas variaram de 4,5 a 6,4 o que sugere que o método é preciso, pois os mesmos estão dentro dos limites estabelecidos pelo Manual de Garantia da Qualidade Analítica do Ministério da Agricultura e Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2011). Os dados em detalhe podem ser observados na tabela 5.

Tabela 5. Taxa de recuperação do PrP e do BuP nos solventes decanol/acetona água deionizada fortificada (n=3)*

Fortificação	R*(%)		CV (%)	
	PrP	BuP	PrP	BuP
4 µg/L	62,8	72,5	4,4	3,9
6 µg/L	63,7	71,1	4,3	5,8

N = número de teste para cada amostra, R = Recuperação

Visando melhorar o método, o passo seguinte foi testar a influência de outros parâmetros, como o pH e a força iônica conforme se pode observar nos itens abaixo.

3.3.3 Efeito do pH da amostra

A eficiência da DLLME pode ser influenciada pelo pH da amostra (HERRERA-HERRERA et al., 2010). Isso acontece porque a fase extratora geralmente utilizada é um solvente orgânico. No caso dos parabenos que possuem grupos ionizáveis, isso pode ser um problema uma vez que o pH do meio é o que ditará as características da molécula. Assim sendo, avaliou-se a influência desse parâmetro na extração do PrP e do BuP em 3 valores diferentes (4, 7 e 10) com amostras fortificadas a 2 µg/L, cujo resultado pode ser observado na Tabela 6.

Tabela 6. Taxa de recuperação do PrP e do BuP em diferentes pH's nos solventes decanol/acetona em água deionizada fortificada (n=3)*.

pH	R* (%)		CV (%)	
	PrP	BuP	PrP	BuP
4	64,1	71,7	4,1	5,6
7	64,1	72,6	5,2	4,8
10	48,0	54,8	6,1	5,3

N = número de teste para cada amostra, R = Recuperação

Como pode ser observado, o valor da taxa de recuperação para os 3 meios foi diferente. Em meio ácido e neutro a taxa recuperada foi praticamente constante, enquanto que em meio básico houve uma redução bastante significativa. Segundo GALINARO et al., (2015) isso acontece porque em meios onde o valor do pH é menor do que o pKa (PrP = 8,4 e BuP = 8,4), as moléculas de parabenos tendem a estar em sua forma neutra. Por outro lado, quando o valor do pH é maior, as moléculas estão em sua forma ionizadas e isso dificulta a extração pelo solvente orgânico. Em face desses resultados e considerando as características da matriz aquosa que apresenta pH entre 5 e 7, optou-se por manter as amostras inalteradas durante o processo de extração.

3.3.4 Efeito da força iônica

Em geral, sais inertes como o NaCl têm sido utilizados na DLLME para modificar a força iônica do meio. Esse procedimento visa diminuir a solubilidade dos analitos orgânicos na amostra aquosa e consequentemente aumentar a sua solubilidade na fase extratora (REZAEI et al., 2006; ZANG et al., 2009; MARTINS et al., 2012). Assim, objetivando otimizar esses efeitos, extrações com a amostra contendo 2 µg/L de parabeno e com diferentes proporções de NaCl (0, 5, 10 e 20%) foram realizadas, cujos resultados podem ser visto na tabela 7.

Tabela 7. Taxa de recuperação do PrP e do BuP em diferentes concentrações de NaCl nos solventes decanol/acetona da solução de parabeno a 2µg/L (n=3)*.

NaCl (%)	R (%)		CV (%)	
	PrP	BuP	PrP	BuP
0	65,4	72,1	4,1	5,8
5	67,5	73,6	5,2	5,1
10	70,8	79,6	6,2	4,7
20	63,0	71,0	7,4	5,7

N = número de teste para cada amostra, R = Recuperação

Na presença do NaCl, observa-se um aumento na recuperação de 65,4 a 70,8% para o PrP e de 72,1 a 79,6 % para o BuP quando a porcentagem do sal varia de 0 a 10%. Contudo, quando essa taxa é aumentada para 20%, observa-se uma diminuição na porcentagem de recuperação. Baseado nesses resultados, foi escolhida a taxa de 10% para uso nos procedimentos de extração.

3.3.5 Aplicação do método

O método desenvolvido foi aplicado na análise das amostras de água coletadas na bacia do Rio Pardo nos meses de agosto e dezembro. A Figura 9 mostra um cromatograma de uma amostra real fortificada (0,10 µg/L) e não fortificada de parabenos (PrP e BuP).

Figura 9. Cromatograma de uma amostra de água coletada na bacia do Rio Pardo após extração por DLLME.

Observa-se que houve uma boa separação entre os picos dos parabenos extraídos da amostra real e que não houve efeitos de matriz sugerindo que a quantificação pode ser realizada por calibração externa em água ultrapura. O resultado de todas as análises é apresentado na Tabela 8.

Tabela 8. Teores de PrP e de BuP determinados em amostras de água da bacia do Rio Pardo coletadas nos meses de agosto e dezembro de 2014.

Mês	Cidade (local de coleta)	PrP ($\mu\text{g/L}$)	BuP ($\mu\text{g/L}$)	Soma dos parabenos ($\mu\text{g/L}$)
A g o s t o	Cajuru	5,1	2,2	7,3
	Cruz das posses	3,1	< LQ	3,1
	Jardinópolis	5,6	< LQ	5,6
	Pontal	2,6	ND*	2,6
	Ribeirão Preto	6,8	2,8	9,6
	Serrana	2,2	< LQ	2,2
D e z e m b r o	Cajuru	4,9	1,9	6,8
	Cruz das posses	2,7	ND*	2,7
	Jardinópolis	4,8	2,4	7,2
	Pontal	3,9	<LQ	3,9
	Ribeirão Preto	5,1	4,9	10,0
	Serrana	2,8	< LQ	2,8

ND* = Não detectado

O método desenvolvido foi comparado com outros propostos para a análise de parabenos. A partir da tabela 9 pode se perceber que o LD e LQ é semelhante aos demais métodos descritos na literatura. O tempo de extração de 150 segundos é muito próximo ao de outros trabalhos envolvendo a DLLME e mais rápido do que a extração sortiva em barra de agitação (SBSE) (FERREIRA et al., 2011) e a extração por fluído supercrítico com headspace on-line (SFC-HS) (YANG et al., 2010). Além disso, o método é simples, barato e de fácil operação sendo, portanto, uma alternativa entre as demais técnicas (GALINARO et al., 2015).

Tabela 9. Comparação do método proposto por DLLME-HPLC-UV com outros métodos descritos para a análise de parabenos.

Metodologias	Parabenos	LD	LQ	Recuperação (%)	Tempo de extração (min)	Referência
DLLME-HPLC-UV	PrP	62,6 µg/L	187,80 µg/L	70,8	2,5	Neste trabalho
	BuP	58,40 µg/L	175,20 µg/L	79,6		
DLLME-HPLC-UV	PrP	0,022 ng/mL	0,07 ng/mL	67	1	(KHANI et al., 2014)
	BuP	0,021 ng/mL	0,07 ng/mL	86		
DLLME-HPLC-DAD	PrP	0,5 µg/L	1,3 µg/L	68,0	2	(GALINARO et al., 2015)
	BuP	0,8 µg/L	2,0 µg/L	41,1		
SBSE-GC-MS	PrP	0,74 µg/Kg	1,56 µg/Kg	110	240	(FERREIRA et al., 2011)
	BuP	0,08 µg/Kg	2,26 µg/Kg	104		
SFC-HS-SPME-GC-MS	PrP	8,3 ng/g	27,5 ng/g	91,2	15	(YANG et al., 2010)
	BuP	8,3 ng/g	27,7 ng/g	99,6		

CAPÍTULO 4

DEGRADAÇÃO FOTOLÍTICA E FOTOELETROCATALÍTICA DO PROPIL, BUTIL E DA MISTURA PROPIL-BUTIL PARABENO E AVALIAÇÃO DA SUA ATIVIDADE ESTROGÊNICA E CITOTÓXICA

4.1 – Material e métodos

4.1.1 – Reagentes utilizados

Os reagentes bem como todos os materiais utilizados neste trabalho estão descritos na Tabela 10.

Tabela 10. Reagentes, solventes e materiais utilizados

Reagentes/Solventes	Procedência
Água deionizada (18,2 MΩ. cm a 25 °C)	Sistema Milli-Q (Milipore)
Propil parabeno	Sigma-Aldrich
Butil parabeno	Sigma-Aldrich
Na ₂ SO ₄	Panreac
HCl	Synth
HF	Synth
NaOH	Synth
Metanol	Panreac
Etanol	Synth
Ácido Fórmico	Quimis
Ácido Acético Glacial	Synth
Dulbecco Mem (DMEM)	Sigma Aldrich
Soro Bovino Fetal (FBS)	Sigma Aldrich
Soro Bovino Fetal com Charcoal stripped (FBS-CS)	Sigma Aldrich
Estreptomicina	Merck
Penicilina	Merck

4.1.2 – Preparo de soluções

As soluções para os experimentos de fotólise e fotoeletrocatalise foram preparadas através da diluição dos parabenos em 2 ml de metanol (grau analítico) e completado com água deionizada ou água de rio (coletada no Rio Pardo).

4.1.3 – Medidas de pH

O pH das soluções foram ajustado com HCl ou com NaOH a 1 M e foram realizadas com o auxílio de um pHmetro digital (Marconi – Ma 522).

4.1.4 – Medidas Espectrofotométrica

Os espectros de absorção das soluções de PrP e de BuP em pH 4, 7 e 10 foram obtidos por meio de um espectrofotômetro V-630 (Jasco Co. Japan) com auxílio de uma cubeta de quartzo de 1cm de caminho ótico com intervalo de varredura de 205 a 400 nm a uma velocidade de 400 nm/min. Já o espectro de emissão da lâmpada foi obtido em um UV-Vis 2000+ (Ocean Optics).

4.1.5 – Preparação do eletrodo de Ti/TiO₂

O eletrodo de nanotubo de Ti/TiO₂ foi preparado conforme procedimento descrito em (GONG et al., 2001; YU et al., 2007; XIE et al., 2010); onde uma placa de titânio de 3 cm² (99% de pureza e 0,5 mm de espessura) foi anodizada em uma solução de 0,5 wt % de HF em uma célula eletroquímica de 2 eletrodos (a folha de Ti como anodo e uma tela de Pt como cátodo) durante 2 horas a um potencial de 20 V a temperatura ambiente. Após a anodização o eletrodo foi cuidadosamente lavado pela imersão em água deionizada e em seguida calcinado a 450 °C durante 2 horas com rampa de aquecimento de 5 °C min⁻¹ para induzir a formação e cristalização da fase anatase.

4.1.6 – Caracterização dos eletrodos de Ti/TiO₂

A morfologia do fotoeletrodo foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) em um equipamento ZEISS LEO 440 (Cambridge, England) com detector OXFORD (model 7060), operando com feixe de elétrons de 20 kV e difração de Raio X (DRX) em um equipamento Bruker modelo D8 advance, fonte Cu na Central de Análises Químicas Instrumentais do Instituto de Química de São Carlos (CAQI/IQSC/USP) .

4.1.7 – Comportamento eletroquímico do fotoânodo de Ti/TiO₂

A técnica de voltametria linear foi utilizada para avaliar a fotoatividade do eletrodo nanotubular de Ti/TiO₂ através de um potenciostato EG/G Princeton Applied Research modelo 273A equipado com o software Corrware. Os experimentos foram realizados no intervalo de 0,0 a +3,5 V com velocidade de varredura de 10 mV s⁻¹ em solução de Na₂SO₄ a 0,1 mol L⁻¹ como eletrólito suporte. Além do Ti/TiO₂ que foi usado como eletrodo trabalho, utilizou-se também uma rede de platina e um eletrodo de Ag/AgCl saturado de KCl que foram usados como eletrodo auxiliar e de referência, respectivamente. O eletrodo de referência foi usado dentro de um capilar de Luggin.

4.1.8 – Experimentos de fotólise e fotoeletrocatalise

Os experimentos de fotólise foram realizados em um reator de vidro encamisado (para controle de temperatura com água a 25 °C) constituído de um único compartimento (V = 250 mL), com entrada (no centro) para um tubo de quartzo de 2,5 cm de diâmetro e 15 cm de profundidade onde uma lâmpada (sem o bulbo) de vapor de mercúrio de 125 W de potência (OSRAM[®]) foi colocada, Figura 10. Para a fotoeletrocatalise foi utilizado o mesmo sistema acrescido apenas dos eletrodos citados na secção anterior.

O controle de temperatura foi realizado utilizando-se um banho ultratermostato da marca ethik.

Figura 10. Esquema do reator fotoquímico.

Os estudos de degradações foram realizados em diferentes concentrações (5, 10, 20 e 30 mg L⁻¹) e 3 diferentes pH's (4, 7 e 10) em matriz de água deionizada e de rio, em que se avaliou a influência desses fatores (massa e pH) e a do meio na remoção dos parabenos.

Durante as degradações as soluções foram agitadas e mantidas a uma temperatura constante e alíquotas foram tiradas em intervalos de tempo pré-determinados para acompanhar o decréscimo das concentrações dos compostos de interesse por HPLC.

4.1.9 – Eficiência de remoção

A eficiência da fotólise e da fotoeletrocatalise na remoção dos parabenos foram acompanhadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e medidas de carbono orgânico total (TOC).

4.1.9.1 – Análise cromatográfica

A análise cromatográfica para acompanhar a redução dos analitos em cada solução foi feita em um HPLC com detector SPD-20A em comprimento de onda de 254 nm, forno CTO-20A na temperatura de 30 °C, bomba LC 20AD, degasificador DGU-20A5 e um módulo de interface CBM-20^a (Shimadzu, Japão). A fase móvel foi

uma mistura de metanol e água (70:30) com fluxo de 1ml/min em uma coluna de fase reversa C18 (4.6 mm × 250 mm x 5 µm) shim-pack CLC-ODS(M) (Shimadzu, Japão).

4.1.9.2 – Carbono Orgânico Total (TOC)

A determinação do TOC das soluções foi realizada em um equipamento Shimadzu (modelo 5000A), que quantifica as frações de Carbono Total (CT) e Carbono Inorgânico (CI) contido nas amostras. As diferenças entre essas medidas fornecem as concentrações de carbono presentes nas soluções na forma de compostos orgânicos solúveis. Neste trabalho as medidas de TOC foram feitas em duplicatas em que uma alíquota de 10 mL de cada amostra foi retirada antes e após a degradação. Após determinar o TOC, uma média dos dados foi obtida e os resultados apresentados.

4.1.10 – Identificação dos produtos de degradação

A identificação dos produtos de degradação foi realizada em um Cromatógrafo Líquido de Ultra Pressão (Ultra performance liquid chromatography - UPLC) com ionização por elétron spray (eletron spray ionization, ESI) acoplado a um detector de espectrometria de massas de alta resolução (LTQ-Orbitrap Velos Thermo Fisher Scientific) operando em modo negativo. As amostras foram separadas em uma coluna de fase reversa C18 (4.6 mm × 250 mm x 5 µm) shim-pack CLC-ODS(M) (Shimadzu, Japão). A fase móvel com fluxo de 1mL/min consistiu de uma mistura de solventes A + B (sendo A água/ácido fórmico, 99,9%:0,1% v/v e B metanol/ácido fórmico, 99,9%:0,1% v/v). O procedimento foi realizado utilizando o seguinte gradiente de eluição: 0–10 min, 65% B em A; 10–15 min, 100% B; 15–22 min, 65% B em A.

4.1.11 – Ensaios de estrogenicidade e citotoxicidade

4.1.11.1 Preparação das amostras

Foram preparadas soluções de PrP e de BuP na concentração de 1 mM cada. Também foi preparada uma mistura contendo ambos compostos na concentração total de parabenos igual a 2 mM. As soluções foram submetidas aos processos de degradação por fotólise e fotoeletrocatalise e amostras foram coletadas em diferentes intervalos (Tabela 11).

Tabela 11. Amostras preparadas para a análise nos ensaios celulares

Intervalo de coleta	PrP+ BuP		BuP		PrP	
	fotólise	fotoeletrocatalise	fotólise	fotoeletrocatalise	fotólise	fotoeletrocatalise
1	0 min		0 min		0 min	
2	250 min	100 min	250 min	50 min	50 min	20 min
3	350 min	150 min	300 min	100 min	150 min	100 min
4	400 min	200 min	350 min	150 min	300 min	150 min

Para os ensaios de estrogenicidade e citotoxicidade, cada amostra foi esterilizada por filtração em membrana PVDF 0,22 μm e diluída 20 vezes em meio Eagle modificado pela Dubelco (DMEM, Vitrocell, Campinas, SP) sem indicador vermelho fenol, suplementado com 10% de soro de feto bovino tratado com carvão ativo-dextran para remoção de hormônios endógenos (FBS-CS). Como controle positivo foi utilizado 17 β -estradiol (E_2) a 10 nmolL^{-1} .

4.1.11.2 Ensaios celulares

Para os ensaios de estrogenicidade foram utilizadas as células de adenocarcinoma mamário MCF-7 e as células de fibroblastos Balb/c 3T3 clone A31 para os ensaios de citotoxicidade. Ambas linhagens foram cultivadas em meio DMEM, contendo indicador vermelho fenol e suplementado com 10% FBS (Vitrocell, Campinas, SP). Ao atingir a confluência de 80%, as células foram transferidas para placas de 96 poços na concentração de $5 \cdot 10^4$ células mL^{-1} , sendo que houve troca do meio de cultura após 24 h para DMEM sem vermelho fenol para evitar interferência no resultado, de acordo com trabalhos anteriormente realizados (Cruz, 2015). No caso da linhagem Balb/c 3T3 o meio DMEM com vermelho fenol foi mantido ao longo de todo o tempo de incubação.

Em ambos experimentos, após 24 h de incubação, 100 μL dos meios de cultura contendo E_2 ou os parabenos foram adicionados em cada poço. Como

controle negativo, foram utilizadas células às quais foi adicionado apenas o meio de cultura DMEM contendo 10% FBS-CS. As placas foram incubadas durante 6 dias, havendo troca do meio de cultura em intervalos de 48 h. Ao final do período de incubação, 100 μL de reagente MTT na concentração 1 mg mL^{-1} em meio DMEM 10% FBS-CS foi adicionado em cada poço. Para o branco de absorbância foi utilizado tampão fosfato (PBS) diluído em meio de cultura na concentração de 20% (v/v). As placas de 96 poços foram incubadas durante 3h. Após esse período, o meio de cultura foi substituído por uma solução de dodecilsulfato de sódio 10% (v/v) em DMSO, contendo 0,6% (v/v) CH_3COOH . As placas foram mantidas sob agitação constante, com a medida de absorbância em 570 nm realizada após 60 min.

Os dados foram analisados por meio dos programas ExcelTM e GraphPad Prism v. 5.

Todos os estudos de estrogenicidade e citotoxicidade foram realizados pela Dra. Patrícia L. S. Bergo, sob supervisão do Prof. Dr. Andrei Leitão no Grupo de Química Medicinal (NEQUIMED).

4.2 – Resultados e discussões

4.2.1 – Avaliação Espectrofotométrica

Antes de iniciar os estudos de degradação comparou-se o espectro de emissão da lâmpada com os espectros de absorção dos parabenos e determinou-se os valores de pKa e os coeficientes de absorção em diferentes valores de pH (4, 7 e 11) e de concentrações (2, 4, 6, 8 e 10 $\mu\text{g/L}$) afim de avaliar a eficiência da fonte de radiação e a influência desses fatores na fotólise direta.

A Figura 11 mostra que a absorção dos parabenos é dependente do pH pois sua absorção em meio ácido e neutro coincide com um pico de emissão da lâmpada em 254 nm, entretanto em meio básico ocorre um deslocamento batocrômico com máximo de absorção em 297 nm. Essa nova região de absorção coincide com dois outros picos de emissão da lâmpada, porém menos energético e de menor intensidade e se sobrepõe de forma parcial a um pico intenso da lâmpada em 315 nm, correspondendo a região do UV-B ou região de onda média. De acordo com (GRYGLIK et al., 2009) esse deslocamento é devido a desprotonação e formação de

ânion na molécula que favorece uma maior mobilidade dos elétrons pi e uma maior absorção da radiação.

Figura 11. Espectro da lâmpada de Hg e dos parabenos em diferentes pH e na concentração de 10 mg/L: **(A)** propilparabeno e **(B)** butilparabeno.

Quanto aos valores de pKa, a determinação foi feita a partir de soluções em 10 diferentes valores de pH (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12) onde um gráfico com a absorbância das formas protonadas e desprotonadas foram ajustadas em curvas sigmoidais no programa origin[®] 8.0. O valor do pKa foi estimado como sendo o valor de pH onde ocorre a intersecção entre as duas sigmoidais, sendo $8,64 \pm 0,25$ e $8,49 \pm 0,12$ para Prp e Bup respectivamente, o que está em conformidade com a literatura (ANGELOV et al., 2007; BŁĘDZKA et al, 2009), Figura 12.

Figura 12. Estimativa do pKa do – **A)** propilparabeno e do **B)** butilparabeno.

Segundo (BOREEN et al., 2004) a determinação do valor do pKa é importante porque ajuda a prever as propriedades óticas e a reatividade de um composto em diferentes meios.

Para determinar o quão fortemente o PrP e o BuP absorvem a radiação nos diferentes pH's, foi calculado, a partir da Figura 13, o coeficiente de absorção molar dos parabenos nos comprimentos de onda 254 e 297nm de acordo com a lei de Beer- Lambert e a partir da equação 16:

$$\text{abs}(\alpha) = \epsilon \times [\text{PB}] \times l, \quad (16)$$

onde:

abs(α) = absorção do parabeno no comprimento de onda 254 ou 297 nm;

ϵ = coeficiente de absorção molar,

[PB] = concentração do parabeno

l = comprimento do caminho ótico em cm.

Figura 13. Absorbância do (A) propilparabeno e do (B) butilparabeno em diferentes concentrações e pH.

As equações das retas ajustadas aos pontos da figura acima e os valores dos coeficientes de determinação são apresentados na Tabela 12.

Tabela 12. Coeficiente de absorção do PrP e do BuP em diferentes pH's.

Analito	pH	Epsilon	R²
Propilparabeno	4	13921.711	0.9995
	7	13501.395	0.9971
	10	21287.656	0.9938
Butilparabeno	4	14623.275	0.9998
	7	14992.256	0.9993
	10	22818.526	0.9947

Esses resultados estão de acordo a literatura (BŁĘDZKA e t al, (2009) e sugerem que a lâmpada de vapor de mercúrio de baixa pressão será eficiente na fotodegradação dos parabenos selecionados; apesar de ϵ ter maior valor em meio básico, acredita-se que a maior taxa de degradação será em meio ácido e neutro, pois nessas condições o máximo de absorção dos parabenos coincide com o pico mais energético de emissão da lâmpada.

4.2.2 – Caracterização dos eletrodos de nanotubos de Ti/TiO₂

A morfologia dos filmes formados de Ti/TiO₂, segundo procedimento descrito na seção experimental, foi estudado pelas técnicas MEV e DRX cujos perfis obtidos são apresentados a seguir.

4.2.2.1 – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As caracterizações foram feitas nas placas de Ti que foram submetidas a 20 V de potenciais durante os tempos de 30, 120, 180 e 240 minutos e cujas as imagens estão respectivamente representadas nas Figuras 14, 15, 16 e 17.

Figura 14. MEV da superfície do eletrodo de Ti/TiO₂ após anodização em 20 V por 30 minutos.

Figura 15. MEV da superfície do eletrodo de Ti/TiO₂ após anodização em 20 V por 120 minutos.

Figura 16. MEV da superfície do eletrodo de Ti/TiO₂ após anodização em 20 V por 180 minutos.

Figura 17. MEV da superfície do eletrodo de Ti/TiO₂ após anodização em 20 V por 240 minutos.

Na Figura 14 pode-se perceber que não houve formação dos nanotubos de Ti/TiO₂ para o tempo de 30 minutos. Porém na Figura 15, observa-se a presença de algumas estruturas tubulares bem como o surgimento de um aspecto rugoso na superfície do eletrodo o que pode indicar o início do processo de formação dos nanotubos. A micrografia apresentada na Figura 16 mostra, após 180 minutos de anodização, a formação dos nanotubos de Ti/TiO₂ com estruturas bem organizadas, densa e uniforme ao longo de toda extensão do eletrodo. Determinação do diâmetro desses tubos através do programa ImageJ, revelou que os mesmos variam de 40 a 90 nm, o que está de acordo com o determinado em XIE QUAN et al. (2005). A Figura 17 mostra a micrografia de um eletrodo anodizado durante 240 minutos e revela que um aumento no tempo de anodização prejudica a formação do eletrodo, pois este sofre um colapso nas suas estruturas nanotubulares, deixando-as desgastadas e desorganizadas o que pode refletir de forma negativa na sua fotoresposta. A partir dos resultados obtidos infere-se que nas condições empregada o tempo de anodização possui um período ótimo que se não alcançado ou ultrapassado, prejudica a formação nanotubular organizada dos fotoeletrodos. Assim, baseado nas imagens de MEV, a melhor estrutura foi obtida após 180 minutos de anodização.

A formação da fase anatase nas placas de titânio após anodização foi confirmada por DRX.

4.2.2.2 – Difração de Raio-X (DRX)

A Figura 18 mostra o difratograma do fotoeletrodo de Ti/TiO₂ com as diferentes fases que foram obtidas após anodização em 20 V durante 180 minutos e posterior tratamento térmico a 450 °C em 120 minutos.

Figura 18. Raio-X do Ti/TiO₂ após anodização em 20 V por 180 minutos e tratamento térmico a 450 °C em 120 minutos.

Os picos de difração 2θ revelados no difratograma em 25,3°, 37,3°, 48,0°, 54,3°, 62,8°, 70° e 75,2° mostram a formação da fase anatase, que é a fase mais fotoativa do TiO₂. Esses resultados estão de acordo com a literatura, onde estudos (CARP, 2004; CHEN; MAO, 2007; FANG et al., 2012; QIU et al., 2012) mostram que quando a calcinação ocorre em temperaturas inferiores a 400 °C, existe somente Ti amorfo na superfície dos eletrodos, e que a partir desta começam a coexistir as fases anatase e rutilo, até o ponto em que as estruturas começam a sofrer deformações e perder atividade catalítica, em geral a partir de 500-800 °C. Considerando esses resultados, pode-se dizer que o mesmo foi preparado com êxito e mostra-se promissor para a aplicação na fotoeletrocatalise.

4.2.3 – Comportamento eletroquímico do fotoeletrodo

O fotoeletrodo produzido teve sua fotoatividade testada por meio da técnica de voltametria linear em que as curvas corrente vs potencial foram registradas na ausência (curva a) e na presença da radiação (curvas b, c e d) em solução com e sem os parabenos a uma velocidade de varredura de 10 mV s^{-1} em Na_2SO_4 a $0,1 \text{ M}$ como eletrólito cujos os resultados são mostradas na Figura 19.

Figura 19. Curvas de fotocorrente-potencial obtidas para eletrodo de Ti/TiO_2 em Na_2SO_4 a $0,1\text{M}$ sem radiação UV (Curva a), com radiação UV (Curva b) e com radiação UV e os parabenos, PrP (curva c) e BuP (curva d) parabeno, na concentração 10 mgL^{-1} .

O gráfico de fotocorrente obtido com o eletrodo de nanotubos de Ti/TiO_2 , mostra que sem irradiação a corrente resultante é praticamente nula, pois o eletrodo funciona como cátodo e não como anodo na ausência de luz UV. Entretanto, quando o sistema é irradiado ocorre um aumento de corrente indicando a presença de fotoatividade no eletrodo. Ao iluminar o eletrodo gera-se um fluxo adicional de elétrons através do circuito externo, devido ao aumento da concentração de elétrons na banda de condução. Isso ocorre porque quando um semiconductor do tipo n (como TiO_2) é irradiado com energia maior ou igual a sua energia de “band gap”, os elétrons migram para a banda de condução e lacunas se formam na banda de valência (PAULA, 2012). Na presença dos parabenos, como se observa na figura,

há ainda um aumento na fotocorrente gerada, o que sugere que os mesmos estão se envolvendo com a atividade fotoeletrocatalítica, ou seja, estão sofrendo oxidação.

4.2.4 – A influência de diferentes parâmetros sobre a cinética de degradação dos parabenos

Em diferentes meios (água deionizada e água de rio) foi investigada a degradação do PrP, do BuP e da mistura PrP-BuP em diferentes concentrações (5 a 30 mg/L) e pH's (4, 7 e 10), através das técnicas de fotólise e fotoeletrocatalise. As degradações por ambas as técnicas seguiram uma cinética de pseudo primeira ordem e uma comparação quantitativa entre as duas técnicas foi feita através da comparação das constantes de degradação cujo os valores foram determinados através da equação 17:

$$\ln (C_t / C_o) = -K t, \quad (17)$$

onde C_t é a concentração de parabeno (mg/L) no tempo t (min), C_o é a concentração inicial (mg/L), K é a constante de pseudo-primeira ordem (min^{-1}) e t é o tempo em minutos de fotólise ou de fotoeletrocatalise da solução. Além da constante foi determinado também, a partir da equação $t_{1/2} = \ln 2/k$, o tempo em que 50% ($t_{1/2}$) da concentração inicial foi degradada. Foram apresentados ainda os coeficientes de correlação e a variação de pH de cada um dos processos de degradação.

4.2.5 – A influência da concentração inicial do PrP, do BuP e da mistura PrP-BuP na degradação por fotólise e fotoeletrocatalise em água deionizada

Sendo os parabenos encontrados em diferentes concentrações no meio ambiente (KASPRZYK-HORDERN et al., 2008; JONKERS et al., 2009) foi avaliado a influência da concentração inicial e a eficiência da fotólise e da fotoeletrocatalise na degradação dos mesmos em condições ideais (soluções de água deionizada). Para isso, soluções de PrP, de BuP e da mistura PrP-BuP foram preparados em diferentes concentrações (5, 10, 20 e 30 mg/L) e submetidos aos diferentes processos de degradação. O decréscimo dos valores de concentração foram acompanhados por HPLC com alíquotas tiradas em tempo pré-determinados (0; 1,5;

3; 7; 12; 18; 25; 35; 45; 55; 65; 75; 85 e 95 minutos). A Figura 20A-D mostra o perfil normalizado de decaimento da concentração das soluções de PrP, BuP e do PrP e do BuP na mistura PrP-BuP durante o processo fotolítico.

Figura 20. Taxas de degradação por fotólise do PrP e do BuP. **A)** PrP, **B)** BuP, **C)** PrP na mistura e **D)** BuP na mistura.

O tempo de estabilização da concentração final das soluções individuais de PrP e de BuP variou de 25 a 65 minutos enquanto a degradação dos parabenos na mistura foi de 35 a 85 minutos. A taxa de remoção dos parabenos em ambas as soluções foi de aproximadamente 99,99 %. Esses resultados estão de acordo com os de GRYGLIK et al., (2009) e de TSOUROUNAKI et al., (2012) que obtiveram, respectivamente, uma redução quase completa do BuP e MeP após o emprego da fotólise. Ainda com base na figura acima, percebe-se que a remoção dos compostos de interesse é dependente da concentração inicial, pois a estabilização é mais lenta para as soluções mais concentradas. Segundo BŁEDZKA et al. (2009), isso acontece porque nas soluções mais concentradas as moléculas estão mais próximas umas das outras e isso pode dificultar uma interação direta e mais homogênea

entre a radiação e as moléculas dos analitos e/ou ainda porque pode ocorrer dissipação de parte da energia absorvida sem que ocorra qualquer alteração na estrutura química do composto. Além disso, de acordo com VISHNU PAREEK, SIEWHUI CHONG, (2011) é muito difícil manter uma distribuição intensa e uniforme da luz no interior de um reator quando ocorre um aumento da concentração dos analitos.

Na fotoeletrocatalise, conforme Figura 21A-D, o tempo gasto para eliminar as diferentes concentrações de parabenos nas soluções individuais e nas misturas foram mais rápidos, sendo esse intervalo de 12 a 55 minutos, o que sugere que este método é mais eficiente do que a fotólise.

Figura 21. Taxas de gradação fotoeletrocatalítica do PrP e do BuP. **A)** PrP, **B)** BuP, **C)** PrP na mistura e **D)** BuP na mistura.

Segundo SIRTORI (2006), essa maior eficiência se dá porque além da degradação pela radiação direta da luz, ocorre também a oxidação na superfície do fotoanodo e principalmente a degradação pela ação dos radicais hidroxila que são formados a partir da oxidação da água. Assim, o sinergismo desses três efeitos leva

a uma maior taxa de remoção e, conseqüentemente a um menor tempo na estabilização da concentração final dos parabenos. Como na fotólise, a fotoeletrocatalise também sofre influência da concentração inicial. Esse retardo, além dos fatores inerentes da fotólise, ocorre porque o aumento da concentração dos parabenos limita a intensidade de luz que chega até a superfície do fotoeletrodo e isso prejudica a formação dos radicais hidroxilas que são os principais responsáveis pela degradação dos analitos (BESSEGATO et al., 2014). Além disso, o processo pode ser prejudicado também pelo processo de transferência de massa no sistema (TSCHIRCH et al., 2008).

Uma comparação quantitativa entre a fotólise e a fotoeletrocatalise foi feita comparando as constantes de velocidade de remoção de ambos os processos. Na fotólise das soluções individuais de PrP e de BuP, os valores das constantes variaram de $1,70 \times 10^{-1}$ a $5,89 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ e de $1,72 \times 10^{-1}$ a $6,37 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ enquanto seus respectivos $t_{1/2}$ foram de 4,07 a 11,76 minutos e de 4,02 a 10,88 minutos. Na fotoeletrocatalise das soluções homólogas, como esperado, os valores determinados para k foram maiores. Para o PrP a constante variou de $4,27 \times 10^{-1}$ a $1,71 \times 10^{-1} \text{ min}^{-1}$ enquanto para o BuP ela foi de $4,46 \times 10^{-1}$ a $1,73 \times 10^{-1} \text{ min}^{-1}$. Os $t_{1/2}$ das respectivas soluções variaram de 1,62 a 4,05 e de 1,55 a 4,06 minutos. Na fotólise das soluções mistas (PrP + BuP), os valores de k para o PrP variou de $1,23 \times 10^{-1}$ a $5,86 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ enquanto os $t_{1/2}$ foram de 5,63 a 19,12 min. Já o k do BuP na mistura foi de $1,27 \times 10^{-1}$ a $3,84 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ e os $t_{1/2}$ de 5,45 a 18,04 min. Além das constantes cinéticas e dos $t_{1/2}$, foi determinado também as constantes de correlação e a variação de pH de cada processo. Na tabela 13 abaixo é apresentado os valores de todas as grandezas obtidas.

Tabela 13. Dados cinéticos obtidos da degradação do PrP e do BuP em diferentes concentrações em água deionizada pelas técnicas de fotólise e fotoeletrocatalise.

Fotólise de parabeno em água deionizada		pH inicial-final	Constante de velocidade (k, min^{-1})^a	Tempo de meia-vida ($t_{1/2}$, min)^b	R^2
PrP (mg/L)	5	7,00 – 5,91±0,20	$1,70 \times 10^{-1}$	4,077	0,9978
	10	7,00 – 5,45±0,08	$1,38 \times 10^{-1}$	5,022	0,9793
	20	7,00 – 5,05±0,09	$9,10 \times 10^{-2}$	7,616	0,9817
	30	7,00 – 4,94±0,15	$5,89 \times 10^{-2}$	11,767	0,9780
BuP (mg/L)	5	7,00 – 5,86±0,20	$1,72 \times 10^{-1}$	4,029	0,9972
	10	7,00 – 5,38±0,08	$1,48 \times 10^{-1}$	4,683	0,9953
	20	7,00 – 5,11±0,09	$1,03 \times 10^{-1}$	6,729	0,9758
	30	7,00 – 4,90±0,15	$6,37 \times 10^{-2}$	10,880	0,9778
PrP na mistura (PrP+BuP) (mg/L)	5	7,00 – 5,59±0,20	$1,23 \times 10^{-1}$	5,634	0,9652
	10	7,00 – 5,21±0,08	$1,01 \times 10^{-1}$	6,862	0,9757
	20	7,00 – 5,03±0,09	$5,86 \times 10^{-2}$	11,827	0,9744
BuP na mistura (PrP+BuP) (mg/L)	5	7,00 – 5,59±0,20	$1,27 \times 10^{-1}$	5,457	0,9792
	10	7,00 – 5,21±0,08	$1,06 \times 10^{-1}$	6,538	0,9717
	20	7,00 – 5,03±0,09	$5,68 \times 10^{-2}$	12,202	0,9748
	30	7,00 – 4,93±0,15	$3,84 \times 10^{-2}$	18,049	0,9743
Fotoeletrocatalise de parabeno em água deionizada		pH inicial-final	Constante de velocidade (k, min^{-1})^a	Tempo de meia-vida ($t_{1/2}$, min)^b	R^2
	5	7,00 – 5,88±0,20	$4,27 \times 10^{-1}$	1,623	0,9896

PrP (mg/L)	10	7,00 – 5,18±0,08	$3,32 \times 10^{-1}$	2,087	0,9808
	20	7,00 – 5,08±0,09	$2,15 \times 10^{-1}$	3,223	0,9951
	30	7,00 – 4,74±0,15	$1,71 \times 10^{-1}$	4,053	0,9901
BuP (mg/L)	5	7,00 – 5,86±0,20	$4,46 \times 10^{-1}$	1,554	0,9924
	10	7,00 – 5,23±0,08	$3,46 \times 10^{-1}$	2,003	0,9754
	20	7,00 – 5,02±0,09	$1,99 \times 10^{-1}$	3,482	0,9975
	30	7,00 – 4,77±0,15	$1,73 \times 10^{-1}$	4,006	0,9975
PrP na mistura (PrP+BuP) (mg/L)	5	7,00 – 5,41±0,20	$3,61 \times 10^{-1}$	1,92	0,9826
	10	7,00 – 5,13±0,08	$2,26 \times 10^{-1}$	3,066	0,9931
	20	7,00 – 4,98±0,09	$1,41 \times 10^{-1}$	4,915	0,9961
	30	7,00 – 4,70±0,15	$1,14 \times 10^{-1}$	6,079	0,9969
BuP na mistura (PrP+BuP) (mg/L)	5	7,00 – 5,41±0,20	$3,73 \times 10^{-1}$	1,858	0,9762
	10	7,00 – 5,13±0,08	$2,86 \times 10^{-1}$	2,423	0,9918
	20	7,00 – 4,98±0,09	$1,58 \times 10^{-1}$	4,386	0,9942
	30	7,00 – 4,70±0,15	$1,20 \times 10^{-1}$	5,775	0,9903

^a constante de velocidade de pseudo-primeira ordem para a degradação dos parabenos em diferentes condições experimentais.

^b tempo de meia-vida para a degradação dos parabenos em diferentes condições experimentais.

Em todos os processos a remoção foi superior a 99% o que sugere que ambos os métodos são eficientes na remoção dos parabenos, contudo, o sinergismo dos efeitos na fotoeletrocatalise induz à degradação mais rápida dos parabenos, o que torna este processo mais eficiente.

4.2.6 – A influência da concentração inicial do PrP, do BuP e da mistura PrP-BuP na degradação por fotólise e na fotoeletrocatalise em água de rio

As águas de superfície geralmente tem diferentes íons (NO_2^- , NO_3^- , Cl^- , NH_4^+ , Ca^{2+} , etc) e diferentes tipos de matéria orgânica, principalmente as águas de rio que atravessam diferentes cidades (SPERLING, 2005). Com o intuito de investigar a influência dessas possíveis substâncias na degradação dos parabenos, soluções de PrP, BuP e de PrP-BuP foram preparadas em água coletada no Rio Pardo e submetidas ao processo de degradação por fotólise e fotoeletrocatalise, cujo resultado já pode ser observado na Figura 22A-H.

Figura 22. Degradação por fotólise e fotoeletrocatalise do PrP e do BuP. **A)** fotólise do PrP, **B)** fotólise BuP, **C)** fotólise PrP na mistura e **D)** fotólise do BuP na mistura, **E)**, fotoeletrocatalise do PrP, **F)** fotoeletrocatalise do BuP, **G)** fotoeletrocatalise PrP na mistura e **H)** fotoeletrocatalise do BuP na mistura.

Na fotólise, o tempo gasto para degradar o PrP e o BuP das respectivas soluções variou de 35 a 85 minutos com taxa de eliminação superior a 98% para os dois conservantes. Na degradação fotoeletrocatalítica, esse tempo foi de 12 a 45

minutos com taxa de remoção maior do que 99% para ambos os analitos. A partir do tempo gasto na eliminação dos conservantes, infere-se que a fotoeletrocatalise, assim como nas degradações realizadas em água deionizada, é mais eficiente do que a fotólise.

De acordo com BAO e NIU, (2015) o maior tempo de fotólise dos parabenos em água de rio se justifica pela presença da matéria orgânica e dos diversos íons que absorvem parte da radiação incidente resultando em uma menor absorção de fótons por parte das moléculas de parabenos; ou ainda, como sugere GRYGLIK et al., (2009), porque a concentração da matéria orgânica e dos íons misturados aos parabenos pode levar a dissipação (perda) de parte da energia absorvida. Além desses fatores, existe também o fato de os coeficientes de absorção dos parabenos poderem ser alterado pela presença dos diversos componentes na água do rio. No caso da fotoeletrocatalise, segundo PASCHOAL et al., (2008), o efeito dos diversos contaminantes presentes na água é também prejudicial para o processo, pois a variedade e a alta concentração destes impedem que a energia da fonte luminosa atinja a superfície do eletrodo de Ti/TiO₂ ou o atinja com uma intensidade de energia mais baixa e prejudique a formação e a manutenção do par elétron/lacuna (e^-/h^+), dos radicais hidroxila ($\bullet OH$) e consequentemente a eficiência do processo fotoeletrocatalítico que se reflete na redução da velocidade e no aumento da matéria orgânica em solução.

No caso da degradação das misturas (soluções de PuP + BuP,) os efeitos acima relatados podem ser ainda mais pronunciado, uma vez que existe um maior número de moléculas de parabenos para cada solução.

A cinética das degradações, assim como as determinadas na secção 4.4 em água deionizada, apresenta um decaimento de pseudo-primeira ordem com as constantes de correlações variando de 0,9276 a 0,9977. Os valores de k determinado para as degradações das soluções individuais variaram de $3,19 \times 10^{-1}$ a $3,92 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ e de $3,08 \times 10^{-1}$ a $4,72 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ para o PrP e o BuP respectivamente enquanto seus respectivos $t_{1/2}$ variaram de 2,17 a 17,68 e de 2,25 a 14,68 minutos. Na remoção das misturas, os valores de k para o PrP foram de $2,36 \times 10^{-1}$ a $2,92 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ com seus $t_{1/2}$ indo de 2,93 a 23,73 minutos. Já para o BuP, o valores de k variaram de $2,12 \times 10^{-1}$ a $2,69 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ e seus $t_{1/2}$ foram de 3,26 a 25,76 minutos, (Tabela 13). Os valores das constantes cinéticas aqui determinadas, foram menores do que os obtidos nas degradações das soluções em água

deionizadas. Esses resultados, estão de acordo com o apresentado por TSOUROUNAKI et al., (2012) que mostraram que a fotólise do MeP é mais rápida em água deionizada do que em água de rio. A tabela 14 abaixo apresenta a constante de cada degradação, os $t_{1/2}$, os coeficientes de correlação e as respectivas variação de pH.

Tabela 14. Dados cinéticos obtidos da degradação do PrP e do BuP em diferentes concentrações em água de rio pelas técnicas de fotólise e fotoeletrocatalise.

Fotólise do parabeno em água rio		pH inicial-final	Constante de velocidade (k , min^{-1}) ^a	Tempo de meia-vida ($t_{1/2}$, min) ^b	R^2
PrP (mg/L)	5	7,00 – 5,91±0,20	$1,41 \times 10^{-1}$	4,915	0,9500
	10	7,00 – 5,54±0,08	$1,14 \times 10^{-1}$	6,079	0,9843
	20	7,00 – 5,05±0,09	$5,94 \times 10^{-2}$	11,668	0,9356
	30	7,00 – 4,90±0,15	$3,92 \times 10^{-2}$	17,681	0,9755
BuP (mg/L)	5	7,00 – 5,88±0,20	$1,43 \times 10^{-1}$	4,846	0,9825
	10	7,00 – 5,23±0,08	$1,15 \times 10^{-1}$	6,026	0,9574
	20	7,00 – 5,01±0,09	$7,35 \times 10^{-2}$	9,429	0,9276
	30	7,00 – 4,84±0,15	$4,72 \times 10^{-2}$	14,684	0,9419
PrP na mistura (Prp+Bup) (mg/L)	5	7,00 – 5,51±0,20	$8,75 \times 10^{-2}$	7,921	0,9841
	10	7,00 – 5,11±0,08	$6,96 \times 10^{-2}$	9,958	0,9507
	20	7,00 – 4,91±0,09	$4,91 \times 10^{-2}$	14,116	0,9353
	30	7,00 – 4,84±0,15	$2,92 \times 10^{-2}$	23,736	0,9468
BuP na mistura (Prp+Bup) (mg/L)	5	7,00 – 5,51±0,20	$7,78 \times 10^{-2}$	8,908	0,9725
	10	7,00 – 5,11±0,08	$6,53 \times 10^{-2}$	10,614	0,9834
	20	7,00 – 5,91±0,09	$4,25 \times 10^{-2}$	16,308	0,9646
	30	7,00 – 4,84±0,15	$2,69 \times 10^{-2}$	25,765	0,9374

Fotoeletrocatalise do parabeno em água deionizada		pH inicial-final	Constante de velocidade (k , min^{-1}) ^a	Tempo de meia-vida ($t_{1/2}$, min) ^b	R^2
PrP (mg/L)	5	7,00 – 5,88±0,20	$3,19 \times 10^{-1}$	2,172	0,9828
	10	7,00 – 5,39±0,08	$2,61 \times 10^{-1}$	2,655	0,9919
	20	7,00 – 5,15±0,09	$1,57 \times 10^{-1}$	4,414	0,9888
	30	7,00 – 4,96±0,15	$1,42 \times 10^{-1}$	4,880	0,9799
BuP (mg/L)	5	7,00 – 5,99±0,20	$3,08 \times 10^{-1}$	2,250	0,9922
	10	7,00 – 5,41±0,08	$2,59 \times 10^{-1}$	2,676	0,9954
	20	7,00 – 5,17±0,09	$1,57 \times 10^{-1}$	4,414	0,9977
	30	7,00 – 5,01±0,15	$1,45 \times 10^{-1}$	4,78	0,9953
PrP na mistura (PrP+BuP) (mg/L)	5	7,00 – 5,94±0,20	$2,36 \times 10^{-1}$	2,936	0,9747
	10	7,00 – 5,83±0,08	$1,91 \times 10^{-1}$	3,628	0,9862
	20	7,00 – 4,85±0,09	$8,80 \times 10^{-2}$	7,876	0,9418
	30	7,00 – 4,54±0,15	$8,15 \times 10^{-2}$	8,504	0,9948
BuP na mistura (PrP+BuP) (mg/L)	5	7,00 – 5,94±0,20	$2,12 \times 10^{-1}$	3,269	0,9820
	10	7,00 – 5,83±0,08	$1,66 \times 10^{-1}$	4,175	0,9903
	20	7,00 – 4,85±0,09	$8,87 \times 10^{-2}$	7,813	0,9352
	30	7,00 – 4,54±0,15	$8,12 \times 10^{-2}$	8,535	0,9865

^a constante de velocidade de pseudo-primeira ordem para a degradação dos parabenos em diferentes condições experimentais.

^b tempo de meia-vida para a degradação dos parabenos

A partir da análise dos resultados apresentados na Tabela 14, é possível perceber, após ambos os processos, que a porcentagem de eliminação dos parabenos na fotólise é muito semelhante a taxa de degradação na fotoeletrocatalise, o que sugere que as moléculas dos parabenos possuem boa

fotossensibilidade e que podem ser eliminadas tanto pela fotólise quanto pela fotoeletrocatalise em diferentes níveis de concentração e em matrizes aquáticas.

4.2.7 – Influência do pH sobre a degradação dos parabenos por fotólise e fotoeletrocatalise

Foi investigada a influência do pH na degradação dos parabenos pelas técnicas de fotólise e fotoeletrocatalise. Para isso soluções de PrP e de BuP foram preparadas em água deionizada em 3 diferentes pH's, (4 ,7 e 10) e submetidas aos diferentes processos de degradação. A Figura 23 abaixo apresenta o resultado desse estudo.

Figura 23. Degradação por fotólise e fotoeletrocatalise do PrP e do BuP em diferentes pH's. **A)** fotólise do PrP, **B)** fotólise do BuP, **C)** fotoeletrocatalise do PrP e **D)** fotoeletrocatalise do BuP.

Pelos resultados apresentados na Figura 23 é possível perceber que para ambos os experimentos os parabenos tiveram uma remoção superior a 99% em relação à concentração inicial. Contudo, o tempo de eliminação dos analitos varia para os diferentes pH's. Em meio básico, o tempo de estabilização da concentração final para o PrP e o BuP, nas duas técnicas de degradação é bem maior do que o

tempo gasto para eliminar os parabenos em meio neutro e ácido. Pelos valores dos coeficientes de absorção molar determinados na seção 4.2.1, a forma mais fotoreativa dos parabenos é em meio básico (pH 10), pois nesta condição os parabenos apresentam maior valor dos coeficientes de absorção. Assim era de se esperar que nesse meio os parabenos se degradassem primeiro, entretanto, isso não ocorre porque seu máximo de absorção se desloca de 256 nm para 297 nm, fato que não ocorre com os parabenos em pH 4 e 7 que têm seu pico de absorção principal coincidindo com o pico de emissão mais energético da lâmpada (em 256 nm).

No caso da fotoeletrocatalise a cinética de degradação é também mais rápida para as soluções em meio ácido e neutro, o que está de acordo com LI et al., (2002) e com QUAN et al., (2007) que degradaram ácido húmico e pentaclorofenol com fotoeletrodo de titânio. De acordo com LI et al. (2002) isso acontece porque o TiO_2 é isoelétrico em pH 6,4; assim, em soluções com pH abaixo desse valor, o Ti/TiO_2 apresenta uma carga positiva e isso contribui para que moléculas com densidades de cargas negativas se adsorvam e sofram degradações rápidas como as moléculas de parabenos. Já em soluções com pH muito acima do ponto isoelétrico, como é o caso das soluções de pH 10, a superfície do Ti/TiO_2 torna-se negativamente carregada e isso dificulta a adsorção dos parabenos devido a repulsão eletrostática. Contudo, vale lembrar que durante as degradações o pH do meio vai diminuindo e isso favorece ambos os processos de degradação pois a superfície do fotoeletrodo vai ficando positiva e o máximo de absorção dos parabenos vai se deslocando em direção ao pico de emissão mais energético da lâmpada. Assim, o sinergismo desses processos otimiza a degradação das soluções de parabenos nos diferentes pH's.

Determinação das constantes de velocidades de remoções dos parabenos nas duas técnicas de degradação e para os diferentes pH's, revelou, como nos experimentos anteriores, uma cinética de pseudo primeira ordem. Na fotólise, os valores determinados para k nas soluções de PrP variaram de $9,59 \times 10^{-2}$ a $2,23 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ enquanto para as soluções de BuP as constantes foram de $1,41 \times 10^{-1}$ a $2,49 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$. Os $t_{1/2}$ calculados para as soluções foram de 7,22 a 31,08 minutos para o PrP e de 6,07 a 27,83 minutos para o BuP respectivamente. Para a fotoeletrocatalise do PrP, a cinética de remoção das soluções em diferentes pH's apresentou uma constante que vai de $1,96 \times 10^{-1}$ a $1,23 \times 10^{-1} \text{ min}^{-1}$ e de 3,53 a 5,63

minutos os respectivos $t_{1/2}$. Na fotoeletrocatalise das soluções do BuP as constantes foram de $1,92 \times 10^{-1}$ a $1,33 \times 10^{-1} \text{ min}^{-1}$ enquanto seus $t_{1/2}$ variaram de 3,60 a 5,20 minutos. Além das constantes cinéticas e dos $t_{1/2}$, na tabela 15 são apresentados os valores das constantes de correlações e as variações de pH de cada processo.

Tabela 15. Dados cinéticos obtidos da degradação do PrP e do BuP em diferentes pH's em água deionizada pelas técnicas de fotólise e fotoeletrocatalise.

Fotólise/fotoeletrocatalise do parabenol em Água deionizada	pH inicial-final	Constante de velocidade (k , min^{-1}) ^a	Tempo de meia-vida ($t_{1/2}$, min) ^b	R ²
Fotólise de 30 mg/L do PrP	4,00 – 3.50±0.20	$9,59 \times 10^{-2}$	7,227	0,9911
	7,00 – 4,77±0.08	$5,89 \times 10^{-2}$	11,767	0,9780
	10,00 – 5.22±0.09	$2,23 \times 10^{-2}$	31,08	0,9347
Fotólise de 30 mg/L do BuP	4,00 – 3.48±0.20	$1,14 \times 10^{-1}$	6,079	0,9830
	7,00 – 5.17±0.08	$6,37 \times 10^{-2}$	10,880	0,9778
	10,00 – 5.28±0.09	$2,49 \times 10^{-2}$	27,835	0,9686
Fotoeletrocatalise de 30 mg/L do PrP	4,00 – 3.43±0.20	$1,96 \times 10^{-1}$	3,536	0,9987
	7,00 – 4,99±0.08	$1,71 \times 10^{-1}$	4,053	0,9901
	10,00 – 5.16±0.09	$1,23 \times 10^{-1}$	5,634	0,9891
Fotoeletrocatalise de 30 mg/L do BuP	4,00 – 3.43±0.20	$1,92 \times 10^{-1}$	3,609	0,9927
	7,00 – 5.03±0.08	$1,73 \times 10^{-1}$	4,006	0,9975
	10,00 – 5,11±0.09	$1,33 \times 10^{-1}$	5,211	0,9793

Comparação entre os valores das constantes de velocidade para as soluções degradadas por fotólise nos diferentes pH's, mostram que o valor de K para o PrP em pH 4 é 1,42 vezes maior do que em pH 7 e em torno de 3,82 maior do que em

pH 10; BuP, o valor de K em pH 4 é 1,90 e 3,97 vezes maior do que as fotólises realizadas em pH 7 e 10 respectivamente. Resultados parecidos são também observados para a fotoeletrocatalise. Esses dados revelam claramente que a remoção dos parabenos pelas técnicas de fotólise e fotoeletrocatalise são significativamente dependente do pH, pois os valores das constantes, como apresentado, decrescem das soluções ácidas para as soluções alcalinas.

4.2.8 – Determinação de Carbono Orgânico Total (TOC)

As medidas de remoção do carbono orgânico total é importante porque permite estimar o nível de mineralização dos compostos degradados. Assim, foi determinado o TOC das soluções individuais de PrP e de BuP degradados pelas técnicas de fotólise e fotoeletrocatalise em diferentes pH's. A porcentagem de remoção foi determinada pela equação 18:

$$\text{TOC} = \frac{\text{TOC}_{\text{inicial}} - \text{TOC}_{\text{final}}}{\text{TOC}_{\text{inicial}}} \times 100 \quad (18)$$

O resultado de todos os experimentos pode ser visto na Figura 24 abaixo.

Figura 24. Taxa de remoção do carbono orgânico total. **A)** fotólise do PrP, **B)** fotólise do BuP, **C)** fotoeletrocatalise do PrP e **D)** fotoeletrocatalise do BuP.

Como se observa, o decaimento do TOC foi relativamente baixo para os dois processos de degradação, o que pode ser devido a estabilidade e ao poder recalcitrante dos produtos. Contudo, esses resultados estão de acordo com os relatados por GMUREK et al. (2015) e DAGHRIR et al. (2014) que obtiveram, aproximadamente, 50 e 43% de mineralização dos parabenos após degradação por catálise e fotossônica respectivamente.

4.2.9 – Identificação dos produtos de degradação dos Parabenos

A Degradação do PrP e do BuP deu origem a produtos de degradações que são semelhantes para ambos. Dados de MS e MS/MS para o PrP, o BuP e seus produtos de degradação são apresentados na Tabela 16.

Tabela 16. Resumo dos dados de espectrometria de massas (MS e MS / MS).

	BuP		PrP	
	BuP	BuP'	PrP	PrP'
[M-H⁺]⁻	193.0873 C ₁₁ H ₁₃ O ₃ calc 193.0859	209.0825 C ₁₁ H ₁₃ O ₄ calc 209.0808	179.0715 C ₁₀ H ₁₁ O ₃ calc 179.0703	195.0666 C ₁₀ H ₁₁ O ₄ calc 195.0652
[M-H⁺-R]⁻	137.0247 C ₇ H ₅ O ₃ calc 137.0233	153.0198 C ₇ H ₅ O ₄ calc 153.0182	137.0246 C ₇ H ₅ O ₃ calc 137.0233	153.0197 C ₇ H ₅ O ₄ calc 153.0182
[M-H⁺-R-HCO₂]⁻	93.0348 C ₆ H ₄ O calc 93.0335	108.0220 C ₆ H ₄ O ₂ calc 108.0206	93.0347 C ₆ H ₄ O calc 93.0335	108.0219 C ₆ H ₄ O ₂ calc 108.0206

A Comparação entre a fórmula molecular do BuP/PrP e seus produtos de degradação, sugere que durante o processo de remoção, ambos os parabenos são oxidados e um átomo de oxigênio é adicionado a molécula.

É bem conhecido que durante a degradação dos parabenos, a oxidação ocorra no anel aromático, o que é confirmado pela via de fragmentação apresentada na Figura 25. O primeiro íon fragmento é gerado pela perda da cadeia lateral. Ambos os precursores e produtos de degradação apresentam a mesma perda (-C₄H₈ para o BuP e BuP' e -C₃H₆ para PrP e PrP') evidenciando que nenhuma modificação ocorreu na cadeia lateral. Além disso, os menores fragmentos, que correspondem ao anel aromático, apresentam um átomo de oxigênio para BuP/PrP e dois átomos de oxigênio para os produtos de degradação (BuP' e PrP')

Figura 25. Fragmentação e produtos de formação dos parabenos

A oxidação no anel aromático pode ocorrer no carbono 2 ou no carbono 3. Embora os dados de MS não permitam atribuir a posição dessa oxidação, faz-se essa sugestão baseado no espectro de UV dos produtos de degradação (Figura 26). NIELSEN et al. (2011) mostraram que o ácido 2,4 dihidroxi benzóico apresenta a absorção em 208, 218, 254 e 294 nm, enquanto o 3,4 ácido dihidroxi benzoico absorve luz UV em 206, 216, 260 e 294 nm. Considerando a absorção do BuP' e do PrP', que ocorre em 220, 261 296nm (para BuP') e 221, 260 e 292 nm (para Prp'), acredita-se que a oxidação do BuP e do PrP ocorre no C3, gerando produtos com oxidação no carbono 3 e 4 que tem banda similar ao ácido 3,4 dihidroxi benzóico.

Figura 26. Espectro de UV: ácido Butil *para*-hidroxi benzóico (**BuP**); Produtos de degradação do Butil *para*-hidroxi benzóico (**BuP'**) ácido Propil *para*-hidroxi benzóico (**PrP**); produtos de degradação do ácido *para*-hidroxi benzóico (**PrP'**).

4.2.10 – Estrogenicidade e citotoxicidade dos parabenos

Os resultados dos ensaios de estrogenicidade foram expressos em termos de efeito proliferativo relativo (RPE), no qual a absorbância do controle negativo é definida como 0 e a do controle positivo como 100%. O PrP, BuP e a mistura de parabenos apresentam atividade estrogênica, atuando como agonistas parciais, quando comparado com o composto de referência estradiol (que é um agonista total).

De acordo com os resultados obtidos, houve uma redução da atividade estrogênica para os três sistemas avaliados (PrP, BuP ou a mistura PrP-BuP) ao final do experimento de degradação. A remoção foi mais eficiente para o PrP, pois sua atividade estrogênica foi abolida ao final do experimento. No caso do BuP e da mistura (PrP + BuP) houve uma redução da atividade estrogênica, mas esta não foi completamente eliminada.

Comparando-se os tratamentos de fotólise e fotoeletrocatalise, uma análise estatística de *t*-Student pareado mostrou não haver diferença significativa entre os métodos de degradação para qualquer um dos três sistemas avaliados. Assim, os dois métodos são equiparáveis para a degradação dos compostos.

Uma análise complementar foi realizada para observar se as substâncias ou seus produtos de degradação apresentavam atividade tóxica nas condições testadas. Os resultados de citotoxicidade indicaram que nenhuma amostra apresentou

toxicidade para células sadias nos dois tipos de degradação usados neste experimento.

Figura 27. Estudos de atividade estrogênica e citotóxica da misturado propil + butilparabenos.

Figura 28. Estudos de atividade estrogênica e citotóxica do butilparabeno.

Figura 29. Estudos de atividade estrogênica e citotóxica do propilparabeno.

E₂: estradiol; NC: controle negativo; foto: fotólise; eletro: fotoeletrocatalise; t₀-t₃: alíquotas retiradas em diferentes tempos de incubação para degradação da amostra.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES

5.1 – Análise do PrP e do BuP na Bacia do Rio Pardo.

- ✓ As condições cromatográficas (HPLC–UV) para análise dos parabenos mostrou seletividade, linearidade, exatidão e precisão;
- ✓ Os limites de detecção e quantificação determinados foram 62,6 µg/L e de 187,8 µg/L para o PrP e de 58,4 µg/L e de 175,2 µg/L para o BuP;
- ✓ Os valores de recuperação dos parabenos foram melhores com a combinação dos solventes decanol/acetona (extrator/dispersor), pH neutro e presença de 10% de NaCl (massa/volume);
- ✓ A recuperação do PrP nas condições otimizadas foi de 70,8 % enquanto a do BuP foi de 79,6;
- ✓ As amostras de água coletadas na bacia do Rio Pardo apresentaram um teor de 2,2 a 6,8 µg/L de PrP e de 1,9 a 4,9 µg/L de BuP. Acredita-se que estes teores reflitam o descarte de esgotos domésticos e/ou industriais lançado diretamente nas águas do Rio Pardo e/ou nas suas proximidades.

5.2 – Degradação e avaliação da atividade estrogênica do propil e do butil parabenos.

- ✓ Os parabenos foram eficazmente degradado pela técnica de fotólise e o menor tempo de remoção foi para as soluções em água deionizada e em pH ácido e neutro;
- ✓ O fotoânodo de Ti/TiO₂ foi obtido na fase anatase e com estruturas organizadas, densas e uniformes ao longo de toda sua extensão;
- ✓ A degradação dos parabenos por fotoeletrocatalise foi eficiente e ocorreu em um tempo menor do que a fotólise para as diferentes condições.
- ✓ A degradação dos parabenos por ambas as técnicas pode ser considerada eficiente uma vez que a remoção foi superior a 99% e atividade estrogênica, no caso do PrP, foi removida enquanto a atividade do BuP e da mistura PrP-BuP foram reduzidas.

- ✓ Os parabenos estudados não apresentaram toxicidade para as células saudáveis, nem antes e nem após as degradações.

6. REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, (ANVISA). **Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos. Uma abordagem sobre os ensaios físicos e químicos**. Brasília, 2008. Disponível em:

http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/f0cb2f00486411e18e5f8f2bd5b3ccf0/guia_cosmetico.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 10 jan. 2016.

AKPAN, U. G.; HAMEED, B. H. Parameters affecting the photocatalytic degradation of dyes using TiO₂ -based photocatalysts : A review. **Journal of Hazardous Materials** , v. 170, p. 520–529, 2009.

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). **Journal of Hazardous Materials**, v. 239-240, p. 48–55, 2012.

ALLEN, E., DOISY, E. A. An ovarian hormone – preliminary report on its localization, extraction and partial purification, and action test animals. **The Journal of the American Medical Association**, v. 81, n. 10, p. 819–821, 1923.

ANGELOV, T.; VLASENKO, A.; TASHKOV, W. HPLC Determination of pKa of parabens and investigation on their lipophilicity parameters. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 31, p. 188–197, 2007.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Perguntas e respostas, Workshop de validação de metodologia analítica. Gerência geral de medicamentos**. Brasília, 2013. p. 1–34.

BAO, Y.; NIU, J. Photochemical transformation of tetrabromobisphenol A under simulated sunlight irradiation: Kinetics, mechanism and influencing factors. **Chemosphere**, v. 134, p. 550–556, 2015.

BESSEGATO, G. G.; GUARALDO, T. T.; ZANONI, M. V. B. Enhancement of photoelectrocatalysis efficiency by using nanostructured electrodes. **Modern Electrochemical Methods in Nano, Surface and Corrosion Science**, p. 271–319, 2014. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/modern-electrochemical-methods-in-nano-surface-and-corrosion-science/enhancement-of-photoelectrocatalysis-efficiency-by-using-nanostructured-electrodes>>. Acesso em: 8 jan. 2016.

BILA, D. M. **Degradação e remoção da atividade estrogênica do desregulador endócrino 17β-estradiol pelo processo de ozonização**. 2005. 302 f. Tese. (Doutorado em Ciências em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

BRITO, N. M; AMARANTE JUNIOR, O. P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos : estratégia e discussão. **Pesticidas: Revista. Ecotoxicologia e Meio Ambiente**. v. 18, p. 129–146, 2003.

BJERREGAARD, P.; ANDERSEN, D. N.; PEDERSEN, K. L.; PEDERSEN, S. N.; KORSGAARD, B. Estrogenic effect of propylparaben (propylhydroxybenzoate) in rainbow trout *oncorhynchus mykiss* after exposure via food and water. **Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & pharmacology**, v. 136, n. 4, p. 309–17, 2003.

BŁEDZKA, D.; GRYGLIK, D.; MILLER, J. S. Photodegradation of butylparaben in aqueous solutions by 254 nm irradiation. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 203, n. 2-3, p. 131–136, 2009.

BŁĘDZKA, D.; GRYGLIK, D.; OLAK, M.; GĘBICKI, J. L.; MILLER, J. S. Degradation of n-butylparaben and 4-tert-octylphenol in H₂O₂/UV system. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 79, n. 4, p. 409–416, 2009.

BOBERG, J.; TAXVIG, C.; CHRISTIANSEN, S.; HASS, U. Possible endocrine disrupting effects of parabens and their metabolites. **Reproductive Toxicology**, v. 30, n. 2, p. 301–312, 2010.

BOREEN, A. L.; ARNOLD, W. A.; MCNEILL, K. Photochemical fate of sulfa drugs in the aquatic environment: sulfa drugs containing five-membered heterocyclic groups. **Environmental Science & Technology**, v. 38, n. 14, p. 3933–40, 2004.

BOUWER, H. Integrated water management: Emerging issues and challenges. **Agricultural Water Management**, v. 45, n. 3, p. 217–228, 2000.

CAMPBELL, J. L.; YOON, M.; CLEWELL, H. J. A case study on quantitative in vitro to in vivo extrapolation for environmental esters: Methyl-, propyl- and butylparaben. **Toxicology**, v. 332, p. 67–76, 2015.

CANOSA, P.; RODRÍGUEZ, I.; RUBÍ, E.; NEGREIRA, N.; CELA, R. Formation of halogenated by-products of parabens in chlorinated water. **Analytica chimica acta**, v. 575, n. 1, p. 106–13, 2006.

CARP, O. Photoinduced reactivity of titanium dioxide. **Progress in Solid State Chemistry**, v. 32, n. 1-2, p. 33–177, 2004.

CASAS FERREIRA, A. M.; MÖDER, M.; FERNÁNDEZ LAESPADA, M. E. GC-MS determination of parabens, triclosan and methyl triclosan in water by in situ derivatisation and stir-bar sorptive extraction. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 399, n. 2, p. 945–53, 2011.

CHANG, H. S.; CHOO, K. H.; LEE, B.; CHOI, S. J. The methods of identification, analysis, and removal of endocrine disrupting compounds (EDCs) in water. **Journal of Hazardous Materials**, v. 172, n. 1, p. 1–12, 2009.

CHEN, G. Electrochemical technologies in wastewater treatment. **Separation and Purification Technology**, v. 38, n. 1, p. 11–41, 2004.

CHEN, X.; MAO, S. S. Titanium dioxide nanomaterials: synthesis, properties, modifications, and applications. **Chemical Reviews**, v. 107, n. 7, p. 2891–959, 2007.

CHONG, M. N.; JIN, B.; CHOW, C. W. K.; SAINT, C. Recent developments in photocatalytic water treatment technology: A review. **Water Research**, v. 44, n. 10, p. 2997–3027, 2010

Cruz, E. C. S. **Estudo de novas moléculas antitumorais em linhagens de células de câncer de próstata e mama hormônio-dependentes**. 2015. 99 f. Dissertação (Mestrado - Química Orgânica e iológica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

DAGHRIR, R.; DIMBOUKOU-MPIRA, A.; SEYHI, B.; DROGUI, P. Photosonochemical degradation of butyl-paraben: Optimization, toxicity and kinetic studies. **Science of the Total Environment**, v. 490, p. 223–234, 2014.

DAGHRIR, R.; DROGUI, P.; ROBERT, D. Photoelectrocatalytic technologies for environmental applications. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 238, p. 41–52, 2012.

DARBRE, P. D.; ALJARRAH, A.; MILLER, W. R.; COLDHAM, N. G.; SAUER M. J.; POPE G. S. Concentrations of parabens in human breast tumours. **Journal of Applied Toxicology**. v. 24, n. 1, p. 5–13, 2004.

DELGADO, B.; PINO, V.; ANDERSON, J. L.; AYALA, J. H.; AFONSO, A. M.; GONZÁLEZ, V. An in-situ extraction-preconcentration method using ionic liquid-based surfactants for the determination of organic contaminants contained in marine sediments. **Talanta**, v. 99, p. 972–83, 2012.

DODDS, E. C., GOLDBERG, L.; LAWSON, W. Estrogenic activity of certain synthetic compounds. **Nature**. v. 141, p. 247–248, 1938.

EUROPERAN COMMISSION. Scientific committee on consumer safety (SCCS). **Clarification on Opinion SCCS/1348/10 in the light of the Danish clause of safeguard banning the use of parabens in cosmetic products intended for children under three years of age**. 2011. Disponível em: <http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_069.pdf>. Acesso em: 10 nov. 2015.

ELDER, R. L. Final report on the safety assessment of methylparaben, ethylparaben, propylparaben, and butylparaben. **International Journal of Toxicology**, v. 3, n. 5, p. 147–209, 1984.

FANG, T.; YANG, C.; LIAO, L. Photoelectrocatalytic degradation of high COD dipterex pesticide by using TiO₂/Ni photo electrode. **Journal of Environmental Sciences (China)**, v. 24, n. 6, p. 1149–1156, 2012.

FERREIRA, A. M. C.; MÖDER, M.; LAESPADA, M. E. F. Stir bar sorptive extraction of parabens, triclosan and methyl triclosan from soil, sediment and sludge with in situ derivatization and determination by gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 25, p. 3837–3844, 2011.

FREDERIKSEN, H.; JØRGENSEN N, A. A. Parabens in urine, serum and seminal plasma from healthy Danish men determined by liquid chromatography–tandem mass spec- trometry (LC–MS/MS). **Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology**, v. 21, n. 3, p. 262–271, 2011.

GAGNÉ, F.; BLAISE, C.; SALAZAR, M.; SALAZAR, S.; HANSEN, P. D. Evaluation of estrogenic effects of municipal effluents to the freshwater mussel *Elliptio complanata*. **Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & pharmacology**. v. 128, n. 2, p. 213–25, 2001.

GALINARO, C. A.; PEREIRA, F. M.; VIEIRA, E. M. Determination of parabens in surface water from Mogi Guaçu River (São Paulo, Brazil) using dispersive liquid-liquid microextraction based on low density solvent and LC-DAD. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 26, n. 11, p. 2205-2213, 2015.

GARRISON A.W. , POPE J. D., Allen, F. R. GC/MS Analysis of organic compounds in domestic wastewater. In : Identification and analysis of organic pollutants in water. **Ann Arbor Science**, p. 517 - 566. 1976.

GMUREK, M.; ROSSI, A. F.; MARTINS, R. C.; QUINTA-FERREIRA, R. M.; LEDAKOWICZ, S. Photodegradation of single and mixture of parabens – Kinetic, by-products identification and cost-efficiency analysis. **Chemical Engineering Journal**, v. 276, p. 303–314, 2015.

GOLDEN, R.; GANDY, J.; VOLLMER, G. A review of the endocrine activity of parabens and implications for potential risks to human health. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 35, n. 5, p. 435–458, 2005.

GOMATHI DEVI, L.; GIRISH KUMAR, S.; MOHAN REDDY, K.; MUNIKRISHNAPPA, C. Photodegradation of methyl orange an azo dye by advanced Fenton process using zero valent metallic iron: influence of various reaction parameters and its degradation mechanism. **Journal of Hazardous Materials**, v. 164, n. 2-3, p. 459–67, 2009.

GONG, D.; GRIMES, C. A.; VARGHESE, O. K.; DICKEY, E. C. Titanium oxide nanotube arrays prepared by anodic oxidation. **Journal of Materials Research**, v.16, n. 12, p. 3331–3334, 2001

GRYGLIK, D.; LACH, M.; MILLER, J. S. The aqueous photosensitized degradation of butylparaben. **Photochemical & Photobiological Sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology**, v. 8, n. 4, p. 549–55, 2009.

HAMBLEEN, E. L.; CRONIN, M. T. D.; SCHULTZ, T. W. Estrogenicity and acute toxicity of selected anilines using a recombinant yeast assay. **Chemosphere**, v. 52, n. 7, p. 1173–81, 2003.

HANDA, O.; KOKURA, S.; ADACHI, S.; TAKAGI, T.; NAITO, Y.; TANIGAWA, T.; YOSHIDA, N.; YOSHIKAWA, T. Methylparaben potentiates UV-induced damage of skin keratinocytes. **Toxicology**, v. 227, n. 1-2, p. 62–72, 2006.

HEIT, G.; NEUNER, A.; SAUGY, P. Y.; BRAUN, A. M. Vacuum-UV (172 nm) actinometry. The quantum yield of the photolysis of water. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 102, n. 28, p. 5551–5561, 1998.

HENRY, V., HELBRONNER, A., RECKLINGHAUSEN, M. Nouvelles recherches sur la sterilization de grandes quantités d'eau par les rayons ultraviolets. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**, v. 151, p. 677 – 680, 1910.

HERRERA-HERRERA, A. V.; ASENSIO-RAMOS, M.; HERNÁNDEZ-BORGES, J.; RODRÍGUEZ-DELGADO, M. Á. Dispersive liquid-liquid microextraction for determination of organic analytes. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 7, p. 728–751, 2010.

HIGNITE, C.; AZARNOFF, D. L. Drugs and drug metabolites as environmental contaminants: Chlorophenoxyisobutyrate and salicylic acid in sewage water effluent **Life Sciences**, n. 20, n. 2, p. 337–341, 1977.

HIJNEN, W. A. M.; BEERENDONK, E. F.; MEDEMA, G. J. Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: a review. **Water Research**, v. 40, n. 1, p. 3–22, 2006.

HOFFMANN, M. R.; MARTIN, S. T.; CHOI, W.; BAHNEMANN, D. W. Environmental applications of semiconductor photocatalysis. **Chemical Reviews**, v. 95, n. 1, p. 69–96, 1995.

JIMÉNEZ-DÍAZ, I.; VELA-SORIA, F.; ZAFRA-GÓMEZ, A.; NAVALÓN, A.; BALLESTEROS, O.; NAVEA, N.; FERNÁNDEZ, M. F.; OLEA, N.; VÍLCHEZ, J. L. A new liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for determination of parabens in human placental tissue samples. **Talanta**, v. 84, n. 3, p. 702–9, 2011.

JONKERS, N.; KOHLER, H.-P. E.; DAMMSHÄUSER, A.; GIGER, W. Mass flows of endocrine disruptors in the Glatt River during varying weather conditions. **Environmental Pollution (Barking, Essex : 1987)**, v. 157, n. 3, p. 714–23, 2009.

JONKERS, N., A. SOUSA, S. G. OLIVEIRA, C. M. BARROSO, H.-P. E. KOHLER, W. G. Occurrence and sources of selected phenolic endocrine disruptors in Rio de Aveiro, Portugal. **Environmental Science & Pollution Research**, v. 17, n. 4, p. 834 – 843, 2010.

KANG, K.-S.; CHE, J.-H.; RYU, D.-Y.; KIM, T.-W.; LI, G.-X.; LEE, Y.-S. Decreased sperm number and motile activity on the F1 offspring maternally exposed to butyl p-hydroxybenzoic acid (butyl paraben). **The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science**, v. 64, n. 3, p. 227–35, 2002.

KASPRZYK-HORDERN, B.; DINSDALE, R. M.; GUWY, A. J. The occurrence of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs in surface water in South Wales, UK. **Water Research**, v. 42, n. 13, p. 3498–518, 2008.

KHANI, R.; GHASEMI, J. B.; SHEMIRANI, F. Simultaneous multicomponent spectrophotometric monitoring of methyl and propyl parabens using multivariate statistical methods after their preconcentration by robust ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 122, p. 295–303, 2014.

KIM, I.; YAMASHITA, N.; TANAKA, H. Photodegradation of pharmaceuticals and personal care products during UV and UV/H₂O₂ treatments. **Chemosphere**, v. 77, n. 4, p. 518–25, 2009.

KRUTHIKA, N. L.; RAJU, G. B.; PRABHAKAR, S. Degradation of tannic acid using TiO₂ nanotubes as electrocatalyst. **Journal of Nanoscience**, v. 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2014/481023>>. Acesso em: 26 jan. 2016.

KRYLOV, V. A.; KRYLOV, A. V.; MOSYAGIN, P. V.; MATKIVSKAYA, Y. O. Liquid-phase microextraction preconcentration of impurities. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 66, n. 4, p. 331–350, 2011.

LAMBROPOULOU, D. A.; ALBANIS, T. A. Application of hollow fiber liquid phase microextraction for the determination of insecticides in water. **Journal of Chromatography A**, v. 1072, n. 1, p. 55–61, 2005.

LI, X. Z.; LI, F. B.; FAN, C. M.; SUN, Y. P. Photoelectrocatalytic degradation of humic acid in aqueous solution using a Ti/TiO₂ mesh photoelectrode. **Water Research**, v. 36, n. 9, p. 2215–2224, 2002.

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

LIAO, C.; KANNAN, K. Concentrations and composition profiles of parabens in currency bills and paper products including sanitary wipes. **Science of the Total Environment**, v. 475, p. 8–15, 2014.

LIAO, C.; LIU, F.; KANNAN, K. Occurrence of and dietary exposure to parabens in foodstuffs from the United States. **Environmental Science & Technology**, v. 47, n. 8, p. 3918–25, 2013.

LIEBERT, N. A. Final Report on the safety assessment of methylparaben, ethylparaben, propylparaben and butylparaben. **Journal of the American College of Toxicology**, v. 3, n. 5, p. 147 - 209, 1984.

LIN, Y.; FERRONATO, C.; DENG, N.; CHOVELON, J.-M. Study of benzylparaben photocatalytic degradation by TiO₂. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 104, n. 3-4, p. 353–360, 2011.

MAIA, D.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 651–666, 2007.

MARTINS, M. L.; PRIMEL, E. G.; CALDAS, S. S.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME). Fundamentos e aplicações. **Scientia Chromatographica**. v 4, n 1, p. 35 -51, 2012.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Manual de garantia da qualidade analítica. Resíduos e contaminantes em alimentos**. Brasília, 2011. p. 1 - 248

MARGRET SCHLUMPFA, KARIN KYPKEB, MATTHIAS WITTASSEKC, JUERGEN ANGERERC, HERMANN MASCHERD, DANIEL MASCHERD, CORA VÖKTE, MONIKA BIRCHLERE, W. L. Exposure patterns of UV filters, fragrances, parabens, phthalates, organochlor pesticides, PBDEs, and PCBs in human milk: Correlation of UV filters with use of cosmetics. **Chemosphere**, v. 81, n. 10, p. 1171–1183, 2010.

MARQUES, J. F. Z. **Síntese e caracterização de sistemas nanoestruturados para fotoeletrocatalise**. 2014. 67 f. Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Nanociências) - Centro Universitário Franciscano, Santa Maria - RS, 2014.

MARTÍNEZ-HUITLE, C. A; FERRO, S. Electrochemical oxidation of organic pollutants for the wastewater treatment: direct and indirect processes. **Chemical Society Reviews**, v. 35, n. 12, p. 1324–40, 2006.

MELO, S. A. S.; TROVÓ, A. G.; BAUTITZ, I. R.; NOGUEIRA, R. F. P. Degradação de fármacos residuais por processos oxidativos avançados. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 188–197, 2009.

MO, S.D.; CHING, W. Y. Electronic and optical properties of three phases of titanium dioxide: Rutile, anatase, and brookite. **Physical Review B**, v. 51, n. 19, p. 13023–13032, 1995.

NAKATA, K.; FUJISHIMA, A. TiO₂ photocatalysis: Design and applications. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v. 13, n. 3, p. 169–189, 2012.

NIELSEN, K. F.; MA, M.; RANK, C.; FRISVAD, J. C.; LARSEN, T. O. Dereplication of microbial natural products by LC-DAD-TOFMS. **Journal of Natural Products**, v. 74, p. 2338 – 2348, 2011.

NÚÑEZ, L.; TADEO, J. L.; GARCÍA-VALCÁRCEL, A I.; TURIEL, E. Determination of parabens in environmental solid samples by ultrasonic-assisted extraction and liquid chromatography with triple quadrupole mass spectrometry. **Journal of Chromatography. A**, v. 1214, n. 1-2, p. 178–82, 2008.

OISHI, S. Effects of butylparaben on the male reproductive system in rats. **Toxicology and Industrial Health**, v. 17, n. 1, p. 31–39, 2001.

OISHI, S. Effects of parabens on the male reproductive system in rats. **Environmental Sciences: an International Journal of Environmental Physiology and Toxicology**, v. 9, n. 2-3, p. 181, 2002.

OSUGI, M. E.; RAJESHWAR, K.; FERRAZ, E. R. A.; OLIVEIRA, D. P.; ARAÚJO, A. R.; ZANONI, M.V.B. Comparison of oxidation efficiency of disperse dyes by chemical and photoelectrocatalytic chlorination and removal of mutagenic activity. **Electrochimica Acta**, v. 54, n. 7, p. 2086–2093, 2009.

PASCHOAL, F. M. M.; ANDERSON, M. A.; ZANONI, M. V. B. Photoelectrocatalytic oxidation of anionic surfactant used in leather industry on nanoporous Ti/TiO₂ Electrodes. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 4, p. 803–810, 2008.

PEDERSEN, K. L.; PEDERSEN, S. N.; CHRISTIANSEN, L. B.; KORSGAARD, B.; BJERREGAARD, P. The preservatives ethyl-, propyl- and butylparaben are oestrogenic in an in vivo fish assay. **Pharmacology & Toxicology**, v. 86, n. 3, p. 110–3, 2000.

PELEGRINI, R.; PERALTA-ZAMORA, P.; ANDRADE, A. R. DE; REYES, J.; DURÁN, N. Electrochemically assisted photocatalytic degradation of reactive dyes. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 22, n. 2, p. 83–90, 1999.

PENA, M. T.; CASAIS, M. C.; MEJUTO, M. C.; CELA, R. Development of an ionic liquid based dispersive liquid–liquid microextraction method for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 36, p. 6356–6364, 2009.

PENG, X.; YU, Y.; TANG, C. Occurrence of steroid estrogens, endocrine-disrupting phenols, and acid pharmaceutical residues in urban riverine water of the Pearl River Delta, South China. **The Science of the Total Environment**, v. 397, n. 1-3, p. 158–66, 2008.

PEREIRA, V. J.; LINDEN, K. G.; WEINBERG, H. S. Evaluation of UV irradiation for photolytic and oxidative degradation of pharmaceutical compounds in water. **Water Research**, v. 41, n. 19, p. 4413–23, 2007.

PRADOS-JOYA, G.; SÁNCHEZ-POLO, M.; RIVERA-UTRILLA, J.; FERRO-GARCÍA, M. Photodegradation of the antibiotics nitroimidazoles in aqueous solution by ultraviolet radiation. **Water Research**, v. 45, n. 1, p. 393–403, 2011.

PROSEN, H.; ZUPANČIČ-KRALJ, L. Solid-phase microextraction. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 18, n. 4, p. 272–282, 1999.

QIU, J.; ZHANG, S.; ZHAO, H. Nanostructured TiO₂ photocatalysts for the determination of organic pollutants. **Journal of Hazardous Materials**, v. 211-212, p. 381–388, 2012.

QUAN, X.; RUAN, X.; ZHAO, H.; CHEN, S.; ZHAO, Y. Photoelectrocatalytic degradation of pentachlorophenol in aqueous solution using a TiO₂ nanotube film electrode. **Environmental Pollution (Barking, Essex : 1987)**, v. 147, n. 2, p. 409–14, 2007.

RASTOGI, S. C., SCHOUTEN, A., DE KRUIJF, N., AND WEIJLAND, J. W. (1995). Contents of methyl-, ethyl-, propyl-, butyl-, and benzylparaben in cosmetic products. **Contact Dermatitis**, v. 32, n. 1, p. 28–30, 1995.

REGUEIRO, J.; BECERRIL, E.; GARCIA-JARES, C.; LLOMPART, M. Trace analysis of parabens, triclosan and related chlorophenols in water by headspace solid-phase microextraction with in situ derivatization and gas chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 23, p. 4693–4702, 2009.

REZAEI, M.; ASSADI, Y.; MILANI HOSSEINI, M.-R.; AGHAEI, E.; AHMADI, F.; BERIJANI, S. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. **Journal of Chromatography. A**, v. 1116, n. 1-2, p. 1–9, 2006.

REZAEI, M.; YAMINI, Y.; FARAJI, M. Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method. **Journal of chromatography. A**, v. 1217, n. 16, p. 2342–57, 2010.

ROSA, A. P.P. **Síntese e caracterização de eletrodos de nanotubos de Ti / TiO₂ para aplicação em fotoeletrocatalise de ti / tio 2 para aplicação em fotoeletrocatalise**. 2012. 72 f. Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Química) - Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande - MS, 2012.

RODRÍGUEZ-CABO, T.; RODRÍGUEZ, I.; RAMIL, M.; CELA, R. Dispersive liquid–liquid microextraction using non-chlorinated, lighter than water solvents for gas chromatography–mass spectrometry determination of fungicides in wine. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 38, p. 6603–6611, 2011.

ROLOFF, G. A. **Degradação do hormônio estradiol por eletrólise , fotólise e fotoeletrocatalise**. 2007. 84 f. Dissertação (Mestrado em Físico-Química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

ROUTLEDGE, E. J.; PARKER, J.; ODUM, J.; ASHBY, J.; SUMPTER, J. P. Some alkyl hydroxy benzoate preservatives (parabens) are estrogenic. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 153, n. 1, p. 12–19, 1998.

ROVARON, CARLOS EDUARDO. **Ocupação da região da caldeira vulcânica de Poços de Caldas-MG (Séc.XVIII-XIX)**. 2009. 253 f. Mestrado - Faculdade de Filosofia, Letras e Ciências Humanas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

RUTHANN A. RUDEL, DAVID E. CAMANN, JOHN D. SPENGLER, LEO R. KORN, A. J. G. B. Other endocrine-disrupting compounds in indoor air and dust rudel. **Environmental Science & Technology**, v. 37, n. 20, p. 4543–4553, 2003.

SABALITSCHKA, T. Application of ethyl p-hydroxybenzoate in maintenance of sterility, in sterilization and in disinfection. **Archives of Pharmacol**, v. 268, p. 653–673, 1930.

SANTIAGO ESPLUGASA, DANIELE M. BILAB, LUIZ GUSTAVO T. KRAUSEC, M. D. Ozonation and advanced oxidation technologies to remove endocrine disrupting chemicals (EDCs) and pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in water effluents. **Journal of Hazardous Materials**, v. 149, n. 3, p. 631–642, 2007.

SARAFRAZ-YAZDI, A.; AMIRI, A. Liquid-phase microextraction. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 1, p. 1–14, 2010.

SIRTORI, C. **Estudo da potencialidade do processo fotoeletroquímico para remediação de águas contaminadas por cianobactérias**. 2006. 109 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba - Pr, 2006.

SONI, M. G.; CARABIN, I. G.; BURDOCK, G. A. Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens). **Food and Chemical Toxicology : an International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 43, n. 7, p. 985–1015, 2005.

SONNENSCHN, C.; SOTO, A M. An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 65, n. 1-6, p. 143–50, 1998.

SPERLING, M. VON. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. 3rd Ed. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2005. 108 p.

TABRIZI, A. B. Development of a dispersive liquid-liquid microextraction method for iron speciation and determination in different water samples. **Journal of Hazardous Materials**, v. 183, n. 1-3, p. 688–93, 2010.

TAY, K. S.; RAHMAN, N. A.; ABAS, M. R. BIN. Ozonation of parabens in aqueous solution: kinetics and mechanism of degradation. **Chemosphere**, v. 81, n. 11, p. 1446–53, 2010.

TEIXEIRA, C. P. A. B.; JARDIM, W. F. **Processos oxidativos avançados: conceitos Teóricos**. Campinas: Unicamp/ IQ/LQA, 2004. 83 p. (Caderno temático, v. 3).

TERNES, T. A. Occurrence of drugs in german sewage treatment plants and rivers. **Water Research**, v. 32, n. 11, p. 3245–3260, 1998.

TSCHIRCH, J.; DILLERT, R.; BAHNEMANN, D.; PROFT, B.; BIEDERMANN, A.; GOER, B. Photodegradation of methylene blue in water, a standard method to determine the activity of photocatalytic coatings? **Research on Chemical Intermediates**, v. 34, n. 4, p. 381–392, 2008.

TSOUROUNAKI, K.; ARONIADA, G.; PSILLAKIS, E. Photodegradation of methylparaben in various environmental aqueous solutions by 254 nm irradiation. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON INDUSTRIAL AND HAZARDOUS WASTE MANAGEMENT, 3., 2012, Chania, Crete - Greece. **Proceedings...** Create: International Scientific Committee, 2012. p. 1 - 7.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Environmental technology verification report**. Newark, 2006. p. 1 - 107.

VALENTE, A. L. P.; RIEDO, C. R. F.; AUGUSTO, F. Análise quantitativa por cromatografia. **Chemkeys**, p. 1–10, 2003.

VALKOVA, N.; LÉPINE, F.; VALEANU, L.; DUPONT, M.; LABRIE, I.; BISAILLON, J-G.; BEAUDET, R.; SHARECK, F.; VILLEMUR, R. Hydrolysis of 4-hydroxybenzoic acid esters (parabens) and their aerobic transformation into phenol by the resistant enterobacter cloacae strain em. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 6, p. 2404–2409, 2001.

VELEGRAKI, T.; HAPESHI, E.; FATTA-KASSINOS, D.; POULIOS, I. Solar-induced heterogeneous photocatalytic degradation of methyl-paraben. **Applied Catalysis B: Environmental**, p. 1–10, 2014.

VIGLINO, L.; PRÉVOST, M.; SAUVÉ, S. High throughput analysis of solid-bound endocrine disruptors by LDTD-APCI-MS/MS. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 13, n. 3, p. 583–90, 2011.

VISHNU PAREEK, SIEWHUI CHONG, M. T. AND A. A. A. Leak detection of gas transport pipelines based on wigner distribution. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ADVANCED CONTROL OF INDUSTRIAL PROCESSES, 2011, Thousand Islands Lake, China. **Proceedings... IEEE**, 2011. p. 23–26.

WAGGOT, A. Trace organic substances in the River Lee. In: COOPER, WJ. **Chemistry in Water Reuse**. Ann Arbor, Michigan: Ann Arbor Science Publisher, 1981. v. 2, p. 55 - 99.

WANG, L.; LIAO, C.; LIU, F.; WU, Q.; GUO, Y.; MOON, H-B.; NAKATA, H.; KANNAN, K. Occurrence and human exposure of p-hydroxybenzoic acid esters (parabens), bisphenol A diglycidyl ether (BADGE), and their hydrolysis products in indoor dust from the United States and three East Asian countries. **Environmental Science & Technology**, v. 46, n. 21, p. 11584–93, 2012.

WARDENCKI, W.; CURYLO, J.; NAMIEŚNIK, J. Trends in solventless sample preparation techniques for environmental analysis. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 70, p. 275–288, 2007.

WENZEL, A.; MÜLLER, J.; TERNES, T. Study on endocrine disruptors in drinking water. **Final Report ENV.D.1/ETU/2000/0083**, Schmallingenberg and Wiesbaden, February 26, 1 - 166 f. 2003.

WU, T.; WANG, C.; WANG, X.; MA, Q. Simultaneous determination of 21 preservatives in cosmetics by ultra performance liquid chromatography. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 30, n. 5, p. 367–72, 2008.

XIE, K.; SUN, L.; WANG, C.; LAI, Y.; WANG, M.; CHEN, H.; LIN, C. Photoelectrocatalytic properties of Ag nanoparticles loaded TiO₂ nanotube arrays

prepared by pulse current deposition. **Electrochimica Acta**, v. 55, n. 24, p. 7211–7218, 2010.

YANG, T.-J.; TSAI, F.-J.; CHEN, C.-Y.; YANG, T. C.-C.; LEE, M.-R. Determination of additives in cosmetics by supercritical fluid extraction on-line headspace solid-phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 668, n. 2, p. 188–94, 2010.

YU, H.; ZHENG, X.; YIN, Z.; TAG, F.; FANG, B.; HOU, K. Preparation of nitrogen-doped TiO₂ nanoparticle catalyst and its catalytic activity under visible light. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 15, p. 802–805, 2007.

ZANG, X. H.; WU, Q. H.; ZHANG, M. Y.; XI, G. H.; WANG, Z. Developments of dispersive liquid-liquid microextraction technique. **Fenxi Huaxue/ Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 37, n. 2, p. 161–168, 2009.