



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS - EQA
CURSO DE QUÍMICA BACHARELADO

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO EMPREGANDO SILLME,
HPLC-DAD E LC-MS/MS PARA DETERMINAÇÃO DE PARABENOS
EM AMOSTRAS DE ÁGUA**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Antunielle Schneider

Rio Grande

2016

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO EMPREGANDO SILLME,
HPLC-DAD E LC-MS/MS PARA DETERMINAÇÃO DE PARABENOS
EM AMOSTRAS DE ÁGUA**

por

Antunielle Schneider

Trabalho apresentado ao curso de Química Bacharelado da Universidade Federal do Rio Grande (FURG, RS), como requisito para obtenção do grau de **Bacharel em Química**.

Orientador: Prof. Dr. Ednei Gilberto Primel

Rio Grande, RS, Brasil

2016

DECLARAÇÃO DE RESPONSABILIDADE E AUTENTICIDADE

Eu, **Antunielle Schneider**, declaro que este trabalho é de minha autoria, tendo sido elaborado com base nos recursos aos quais faço referência ao longo do texto e experiências no decorrer do referido trabalho.

Assinatura do Orientando

Rio Grande, 30 de novembro de 2016.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Ednei Gilberto Primel
Universidade Federal do Rio Grande - FURG

Avaliador: Prof. Dr. Bruno Meira Soares
Universidade Federal do Rio Grande - FURG

Avaliadora: Dr^a. Sergiane Caldas Barbosa
Universidade Federal do Rio Grande - FURG

“O rio atinge seus objetivos porque aprendeu a contornar obstáculos.”
Lao-Tsé

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Ednei Gilberto Primel**, pela orientação, por seu auxílio no desenvolvimento deste trabalho e acima de tudo, por seu incentivo durante o mesmo e no decorrer da minha graduação.

Ao **Prof. Dr. Bruno Meira Soares**, pois além de participar da banca desse trabalho, é um grande amigo e colega de laboratório, que sempre me auxiliou durante os seminários de grupo e que também esclareceu algumas dúvidas durante a minha graduação.

A **Dr^a. Sergiane**, por sua orientação desde os primeiros momentos da minha iniciação científica, por estar sempre ao meu lado à disposição para responder qualquer pergunta e solucionar os problemas que surgiram no decorrer desta caminhada. Agradeço também pelo seu incentivo, principalmente nos seminários de grupo, e por sua amizade.

Ao meu esposo e colega de trabalho, **Jean Lucas**, por me auxiliar não só no desenvolvimento deste trabalho, mas também nas dúvidas existentes em algumas disciplinas da graduação. Além disso, por estar sempre ao meu lado me apoiando e suportando todas as minhas crises, me incentivando sempre a seguir em frente. Obrigada por tudo, amo você!

Aos meus pais, **Eva e Mário**, por seu apoio em todas as minhas decisões, por seu incentivo, pelo entendimento quanto as minhas ausências, pelos momentos em que sofreram e se preocuparam junto comigo e principalmente pelo carinho, amor e pela dedicação com relação a minha formação pessoal e profissional. Se não fosse por vocês eu nada seria, essa vitória é nossa! Amo vocês!

Ao meu irmão, **Thiago**, pelo apoio e incentivo, por seus conselhos e pelos momentos de descontração. Além de ser um irmão que vale ouro, você é um grande amigo que sei que posso contar sempre! Amo você!

A minha cunhada, **Daiane**, e ao meu irmão, **Thiago**, por me darem o maior presente que eu poderia receber no decorrer da minha graduação, o meu sobrinho, **Felipe**. Ser tia é transbordar de amor, é olhar para o sorriso do Felipe, receber o seu abraço, o ouvir gritando tia "Néli" e esquecer todos os problemas. Obrigada por tudo, amo vocês!

A minha **família carioca**, que esteve sempre na torcida, oferecendo apoio e incentivo, além dos inesquecíveis momentos de descontração. Amo vocês!

Aos meus **colegas do LACOM** pela amizade, companheirismo e pelos momentos de descontração com seus assuntos polêmicos. Obrigada por todo o apoio!

Aos meus amigos estrangeiros, **Jahir, Ana e Diana**, podem ter certeza que vocês marcaram a minha vida. Obrigada pelos momentos de parceria não só no LACOM, mas também fora do laboratório. Adoro vocês e vou sentir saudades!

As minha amigas e agora colegas de profissão, **Cristiane e Sabrina**, pelos momentos vividos durante a graduação. Nossa caminhada não foi fácil, sofremos, reclamamos e choramos, mas tudo teria sido ainda pior se não estivéssemos juntas. Adoro vocês e vou sentir saudades!

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO EMPREGANDO SILLME, HPLC-DAD E LC-MS/MS PARA DETERMINAÇÃO DE PARABENOS EM AMOSTRAS DE ÁGUA

Autor: Antunielle Schneider
Orientador: Prof. Dr. Ednei Gilberto Primel

Rio Grande, 30 de novembro de 2016.

O desenvolvimento de métodos para determinação de parabenos em diferentes amostras torna-se cada vez mais importante no âmbito analítico, visto a sua ampla utilização como conservantes em diversos produtos e também pelo fato de que esses compostos podem ser prejudiciais a saúde animal e humana. Quando se trata da análise de parabenos em água, o estudo torna-se muito importante, visto que, até o momento não existe legislação para o controle desses compostos em água. Nesse trabalho, estudou-se a técnica de Microextração Líquido-Líquido Induzida pelo Efeito *Salting-out* (SILLME) para a extração de parabenos em amostras de água. As determinações foram realizadas por Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS). Todas as curvas analíticas apresentaram boa linearidade, com coeficientes de correlação (r) superiores a 0,99. O método mostrou-se exato e preciso, com recuperações que variaram entre 103,4-120,1% e com desvio padrão relativo (RSD) $\leq 4,1\%$ para os analitos em estudo. O efeito matriz foi baixo, na faixa de $\pm 20\%$, para todos os analitos. O método desenvolvido mostrou-se adequado para a determinação de parabenos em amostras de água, apresentando as vantagens de ser rápido, fácil, utilizar baixo volume de amostra e solvente, além de gerar menores volumes de resíduos quando comparados aos métodos tradicionalmente empregados.

Palavras-chave: Parabenos; Água; SILLME; Cromatografia líquida.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Reação de síntese de alguns parabenos	20
Figura 2 - Procedimento da SPE	26
Figura 3 - Procedimento da SPME	26
Figura 4 - Procedimento da DLLME	27
Figura 5 - Procedimento da SILLME	29
Figura 6 - Cromatograma obtido por meio de um padrão de concentração 1 mg L^{-1} com a mistura dos analitos	38
Figura 7 - Espectros obtidos por meio de um padrão de concentração 1 mg L^{-1} com a mistura dos analitos	38
Figura 8 - Recuperações (%) para os analitos em estudo utilizando acetonitrila como solvente extrator. Barras de erro indicam RSD ($n = 3$). Condições de extração: volume de amostra, 5 mL; solvente extrator (acetonitrila), 1000 μL ; sal (MgSO_4), 2 g.	40
Figura 9 - Separação de fases: sistema acetonitrila/ MgSO_4	40
Figura 10 - Separação de fases utilizando 1000 μL (1) e 500 μL (2) de solvente extrator	41
Figura 11 - Recuperações (%) para os analitos em estudo empregando a variação do pH da amostra. Barras de erro indicam RSD ($n = 3$). Condições de extração: volume de amostra, 5 mL; solvente extrator (acetonitrila), 500 μL ; sal (MgSO_4), 2 g.	42
Figura 12 - Recuperações (%) para os analitos em estudo empregando a variação do tempo de agitação na primeira etapa. Barras de erro indicam RSD ($n = 3$). Condições de extração: volume de amostra, 5 mL; solvente extrator (acetonitrila), 500 μL ; sal (MgSO_4), 2 g.	44
Figura 13 - Recuperações (%) para os analitos em estudo empregando a variação do tempo de agitação na segunda etapa. Barras de erro indicam RSD ($n = 3$). Condições de extração: volume de amostra, 5 mL; solvente extrator (acetonitrila), 500 μL ; sal (MgSO_4), 2 g.	44
Figura 14 - Recuperações (%) para os analitos em estudo empregando duas etapas de agitação e uma única etapa. Barras de erro indicam RSD ($n = 3$). Condições de extração: volume de amostra, 5 mL; solvente extrator (acetonitrila), 500 μL ; sal (MgSO_4), 2 g.	45
Figura 15 - Esquema da SILLME com as melhores condições	46
Figura 16 - Cromatograma obtido por meio da injeção de uma mistura dos analitos na concentração $0,1 \text{ mg L}^{-1}$	50
Figura 17 - Exatidão e precisão empregando a SILLME estudada. Barras de erros representam RSD ($n = 9$). Condições de extração: volume de amostra, 5 mL; solvente extrator (acetonitrila), 500 μL ; sal (MgSO_4), 2 g.	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estrutura química dos parabenos e suas propriedades físico-químicas.....	21
Tabela 2 - Condições estabelecidas MS/MS	48
Tabela 3 - Parâmetros instrumentais	49
Tabela 4 - Gradiente de eluição	49
Tabela 5 - LOD e LOQ instrumentais e do método	50
Tabela 6 - Curvas analíticas no solvente, extrato e efeito matriz	51
Tabela 7 - Comparação do método proposto com outros métodos	53

LISTA DE SIGLAS

BePB, Benzilparabeno

BuPB, Butilparabeno

DLLME, Microextração Líquido-Líquido Dispersiva, do inglês *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*

EM, efeito matriz, do inglês *Matrix effect*

ESI, ionização por eletrospray, do inglês *electrospray ionization*

EtPB, Etilparabeno

HPLC-DAD, Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos, do inglês *high pressure liquid chromatography with diode array detector*

iBuPB, Isobutilparabeno

iPrPB, Isopropilparabeno

$\log K_{ow}$, coeficiente de partição octanol-água

LC-MS/MS, Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial, do inglês *Liquid chromatography tandem mass spectrometry*

LLE, Extração Líquido-Líquido, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*

LOD, Limite de detecção, do inglês *Limit of detection*

LOD_i, LOD instrumental

LOD_m, LOD do método

LOQ, Limite de quantificação, do inglês *Limit of quantification*

LOQ_i, LOQ instrumental

LOQ_m, LOQ do método

m/z, razão massa-carga

MePB, Metilparabeno

MRM, Monitoramento de Reações Múltiplas, do inglês *Multiple reaction monitoring*

nBuPB, n-Butilparabeno

nPrPB, n-Propilparabeno

pH, potencial hidrogeniônico

PhPB, Fenilparabeno

pK_a, potencial de dissociação ácida

PPCPs, Produtos Farmacêuticos e de Cuidado Pessoal, do inglês *Pharmaceuticals and Personal Care Products*

PrPB, Propilparabeno

R, recuperação

r, coeficiente de correlação linear

RSD, Desvio Padrão Relativo, do inglês *Relative Standard Deviation*

s/n, relação sinal-ruído

SALLE, Extração Líquido-Líquido Assistida por *Salting-out*, do inglês *Salting-out Assisted Liquid-Liquid Extraction*

SD-DLLME, DLLME com auxílio de solvente demulsificante, do inglês *Solvent-based Demulsification Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*

SILLME, Microextração Líquido-Líquido Induzida pelo Efeito *Salting-out*, do inglês *Salting-out Induced Liquid-Liquid Microextraction*

SPE, Extração em Fase Sólida, do inglês *Solid Phase Extraction*

SPME, Microextração em Fase Sólida, do inglês *Solid Phase Microextraction*

t_R, tempo de retenção

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	17
3. DESENVOLVIMENTO	18
3.1. Revisão Bibliográfica.....	18
3.1.1. Água.....	18
3.1.2. PPCPs e Parabenos	18
3.1.3. Técnicas de extração de parabenos em amostras de água	25
3.1.4. SILLME.....	28
3.2. Procedimentos experimentais	29
3.2.1. Instrumentação.....	30
3.2.2. Reagentes, solventes e materiais.....	30
3.2.3. Parabenos selecionados	31
3.2.4. Preparo das soluções analíticas.....	32
3.2.5. Amostras de água.....	32
3.2.6. Estudo da extração por SILLME	32
3.2.6.1. Método proposto por Du e colaboradores	33
3.2.6.2. Avaliação do solvente extrator	33
3.2.6.3. Avaliação do sal.....	33
3.2.6.4. Avaliação do volume de solvente extrator	33
3.2.6.5. Avaliação do volume de amostra	33
3.2.6.6. Avaliação da massa de sal	34
3.2.6.7. Avaliação do pH da amostra.....	34
3.2.6.8. Avaliação do tempo de agitação	34
3.2.7. Validação do método	34
3.2.7.1. Limite de Detecção e Limite de Quantificação	35
3.2.7.2. Curvas Analíticas e Linearidade.....	35
3.2.7.3. Efeito Matriz.....	36
3.2.7.4. Exatidão	36
3.2.7.5. Precisão.....	37
3.3. Resultados e discussão	37

3.3.1. Separação cromatográfica por HPLC-DAD	37
3.3.2. Estudo da extração por SILLME	39
3.3.2.1. Avaliação do solvente extrator e do sal	39
3.3.2.2. Avaliação do volume de solvente extrator	40
3.3.2.3. Avaliação do volume de amostra	41
3.3.2.4. Avaliação da massa de sal	42
3.3.2.5. Avaliação do pH da amostra.....	42
3.3.2.6. Avaliação do tempo de agitação.....	43
3.3.2.7. Extração por SILLME	46
3.3.3. Separação cromatográfica por LC-MS/MS	46
3.3.4. Validação do método por LC-MS/MS.....	50
3.3.5. Comparação do método proposto com outros métodos.....	52
4. CONCLUSÕES	54
5. RESÍDUOS	55
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, o interesse na determinação de contaminantes como os Produtos Farmacêuticos e de Cuidado Pessoal (PPCPs, do inglês *Pharmaceuticals and Personal Care Products*) tem sido crescente devido às suas características pseudo persistentes e seus potenciais efeitos nocivos para os seres humanos e para o ambiente. As principais fontes desses produtos no ambiente são águas residuais provenientes de hospitais, casas e indústrias farmacêuticas, aquicultura, pecuária e o descarte inadequado desses produtos, seja pela não utilização ou por expiração do prazo de validade dos mesmos (CARDOSO *et al.*, 2011).

As estações de tratamento de água residual não são projetadas para remover completamente a maioria desses compostos, uma vez que, eles possuem elevada solubilidade em água e baixa degradabilidade. Desta forma, esses acabam por ser liberados nas águas superficiais, sendo possível que, mesmo em baixos níveis de concentração, possam levar a mudanças sutis em organismos (CARDOSO *et al.*, 2011).

Dentre os PPCPs atualmente estudados, destaca-se a classe dos parabenos. Estes compostos são quimicamente denominados de ésteres do ácido *p*-hidroxibenzóico e são amplamente utilizados por mais de 50 anos como conservantes antimicrobianos na fabricação de produtos de higiene pessoal tais como hidratantes, maquiagens, desodorantes e produtos para o cabelo, além de medicamentos e alimentos. Os parabenos mais utilizados são o Metilparabeno (MePB), Etilparabeno (EtPB), Propilparabeno (PrPB) e Butilparabeno (BuPB). A grande utilização desses produtos pela população tornou-se importante fonte de exposição humana a esses compostos (SOUZA *et al.*, 2014).

Estudos empregando parabenos demonstraram que essas substâncias são potenciais desreguladores endócrinos, sendo sua atividade estrogênica crescente de acordo com o comprimento da cadeia lateral do substituinte (BOBERG *et al.*, 2010). Oishi observou que o BuPB apresentou efeito adverso no sistema reprodutivo de ratos machos, e que, além disso, esse composto danificava as últimas etapas da espermatogênese nos testículos desses animais (OISHI, 2002). Diversos autores também demonstraram que o uso de produtos de cuidado pessoal contendo parabenos relaciona-se diretamente com o aumento da concentração na urina desses compostos. No estudo realizado por Braun e colaboradores foi determinada a concentração na urina de três parabenos e a sua relação com o uso de produtos de cuidado pessoal em mulheres grávidas da cidade de Boston nos EUA. Foi observado que as grávidas

que utilizavam loção corporal apresentaram concentrações de BuPB e PrPB de 2 a 3 vezes maiores do que aquelas que não utilizavam (BRAUN *et al.*, 2014).

Para que seja realizada a determinação desses compostos em amostras de água é necessária uma etapa de preparo de amostra, que é considerada uma das mais críticas na sequência analítica. Nela, os analitos são separados a partir das amostras e podem ser pré-concentrados, buscando melhor seletividade, sensibilidade, exatidão e reprodutibilidade para a análise (PIAO *et al.*, 2014).

Dentre os métodos empregados para extração de diferentes compostos em amostras aquosas, pode-se citar a Extração Líquido-Líquido (LLE, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*), uma técnica exaustiva e que emprega grandes volumes de solventes orgânicos, além de técnicas que consomem menor volume de solvente e demandam menor tempo, como a Extração em Fase Sólida (SPE, do inglês *Solid Phase Extraction*), a Microextração em Fase Sólida (SPME, do inglês *Solid Phase Microextraction*), a Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME, do inglês *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*) e a recente Microextração Líquido-Líquido Induzida pelo Efeito *Salting-out* (SILLME, do inglês *Salting-out Induced Liquid-Liquid Microextraction*) (CALDAS *et al.*, 2011; DU *et al.*, 2014).

A SILLME baseia-se nos mesmos princípios da técnica de Extração Líquido-Líquido Assistida por *Salting-out* (SALLE, do inglês *Salting-out Assisted Liquid-Liquid Extraction*), na qual o fenômeno de separação de fases é induzido pelo efeito *salting-out*. Nela a fase orgânica é separada a partir de uma solução homogênea e, assim, simultaneamente os analitos são extraídos para um solvente orgânico quando sais orgânicos ou inorgânicos são adicionados. Quando comparada à LLE, a SILLME utiliza pequenos volumes de solventes com baixa toxicidade e com relação a outras técnicas, não demanda materiais de alto custo (DU *et al.*, 2014).

Considerando o grande consumo mundial de produtos contendo parabens como conservantes e os possíveis efeitos que eles podem causar ao homem e ao meio ambiente, esse trabalho teve como objetivo o desenvolvimento e a validação de um método empregando a SILLME, Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD, do inglês *High pressure liquid chromatography with diode array detector*) e Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS, do inglês *Liquid chromatography tandem mass spectrometry*) para extração e determinação de parabens em amostras de água.

Cabe salientar a importância desse estudo na geração de dados envolvendo a determinação desses compostos em água, visto que, até o momento não existe legislação estabelecida para parabenos nessa matriz.

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

Geral

❖ Desenvolver um método para a extração de parabenos em amostras de água, utilizando a técnica SILLME e a determinação por HPLC-DAD e LC-MS/MS.

Específicos

- ❖ Avaliar os parâmetros de determinação por HPLC-DAD;
- ❖ Avaliar os parâmetros de extração da técnica SILLME por HPLC-DAD;
- ❖ Validar o método de extração por LC-MS/MS, através das seguintes figuras de mérito: limites de detecção, limites de quantificação, curva analítica, linearidade, efeito matriz, exatidão e precisão.

3. DESENVOLVIMENTO

3.1. Revisão Bibliográfica

3.1.1. Água

A água é um recurso essencial para a vida no planeta, sendo amplamente empregada em uma série de atividades, como na agricultura, na geração de energia e no abastecimento público e industrial (PRIMEL *et al.*, 2012).

O crescimento da população, juntamente com o desenvolvimento das atividades industriais e agrícolas ocasiona um aumento na demanda por água, além de possíveis problemas relacionados à qualidade da mesma (CALDAS *et al.*, 2013). A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que milhões de pessoas morram por ano no mundo devido a doenças transmitidas através da água e que grande parte da população ainda não dispõe de abastecimento adequado de água potável (CALDAS, 2009).

Com os avanços tecnológicos do século 20 foram descobertos mais de 100000 produtos químicos que ainda são utilizados em sua maioria no cotidiano da população, seja em casas, indústrias ou na agricultura. Eles foram introduzidos sem que as suas consequências para o meio ambiente e, direta ou indiretamente, para a saúde do ser humano fossem notadas (PRIMEL *et al.*, 2012).

Hoje em dia, uma grande variedade de poluentes pode ser encontrada nas águas (CALDAS *et al.*, 2013). As águas superficiais, tais como rios, lagos e mares, recebem grandes quantidades de águas residuais provenientes de fontes industriais, agrícolas e domésticas, incluindo estações de tratamento de esgoto municipal. Estas águas, que podem conter grande diversidade de compostos desconhecidos, são muitas vezes utilizadas como uma fonte de água potável, bem como para o desenvolvimento de atividades agrícolas e de lazer em todo o mundo. Conseqüentemente, a sua poluição pode representar riscos para a saúde pública e graves problemas ao ecossistema aquático (OHE *et al.*, 2004; BŁĘDZKA *et al.*, 2014).

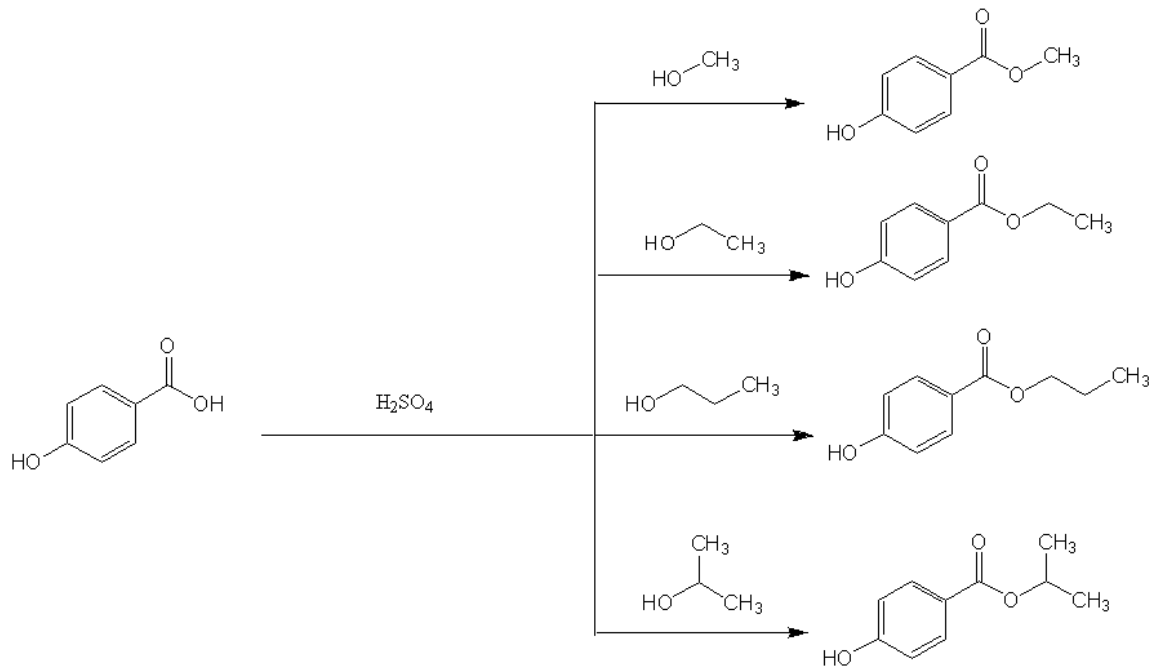
3.1.2. PPCPs e Parabenos

Entre os contaminantes frequentemente detectados nos meios aquáticos estão os PPCPs (PENG *et al.*, 2008; YAMAMOTO *et al.*, 2011; MARUBE *et al.*, 2015; CALDAS *et al.*, 2016). Descritos como contaminantes orgânicos emergentes, os PPCPs tem causado

grandes preocupações devido a sua larga escala de produção em todo o mundo e a sua vasta utilização, o que os tornou indispensáveis para a sociedade moderna. Sua determinação no ambiente também tem chamado muito a atenção devido ao fato de que essas substâncias são comumente encontradas em efluentes de estações de tratamento de águas residuais e em outras fontes de águas, em concentrações que variam de $\mu\text{g L}^{-1}$ a ng L^{-1} . Porém, o conhecimento sobre os efeitos dos mesmos sobre o meio ambiente ainda são limitados (FENT *et al.*, 2006; PRIMEL *et al.*, 2012).

Dentre os PPCPs pode ser citada a classe dos parabenos, que são produzidos pela esterificação do ácido *p*-hidroxibenzóico com diferentes álcoois na presença de um catalisador ácido (Figura 1), amplamente utilizados como conservantes em produtos de uso diário como cosméticos, alimentos, produtos de higiene pessoal e farmacêuticos (LIAO *et al.*, 2002; BŁĘDZKA *et al.*, 2014). Seu uso como conservante deve-se a algumas características, como o seu largo espectro de atividade antibacteriana, estabilidade química (em intervalos amplos de temperatura e pH), solubilidade suficiente em água (o que permite obter a sua concentração efetiva), uso relativamente seguro, baixos custos de síntese, não possuir odor ou gosto perceptíveis e a não causar mudanças na consistência ou coloração dos produtos (SONI *et al.*, 2002; BŁĘDZKA *et al.*, 2014).

Figura 1 - Reação de síntese de alguns parabenos

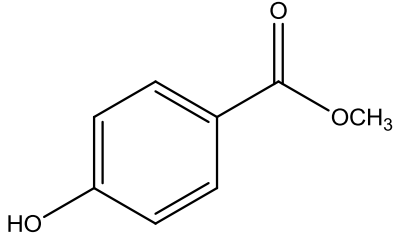
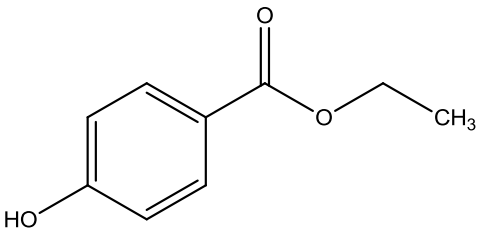
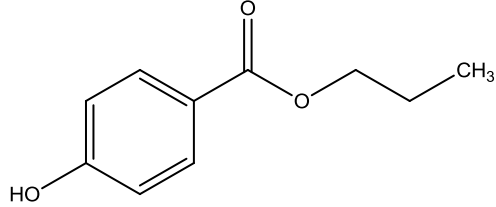


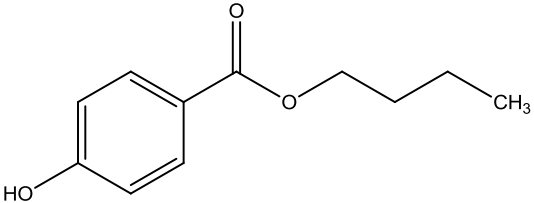
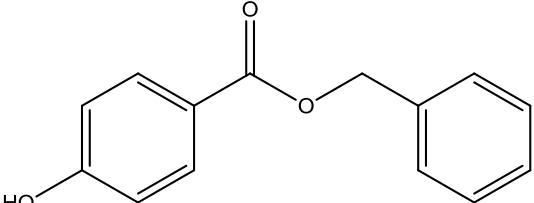
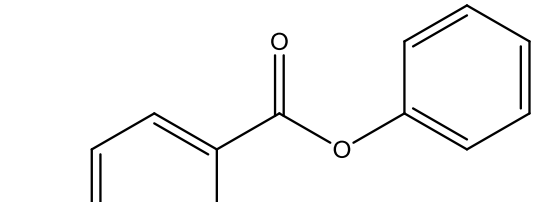
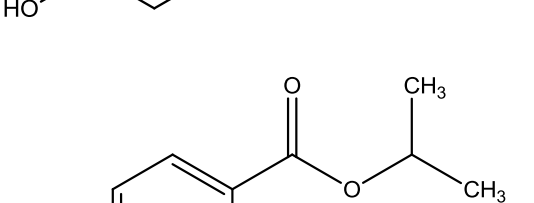
Fonte: Adaptado de Fernandes e colaboradores (2013).

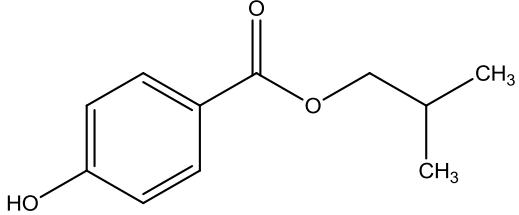
Essas características são regidas em sua maioria pelas propriedades físico-químicas dos parabenos. Por exemplo, de acordo com o pH, em soluções aquosas ácidas os parabenos são estáveis, já em soluções alcalinas são hidrolisados a ácido *p*-hidroxibenzóico e ao álcool correspondente. Além disso, com o aumento do comprimento da cadeia alquila a resistência dos parabenos à hidrólise em soluções aquosas aumenta (BŁĘDZKA *et al.*, 2014).

Outro fator importante é que as propriedades antibacterianas dos parabenos estão diretamente relacionadas ao comprimento da cadeia do grupo éster. Dessa forma, o BuPB possui 4 vezes mais capacidade de inibir o crescimento de microrganismos do que o EtPB. Entretanto, com o aumento do comprimento da cadeia alquila, o valor do $\log K_{ow}$ aumenta, resultando na diminuição da solubilidade do analito em água (SONI *et al.*, 2002; BŁĘDZKA *et al.*, 2014). As estruturas de alguns parabenos e suas propriedades físico-químicas são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Estrutura química dos parabenos e suas propriedades físico-químicas

Parabeno	Estrutura Química	Massa molecular (g mol ⁻¹)	Solubilidade em água a 25 °C (mg L ⁻¹)	log K _{ow}	pK _a
Metilparabeno (MePB)		152,15	2,50 x 10 ³	1,96	8,40
Etilparabeno (EtPB)		166,17	8,85 x 10 ²	2,47	8,34
Propilparabeno (PrPB)		180,20	5,00 x 10 ²	3,04	7,91

Butilparabeno (BuPB)		194,23	$2,07 \times 10^2$	3,57	8,47
Benzilparabeno (BePB)		228,24	$2,34 \times 10^1$	3,56	-
Fenilparabeno (PhPB)		214,22	$7,57 \times 10^1$	3,21	-
Isopropilparabeno (iPrPB)		180,20	$7,12 \times 10^2$	2,91	-

Isobutilparabeno (iBuPB)		194,23	$2,23 \times 10^2$	3,40	-
---------------------------------	--	--------	--------------------	------	---

Fonte: Adaptado de (EPA, 2013) e (ChemSpider, 2016).

No entanto, mesmo sendo considerados bons conservantes e dificilmente substituíveis, estudos recentes têm alertado que a exposição à parabenos pode causar distúrbios no sistema endócrino, tornando-se prejudicial à saúde animal e humana (VO *et al.*, 2011). Foi demonstrado que a exposição dérmica prolongada aos desodorantes que continham parabenos poderia levar ao câncer de mama (DARBRE *et al.*, 2004). Alguns estudos também relataram efeitos adversos no sistema reprodutivo de ratos machos devido aos parabenos (OISHI, 2002).

Dessa forma, a fim de reduzir os possíveis danos causados pelos parabenos à saúde humana, eles são regulamentados em vários países. A União Europeia, os Estados Unidos e o Canadá permitem uma concentração máxima de 0,4% para uso individual e 0,8% para uso de uma mistura de parabenos no cosmético final. No Japão, a concentração máxima permitida é de 1,0%. O governo Dinamarquês introduziu algumas restrições adicionais, proibindo a utilização de alguns parabenos, como o PrPB, iPrPB, BuPB e iBuPB em produtos de cuidado pessoal destinados a crianças com idades menores do que três anos (BŁĘDZKA *et al.*, 2014).

A produção e a utilização de parabenos podem resultar na contaminação do meio ambiente, uma vez que, podem ser liberados nas águas através de resíduos de tratamento de esgoto, através de fontes não pontuais e também por meio da deposição de partículas da atmosfera, sendo as águas de superfície mais suscetíveis à contaminação (BŁĘDZKA *et al.*, 2014). Peng e colaboradores determinaram MePB e PrPB em concentrações de 1062 ng L⁻¹ e 2142 ng L⁻¹, respectivamente, nos rios chineses (PENG *et al.*, 2008). Já Yamamoto e colaboradores determinaram MePB, EtPB, PrPB, BuPB e BePB em rios do Japão em concentrações de até 676 ng L⁻¹, 64 ng L⁻¹, 207 ng L⁻¹, 163 ng L⁻¹ e 2,3 ng L⁻¹, respectivamente (YAMAMOTO *et al.*, 2011). Caldas e colaboradores também determinaram MePB em concentrações de até 805 ng L⁻¹ em águas de superfície no Brasil (CALDAS *et al.*, 2016).

Geralmente, as maiores concentrações são registradas para as espécies mais utilizadas em cosméticos, como o MePB e o PrPB (BŁĘDZKA *et al.*, 2014). Com relação à água tratada, as concentrações detectadas são normalmente menores. Ferreira e colaboradores relataram a ocorrência de MePB em água da torneira na Alemanha, em concentrações de 15 ng L⁻¹ (FERREIRA *et al.*, 2011). Já Loraine e Pettigrove não detectaram esse analito em amostras de água tratada proveniente da estação de tratamento dos Estados Unidos (LORAINE e PETTIGROVE, 2006).

Maiores concentrações de parabenos também foram determinadas em amostras aquosas provenientes de esgotos residenciais antes do tratamento na estação. González-

Mariño e colaboradores relataram máximos de concentrações de 5138 ng L⁻¹, 549 ng L⁻¹, 1302 ng L⁻¹ e 181 ng L⁻¹ para MePB, EtPB, PrPB e BuPB, respectivamente, sendo que, ao realizar a comparação com as amostras após o tratamento, os autores constataram máximo de concentração de 1,5 ng L⁻¹ para o MePB e 3,6 ng L⁻¹ para o BuPB, em amostras coletadas na estação de tratamento de águas residuais da Espanha (GONZÁLEZ-MARIÑO *et al.*, 2009).

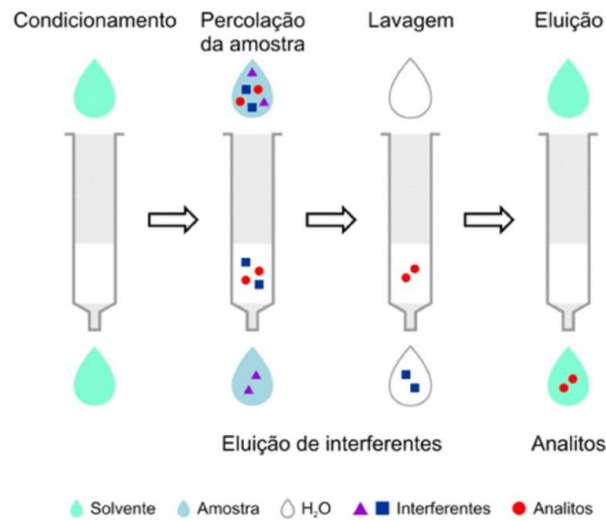
3.1.3. Técnicas de extração de parabenos em amostras de água

O preparo de amostra é considerado uma das etapas mais críticas no processo analítico, pois é nela que os analitos são separados a partir das amostras e podem ser pré-concentrados, buscando melhor seletividade, sensibilidade, exatidão e reprodutibilidade para a análise. Muitas vezes as amostras são complexas, necessitando de uma etapa de limpeza para facilitar a análise e impedir a deterioração do sistema cromatográfico e do detector utilizado. A etapa de preparo de amostra é muitas vezes a mais demorada para uma análise e também a principal fonte de erro de um método analítico (PIAO *et al.*, 2014).

Dentre os métodos tradicionais para extração de diferentes compostos em amostras aquosas, pode-se citar a LLE, que emprega grandes volumes de solventes orgânicos, demanda longos tempos para a extração e possui custo elevado (CALDAS *et al.*, 2011). Com isso, novas técnicas de preparo de amostra eficazes, que consomem menor volume de solvente e demandam menor tempo, vem sendo desenvolvidas. Dentre elas, a SPE, a SPME e a DLLME.

A SPE é uma das técnicas mais comuns para o preparo de amostras visando a determinação de compostos orgânicos. Para amostras aquosas, ela é utilizada diretamente para tratar amostras reais em geral, já para amostras sólidas, os analitos são geralmente extraídos a partir das amostras utilizando solventes orgânicos, como o metanol e, em seguida, o procedimento de SPE é realizado normalmente (PIAO *et al.*, 2014). Essa técnica foi introduzida em meados de 1970, nela os analitos presentes na amostra ficam retidos em um cartucho contendo sorvente e, após, um solvente orgânico apropriado é utilizado para eluir os analitos (CALDAS *et al.*, 2011), conforme ilustrado na Figura 2. Em 2009, González-Mariño e colaboradores desenvolveram um método empregando SPE e LC-MS/MS que permitiu a determinação simultânea de triclosan, triclocarban e sete parabenos em amostras de água (GONZÁLEZ-MARIÑO *et al.*, 2009).

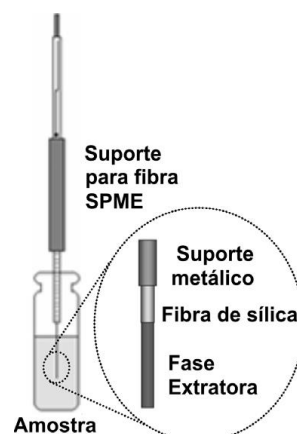
Figura 2 - Procedimento da SPE



Fonte: Adaptado de Caldas e colaboradores (2011).

A SPME foi desenvolvida por Arthur e Pawliszyn no início de 1990 (ARTHUR e PAWLISZYN, 1990), sendo uma técnica rápida, simples, de baixo custo e que possui altos fatores de pré-concentração, na qual os solventes orgânicos não são necessários para a extração (CALDAS *et al.*, 2011; PIAO *et al.*, 2014). Essa técnica consiste no recobrimento de uma fibra de sílica fundida com a fase estacionária, geralmente polidimetilsiloxano (PDMS), que é exposta na amostra aquosa ou gasosa pelo tempo necessário para que se atinja o equilíbrio e, após, o analito é desorvido pela fase móvel ou por aquecimento diretamente no injetor do cromatógrafo a gás (CALDAS *et al.*, 2011), conforme ilustrado na Figura 3. Em 2006, Canosa e colaboradores desenvolveram um método empregando SPME e GC-MS/MS para determinação de cinco parabenos em amostras de águas superficiais e de esgoto (CANOSA *et al.*, 2006).

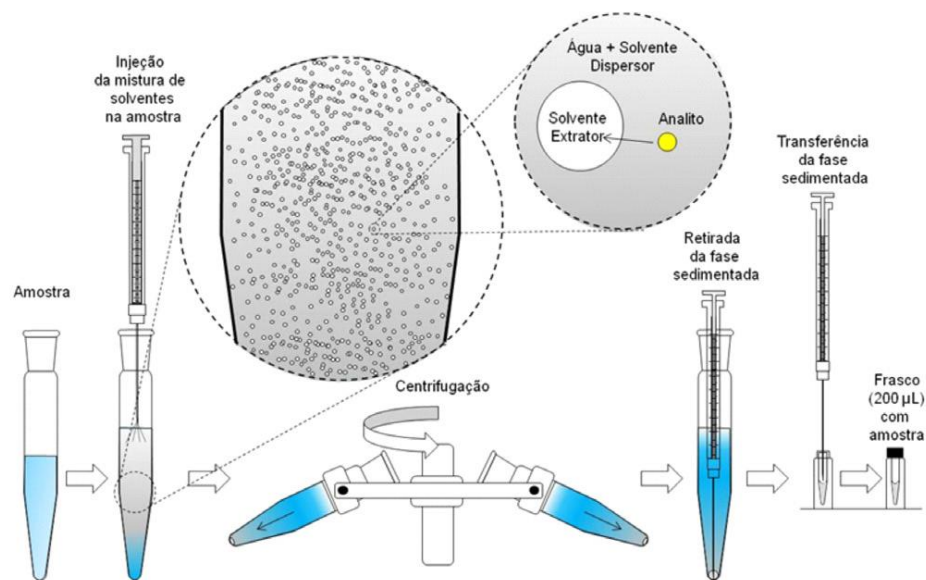
Figura 3 - Procedimento da SPME



Fonte: Adaptado de Caldas e colaboradores (2011).

A DLLME foi desenvolvida em 2006 por Rezaee e colaboradores (REZAEI *et al.*, 2006) e está baseada na utilização de um sistema ternário de solventes, sendo considerada uma miniaturização da LLE, consumindo baixo volume de solvente orgânico (CALDAS *et al.*, 2011; PIAO *et al.*, 2014). Essa técnica possui como vantagens a rapidez para sua execução, baixo custo, baixo consumo de solventes orgânicos, alta recuperação, alto fator de enriquecimento e compatibilidade com os métodos analíticos com análise por cromatografia gasosa ou cromatografia líquida. Por outro lado, suas maiores dificuldades se encontram na seleção do solvente extrator, que deve ser imiscível com água, e do solvente dispersor, que deve ser miscível em água e no solvente extrator. Além disso, a DLLME demanda experiência, principalmente na retirada da fase sedimentada (CALDAS *et al.*, 2011). As etapas do procedimento de extração estão demonstradas na Figura 4. Em 2016, Caldas e colaboradores desenvolveram um método multiresíduo empregando a DLLME com auxílio de solvente demulsificante (SD-DLLME, do inglês *Solvent-based De-emulsification Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*) e LC-MS/MS para a determinação de agrotóxicos, fármacos e produtos de cuidado pessoal, dentre eles o MePB e o PrPB, em amostras de água (CALDAS *et al.*, 2016).

Figura 4 - Procedimento da DLLME



Fonte: Adaptado de Caldas e colaboradores (2011).

3.1.4. SILLME

A SILLME surgiu de uma modificação da técnica SALLE, introduzida por Matkovich e colaboradores em 1973 para a extração de complexos através da separação das fases orgânica e aquosa por *salting-out* (MATKOVICH e CHRISTIAN, 1973).

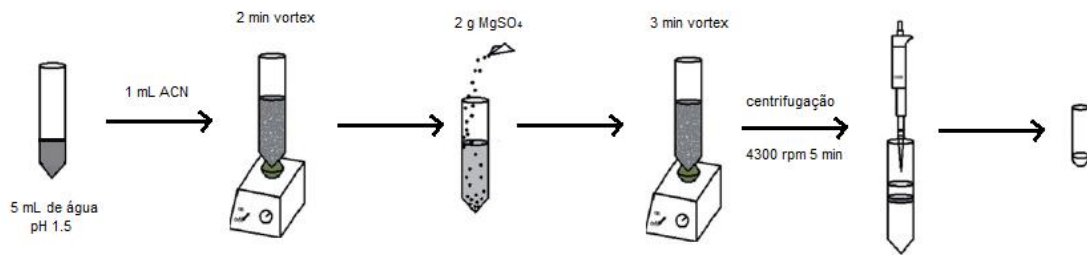
A SALLE baseia-se no fenômeno de separação de fases induzida pelo efeito *salting-out*, na qual a fase orgânica é separada a partir de uma solução homogênea e assim, simultaneamente os analitos são extraídos para um solvente orgânico quando sais orgânicos ou inorgânicos são adicionados. Este fenômeno ocorre porque a dissolução do sal auxilia na diminuição da solubilidade de substâncias altamente solúveis em água que estão presentes no meio, facilitando sua extração para a fase orgânica (MATKOVICH e CHRISTIAN, 1973; DU *et al.*, 2014).

Comparada à LLE, a extração por SALLE utiliza pequeno volume de um solvente com baixa toxicidade, além disso, agitação mecânica vigorosa e destilação à vácuo não são obrigatórios para se obter uma boa eficiência de extração. Já a SPE é uma das técnicas de preparo de amostra mais populares para a extração de compostos orgânicos em amostra de água, no entanto, os cartuchos comerciais utilizados possuem custo relativamente elevado (DU *et al.*, 2014).

Essa técnica foi aplicada para a determinação de diferentes analitos em diferentes matrizes como água, plantas e alimentos (HAN *et al.*, 2013; NANITA e PADIVITAGE, 2013), uma vez que, ela integra a limpeza e pré-concentração da amostra em uma única etapa. Porém, durante o processo de desenvolvimento das diferentes metodologias, sempre se buscou a redução do tempo e do consumo de reagentes envolvidos no processo, além de métodos de alto rendimento. Dessa forma, a técnica foi miniaturizada e renomeada como SILLME, visto que, o sal é fundamental para o particionamento das fases e, assim, a extração dos analitos, levando a entender que a microextração não é apenas assistida pelo efeito *salting-out* e, sim, induzida por ele (DU *et al.*, 2014).

A técnica denominada SILLME foi aplicada pela primeira vez por Du e colaboradores em 2014 para a extração de fluoroquinolonas, possuindo os mesmos princípios da SALLE, porém utilizando menor volume de solvente e a nova nomenclatura (DU *et al.*, 2014). A SILLME consiste em pequenas etapas, demonstradas na Figura 5.

Figura 5 - Procedimento da SILLME



Fonte: Adaptado de Du e colaboradores (2014).

Primeiramente, adiciona-se 1 mL do solvente extrator, acetonitrila, em 5 mL de amostra acidificada a pH 1,5, agita-se por 2 minutos em vórtex. Após, adiciona-se 2 g de $MgSO_4$, com o objetivo de promover o efeito *salting-out*, agita-se por 3 minutos em vórtex e retira-se a fase sobrenadante para análise.

Nesse trabalho foram avaliados os parâmetros críticos que poderiam influenciar na eficiência de extração da SILLME, como os tipos e quantidades de solvente de extração e de sal e o pH. Após o método validado, esse foi aplicado para amostras de água, mel, leite, plasma suíno e músculo. Dessa forma, o método proposto pelo autor forneceu um procedimento simples, rápido, barato e que satisfaz alguns princípios da química verde para extração e determinação de fluoroquinolonas em diferentes amostras (DU *et al.*, 2014). Além disso, forneceu a possibilidade da técnica empregada ser utilizada para outros analitos e amostras, como por exemplo, nesse trabalho em que a SILLME foi utilizada para a extração de parabenos em amostras de água.

3.2. Procedimentos experimentais

Esse trabalho consistiu no desenvolvimento de um método empregando a SILLME, visando um procedimento rápido e com menor utilização de reagentes para a determinação de parabenos em amostras de água.

O estudo foi realizado no Laboratório de Análise de Compostos Orgânicos e Metais (LACOM), da Escola de Química e Alimentos (EQA), na Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

3.2.1. Instrumentação

- ❖ Balança Analítica de precisão modelo FA 2104N, Bioprecisa (Curitiba, Brasil);
- ❖ Micropipetadores automáticos com capacidade variável (100 µL, 1000 µL e 5000 µL) Labmate (Varsóvia, Polônia);
- ❖ Bomba à vácuo Tecnal TE-058 (Piracicaba, SP, Brasil);
- ❖ Sistema de filtração em membrana Phenomenex (Torrance, CA, USA);
- ❖ Sistema de Purificação de água Milli-Q Direct-Q UV3® Millipore (Millipore, Bedford, MA, USA);
- ❖ pHmetro Hanna pH20 pH21 – eletrodo de vidro combinado (São Paulo, SP, Brasil);
- ❖ Ultrassom Quimis modelo Q335D (Diadema, SP, Brasil);
- ❖ Agitador tipo vórtex modelo Certomat® MV-B. Braun (Bioteck Internacional, Alemmar - Comercial e Industrial S.A.);
- ❖ Centrífuga de tubos microprocessada modelo Quimis® Q222T (QUIMIS aparelhos científicos);
- ❖ Cromatógrafo à líquido Waters (Milford, MA, USA) equipado com bomba quaternária modelo 600, Detector por Arranjo de Diodos 2996 e sistema de aquisição de dados software Empower PDA.
- ❖ Coluna analítica Sinergy C18 4 µm (250 mm x 4,6 mm d.i.) (Phenomenex, Torrance, CA, EUA);
- ❖ Cromatógrafo à líquido *Alliance Separations* modelo 2695 Waters (Milford, MA, USA) equipado com: amostrador automático, bomba quaternária, forno para coluna, sistema de desgaseificação, Detector MS, Micromass® Quatro Micro™ API Waters com fonte API, utilizando o modo de ionização por Eletrospray (ESI) e sistema de aquisição de dados através do software MassLynx 4.0 Waters;
- ❖ Coluna analítica Kinetex C18 2,6 µm (50 mm x 3,0 mm d.i.) (Phenomenex, Torrance, CA, EUA);
- ❖ Sistema gerador de nitrogênio Peak Scientifics (Instruments Ltda., Escócia).

3.2.2. Reagentes, solventes e materiais

- ❖ Acetonitrila, grau HPLC (J.T. Baker, EUA);
- ❖ Metanol, grau HPLC (J.T. Baker);
- ❖ Etanol, grau HPLC (J.T. Baker);

- ❖ Acetona, grau HPLC (Macron, EUA);
- ❖ Água ultrapura, purificada em sistema Direct-Q UV3[®] Millipore (resistividade 18,2 MΩ cm⁻¹);
- ❖ H₃PO₄ 85%, PA (Tedia, EUA);
- ❖ Gás argônio analítico 5.0 usado como gás de colisão no sistema LC-MS/MS (White Martins, Brasil);
- ❖ Detergente Extran[®] neutro (Merck, Brasil);
- ❖ Água destilada obtida por sistema de destilação da EQA;
- ❖ Acetona, PA (Vetec, Brasil);
- ❖ Padrões analíticos (pureza > 99%): MePB, EtPB, PrPB, BuPB, BePB, PhPB, iPrPB e iBuPB;
- ❖ Vidraria comum de laboratório (balões volumétricos, béquer e espátulas);
- ❖ Tubos de polipropileno, com tampas rosqueáveis, 15 mL de capacidade (Sarstedt, Alemanha);
- ❖ MgSO₄ anidro (J.T. Baker);
- ❖ Na₂SO₄ anidro (Synth, Brasil);
- ❖ (NH₄)₂SO₄ anidro (Synth);
- ❖ NH₄Cl anidro (Synth);
- ❖ Membrana filtrante de nylon 0,45 μm de diâmetro de poro e 47 mm de diâmetro (Millipore, SP, Brasil);
- ❖ Frascos de vidro (*vials*), capacidade de 2,0 mL.

3.2.3. *Parabenos selecionados*

Devido a grande utilização de diversos tipos de parabenos como conservantes em produtos cosméticos, de higiene pessoal e até mesmo em alimentos, torna-se provável a contaminação das águas com esses produtos. Dessa forma, optou-se pelo desenvolvimento de um método para determinação de MePB, EtPB, PrPB, BuPB, BePB, PhPB, iPrPB e iBuPB em amostras de água, sendo esses analitos selecionados de acordo com a sua utilização em diferentes produtos.

3.2.4. *Preparo das soluções analíticas*

As soluções estoque de concentração 1000 mg L^{-1} dos parabenos em estudo foram preparadas através da dissolução dos padrões sólidos em acetonitrila grau HPLC, sendo armazenadas em frascos âmbar e estocadas a baixas temperaturas. Os padrões utilizados possuem alto teor de pureza, superior a 99%.

A partir das soluções estoques de 1000 mg L^{-1} foram preparadas as soluções estoque de concentração 100 mg L^{-1} , em acetonitrila, de cada analito. Através dessas soluções estoques foram preparadas as soluções trabalho. Uma mistura de MePB e PrPB na concentração 10 mg L^{-1} em acetonitrila foi preparada para o estudo da extração por SILLME e determinação por HPLC-DAD. Para as avaliações no LC-MS/MS, uma mistura com os oito parabenos na concentração 1 mg L^{-1} em acetonitrila foi preparada, sendo que, essas soluções foram preparadas mensalmente e as suas diluições diariamente.

3.2.5. *Amostras de água*

As amostras de água utilizadas na validação da SILLME foram coletadas da torneira do laboratório, uma vez que, elas possuem semelhanças com as amostras reais, apresentando resposta similar no equipamento e possibilitando a avaliação de possíveis interferentes que poderiam prejudicar a análise. É importante destacar que, inicialmente analisou-se o branco da amostra, sem a adição do padrão, com o objetivo de verificar se os compostos em estudo estavam presentes na mesma.

3.2.6. *Estudo da extração por SILLME*

Primeiramente, aplicou-se a SILLME original (DU *et al.*, 2014), para comprovar a eficiência da técnica para a extração de parabenos, uma vez que, sua aplicação original foi para fluoroquinolonas. Posteriormente, realizou-se um estudo com relação à técnica, buscando-se reduzir a utilização de solventes e demais materiais e tornar o procedimento mais rápido, comparando-se os resultados obtidos com os do método original.

3.2.6.1. Método proposto por Du e colaboradores

O método descrito na literatura foi realizado adicionando-se 5 mL de água ultrapura (acidificada a pH 1,5 com H_3PO_4) em um tubo de fundo cônico com capacidade para 15 mL; adicionou-se 1 mL de acetonitrila e agitou-se em vórtex por 2 minutos; após, 2,0 g de MgSO_4 foram adicionados à mistura e agitou-se o tubo novamente em vórtex por 3 minutos; em seguida, realizou-se a centrifugação à 4300 rpm por 5 minutos; e transferiu-se o sobrenadante para outro frasco (DU *et al.*, 2014).

3.2.6.2. Avaliação do solvente extrator

Para avaliar o solvente extrator ideal para a SILLME, realizou-se o procedimento tradicional (DU *et al.*, 2014), porém, utilizando-se além do solvente original, acetonitrila, outros possíveis solventes, como o etanol e a acetona.

3.2.6.3. Avaliação do sal

Para avaliar o sal que seria capaz de promover a migração dos analitos para a fase orgânica e o eficiente particionamento das fases do sistema na SILLME, testou-se a combinação de cada um dos solventes do item 3.2.6.2. com o sal original, MgSO_4 , e outros possíveis sais, como o Na_2SO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e o NH_4Cl .

3.2.6.4. Avaliação do volume de solvente extrator

Para avaliar o volume de solvente extrator que seria capaz de proporcionar um maior fator de pré-concentração e ao mesmo tempo uma melhor visualização das fases particionadas para retirada da fase sobrenadante, realizou-se o procedimento com tipo de solvente e sal fixados anteriormente, porém, utilizando-se além do volume original, 1000 μL , os volumes de 750 μL , 500 μL e 250 μL de solvente extrator.

3.2.6.5. Avaliação do volume de amostra

Na avaliação do volume de amostra, buscou-se o aumento no fator de pré-concentração e o eficiente particionamento das fases. Assim, realizou-se o procedimento com

as condições fixadas anteriormente e avaliou-se o aumento do volume de amostra, de 5 mL para 10 mL, sem variar a massa de sal e com o aumento proporcional da massa de sal, de 2 para 4 g de MgSO_4 .

3.2.6.6. Avaliação da massa de sal

Na avaliação da massa de sal, buscou-se a massa ideal de MgSO_4 para promover o eficiente particionamento entre as fases aquosa e orgânica e, por meio deste, a migração dos analitos para a fase orgânica. Desta forma, realizou-se o procedimento com as condições fixadas anteriormente e avaliou-se a diminuição da massa de sal de 2 g para 1,75 e 1,5 g sem variar outras condições.

3.2.6.7. Avaliação do pH da amostra

Na avaliação do pH da amostra, buscou-se a confirmação de que seria possível a extração dos analitos em estudo em diferentes valores de pH, ou seja, sem que fosse necessária a acidificação prévia da amostra. Desta forma, realizou-se o procedimento com as condições fixadas anteriormente, porém, utilizando-se a amostra acidificada a pH 2, 4, 6 e 8.

3.2.6.8. Avaliação do tempo de agitação

Na avaliação do tempo de agitação, visou-se reduzir o tempo total do método de extração e estudar a influência do tempo na extração dos analitos. Desta forma, realizou-se o procedimento com as condições fixadas anteriormente, porém, utilizando-se para a primeira etapa de agitação os tempos de 1, 2 e 4 minutos e para a segunda etapa os tempos de 1, 3 e 5 minutos. Além de testar a utilização de apenas uma etapa de agitação ao final da adição de acetonitrila e de sulfato de magnésio, com o tempo total de 2 minutos.

3.2.7. *Validação do método*

A validação do método foi realizada por LC-MS/MS, consistindo na avaliação das figuras de mérito: limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), curvas analíticas preparadas no solvente e no extrato, linearidade, efeito matriz (EM), exatidão (por meio de

ensaios de recuperação) e precisão (em termos de repetibilidade) (ANVISA, 2003; SANTE, 2015).

3.2.7.1. Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Os limites instrumentais foram obtidos através do preparo de soluções analíticas de diferentes concentrações em acetonitrila. Sendo que, o LOD e o LOQ foram estimados pela relação sinal-ruído (s/n) calculada pelo software do equipamento, sendo definido como LOQ a concentração na qual foi obtida uma relação $s/n \geq 10$ e LOD a concentração na qual foi obtida uma relação $s/n \geq 3$.

Uma vez definidos os limites instrumentais, para a definição dos limites de quantificação do método, as amostras foram fortificadas nas concentrações equivalentes ao LOQ do instrumento e submetidas ao procedimento de extração, de modo a confirmar experimentalmente esses valores. Os limites de quantificação do método para a SILLME apresentaram fator de pré-concentração de 10 vezes, uma vez que, a proporção utilizada no preparo de amostra é de 5 mL de amostra para 0,5 mL de extrato final, resultando na Equação 1 para o cálculo do LOQ do método.

$$\text{LOQ}_m (\mu\text{g L}^{-1}) = \frac{\text{LOQ}_i}{10} \quad \text{Equação 1}$$

Com relação ao LOD do método, ele foi calculado por meio da Equação 2.

$$\text{LOD}_m (\mu\text{g L}^{-1}) = \frac{\text{LOQ}_m}{3,333} \quad \text{Equação 2}$$

Onde:

LOQ_i = Limite de quantificação instrumental

LOQ_m = Limite de quantificação do método

LOD_m = Limite de detecção do método

3.2.7.2. Curvas Analíticas e Linearidade

As curvas analíticas foram preparadas em cinco níveis de concentração, iniciando pelo LOQ de cada analito até uma concentração referente a 100 LOQ. De acordo com as características de cada analito, as curvas analíticas responderam em diferentes faixas de concentração, sendo necessário o preparo de uma solução trabalho contendo a mistura dos 8

analitos com diferentes concentrações para cada um. Assim, através de diluições sucessivas dessa solução foram construídas as curvas analíticas no solvente e no extrato.

A linearidade foi avaliada por meio do valor do coeficiente de correlação linear (r).

3.2.7.3. Efeito Matriz

O efeito matriz foi avaliado por meio da comparação entre os coeficientes angulares das curvas preparadas no extrato da matriz e no solvente, através da Equação 3 (ECONOMOU *et al.*, 2009).

$$EM(\%) = 100 \times \left(1 - \frac{a_{\text{extrato}}}{a_{\text{solvente}}} \right) \quad \text{Equação 3}$$

Onde:

EM = Efeito matriz

a_{extrato} = Coeficiente angular da curva preparada no extrato da matriz

a_{solvente} = Coeficiente angular da curva preparada no solvente

De acordo com Economou e colaboradores, quando os valores encontrados para o efeito matriz estiverem na faixa de $\pm 20\%$, considera-se efeito matriz baixo; se estiverem entre -50 e -20% ou $+20$ e $+50\%$ considera-se efeito matriz médio; e se estiverem abaixo de -50% ou acima de $+50\%$, o efeito matriz é considerado alto (ECONOMOU *et al.*, 2009).

3.2.7.4. Exatidão

A exatidão do método foi avaliada por meio da adição de quantidades conhecidas dos analitos em amostras de água da torneira, sendo que, foi feito um branco da amostra para avaliar a presença de algum dos analitos. As fortificações foram realizadas em três níveis de concentração, 1, 5 e 10 vezes o LOQ de cada analito, sendo os ensaios realizados em triplicata para cada nível e as replicatas injetadas três vezes no equipamento ($n = 9$).

As amostras 1, 5 e 10 LOQ foram fortificadas pela adição de 25 μL de uma solução 20 LOQ, 100 LOQ e 200 LOQ, respectivamente. Sendo mantidas em repouso por 30 minutos e em seguida submetidas ao procedimento de extração.

A exatidão foi avaliada em termos de recuperação, conforme é demonstrado na Equação 4.

$$R(\%) = \frac{A_{\text{fortificação}} - A_{\text{branco}}}{A_{\text{extrato}}} \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

Onde:

R = Recuperação

$A_{\text{fortificação}}$ = Média das áreas da amostra fortificada

A_{extrato} = Média das áreas do padrão no extrato

A_{branco} = Média das áreas da amostra não fortificada

3.2.7.5. Precisão

A precisão do método foi avaliada por meio da repetibilidade, expressa pelo desvio padrão relativo (RSD). Dessa forma, as amostras foram fortificadas em três níveis de concentração, 1, 5 e 10 vezes o LOQ de cada analito, sendo os ensaios realizados em triplicata para cada nível e a replicata injetada três vezes no equipamento ($n = 9$) no mesmo dia, pelo mesmo analista e nas mesmas condições cromatográficas. Para os cálculos do RSD utilizou-se a Equação 5.

$$RSD(\%) = \frac{s}{\bar{X}} \times 100 \quad \text{Equação 5}$$

Onde:

s = Estimativa do desvio padrão absoluto

\bar{X} = Média das replicatas

3.3. Resultados e discussão

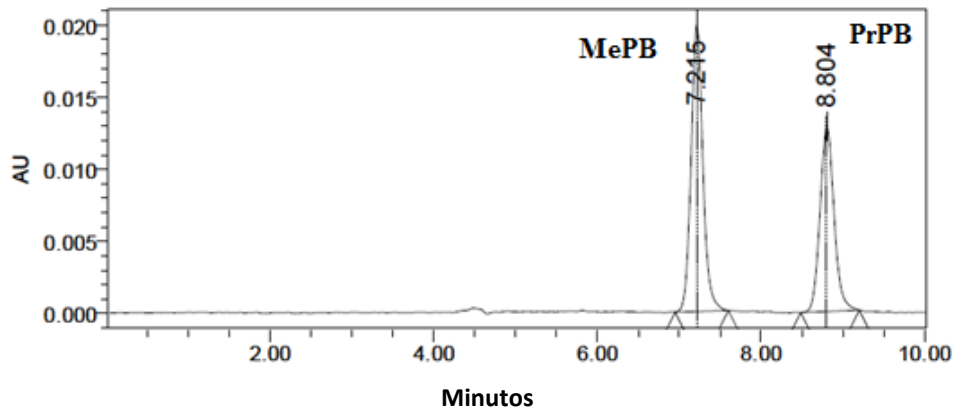
3.3.1. *Separação cromatográfica por HPLC-DAD*

Foi realizado o preparo dos padrões individuais de MePB e PrPB e da mistura dos analitos na concentração de 1 mg L^{-1} diariamente, para sua posterior injeção no HPLC-DAD.

A separação cromatográfica foi obtida com a utilização de uma coluna analítica Sinergy C18 (250 mm x 4,6 mm, 4 μm) e fase móvel composta por acetonitrila e água ultrapura pH 3,2 (acidificada com solução de H_3PO_4 1:1) na proporção 70:30, além de modo de eluição isocrático e uma vazão de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. O modo de eluição isocrático possibilitou uma separação eficaz para os analitos em estudo, sendo que, o tempo de análise resultante foi

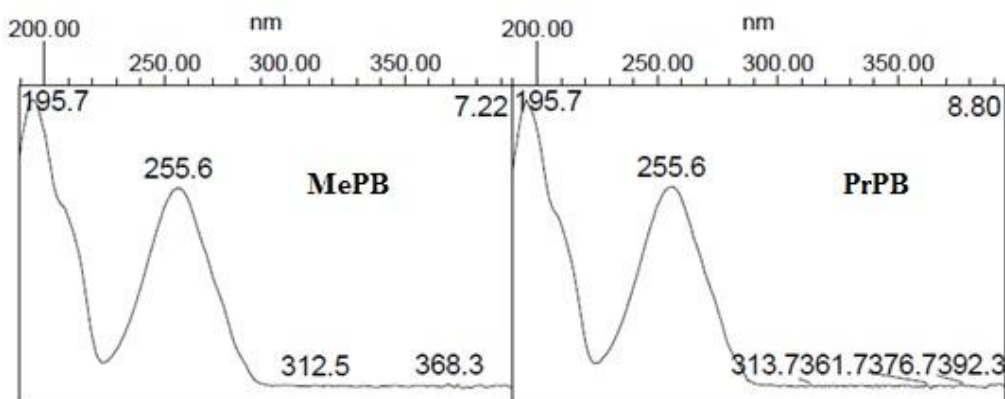
de 10 minutos. As Figuras 6 e 7 apresentam o cromatograma e os espectros referentes ao MePB e ao PrPB.

Figura 6 - Cromatograma obtido por meio de um padrão de concentração 1 mg L^{-1} com a mistura dos analitos



Fonte: Próprio autor (2016).

Figura 7 - Espectros obtidos por meio de um padrão de concentração 1 mg L^{-1} com a mistura dos analitos



Fonte: Próprio autor (2016).

A avaliação com detectores como o arranjo de diodos compara o espectro do pico obtido na separação cromatográfica com o de um padrão, confirmando a presença de um determinado composto puro e garantindo a seletividade do método (CALDAS, 2009). Assim, os espectros obtidos para os analitos em estudo na separação cromatográfica demonstraram a seletividade do método, uma vez que, garantiram que o pico de resposta é referente ao composto de interesse.

3.3.2. Estudo da extração por SILLME

3.3.2.1. Avaliação do solvente extrator e do sal

Inicialmente, testou-se o procedimento de extração utilizando-se diferentes solventes e sais. Para os solventes testou-se acetonitrila, etanol e acetona e para os sais MgSO_4 , Na_2SO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e do NH_4Cl . Foi constatado que ao utilizar etanol e acetona com cada um dos sais, não houve um particionamento eficiente entre as fases orgânica e aquosa, já que, ao transferir o sobrenadante para o *vial* ocorreu a precipitação de sal, o que poderia comprometer o sistema cromatográfico se injetado diretamente. O mesmo ocorreu para os sistemas acetonitrila/ Na_2SO_4 , acetonitrila/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e acetonitrila/ NH_4Cl , demonstrando que a técnica original empregando o sistema acetonitrila/ MgSO_4 é realmente a mais eficiente.

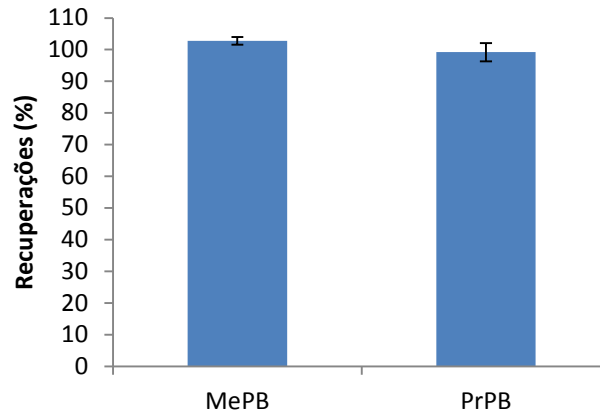
A acetonitrila é altamente miscível em água, o que dificulta a sua utilização em técnicas como a LLE. Porém, na SILLME, com a adição de sal e o particionamento das fases orgânica e aquosa, a sua utilização como solvente extrator para amostras aquosas se torna possível. A acetonitrila tem polaridade favorável para a extração de uma vasta gama de compostos, além de ser um solvente menos tóxico do que os convencionais empregados na LLE. Ela também é recomendada como solvente extrator para amostras de alimentos, pois facilita a precipitação de proteínas, reduzindo o efeito matriz (DU *et al.*, 2014).

Além do MgSO_4 ser o único sal que possibilitou o melhor particionamento das fases orgânica e aquosa, sua eficiência de extração pode ser explicada por meio da série liotrópica que estipula uma ordem para os cátions e ânions baseada na sua capacidade de reduzir a solubilidade de substâncias altamente solúveis em água que estão presentes nesse meio, facilitando sua extração para a fase orgânica. Dobry-Duclaux reporta a seguinte ordem para os cátions: $\text{Mg}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Ba}^{2+} > \text{K}^+ > \text{Na}^+ > \text{NH}_4^+ > \text{Li}^+$ e para os ânions: $\text{SO}_4^{2-} > \text{CH}_3\text{COO}^- > \text{Cl}^- > \text{NO}_3^- > \text{Br}^- > \text{I}^- > \text{CNS}^-$ (MATKOVICH e CHRISTIAN, 1973).

Por meio da série, nota-se que os íons que compõem o sal utilizado estão entre os que possuem essa maior habilidade. Assim, quando o sal é adicionado à solução, as moléculas de água formam uma esfera de hidratação ao redor da espécie iônica do sal. Essas esferas reduzem a quantidade de água disponível para dissolver os analitos favorecendo assim, a extração dos mesmos para a fase orgânica (BEHBAHANI *et al.*, 2014).

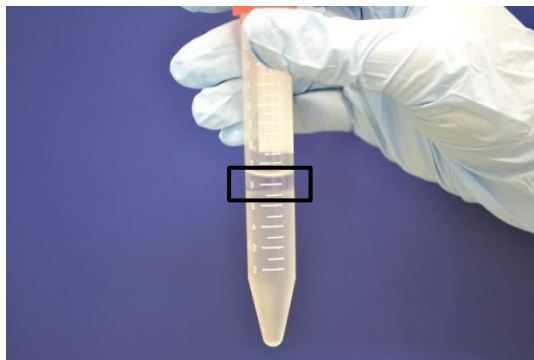
Dessa forma, obteve-se resultados em termos de recuperação referentes apenas ao sistema acetonitrila/ MgSO_4 , conforme demonstrado na Figura 8.

Figura 8 - Recuperações (%) para os analitos em estudo utilizando acetonitrila como solvente extrator. Barras de erro indicam RSD (n = 3). Condições de extração: volume de amostra, 5 mL; solvente extrator (acetonitrila), 1000 μ L; sal (MgSO_4), 2 g.



A separação de fases empregando o sistema acetonitrila/ MgSO_4 selecionado é demonstrada na Figura 9, destacando-se a fase sobrenadante.

Figura 9 - Separação de fases: sistema acetonitrila/ MgSO_4



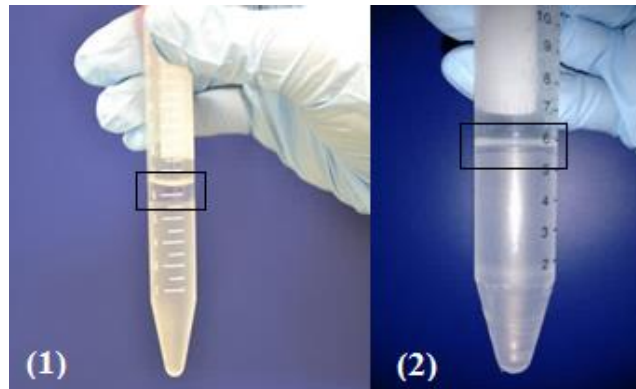
Fonte: Próprio autor (2016).

3.3.2.2. Avaliação do volume de solvente extrator

Com o objetivo de reduzir o volume de solvente empregado na técnica e aumentar o fator de pré-concentração, testou-se a redução do volume utilizado no método original, 1000 μ L, para 750 μ L, 500 μ L e 250 μ L de solvente extrator. Os volumes de 750 μ L e 500 μ L foram considerados satisfatórios, promovendo fácil visualização da fase a ser retirada. O volume de 250 μ L tornou a visualização dificultada, o que atrapalhou na retirada do extrato. Dessa forma, selecionou-se como volume de solvente extrator 500 μ L, o que proporcionou o aumento do fator de pré-concentração de 5 para 10 vezes, reduziu o gasto de solvente

orgânico e o resíduo gerado. A Figura 10 apresenta a separação das fases utilizando 1000 μL e 500 μL de solvente extrator.

Figura 10 - Separação de fases utilizando 1000 μL (1) e 500 μL (2) de solvente extrator



Fonte: Próprio autor (2016).

Com a redução no volume de solvente extrator de 1000 μL para 500 μL não ocorreram modificações nos valores de recuperação apresentados no item 3.3.2.1. referentes a utilização de 1000 μL de solvente.

3.3.2.3. Avaliação do volume de amostra

Ao avaliar o volume de amostra, testou-se aumentá-la de 5 mL para 10 mL sem variar a massa de sal. Porém, constatou-se que o equilíbrio entre as fases aquosa e orgânica é tênue, não ocorrendo separação das fases. Com o aumento do volume de amostra e o aumento proporcional da massa de sal, de 2 para 4 g de MgSO_4 , o equilíbrio foi mantido, porém, essa modificação seria pouco interessante, pelo fato de necessitar de maior massa de sal, aumentando o custo do procedimento.

A redução do volume de amostra de 5 mL para 2,5 mL não foi testada, pois embora fosse uma melhoria com relação ao volume de amostra necessário para a realização do procedimento, ocasionaria em um menor fator de pré-concentração e, conseqüentemente, maiores valores de LOQ. Dessa forma, fixou-se o volume de 5 mL de amostra para o procedimento.

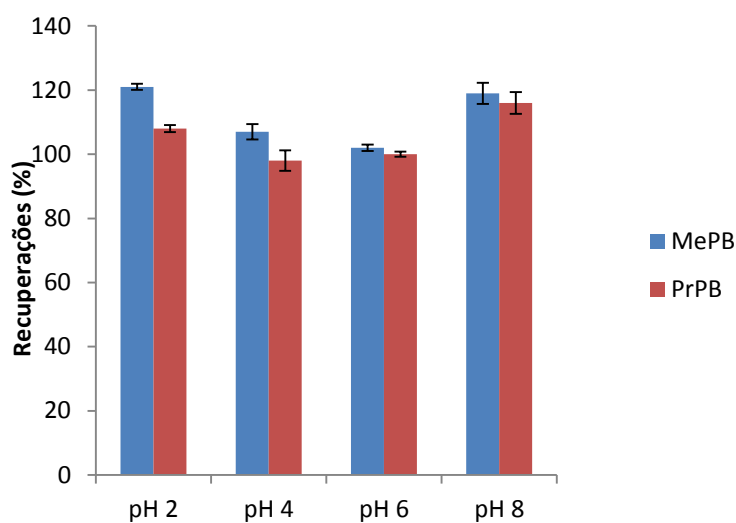
3.3.2.4. Avaliação da massa de sal

Na avaliação da massa de sal, testou-se a redução da massa utilizada no procedimento, variando-a de 2 g para 1,5 e 1,75 g. Comprovou-se que para promover o melhor particionamento entre as fases aquosa e orgânica, a massa de 2 g de MgSO_4 foi a ideal. Com massas menores de sal o particionamento não ocorre ou ocorre de maneira ineficaz, sendo que, se o extrato resultante for injetado mesmo assim, pode comprometer o funcionamento do equipamento.

3.3.2.5. Avaliação do pH da amostra

O pH da amostra foi avaliado com a finalidade de comprovar a estabilidade dos parabenos, ou seja, que a sua extração seria possível em diferentes valores de pH, sem que fosse necessária a acidificação prévia da amostra. Testou-se a amostra acidificada a pH 2, 4, 6 e 8, sendo que, foram obtidos altos valores de recuperação, estando entre 98 e 121%, e baixos valores de RSD, menores do que 3,39% (ANVISA, 2003). A Figura 11 apresenta os resultados obtidos em termos de recuperação.

Figura 11 - Recuperações (%) para os analitos em estudo empregando a variação do pH da amostra. Barras de erro indicam RSD (n = 3). Condições de extração: volume de amostra, 5 mL; solvente extrator (acetonitrila), 500 μL ; sal (MgSO_4), 2 g.



Fonte: Próprio autor (2016).

Os resultados obtidos estão de acordo com os reportados na literatura. Farajzadeh e colaboradores (FARAJZADEH *et al.*, 2010) estudaram o efeito do pH no intervalo de 2 a 12, os resultados obtidos demonstraram que as áreas de picos se tornavam maiores com o aumento do pH, até atingir um máximo e diminuir posteriormente, até que a extração não ocorresse a valores de pH mais elevados. Caldas e colaboradores (CALDAS *et al.*, 2016) também realizaram o mesmo estudo e obtiveram recuperações semelhantes entre si para MePB e PrPB no intervalo de pH de 1 a 8, além de comprovar também que houve redução nas recuperações a pH 10 e que não houve extração a pH 12.

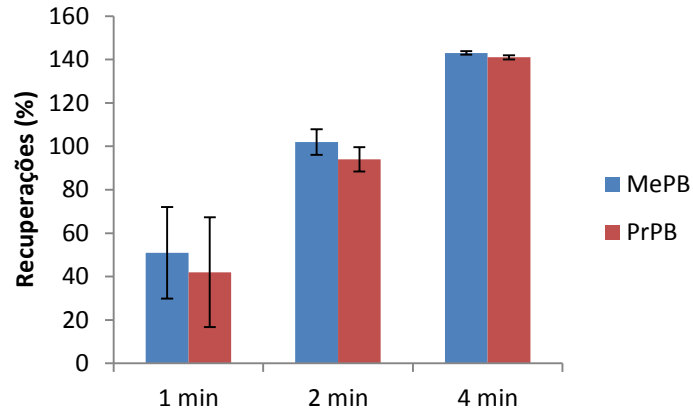
Farajzadeh e colaboradores (FARAJZADEH *et al.*, 2010) concluíram que a diminuição na eficácia de extração a valores de pH elevados deve-se ao pKa dos parabenos, pois em pH elevado os compostos estão em sua forma iônica, não sendo extraídos pelo solvente orgânico. Além disso, nessa faixa de pH pode ocorrer a hidrólise dos parabenos (SONI *et al.*, 2002).

Dessa forma, comprovou-se que os parabenos podem ser extraídos consideravelmente em valores de pH até 8, sem que seja necessário o ajuste do pH de amostras que se encontrem nessa faixa de pH.

3.3.2.6. Avaliação do tempo de agitação

Com o objetivo de estudar a influência do tempo na extração dos analitos e reduzir o tempo total do método de extração, testou-se para a primeira etapa de agitação os tempos de 1, 2 e 4 minutos e para a segunda etapa os tempos de 1, 3 e 5 minutos. Além disso, avaliou-se também, a possível utilização de apenas uma etapa de agitação ao final da adição de acetonitrila e de MgSO₄, com o tempo total de 2 minutos. A Figura 12 demonstra os resultados para a primeira etapa de agitação.

Figura 12 - Recuperações (%) para os analitos em estudo empregando a variação do tempo de agitação na primeira etapa. Barras de erro indicam RSD (n = 3). Condições de extração: volume de amostra, 5 mL; solvente extrator (acetonitrila), 500 μ L; sal ($MgSO_4$), 2 g.

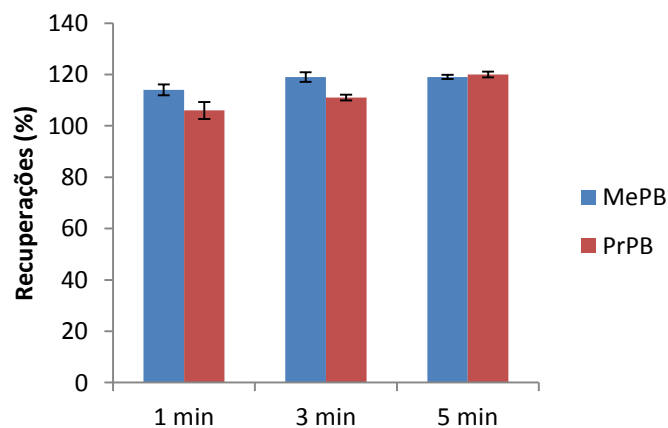


Fonte: Próprio autor (2016).

De acordo com os resultados obtidos, pode-se afirmar que na primeira etapa, extração com a acetonitrila, o tempo influencia, uma vez que, comprovou-se que utilizando o tempo de 1 minuto as recuperações se reduzem praticamente à metade quando comparadas à utilização do tempo de 2 minutos, no qual as recuperações já são satisfatórias. Desta forma, demonstra-se que o tempo de agitação empregado na primeira etapa no método original (DU *et al.*, 2014) pode ser considerado o tempo ótimo de extração.

A Figura 13 demonstra os resultados obtidos para a segunda etapa de agitação.

Figura 13 - Recuperações (%) para os analitos em estudo empregando a variação do tempo de agitação na segunda etapa. Barras de erro indicam RSD (n = 3). Condições de extração: volume de amostra, 5 mL; solvente extrator (acetonitrila), 500 μ L; sal ($MgSO_4$), 2 g.

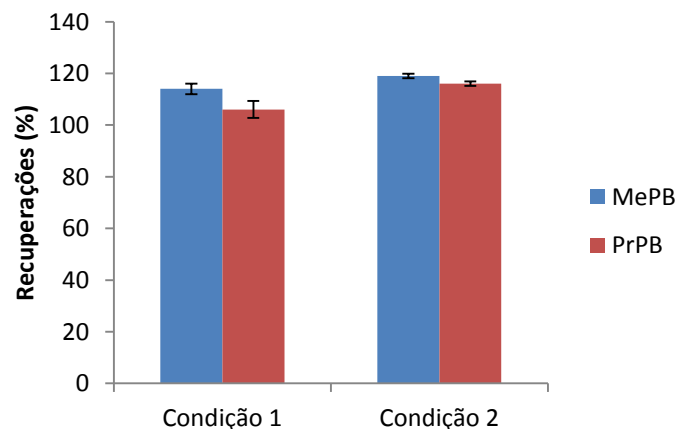


Fonte: Próprio autor (2016).

Os resultados obtidos comprovam que a segunda etapa de agitação, após a adição do MgSO_4 , não exerce influência sobre a extração dos analitos, uma vez que, as recuperações obtidas com a variação do tempo de agitação não apresentaram diferenças expressivas. A adição do sal promove além do particionamento das fases, o efeito *salting-out*, levando a diminuição da solubilidade dos analitos na fase aquosa e possibilitando sua migração para a fase orgânica. Porém, esse efeito já tem início no momento da adição, sendo desnecessária a agitação da solução resultante para que ele ocorra.

Considerando-se as condições satisfatórias obtidas para as duas etapas de agitação, pode-se avaliar que inicialmente os melhores tempos seriam 2 minutos e 1 minuto, para a primeira e a segunda etapa, respectivamente, resultando em um tempo total de agitação de 3 minutos. Como se notou que a segunda etapa não exerceu influência na extração dos analitos, pensou-se em avaliar se seria possível utilizar apenas uma etapa de agitação de 2 minutos, tempo ótimo para a primeira etapa, ao final da adição do solvente extrator e do sal. A Figura 14 apresenta a comparação entre a melhor condição em duas etapas com tempo total de 3 minutos (Condição 1) e a condição em uma etapa com tempo de 2 minutos (Condição 2).

Figura 14 - Recuperações (%) para os analitos em estudo empregando duas etapas de agitação e uma única etapa. Barras de erro indicam RSD (n = 3). Condições de extração: volume de amostra, 5 mL; solvente extrator (acetonitrila), 500 μL ; sal (MgSO_4), 2 g.



Fonte: Próprio autor (2016).

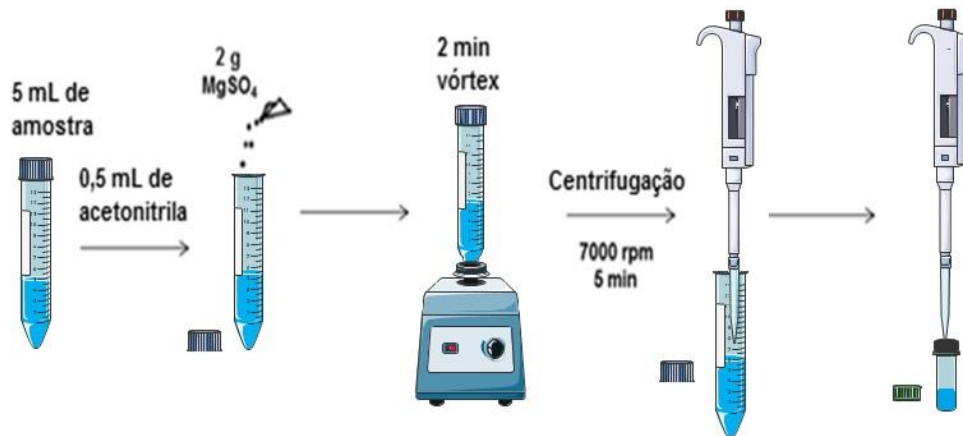
Comparando-se a condição em duas etapas estudada e a em etapa única, pode-se notar que a utilização de uma única etapa de agitação de 2 minutos mostrou-se tão eficaz quanto à condição em duas etapas de agitação, já que, seus valores de recuperação e desvios também se encontram dentro do aceitável.

Dessa forma, optou-se pela utilização de apenas uma etapa de agitação de 2 minutos, o que além de possibilitar bons resultados, levou a uma redução no tempo total de extração, visto que, no método original, as duas etapas de agitação resultavam em 5 minutos de tempo total.

3.3.2.7. Extração por SILLME

A partir do estudo realizado e de acordo com os resultados apresentados, o procedimento final de extração é representado na Figura 15.

Figura 15 - Esquema da SILLME com as melhores condições



Fonte: Próprio autor (2016).

3.3.3. *Separação cromatográfica por LC-MS/MS*

As condições referentes ao LC-MS/MS para os analitos em estudo foram definidas em outro trabalho realizado no laborat, sendo apenas aplicadas e discutidas nesse trabalho.

As condições de detecção por espectrometria de massas foram definidas de forma a se obter maior sensibilidade analítica. Foram estudados os valores de voltagem do cone, energia de colisão e ionização por *eletrospray* (ESI), em positivo ou negativo, visto que, os compostos que apresentam grupos nucleofílicos possuem tendência a se ionizar no modo positivo, pela adição de um próton proveniente da fase móvel. Demais compostos apresentam a ionização mais eficiente no modo negativo, principalmente aqueles que possuem características mais ácidas (ALBA, 2004). Além disso, buscaram-se duas transições características de fragmentação para cada analito, sendo a mais intensa utilizada para quantificação e a segunda mais intensa utilizada para confirmação, sendo as determinações

realizadas no modo de Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM). A Tabela 2 apresenta as condições estabelecidas no MS/MS, além do t_R para cada analito.

Tabela 2 - Condições estabelecidas MS/MS

Analito	t_R (min)	Massa molecular monoisotópica	ESI	Transições (m/z)	Voltagem do cone (V)	Energia de colisão (eV)
MePB	3,43	152,05	(-)	Q 151 > 91,6	35	20
				q 151 > 135,9	35	15
EtPB	6,27	166,06	(-)	Q 165,11 > 92,2	27	19
				q 165,11 > 136,7	27	13
iPrPB	9,02	180,08	(-)	Q 179,12 > 137,0	27	21
				q 179,12 > 92,7	27	15
PrPB	9,61	180,08	(-)	Q 179,1 > 91,8	30	20
				q 179,1 > 137,1	30	15
PhPB	13,14	214,21	(-)	Q 213,16 > 92,9	23	15
				q 213,16 > 64,9	23	53
iBuPB	14,31	194,04	(-)	Q 193,15 > 136,1	31	21
				q 193,15 > 92,0	31	17
BuPB	14,90	194,09	(-)	Q 193,21 > 92,0	31	23
				q 193,21 > 136,3	31	17
BePB	16,08	228,08	(-)	Q 227,16 > 135,9	27	15
				q 227,16 > 91,9	27	13

Fonte: Próprio autor (2016).

Q – transição de quantificação

q – transição de confirmação

Foram definidos também outros parâmetros instrumentais do equipamento, apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Parâmetros instrumentais

Temperatura da fonte (°C)	100
Temperatura de dessolvatação (°C)	400
Vazão de gás do cone (Lh⁻¹)	50
Vazão de gás de dessolvatação (Lh⁻¹)	500

Fonte: Próprio autor (2016).

Para a separação cromatográfica utilizou-se coluna e condições de fase móvel iniciais disponíveis na literatura, adequando essas condições até a obtenção de uma boa separação cromatográfica para os analitos em estudo.

Obteve-se a separação cromatográfica utilizando uma coluna analítica Kinetex C18 (50 mm x 3,0 mm, 2,6 µm) e modo de eluição por gradiente. A fase móvel foi composta por água ultrapura (A) e uma mistura de acetonitrila:metanol (B) na proporção 50:50 (v/v), a Tabela 4 apresenta o gradiente utilizado.

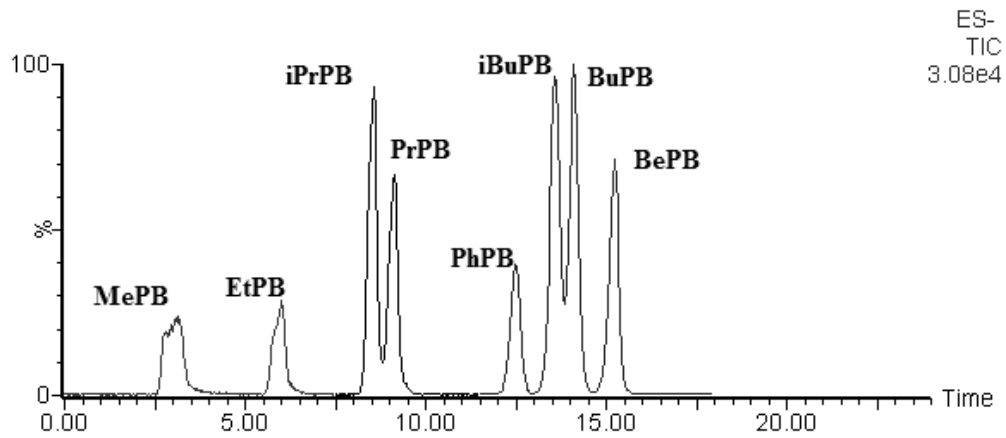
Tabela 4 - Gradiente de eluição

Tempo (min)	A (%)	B (%)
0	75	25
2	75	25
4	65	35
8	63	37
13	60	40
16	60	40
18	20	80
19	75	25
24	75	25

Fonte: Próprio autor (2016).

A vazão da fase móvel foi de 0,4 mL min⁻¹, resultando em um tempo total de análise de 24 minutos. O modo de eluição por gradiente permitiu uma melhor separação dos analitos, inclusive para os isômeros, conforme apresentado no cromatograma resultante na Figura 16.

Figura 16 - Cromatograma obtido por meio da injeção de uma mistura dos analitos na concentração $0,1 \text{ mg L}^{-1}$



Fonte: Próprio autor (2016).

3.3.4. Validação do método por LC-MS/MS

Primeiramente, definiram-se os limites de quantificação e detecção instrumentais e do método para cada analito. Após, realizou-se o preparo e a injeção das curvas no solvente e no extrato. A Tabela 5 apresenta os valores de LOD e LOQ instrumentais e do método para os analitos em estudo e a Tabela 6 as curvas analíticas preparadas no solvente e no extrato, seguidas de seus respectivos r , e o efeito matriz obtidos na validação do método.

Tabela 5 - LOD e LOQ instrumentais e do método

Analito	LOD _i ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ _i ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOD _m ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ _m ($\mu\text{g L}^{-1}$)
MePB	5,0	10	0,3	1,0
EtPB	5,0	10	0,3	1,0
iPrPB	5,0	10	0,3	1,0
PrPB	5,0	5,0	0,15	0,5
PhPB	5,0	5,0	0,15	0,5
iBuPB	5,0	5,0	0,15	0,5
BuPB	5,0	5,0	0,15	0,5
BePB	5,0	5,0	0,15	0,5

Fonte: Próprio autor (2016).

Tabela 6 - Curvas analíticas no solvente, extrato e efeito matriz

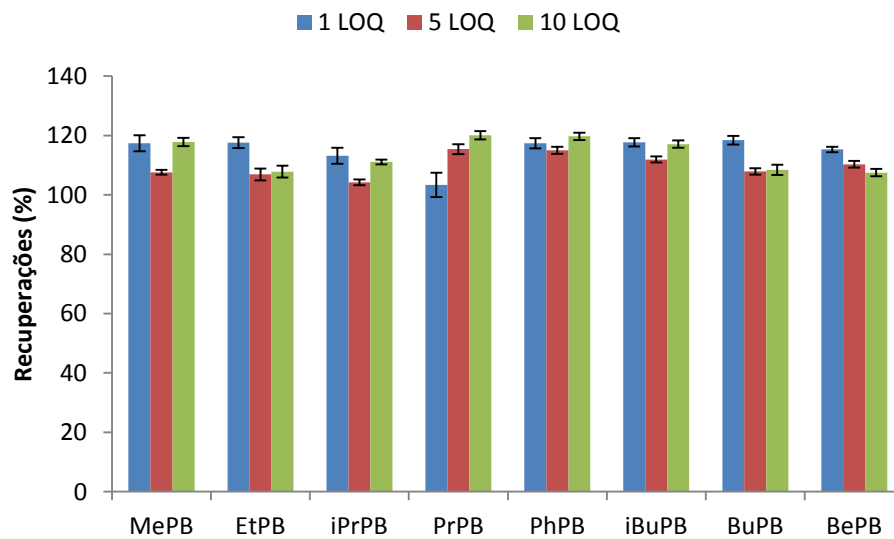
Analito	Solvente	r	Extrato	r	Efeito Matriz (%)
MePB	$y = 25473x + 26,667$	0,9999	$y = 25015x + 28,123$	0,9999	1,8
EtPB	$y = 17676,5x - 11,0478$	0,9997	$y = 18502,4x - 5,79385$	0,9998	-4,7
iPrPB	$y = 20591,2x - 6,09822$	0,9998	$y = 20744,9x + 14,9504$	0,9994	-0,7
PrPB	$y = 25961x + 92,596$	0,9999	$y = 26953x - 34,435$	0,9998	-3,8
PhPB	$y = 36175,4x - 9,30981$	0,9999	$y = 36097,2x + 12,1079$	0,9995	0,2
iBuPB	$y = 32834,1x + 30,3422$	0,9991	$y = 32896,1x + 21,2232$	0,9996	-0,2
BuPB	$y = 25471,7x - 6,85542$	0,9998	$y = 25492,3x + 12,5697$	0,9997	-0,1
BePB	$y = 34374,7x - 1,40238$	0,9996	$y = 34661,5x + 16,1736$	0,9998	-0,8

Fonte: Próprio autor (2016).

Segundo o guia de validação da ANVISA, as curvas analíticas apresentam boa linearidade, uma vez que, $r > 0,99$ para todas as curvas na faixa de trabalho utilizada, indicando um ajuste ideal dos dados para as linhas de regressão empregadas (ANVISA, 2003; RIBANI *et al.*, 2004). As curvas analíticas no solvente e no extrato foram utilizadas para o cálculo do efeito matriz, sendo que, todos os analitos apresentaram efeito matriz considerado baixo (na faixa de $\pm 20\%$) (ECONOMOU *et al.*, 2009; SANTE, 2015).

Com relação à exatidão e precisão, foram obtidas recuperações entre 103,4 e 120,1%, com $RSD \leq 4,1\%$ para os oito analitos, estando dentro dos parâmetros aceitáveis de acordo com o guia de validação da ANVISA (ANVISA, 2003). Os resultados são ilustrados na Figura 17.

Figura 17 - Exatidão e precisão empregando a SILLME estudada. Barras de erros representam RSD ($n = 9$). Condições de extração: volume de amostra, 5 mL; solvente extrator (acetonitrila), 500 μ L; sal ($MgSO_4$), 2 g.



Fonte: Próprio autor (2016).

3.3.5. Comparação do método proposto com outros métodos

Realizou-se uma comparação entre o método proposto e outros comumente empregados para a análise de parabenos em água, visto que, não existe um método oficial para análise de parabenos nessa matriz. A Tabela 7 ilustra algumas diferenças entre os métodos.

Tabela 7 - Comparação do método proposto com outros métodos

Técnica	Determinação	Analitos	Amostra (volume, pH e sal)	Solvente extrator (volume)	Tempo de extração	Exatidão (%)	Precisão (%)	LOQ _i (µg L ⁻¹)	LOQ _m (µg L ⁻¹)	Referência
SPE	LC-MS/MS	MePB, EtPB, iPrPB, nPrPB, iBuPB, nBuPB e BePB	Água (500 mL, sem modificações)	Metanol (4 mL)	-	87,9-99,2	7,5-24	0,02- 0,7	0,0004- 0,0014	(GONZÁLEZ- MARIÑO <i>et al.</i> , 2009)
SPME*	GC-MS/MS	MePB, EtPB, PrPB, BuPB e BePB	Água (10 mL, pH 6 e 150 mg mL ⁻¹ de NaCl)	-	50 min	98-114	2-13	0,001- 0,025	0,001- 0,025	(CANOSA <i>et al.</i> , 2006)
SD- DLLME	LC-MS/MS	MePB e PrPB	Água (10 mL, pH 2 e pH 8, 1% MgSO ₄)	1-octanol (120 µL)	10 min	65-119	7-25	5,0- 10,0	0,125- 0,250	(CALDAS <i>et al.</i> , 2016)
SILLME	LC-MS/MS	MePB, EtPB, iPrPB, PrPB, PhPB, iBuPB, BuPB e BePB	Água (5 mL, sem modificações)	ACN (0,5 mL)	7 min	103,4- 120,1	0,8-4,1	5,0- 10,0	0,5-1,0	Método proposto

Fonte: Próprio autor (2016).

* Necessita de etapa de derivatização.

Com os dados ilustrados na Tabela 7, nota-se que a SILLME pode ser considerada como um método alternativo aos já existentes, uma vez que, é rápida, fácil, utiliza baixos volumes de amostra e solvente e não necessita de modificações de pH ou adição de sal na amostra antes da etapa de extração para os analitos em estudo. Além disso, o solvente utilizado é considerado de baixa toxicidade quando comparado aos métodos tradicionais que empregavam solventes clorados.

Outra vantagem é a menor geração de resíduos, visto que, a SILLME utiliza menores volumes de amostra e solvente e determinação por LC-MS/MS, gerando também menores resíduos de fase móvel quando comparada à técnica de HPLC-DAD.

Dessa forma, os fatores acima destacados tornam este método vantajoso mesmo que os seus limites de quantificação não sejam tão baixos como os de outros métodos.

4. CONCLUSÕES

As condições estabelecidas para o sistema cromatográfico por HPLC-DAD possibilitaram o estudo da extração por SILLME, por meio da identificação e quantificação de MePB e PrPB através de uma análise com tempo total de 10 minutos.

Já as condições estabelecidas para o sistema cromatográfico por LC-MS/MS possibilitaram a identificação e quantificação de oito parabenos, incluindo isômeros, em um tempo total de análise de 24 minutos, permitindo que a técnica anteriormente estudada em um equipamento de HPLC-DAD pudesse ser validada para uma maior quantidade de analitos empregando o LC-MS/MS.

O método validado apresentou boa linearidade, com $r > 0,99$ para todas as curvas analíticas, em faixas de trabalho que variaram desde o LOQ de cada analito até 100 vezes o LOQ.

O método apresentou exatidão e precisão adequadas, com recuperações que variaram entre 103,4-120,1% e com $RSD \leq 4,1\%$ para os analitos em estudo. O efeito matriz do método também foi avaliado, indicando um baixo efeito matriz, na faixa de $\pm 20\%$ para todos os analitos.

Dessa forma, o método desenvolvido mostrou-se adequado para a determinação de parabenos em amostras de água, apresentando vantagens como rapidez, simplicidade, uso de solventes de baixa toxicidade quando comparado aos métodos tradicionais, baixo volume de amostra e solvente, além de gerar menores volumes de resíduos.

Além disso, o método pode contribuir analiticamente na geração de dados que poderão levar ao desenvolvimento de legislação para parabenos em amostras de água, que até o momento não existe.

5. RESÍDUOS

Todos os resíduos gerados nesse trabalho foram recolhidos, armazenados em frascos vidros âmbar, rotulados de acordo com as normas definidas pela comissão de resíduos da Escola de Química e Alimentos (EQA) e armazenados na própria unidade para posterior recolhimento e tratamento pela Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBA, A. F. **Chromatographic-mass spectrometric food analysis for trace determination of pesticide residues**. Access Online via Elsevier, 2004.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RE nº 899: Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. p. 15, 2003.

ARTHUR, C. L.; PAWLISZYN, J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. **Analytical Chemistry**, v. 62, n. 19, p. 2145-2148, 1990.

BEHBAHANI, M. et al. Modified nanoporous carbon as a novel sorbent before solvent-based de-emulsification dispersive liquid-liquid microextraction for ultra-trace detection of cadmium by flame atomic absorption spectrophotometry. **Measurement**, v. 51, p. 174-181, 2014.

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

BOBERG, J. et al. Possible endocrine disrupting effects of parabens and their metabolites. **Reproductive Toxicology**, v. 30, n. 2, p. 301-312, 2010.

BRAUN, J. M. et al. Personal care product use and urinary phthalate metabolite and paraben concentrations during pregnancy among women from a fertility clinic. **Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology**, v. 24, n. 5, p. 459-466, 2014.

CALDAS, S. S. **Otimização e validação de métodos empregando DLLME, SPE, HPLC-DAD e LC-ESI-MS/MS para determinação de agrotóxicos em água subterrânea**. 2009. 145 Universidade Federal do Rio Grande - FURG.

CALDAS, S. S. et al. Determination of pharmaceuticals, personal care products, and pesticides in surface and treated waters: method development and survey. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, n. 8, p. 5855-5863, 2013.

CALDAS, S. S. et al. Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 34, n. 9, p. 1604-1617, 2011.

CALDAS, S. S. et al. Multi-residue method for determination of 58 pesticides, pharmaceuticals and personal care products in water using solvent demulsification dispersive liquid-liquid microextraction combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 146, p. 676-688, 2016.

CANOSA, P. et al. Optimisation of a solid-phase microextraction method for the determination of parabens in water samples at the low ng per litre level. **Journal of Chromatography A**, v. 1124, n. 1, p. 3-10, 2006.

CARDOSO, L. V. et al. Optimization and Validation of a Method using SPE and LC-APCI-MS/MS for Determination of Pharmaceuticals in Surface and Public Supply Water. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 10, p. 1944-1952, 2011.

ChemSpider. 2016. Disponível em: < <http://www.chemspider.com/> >. Acesso em: 30 de março de 2016.

DARBRE, P. et al. Concentrations of parabens in human breast tumours. **Journal of Applied Toxicology**, v. 24, n. 1, p. 5-13, 2004.

DU, D. et al. Salting-out induced liquid–liquid microextraction based on the system of acetonitrile/magnesium sulfate for trace-level quantitative analysis of fluoroquinolones in water, food and biological matrices by high-performance liquid chromatography with a fluorescence detector. **Analytical Methods**, v. 6, n. 17, p. 6973-6980, 2014.

ECONOMOU, A. et al. Determination of multi-class pesticides in wines by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 31, p. 5856-5867, 2009.

EPA. DANISH ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Environmental Project No. 1474: Survey of Parabens. p. 58, 2013.

FARAJZADEH, M.; DJOZAN, D.; BAKHTIYARI, R. F. Use of a capillary tube for collecting an extraction solvent lighter than water after dispersive liquid–liquid microextraction and its application in the determination of parabens in different samples by gas chromatography—Flame ionization detection. **Talanta**, v. 81, n. 4, p. 1360-1367, 2010.

FENT, K.; WESTON, A. A.; CAMINADA, D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. **Aquatic Toxicology**, v. 76, n. 2, p. 122-159, 2006.

FERREIRA, A. M. C.; MÖDER, M.; LAESPADA, M. E. F. 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. 945-953, 2011.

GONZÁLEZ-MARIÑO, I. et al. Simultaneous determination of parabens, triclosan and triclocarban in water by liquid chromatography/electrospray ionisation tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 23, n. 12, p. 1756-1766, 2009.

HAN, J. et al. Ionic liquid-salt aqueous two-phase extraction based on salting-out coupled with high-performance liquid chromatography for the determination of sulfonamides in water and food. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, n. 4, p. 1245-1255, 2013.

LIAO, X.; RAGHAVAN, G.; YAYLAYAN, V. A novel way to prepare n-butylparaben under microwave irradiation. **Tetrahedron Letters**, v. 43, n. 1, p. 45-48, 2002.

LORAINÉ, G. A.; PETTIGROVE, M. E. Seasonal variations in concentrations of pharmaceuticals and personal care products in drinking water and reclaimed wastewater in southern California. **Environmental Science & Technology**, v. 40, n. 3, p. 687-695, 2006.

MARUBE, L. C. et al. Dispersive liquid-liquid microextraction with solidification of floating organic droplets for simultaneous extraction of pesticides, pharmaceuticals and personal care products. **Microchimica Acta**, v. 182, n. 9-10, p. 1765-1774, 2015.

MATKOVICH, C. E.; CHRISTIAN, G. D. Salting-out of acetone from water. Basis of a new solvent extraction system. **Analytical Chemistry**, v. 45, n. 11, p. 1915-1921, 1973.

NANITA, S. C.; PADIVITAGE, N. L. Ammonium chloride salting out extraction/cleanup for trace-level quantitative analysis in food and biological matrices by flow injection tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 768, p. 1-11, 2013.

OHE, T.; WATANABE, T.; WAKABAYASHI, K. Mutagens in surface waters: a review. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 567, n. 2, p. 109-149, 2004.

OISHI, S. Effects of butyl paraben on the male reproductive system in mice. **Archives of Toxicology**, v. 76, n. 7, p. 423-429, 2002.

PENG, X. et al. Occurrence of steroid estrogens, endocrine-disrupting phenols, and acid pharmaceutical residues in urban riverine water of the Pearl River Delta, South China. **Science of the Total Environment**, v. 397, n. 1, p. 158-166, 2008.

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

PRIMEL, E. G.; CALDAS, S. S.; ESCARRONE, A. L. Multi-residue analytical methods for the determination of pesticides and PPCPs in water by LC-MS/MS: a review. **Central European Journal of Chemistry**, v. 10, n. 3, p. 876-899, 2012.

REZAEI, M. et al. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1116, n. 1, p. 1-9, 2006.

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

SANTE. Document n° SANTE/11945/2015. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. 2015.

SONI, M. et al. Evaluation of the health aspects of methyl paraben: a review of the published literature. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, n. 10, p. 1335-1373, 2002.

SOUZA, J. M. O. et al. CONTAMINANTES EMERGENTES (2º Capítulo): Ftalatos e Parabenos. v. 2, 2014.

VO, T. T. et al. Estrogen receptor α is involved in the induction of Calbindin-D 9k and progesterone receptor by parabens in GH3 cells: A biomarker gene for screening xenoestrogens. **Steroids**, v. 76, n. 7, p. 675-681, 2011.

YAMAMOTO, H. et al. Aquatic toxicity and ecological risk assessment of seven parabens: individual and additive approach. **Science of the Total Environment**, v. 410, p. 102-111, 2011.