

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**“ANÁLISE DE PARABENOS EM ÁGUAS SUPERFICIAIS
URBANAS POR EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA *ON-LINE* USANDO
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE
MASSAS”**

Simone Pereira do Nascimento Triano

Dissertação apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do título de MESTRE
PROFISSIONAL EM QUÍMICA, área de
concentração: QUÍMICA TECNOLÓGICA.

Orientador (a): Dra. Quezia Bezerra Cass
*** Vínculo Empregatício: Agilent Technologies Brasil**

São Carlos – SP

2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Simone Pereira do Nascimento Triano, realizada em 24/05/2017.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Quezia Bezerra Cass (UFSCar)

Prof. Dr. Pedro Sergio Fadini (UFSCar)

Profa. Dra. Juliana Cristina Barreiro (IQSC/USP)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Química.

Dedico esta dissertação
....aos meus pais Eugênio e Verônica
....minha irmã Amanda
e ao meu marido Augusto.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Quezia B. Cass pelo exemplo profissional, orientação, incentivo, dedicação e compreensão.

À Agilent Technologies Brasil por apoiar continuamente o aperfeiçoamento profissional dos funcionários, valorizando as colaborações empresa-academia.

À gerência do laboratório e de recursos técnicos da Agilent Technologies Brasil Dra. Cintia Matuyama pelo incentivo para meu ingresso no mestrado profissional até conclusão.

Ao colega Dr. Celso Blatt pelos ensinamentos e discussões sobre o equipamento.

À Dra. Marina Denadai por toda prontidão e discussão para execução das coletas e validações.

Às doutoras Juliana Cristina Barreiro, Neila M. Cassiano, Bianca R. Lopes por discussões e suporte durante estes anos.

Ao departamento de Instrumentação Analítica da Embrapa de São Carlos-SP por gentilmente fornecer o ácido fúlvico.

Ao Professor Dr. Pedro Fadini do Laboratório de Biogeoquímica Ambiental da UFSCar por gentilmente fornecer o ácido húmico.

À estagiária Marjorie Mendonaa por ter sido a analista 2 para a validação.

À minha irmã e companheira de coleta de amostras Amanda Nascimento pelo apoio.

Muito Obrigada!

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1: Resumo das técnicas de preparo de amostra para águas por LC-MS/MS.....	3
TABELA 1.2: Características físico-químicas dos parabenos adaptada de Cabaleiro.....	15
TABELA 1.3: Parâmetros da SPE On-line.....	21
TABELA 1.4: Parâmetros do cromatógrafo líquido.....	22
TABELA 1.5: Parâmetros da fonte de Ionização ESI.	23
TABELA 1.6: Parâmetros do triplo quadrupolo.....	24
TABELA 1.7: Parâmetros da curva de calibração dos parabenos.....	40
TABELA 1.8: Precisão e exatidão intra-lotes (n=15).	41
TABELA 1.8: Precisão intermediária inter-lotes e exatidão (n=30).....	42
TABELA 1.9: Eficiência de extração dos controles de qualidade para cada parabeno e concentração avaliada (n=15).	43
TABELA 2.1: Limite de detecção e quantificação do método determinado experimentalmente.....	44
TABELA 2.2: Estabilidade da amostra do ponto (4) e solução padrão de 125 ng / L.	45
TABELA 2.3: Porcentagem de supressão iônica e aumento de sinal nas amostras dos quatro pontos de coleta (n=10).....	46

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1: Formatos de cartuchos mais conhecidos de extração em fase sólida cartucho de 60 mL até 1 mL e formato para uso com seringa, e seu leito varia de 10mg a 10 g adaptada de Agilent Technologies, Inc.....	5
FIGURA 1.2: Ilustração da metodologia SPE off-line e on-line adaptada de Buszewski e Szultka.....	7
FIGURA 1.3: Válvulas mais utilizadas em SPE on-line adaptada de Agilent Technologies, Inc.	8
FIGURA 1.4: Resumo de aplicações das diferentes fontes de ionização adaptada de Agilent Technologies, Inc.	10
FIGURA 1.5: Triplo Quadrupolo (QqQ) modelo 6460 da Agilent Technologies, Inc.	10
FIGURA 1.6: Estruturas propostas de ácidos fúlvicos (A) e (B) ácidos húmicos.....	12
FIGURA 1.7: Parabenos mais encontrados em produtos de cuidado pessoal.....	14
FIGURA 1.8: Pontos de coleta das amostras no Rio Monjolinho.	17
FIGURA 1.9: Válvula de SPE on-line na posição 1.	21
FIGURA 2.1: Válvula de SPE on-line na posição 2.	22
FIGURA 2.2: Chuva acumulada no ano de 2016 por mês.	29
FIGURA 2.3: Ciclo dos parâmetros de desenvolvimento do método de SPE on-line acoplada ao cromatógrafo líquido e triplo quadrupolo.....	30
FIGURA 2.4: Comparação da intensidade de sinais no modo scan em polaridade positiva (preto) e negativa (vermelho) no LC-MS por injeção direta, sem SPE e coluna analítica. Vazão de 0,4 mL/min de acetonitrila e água (1:1).....	31
FIGURA 2.5: Principal via de fragmentação para os parabenos	32
FIGURA 2.6: Cromatograma da mistura dos parabenos na concentração de 10 mg/mL a 0,4 mL / min no LC-DAD a 254nm.	33
FIGURA 2.7: Representação esquemática da fonte de ionização ESI Agilent JetStream (AJT).	34

- FIGURA 2.8: Cromatograma a 254nm com a coluna polimérica (PLRP) de SPE on-line acoplada a 95:5 água e metanol dos pontos de coleta (1) - rosa, (2) - verde, (3) – azul, (4) - laranja e o de cor preta água ultra purificada, sendo entre as amostras a nascente do Rio Monjolinho o de menor intensidade.35
- FIGURA 2.9: Cromatograma dos parabenos obtidos por MRM em coluna SPE on-line sem coluna analítica, condições cromatográficas: 0,4 mL / min e gradiente de água e acetonitrila conforme selecionado e apresentado na TABELA 1.4.....36
- FIGURA 3.1: MRM de cada parabeno e padrão interno (A) e MRM extraído dos parabenos, sendo selecionado como íon quantificador os de maior intensidade e o confirmador de menor intensidade (B).37
- FIGURA 3.2: MRM extraído do íon quantificador dos parabenos e respectivo padrão interno.37
- FIGURA 3.3: Corrida analítica com e sem injeção do branco e comparação de intensidade de sinal do MRM obtido na injeção do padrão na concentração de 2000ng / L dos parabenos.39
- FIGURA 3.4: Cromatogramas obtidos a 254nm nas mesmas condições do método aplicado na análise mostram agregados de moléculas para as amostras coletadas nos pontos (1), (2), (3) e (4) ao longo do Rio Monjolinho.47
- FIGURA 3.5: Cromatogramas obtidos a 254nm nas mesmas condições do método aplicado na análise para solução de ácidos fúlvicos e húmicos analisados separadamente e comparados com ponto (4).47
- FIGURA 3.6: Cromatogramas dos resultados encontrados em amostras de águas de superficiais urbanas dos pontos (3) e (4) com MRM extraído e os espectros de massas adquiridos.49

RESUMO

ANÁLISE DE PARABENOS EM ÁGUAS SUPERFICIAIS URBANAS POR EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA *ON-LINE* USANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Os parabenos são antimicrobianos utilizados em larga escala por mais de 100 anos em produtos de higiene pessoal. Os mais utilizados são metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno e butilparabeno. A liberação contínua desses antimicrobianos os coloca na categoria de poluentes orgânicos pseudo persistentes. Assim, métodos que possibilitem a quantificação em baixos limites em matrizes ambientais são importantes. O presente trabalho apresenta os resultados do desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação desses quatro parabenos em água de efluentes por extração em fase sólida *on-line* usando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. O método desenvolvido foi aplicado para análises de águas de efluente coletadas ao longo do rio Monjolinho em São Carlos, SP, Brasil. Metilparabeno na concentração de 20,0 ng / L foi encontrado próximo da jusante da confluência com o córrego do Tijuco Preto, latitude 22°00'68"S, longitude: 47°90'47"W e tanto o metilparabeno quanto o butilparabeno foram encontrados no trecho médio do Monjolinho, latitude: 22°02'21"S, longitude: 47°91'40"W nas respectivas concentrações de 18,0 ng / L e 4,1 ng / L. O atrativo do método desenvolvido consiste no baixo volume de água necessário para as análises e o baixo volume de solventes produzido para descarte. Os quatro parabenos foram quantificados na matriz nativa com tempo de corrida cromatográfica de 9,5 min.

ABSTRACT

DETERMINATION OF PARABENS IN URBAN WATERS BY *ON-LINE* SOLID PHASE EXTRACTION USING LIQUID CHROMATOGRAPHY AND MASS SPECTROMETRY

Parabens are the most popular antimicrobials used for more than 100 years in personal care products, the most known are methylparaben, ethylparaben, propylparaben and butylparaben. The continued release of these antimicrobials turned them into organic pollutants. Therefore, methods that allow quantification at low limits are important. The present study discusses the development and validation of the analytical method by direct injection of samples into solid phase extraction using liquid chromatography coupled to the mass spectrometer for determination at low levels in spring water and waste water (ng / L) from the city of São Carlos - SP. Methylparaben at 20.0 ng / L was found in river water sample from latitude 22°00'68"S, longitude: 47°90'47"W ; methylparaben at 18.0 ng / L and butylparaben 4.1 ng / L were found in urban water sample latitude: 22°02'21"S, longitude: 47°91'40"W around Monjolinho River. The attractiveness of the developed method consists of the low volume of samples and solvents required for analyses. The four parabens were quantified in the native matrix in a total run time of 9.5 min.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Métodos analíticos para determinação de traços em matrizes ambientais.....	1
1.1.1. Extração em fase sólida.....	4
1.1.2. Extração em fase sólida on-line	7
1.2. Cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas (LC-MS).....	8
1.3. Interferências da matriz	11
1.4. A importância do estudo de produtos de cuidado pessoal em ambientes aquáticos	13
1.5. O estudo de parabenos em ambientes aquáticos	14
1.6. Caracterização da área estudada.....	16
1.6.1. Rio Monjolinho	16
2. OBJETIVO	17
3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	18
3.1. Generalidade	18
3.2. Desenvolvimento do método	19
3.2.1. Preparo das soluções padrão	19
3.2.2. Condições cromatográficas.....	20
3.2.3. Espectrômetro de massas	23
3.2.4. Parâmetros de validação do método	24
3.2.4.1. Efeito memória	25
3.2.4.2. Curva de calibração	25
3.2.4.3. Seletividade.....	25
3.2.4.4. Recuperação.....	25
3.2.4.5. Precisão e exatidão	26
3.2.4.6. Limite de detecção e quantificação do método	26

3.2.4.7. Integridade de diluição	27
3.2.4.8. Efeito matriz	27
3.2.4.9. Estabilidade.....	27
3.2.5. Coleta e pré-tratamento das amostras.....	28
3.2.6. Aplicação do método	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4.1. Desenvolvimento do método SPE on-line e LC-MS/MS.....	29
4.2. Validação do método.....	38
4.2.1. Efeito memória.....	38
4.2.2. Seletividade, curva de calibração, precisão e exatidão	40
4.2.3. Eficiência do processo	42
4.2.4. Limite de quantificação e detecção do método	43
4.2.5. Integridade de diluição e estabilidade	44
4.2.6. Efeito matriz.....	45
4.2.7. Análises dos parabenos em amostras de águas superficiais urbanas.....	48
5. CONCLUSÕES	50
6. REFERÊNCIAS.....	51

1. INTRODUÇÃO

1.1. Métodos analíticos para determinação de traços em matrizes ambientais

O método analítico para determinação de traço de fármacos em matrizes ambientais complexas envolve um número considerável de métodos já descritos na literatura e este número tem aumentando consideravelmente.¹⁻³ Há mais de dez anos atrás a técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC/MS) com extração dos compostos utilizando 1 L de amostras e derivação foi escolhido para quantificar baixas concentrações como $\mu\text{g} / \text{L}$ e ng / L .⁴⁻⁹

Etapas de coleta, armazenamento e preservação, transporte e pré-tratamento de amostras são tão importantes quanto o tipo de preparo de amostra selecionado para garantir a qualidade dos resultados.¹⁰⁻¹²

Estudos recentes mostram que o tempo gasto no preparo de amostra continua sendo responsável por 61% do tempo total investido no laboratório priorizando a obtenção de atender baixos limites de quantificação.^{13, 14} O tempo gasto continua sendo exaustivo porque realizar o enriquecimento dos analitos de interesse de forma seletiva e a eliminação dos interferentes envolvem etapas que consomem bastante tempo. Por este motivo, e com o crescente número de amostras a serem analisadas em laboratórios de monitoramento, há uma busca contínua por métodos de alta produtividade, custo efetivo e de fácil manuseio. Com isso, ao longo dos últimos anos, tem havido um aumento na utilização de instrumentos automatizados que integram a extração, purificação e detecção.^{15,16}

Baseado no parque instrumental instalado nos laboratórios privados de análises ambientais no Brasil, mais de 80% dos métodos estão direcionados a técnica GC-MS (cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas) a qual é robusto e bem consolidado na literatura, principalmente em métodos oficiais como a série EPA (*Environmental Protection Agency*) como a série 500.¹⁷⁻²⁰ No entanto, o efeito no meio ambiente por utilizar grandes volumes de solventes, geralmente clorados são mais agressivos¹⁰, e nem sempre a combinação de LLE (extração líquido-líquido) e GC/MS são adequados para atender baixa sensibilidade exigidas na

legislação, por alguns compostos terem instabilidade térmica ou serem mais polares.^{17,18} O EPA tem alguns métodos publicados indicando o uso de extração em fase sólida (SPE), como fenóis em água, mas em menor número do que em LLE.¹⁹⁻²⁰

Abordagens genéricas têm sido desenvolvidas para preparo de amostras de água tendo como análise final o LC-MS/MS (cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial) envolve principalmente técnicas como: LLE, SPE, micro extração em fase sólida (SPME) e extração sortiva em barra de agitação (SBSE), ainda outras técnicas como: materiais de acesso restrito (RAM) e cromatografia de fluxo turbulento (TFC) tem sido exploradas,¹²⁻¹⁵ a TABELA 1.1 mostra resumidamente estas técnicas.^{11,12,18-21}

Atualmente, a técnica por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS) oferece alta sensibilidade,^{10,16} utiliza menores volumes de amostra, o que possibilita menor custo com logística e estocagem, reduz a possibilidade de erro por manuseio, gasta menor quantidade de solvente o que proporciona benefício duplo com menor compra e descarte, sem etapa de evaporação, sem necessidade de reconstituição e o sistema integrado com software aumenta a produtividade.

TABELA 1.1: Resumo das técnicas de preparo de amostra para águas por LC-MS/MS.

11,12,13-15, 21

Método de Preparo de Amostra	Princípios da Técnica	Comentários
Extração Líquido-Líquido (LLE)	Há partição entre duas fases imiscíveis (amostra de água e um ou uma mistura de solventes) onde o solvente é escolhido para maximizar a diferença de solubilidade com a fase aquosa. O analito é recuperado preferencialmente sem interferentes em uma das duas fases.	É comum a formação de emulsões, o que dificulta a recuperação dos compostos e/ou aumenta o tempo de preparo de amostra. Em geral, as emulsões são quebradas com aquecimento ou adição de sais. O fator de solubilidade pode ser otimizado por utilizar diferentes solventes ou aditivos (como tampão para ajuste de pH, sais de força iônica, agentes complexantes, agentes de pareamento iônico e outros). Grandes volumes de solventes são utilizados. Há muitos métodos publicados. A técnica não é considerada moderna, exceto quando se trata de sua miniaturização.
Extração em Fase Sólida (SPE)	Similar a técnica de HPLC, a amostra é aplicada em cartucho ou disco empacotado após o condicionamento, seguido pela remoção dos interferentes e por último a eluição dos analitos de interesse.	Variedades de fases estacionárias estão disponíveis para remoção seletiva de interferentes como: sais, proteínas, lipídios e surfactantes, existem fases especiais para drogas, carboidratos, catecolaminas, íons metálicos, análises de traço de água entre outros.
Microextração em Fase Sólida (SPME)	Há difusão e partição/adsorção entre as fases, os analitos são dessorvidos por colocar a fibra em um líquido para posterior análise e separação por LC.	Há variedades de polímeros disponíveis como polimetilsiloxano (PDMS), poliacrilato, divinil carbowax e carboxen-PMDS. Pode trabalhar com pequenos volumes de amostra, é transportável facilmente.
Extração Sortiva em Barra de Agitação (SBSE)	Técnica análoga ao SPME exceto que a relação de massa do SBSE é maior. Uma barra de agitação magnética geralmente envolta em vidro é revestida com uma fase polimérica. A barra sortiva é colocada em uma amostra líquida e os	SBSE é também um método de equilíbrio, mas devido ao grande volume de massa do sorvente na barra, a capacidade de amostra (e por isso a sensibilidade) desta técnica excede a de

	<p>analitos são difusos, particionados ou adsorvidos na fase estacionária, após a remoção da barra sortiva da amostra ela é secada e como o SPME os analitos são desorvidos em um apropriado solvente para HPLC.</p>	<p>SPME em magnitude. A técnica é de automação mais difícil que o SPME.</p>
<p>Material de Acesso Restrito (RAM)</p>	<p>Na fase RAM as macromoléculas são excluídas por uma barreira de difusão física e/ou por uma barreira de difusão química enquanto os analitos de baixa massa molecular são retidos baseado em um <i>cut-off</i> e extraídos pelos mesmos conceitos da cromatografia líquida.</p>	<p>Publicações utilizando esta técnica com SPE <i>off-line</i> e por injeção direta em 2D-LC (Cromatografia líquida de duas dimensões) tem sido apresentada. Esta técnica tem se mostrado promissora e de fácil automação para as aplicações em matrizes de leite, plasma, sangue e águas.</p>
<p>Cromatografia de Fluxo Turbulento (TFC)</p>	<p>Uma coluna de partícula grande (~ 50 µm) e de diâmetro pequeno (1mm) empacotada de fase reversa é utilizada em alto vazão linear de até 8 mL/min. Esta elevada velocidade linear não permite que as macromoléculas se difundam e sejam extraídas, com isso as macromoléculas são descartadas e as moléculas pequenas como fármacos e metabólitos em seguida são eluídas com fase móvel aquosa-orgânica para detecção no MS.</p>	<p>O número teórico de <i>Reynolds</i> não é atingido na vazão usada em TFC para ser considerado turbulento, mas a velocidade linear permite que as macromoléculas como proteínas e ácidos húmicos sejam descartados e as moléculas pequenas penetrem nos poros da coluna da mesma forma.</p>

1.1.1. Extração em fase sólida

Desde a década 1970, a extração em fase sólida se tornou a técnica de preparo mais comum e uma das mais efetivas para extrair analitos de matrizes complexas, onde várias amostras podem ser extraídas ao mesmo tempo (tipicamente 6, 12, 20, 24 e 96 posições) com a possibilidade de concentração do analito de interesse, sem a necessidade de grandes volumes de solvente como a extração líquido-líquido e com procedimentos que podem ser facilmente automatizados tendo como objetivos além da concentração do analito de interesse, *clean-up*, maior produtividade e diminuição da possibilidade de erros no preparo de amostra.^{1,10,11}

Os formatos de SPE disponíveis são diversos, indo de formatos como ponteiros de micro pipetas, micro placas, seringas, discos até cartuchos sendo diferenciados por volume, tipos de fase e massa do leito (fase sólida).^{10,13, 21} Para águas, os formatos utilizados são de cartuchos ou discos,^{10,17} a FIGURA 1.1 mostra os principais formatos dos cartuchos.

A seleção de fase estacionária para SPE depende da característica físico-química do analito de interesse, matriz, concentração esperada, técnica analítica e quantidade de amostra disponível. Desta forma, a seleção do formato e fase se baseará em um ou mais mecanismo de interação, como: apolares, polares, de troca iônica e por forças de Van Der Waals da mesma forma que empregado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).^{10,13, 22-23-23}

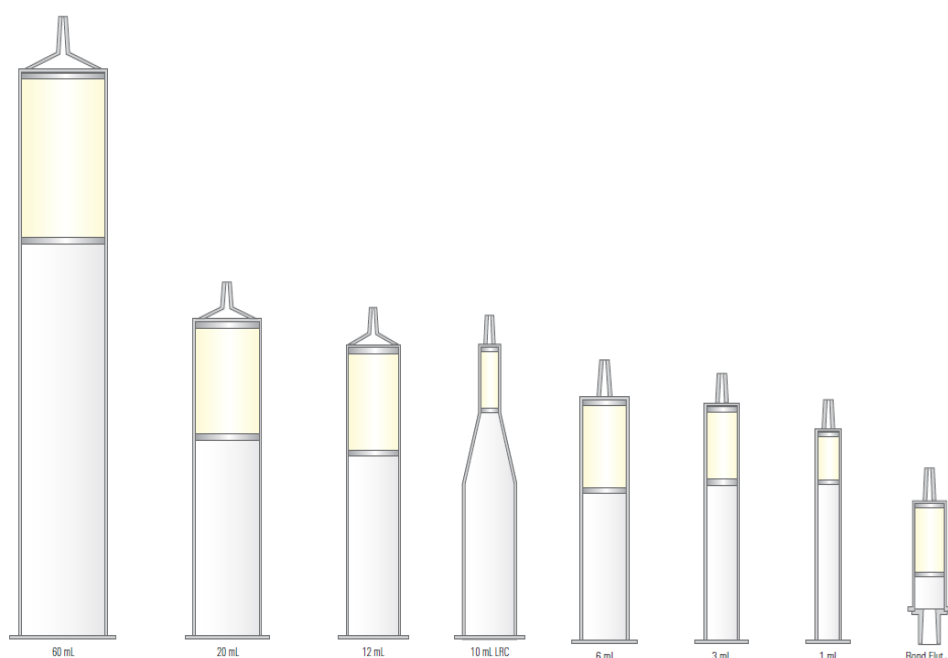


FIGURA 1.1: Formatos de cartuchos mais conhecidos de extração em fase sólida cartucho de 60 mL até 1 mL e formato para uso com seringa, e seu leito varia de 10mg a 10 g adaptada de Agilent Technologies, Inc.¹⁰

A técnica de SPE consiste basicamente de quatro etapas: 1) condicionamento, para ativação dos materiais a base de sílica evitando blindagem hidrofóbica-hidrofílica e para garantir a limpeza dos materiais a base de polímeros, 2)

aplicação ou carregamento da amostra para extração dos analitos de interesse, 3) *clean-up* para purificação/limpeza da fase de SPE, visto que muitos interferentes são extraídos juntos com os compostos de interesse e 4) eluição para obtenção do analito.
10, 21, 22

Fases a base de sílica, tem possibilitado extração de diferentes classes de analitos devido a sua diversidade, sendo a mais utilizada em matrizes ambientais aquosa a de C18, outras fases também utilizadas são C8, Fenila, NH₂, SAX (troca aniônica forte) e SCX (Troca catiônica forte). Fases baseadas em sílica tem limitações de aplicações pela estreita faixa de pH operacional.²⁰⁻²³

Muitos trabalhos nos últimos 15 anos foram publicados utilizando materiais a base de polímero para poluentes orgânicos emergentes (EOCs), que inclui fármacos e produtos de higiene pessoal (PPCPs), hormônios, drogas e pesticidas.
14,23

A busca por fases de SPE que possam ser usadas para extração de compostos orgânicos polares e apolares teve o foco industrial de várias empresas e lançamentos de novos produtos nos anos 90 e início dos anos 2000 traziam alta expectativa para preparos de amostras genéricos e simplificados. Os polímeros, assim como os a base de sílica tem fases para troca iônica fraca e forte. Além disto, apresentam fases do modo misto.^{10, 21-23} As fases poliméricas comercialmente disponíveis são majoritariamente as de estireno-divinilbenzeno e poli(divinilbenzeno-co-N-vinilpirrolidona), sendo a última, considerada na segundo a literatura a mais promissora no que se refere extração de diferentes classes de compostos, porém não é de uso universal. De todo modo, a sonhada fase universal está longe de ser encontrada, diversas publicações comprovam que tal fase não está disponível.^{14, 23,24}

Novas fases de SPE têm sido desenvolvidas para ampliar e aprimorar as extrações em aplicações específicas.¹⁴ Dentre elas as fases *MIPs* (polímeros de impressão molecular), onde o objetivo é produzir sítios específicos a partir de um modelo molecular para extrair seletivamente uma molécula; as colunas contendo fases de meio de acesso restrito (RAM) onde as macromoléculas são excluídas e as de baixa massa molecular são extraídas; e nanotubos de carbono que possuem elevada área superficial viabilizando extração de compostos orgânicos e inorgânicos.

^{14, 25} A aplicação destas fases em diferentes matrizes como fluídos biológicos, ^{25, 26} vinho ²⁷, águas ²⁸⁻³⁰ e leite materno ²⁶ tem sido promissora.

1.1.2. Extração em fase sólida *on-line*

As principais vantagens da SPE *on-line* ao *off-line* ³¹ estão listadas na FIGURA 1.2, sendo os cartuchos reutilizáveis no formato de pré-colunas de HPLC, rápida eluição com menor consumo de solventes por ter a eluição com a fase móvel depois do enriquecimento, mínima degradação e sem perda do analito por evaporação, esta etapa não faz parte do protocolo e por isso a técnica *on-line* traz tempo de análise reduzido. Suas desvantagens são a menor flexibilidade em relação as fases selecionadas, menor fator de concentração do analito e necessidade de válvulas de comutação de colunas resultando em um sistema inicial de custo mais elevado que o *off-line*. ^{22,31-33}

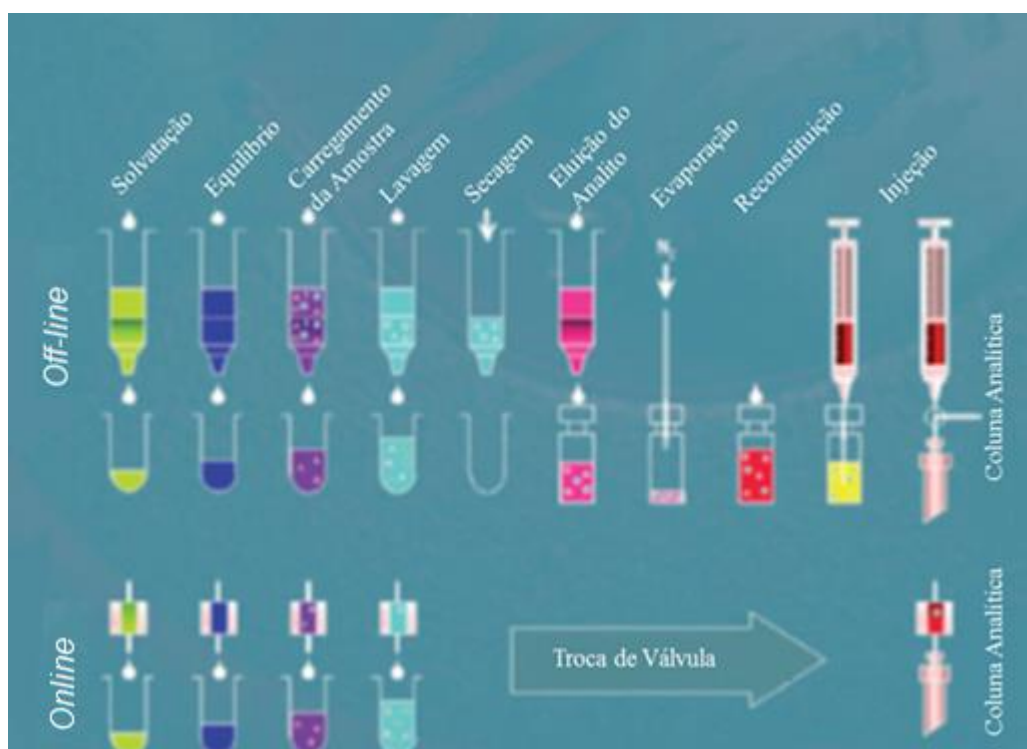


FIGURA 1.2: Ilustração da metodologia SPE *off-line* e *on-line* adaptada de Buszewski e Szultka. ³¹

A SPE é denominada *on-line* quando usa válvulas de comutação para acoplar a coluna de SPE a coluna analítica com alta flexibilidade de uso e várias configurações do sistema cromatográfico. A FIGURA 1.3 mostra as opções de válvulas mais utilizadas. Sendo, a válvula de 10 pórticos de mesma funcionalidade que a de 6 pórticos tendo a vantagem de utilizar duas colunas de SPE e assim ser mais produtivo. Ambas são utilizadas para o enriquecimento, limpeza da amostra e regeneração das colunas.³⁴

As aplicações utilizando a técnica de SPE *on-line* tem se tornado cada vez mais popular e diferentes tipos de aplicações têm sido publicadas como drogas, antibióticos, carbamatos, piretróides, sulfanamidas e produtos farmacêuticos em águas. Os volumes de injeção variam de 0,5 mL – 10 mL.³⁶⁻³⁹

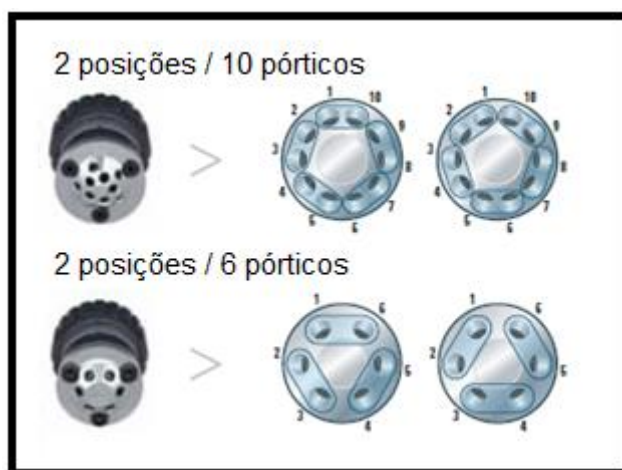


FIGURA 1.3: Válvulas mais utilizadas em SPE *on-line* adaptada de Agilent Technologies, Inc.

1.2. Cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas (LC-MS)

Para a maioria dos analitos o espectrômetro de massas é mais sensível que todos os outros detectores acoplados ao LC.⁴⁰ Ele pode analisar compostos que não contém cromóforo, identificar analitos em coeluição, quando estes têm massas e carga diferentes, reduzindo a necessidade de alta resolução cromatográfica.⁴¹⁻⁴⁷

O espectrômetro de massas trabalha com moléculas ionizadas e de acordo com suas massas, cargas e fragmentos são identificadas.⁴¹ A fonte de massas que gera os íons e o analisador de espectro de massas que classifica os íons são importantes para gerar os resultados. Diversos tipos de fonte de ionização e analisadores de massas estão disponíveis. Cada um é adequado para diferentes aplicações, tendo cada um suas vantagens e desvantagens dependendo do objetivo.

39, 41-43

Na ionização em pressão atmosférica (API), os íons moleculares são ionizados e os analitos são mecanicamente ou eletrostaticamente separados de moléculas neutras. As técnicas mais comuns utilizadas com ionização à pressão atmosférica são: ionização por *electrospray* (ESI), ionização química à pressão atmosférica (APCI) e fotoionização à pressão atmosférica (APPI),^{39, 41, 44, 45} as suas aplicações variam de acordo com o peso molecular e polaridade dos compostos alvos conforme resumido na FIGURA 1.4.

A configuração do analisador triplo quadrupolo (QqQ) representado na FIGURA 1.5 mostra o seu funcionamento após a fonte de íons que é a etapa de formação do aerossol pelo nebulizador eliminando a fase líquida pelo processo de explosão de Coulomb e formação de íons na fase gasosa. Estes íons são induzidos para dentro do capilar e por um cone com um orifício central (*Skimmer*) seguindo em direção ao octapolo que direciona os íons para o primeiro quadrupolo (Q1) para monitoramento na forma de varredura de íons, ou seletiva, quando monitorado os analitos isoladamente e em seguida para a cela de colisão, que quando utilizada promove a dissociação por colisão com gás e seguem direcionada para o segundo quadrupolo (Q2) que também pode ser utilizado como um filtro de massas.³⁹⁻⁴¹

Para compostos orgânicos em ambientes aquáticos, o QqQ é o mais popular por apresentar sensibilidade na ordem de $\mu\text{g} / \text{L}$ a ng / L , facilidade e baixo custo comparado a outros analisadores. Porém, a técnica de espectrometria de massas não está isenta do efeito matriz e por isto a seleção adequada do preparo de amostra se faz necessário.^{18, 39, 43, 48}

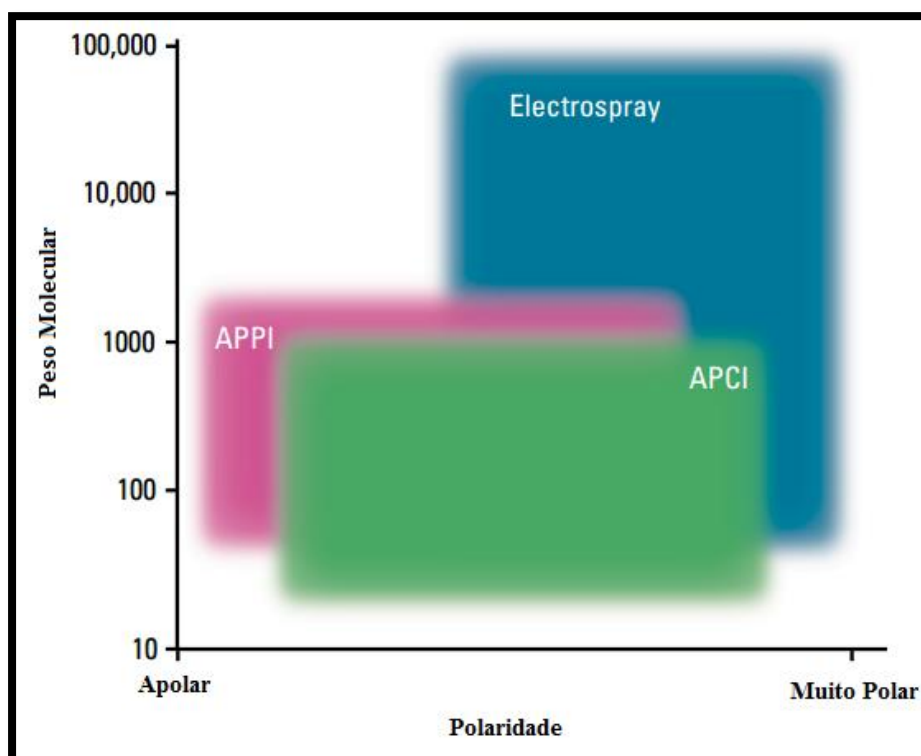


FIGURA 1.4: Resumo de aplicações das diferentes fontes de ionização adaptada de Agilent Technologies, Inc.

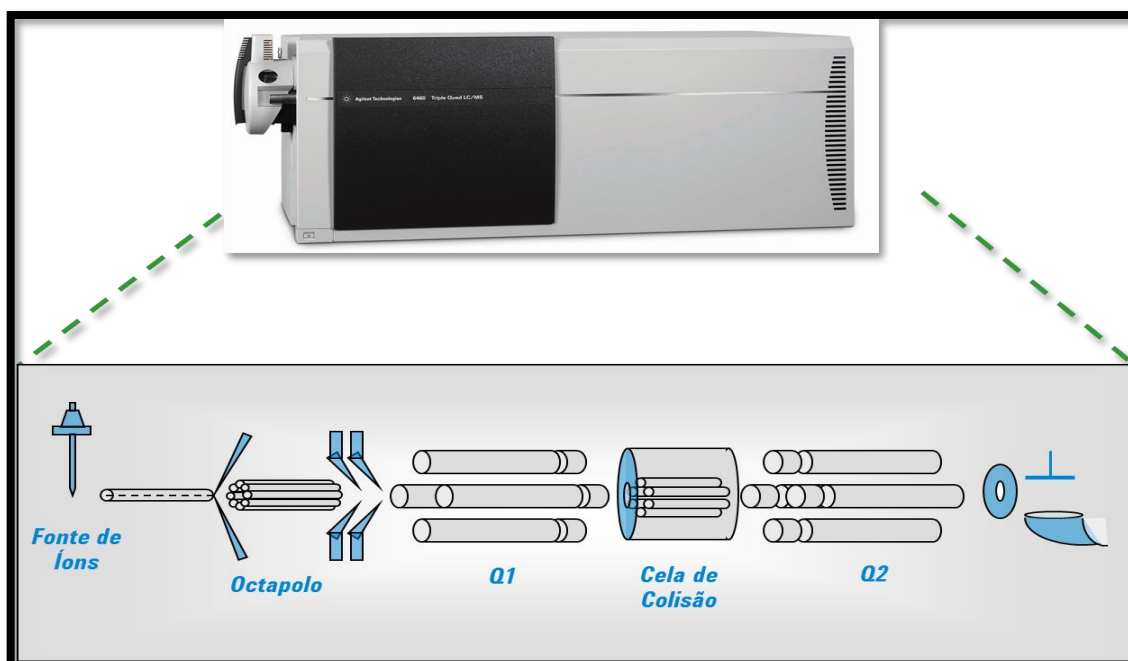


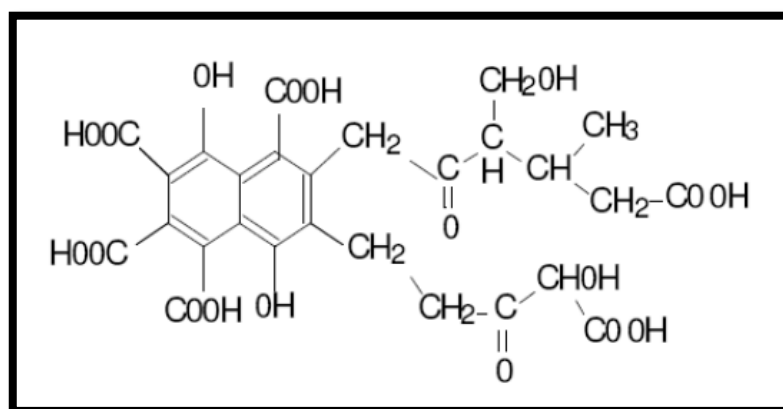
FIGURA 1.5: Triplo Quadrupolo (QqQ) modelo 6460 da Agilent Technologies, Inc.

1.3. Interferências da matriz

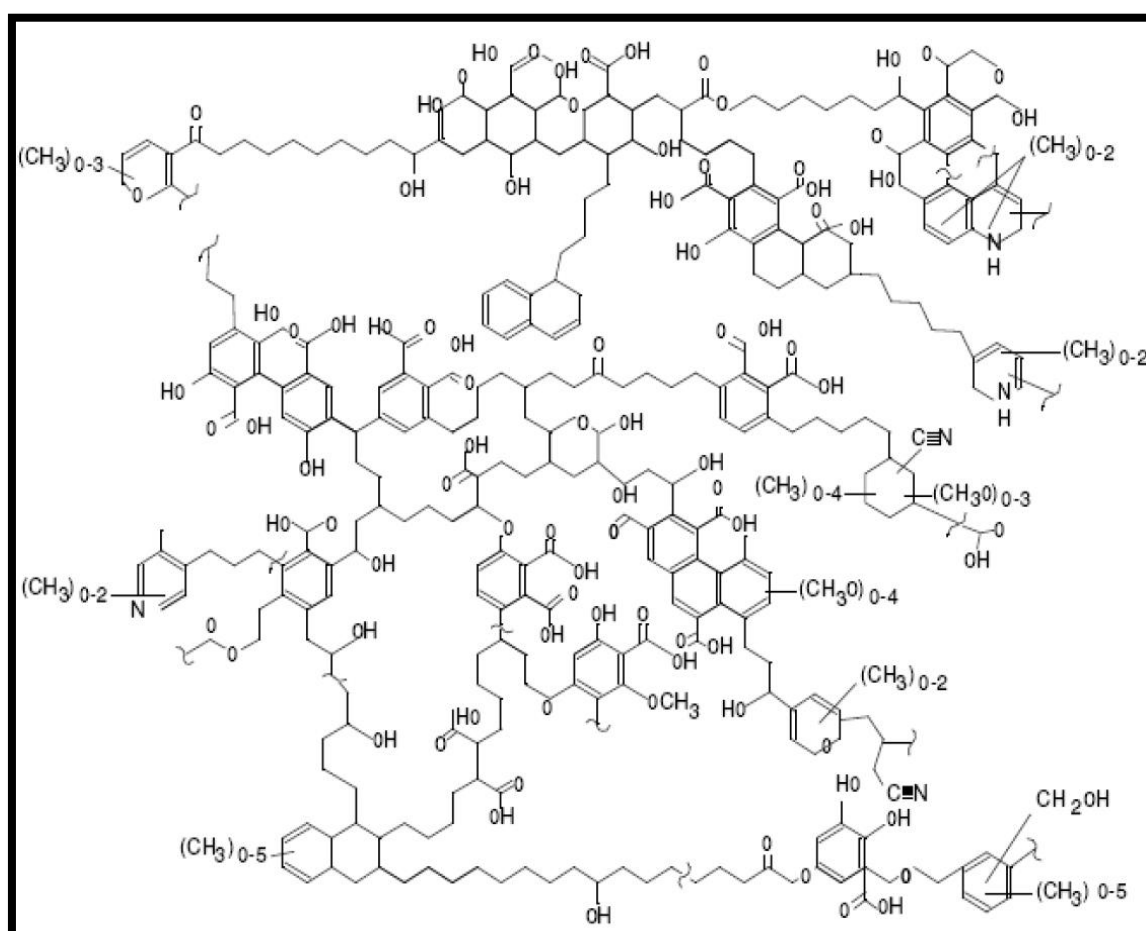
As substâncias húmicas são encontradas em solos, solos turfosos, sedimentos e águas naturais; são formadas pela degradação química e biológica de resíduos de vegetais e de animais e da atividade de síntese de microrganismos. Sustâncias húmicas podem ser separadas em três categorias: ácidos húmicos, ácidos fúlvicos e humina. Das substâncias húmicas, os ácidos húmicos e fúlvicos são os mais estudados. ⁵⁰⁻⁵²

Em 2015, o estudo realizado por Ribeiro et al ⁴² sobre monitoramento de diversas classes de compostos em águas residuais demonstrou o efeito de matriz baseado na comparação das áreas dos compostos de mesma concentração preparados em uma solução etanólica com as áreas obtidas quando preparados na matriz. Com isso, foi possível verificar os resultados em matrizes com e sem interferentes. Na avaliação dos resultados o valor de 100% indicava a ausência absoluta de efeito matriz, superior a 100% indicava um aumento de ionização, e inferior a 100% indicava supressão de ionização. Dependendo do tempo de retenção estrutura química dos analitos, tanto supressão iônica e aumento de sinal foram observados na maioria dos compostos.

Em estudos utilizando águas de estuário ^{19, 52} foi demonstrado que a presença de substâncias húmicas podem também ser responsáveis pelo efeito matriz, a FIGURA 1.6 mostra estrutura proposta dos ácidos fúlvicos e húmicos. ^{52, 53}



(A)



(B)

FIGURA 1.6: Estruturas propostas de ácidos fúlvicos (A) e (B) ácidos húmicos. ⁵²

1.4. A importância do estudo de produtos de cuidado pessoal em ambientes aquáticos

A EPA tem trabalhado com uma classe maior que os PCPs (*Personal Care Products*), chamado de PPCP's (*Pharmaceuticals and Personal Care Products*), o qual envolve possíveis interferentes endócrinos provenientes de fármacos e produtos de cuidado pessoal. Dentre os grupos de compostos podemos destacar os dos PPCP's: hormônios, estimulantes, antidepressivos, antibióticos, analgésicos, anti-inflamatórios, agentes de proteção solar e antisépticos/desinfetantes entre outros. Considerando o grupo dos preservantes/conservantes, os parabenos são os mais presente. A toxicidade aguda destes compostos é considerada baixa, mas a ação competitiva entre o butilparabeno e o estradiol para se ligar ao receptor de estrogênio foi observado em ratos, também o risco de aplicação dérmica é desconhecido e a introdução contínua desses benzoatos em efluente e águas de recreação podem colocar em risco os organismos aquáticos. ⁵⁵⁻⁵⁹

Os PCPs são diversos grupos de compostos usados em produtos de higiene pessoal (batons, fragrâncias, loções, pasta de dente, filtros solares entre outros) e diferentemente dos produtos farmacêuticos que são de uso interno, os PCPs são produtos de uso externo e, portanto, com baixa capacidade de metabolização quando comparado aos medicamentos. ^{53, 54} Por esta razão, grandes quantidades de PCPs entram no meio ambiente de forma inalterada através do uso regular desses produtos pelo homem. Como são usados em ampla escala, estudos recentes têm indicado que muitos são persistentes. ^{55, 56}

Os PCPs e os PPCPs não são tão persistentes quanto outros poluentes orgânicos, porém as suas liberações contínuas fazem com que estes sejam considerados compostos pseudo persistentes. ⁵⁴⁻⁵⁶ Em decorrência disso, o desenvolvimento de métodos que possibilitem a quantificação em baixos limites é de grande importância.

1.5. O estudo de parabenos em ambientes aquáticos

Os parabenos são grupos de substâncias utilizadas por mais de 100 anos como preservativos antimicrobianos em cosméticos, alimentos e fármacos e tem sido detectado com frequência em ambientes aquáticos e amostras biológicas.⁵⁵⁻⁶⁴ Os parabenos mais encontrados em cosméticos são os metilparabeno (MP), etilparabeno (EP), propilparabeno (PP) e butilparabeno (BP),^{61, 65} a FIGURA 1.7 apresenta a estrutura química desses parabenos. Comercialmente, os parabenos são produzidos por esterificação do ácido p-hidroxibenzóico com o álcool correspondente na presença de um catalisador (por exemplo, ácido sulfúrico concentrado ou ácido p-toluenossulfônico).⁶⁵

Eles apresentam muitas vantagens em comparação a outros conservantes, tal como estabilidade e eficiência sobre uma ampla faixa de pH, além de serem suficientemente solúveis em água, não apresentarem nem odor ou gosto perceptíveis, não induzem a descoloração e são estáveis. Devido a essas características, os parabenos podem ser aplicados de modo eficaz em produtos de cuidado pessoal como preservantes mesmo em fase aquosa e também são utilizados como aditivos em embalagens de alimentos.^{61, 62, 65}

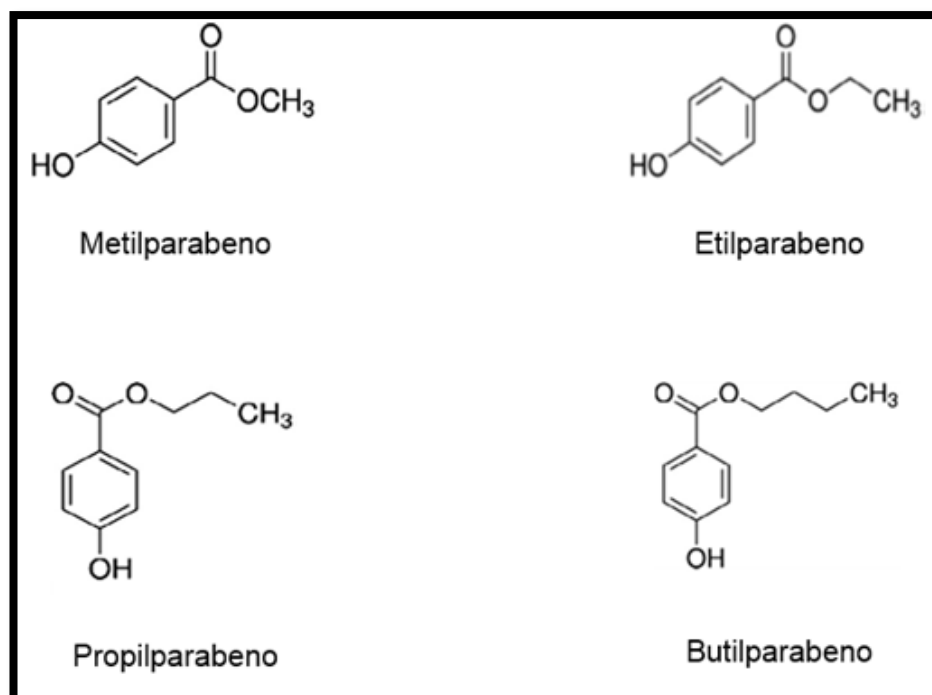


FIGURA 1.7: Parabenos mais encontrados em produtos de cuidado pessoal.

As propriedades antibacterianas dos parabenos são diretamente proporcionais ao comprimento da cadeia do grupo éster, e assim, por exemplo, o butilparabeno tem 4 vezes mais capacidade de inibir o crescimento do que o etilparabeno. No entanto, com o aumento do comprimento da cadeia, o valor do coeficiente de partição sobe o qual resulta na diminuição da solubilidade em água, ^{61, 65} a TABELA 1.2 mostra estas informações.

Aproximadamente 80% dos produtos de cuidado pessoal contém a presença dos parabenos. ⁶²⁻⁶⁵ Em águas cloradas, compostos fenólicos contendo grupos hidroxilas como os parabenos tem cinética favorável para cloração, com isso eles são facilmente clorados por hipoclorito de sódio que é uma das técnicas mais utilizadas para o branqueamento da água. ^{62, 64, 65}

Nos últimos anos, tem se dado mais atenção aos PPCPs e estudos tem sido desenvolvido para melhor compreensão dos problemas toxicológicos em diferentes doses a exposição a múltiplo estressores químicos e como os riscos humanos e ecológicos que podem ser afetados por estes coquetéis químicos. ⁶³⁻⁶⁵

TABELA 1.2: Características físico-químicas dos parabenos adaptada de Cabaleiro. ⁶⁰

Características	MP	EP	PP	BP
Fórmula Química	C ₈ H ₈ O ₃	C ₉ H ₁₀ O ₃	C ₁₀ H ₁₂ O ₃	C ₁₁ H ₁₄ O ₃
Massa Molecular (g/mol)	152,16	166,18	180,21	194,23
pKa	8,17	8,22	8,35	8,37
Log de partição octanol- água	1,66	2,19	2,71	3,24
Solubilidade a 25 °C (g/100 ml)	2,00	0,86	0,30	0,15

Os parabenos tem sido detectado em efluentes nas concentrações de até 13 µg / L e em afluentes a 0,08513 µg / L, isso mostra que diariamente produtos

farmacêuticos e de cuidado pessoal são lançados continuamente em ambientes aquáticos.^{56, 57}

Outros estudos apontam que pode ocorrer bioacumulação de parabenos no ambiente. Resultados apresentados em artigos científicos mencionam a exposição diária do homem de até 8 µg/kg proveniente de produtos de cuidado pessoal, 417 µg/kg de produtos farmacêuticos, 0,00253 µg/kg de produtos alimentícios entre outros contatos proveniente de poeira e ar. O destino dessa exposição humana é esgoto doméstico. Estudos apresentaram como resultado a concentração em afluentes de 79,6 µg / L, efluente 3,83 µg / L, planta 8 µg/g, lodo 0,202 µg / g, solo 0,008 µg / g, sedimento 0,377 µg / g, águas superficiais 3 µg / L e em peixe 3,6 µg / g.⁵³⁻⁵⁷

1.6. Caracterização da área estudada

1.6.1. Rio Monjolinho

O Rio Monjolinho, cuja extensão é de 43 km, faz parte de uma sub-bacia hidrográfica que tem 274 km² de extensão e desagua no rio Jacaré-Guaçu, um dos principais afluentes do rio Tietê.⁶⁷ O Monjolinho, por si só, tem cerca de 40 afluentes que desaguam nele, e a maior parte desse rio fica localizada na cidade de São Carlos, o que inclui sua nascente, que fica na zona rural.⁶⁸⁻⁷¹

A partir da nascente, o rio se estende pela cidade em direção ao norte, até chegar ao campus da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). De lá, segue rumo à área urbana da cidade, até o ponto de desaguar em sua foz, no rio Jacaré-Guaçu.⁷⁰ Quando entram na área urbana, as águas do Monjolinho passam a receber todo tipo de efluentes direcionados para o escoamento superficial urbano. Isso inclui tanto efluentes domésticos, por meio do esgoto da cidade, quanto industriais (vindos de indústrias químicas, alimentícias e de outros setores), principalmente por meio de afluentes como o Tijuco Preto, córrego do Gregório e Santa Maria Madalena.⁷⁰⁻⁷²

Por conta do considerável aumento na poluição das águas do rio Monjolinho com o passar dos anos, chegou-se à conclusão de que era necessário criar uma estação de tratamento de esgoto, a ETE Monjolinho.⁶⁸⁻⁷³ Inaugurada em 2008, essa unidade consegue tratar em média 457 L/s.⁶⁸

Os pontos de coleta ao longo do Rio Monjolinho conforme visualização na FIGURA 1.8 correspondem a: (1) nascente do Rio Monjolinho - latitude: 22°00'33"S e longitude: 47°50'07"W; (2) áreas com possíveis contaminações industrial e urbana - latitude: 21°98'58"S, longitude: 47°88'22"W. Localiza-se na Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). (3) próximo da jusante da confluência com o córrego do Tijuco Preto, inserida em área urbanizada. Latitude 22°00'68"S, longitude: 47°90'47" W. (4) situa-se no trecho médio do Monjolinho, logo após a área urbana. Nesse local, havia uma barragem construída pela Companhia de Força e Luz (CPFL), a qual foi parcialmente derrubada, em 1999, para aumentar o escoamento. Latitude: 22°02'21"S, longitude: 47°91'40"W. O sistema de tratamento de esgoto da cidade de São Carlos está operacionalizado em 100%.⁷⁴

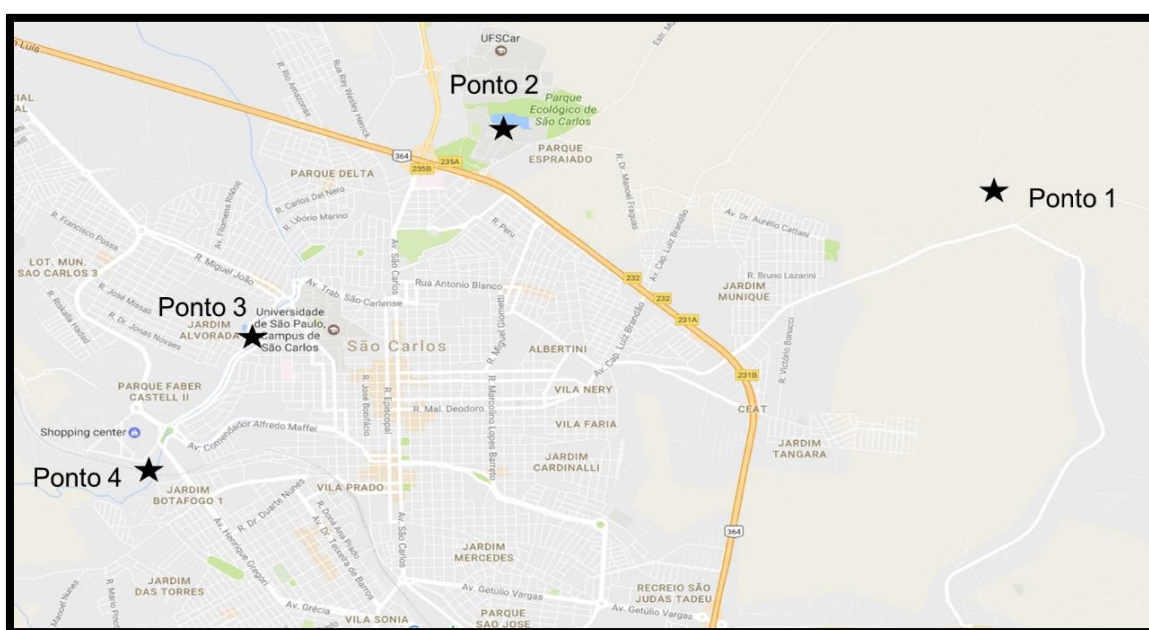


FIGURA 1.8: Pontos de coleta das amostras no Rio Monjolinho. (Fonte: Google Maps).

2. OBJETIVO

Os objetivos deste trabalho foram:

- a) Análise de parabenos em águas superficiais urbanas por extração em fase sólida *on-line* usando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas.

- b) Validação do método desenvolvido para análise de parabenos em águas superficiais urbanas.
- c) Como parte do mestrado profissional, capacitar o colaborador para trabalhar com a tecnologia instrumental envolvida.

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1. Generalidade

Os solventes orgânicos utilizados foram grau HPLC, das marcas Sigma-Aldrich e Honeywell. A água utilizada na composição das fases móveis e preparação de soluções foi ultrapura purificada através de um sistema SARTORIUS. Os eluentes utilizados foram sempre medidos na relação volume/volume. As micropipetas utilizadas no preparo das amostras foram GILSON e EPPENDORF.

Para a pesagem dos reagentes foi utilizada uma balança analítica SARTORIUS, modelo MSU324P-OCE-CU, com precisão $\pm 0,0001\text{g}$ e AND, modelo HR200, com precisão $\pm 0,0001\text{g}$.

Vortex Ika modelo 3 foi utilizado para homogeneizar as soluções.

Para a realização dos experimentos foram utilizados os padrões da marca Fluka contendo 1g por frasco de metilparabeno (MP) código PHR1012-1G, etilparabeno (EP) código PHR1011-1G, propilparabeno (PP) código PHR1010-1G e butilparabeno (BP) código PHR1022-1G que são os analitos alvo e padrão interno de cada parabeno como $^{13}\text{C}_6$ código 32124-5ML na concentração de 10 mg/L em acetona. Ácido Fúlvico IHSS SUWANNE River Fulvic Acid Stantard lote: 1S101 foi gentilmente doado pelo laboratório Instrumentação Analítica da EMBRAPA de São Carlos-SP e Ácido Húmico da marca Sigma de código 53680 gentilmente doado pelo Laboratório de Biogeoquímica Ambiental da UFSCar de São Carlos-SP.

Filtro de seringa de celulose regenerada 15mm x 0.45 μm código 5190-5109. Seringa manual de 2,5mL de código 5190-1535. Fita de pH 1-14 da marca MACHEREY-NAGEL código: 92110.

Para filtração das amostras, os seguintes materiais da marca Agilent Technologies foram utilizados, filtro de celulose regenerada 47 mm e 0,45 µm código 3150-0576, aparato de filtração 3150-0577, bomba a vácuo modelo IDP, coluna Poroshell SB-C18 2,1 mm x 50 mm x 2,7 µm e coluna de SPE PLRP-S 2,1 mm x 12,5 mm x 15 µm foram utilizados para desenvolvimento e validação do método.

O instrumento de SPE *on-line* acoplada a cromatografia líquida e a espectrometria de massas da Agilent Technologies, sendo a bomba quaternária, detector DAD (*Diode Array Detector*), amostrador do modelo UHPLC (cromatografia líquida de ultra eficiência)1290, módulo com válvula de 2-posições/10-pórticos para SPE (*Infinity Flexible Cube*) e compartimento de aquecimento da coluna do modelo 1290. Espectrômetro de massas do modelo 6460C triplo quadrupolo com fonte *ES/Agilent Jet Stream* (AJT) que estava localizado no laboratório COE (Center of Excellence) da sede Agilent Technologies no Brasil ativo em Barueri, São Paulo na Avenida Alameda Araguaia 1142 do bairro Alphaville.

3.2. Desenvolvimento do método

3.2.1. Preparo das soluções padrão

Foram preparadas soluções individuais dos parabenos analisados, nas seguintes concentrações: MP 280 mg/L, EP 740 mg/L, PP 1050 mg/L e BP 1020 mg/L. O preparo se deu pela dissolução de 2,8 mg de MP, 7,4 mg de EP, 10,5 mg de PP e 10,2 mg de BP em 10,0 mL de uma mistura de metanol e água (50:50). A partir destas soluções uma mistura dos parabenos na concentração de 10,0 mg/L em água e metanol (95:5) foi obtido e esta foi chamada de solução estoque 1 (SE-1). A solução estoque 2 (SE-2) foi preparada na concentração de 1 mg/L a partir da diluição de 1000 µL da SE-1 em 10,0 mL da mistura de água e metanol (95:5). A solução trabalho 1 (ST-1) foi preparada na concentração de 1 µg/L a partir da diluição de 10 µL da SE-2 em 10,0 mL da mistura de água e metanol (95:5) e a partir dela foram preparadas as soluções diluídas em água para a curva de calibração nas concentrações: 3,9; 7,8; 15,6; 31,25; 62,5; 125; 250; 500 e 1000 ng / L.

As soluções de controle de qualidade foram de 20,0; 400,0; 800,0 ng / L para MP e PP, 90,0; 400,0; 800,0 ng / L para EP e 10,0; 400,0; 800,0 ng / L para BP.

As três diferentes concentrações dos controles de qualidade foram selecionadas considerando de 2-3 vezes o limite inferior de quantificação (LIQ), sendo este o controle de qualidade baixo (CQB), 40% da concentração do ponto mais alto da curva o controle de qualidade médio (CQM) e 80% da maior concentração da curva como controle de qualidade alto (CQA).

Solução de trabalho dos padrão internos (PI-1) na concentração de 0,01 mg/L foi preparada a partir da diluição de 10 µL do padrão interno comercial com a mistura de MP, EP, PP e BP $^{13}\text{C}_6$ para 10 mL. O volume de 5,0 µL da solução PI-1 foi adicionado para cada 1 mL das soluções de curva de calibração, controles de qualidade, amostras e brancos. Desta forma, a concentração fixa de 50 ng / L foi monitorada e utilizada para avaliação dos resultados, quer indicasse supressão iônica ou aumento de sinal.

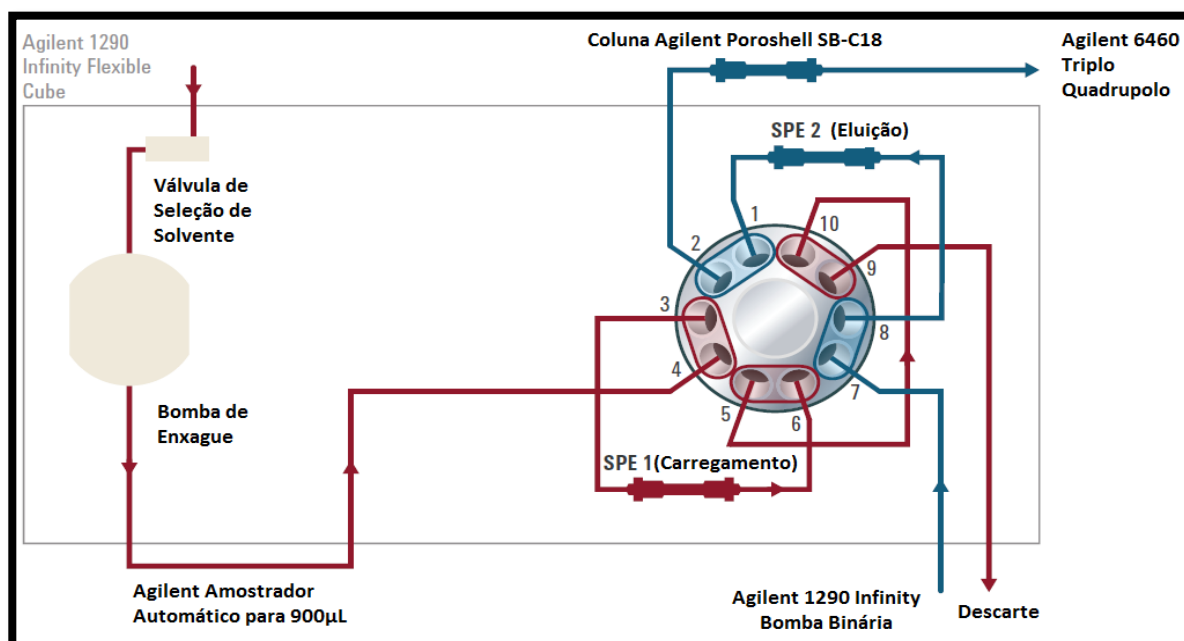
3.2.2. Condições cromatográficas

O volume de injeção foi de 800 µL, a limpeza automática da agulha do injetor foi de 60 segundos após a injeção com uma solução de 5% de metanol em água. Testes com outros solventes como acetonitrila e isopropanol foram realizados, porém a banda cromatográfica se alargava na utilização destes solventes, sendo a concentração e o solvente mencionado os que apresentaram resultados melhores.

Os cartuchos de SPE PLRP-S, 2,1 x 12,5 mm 15µm de código: 5982-1271 foi utilizado na SPE *on-line* e as FIGURAS 1.9 e 2.1 mostram as alterações das válvulas seguindo os tempos determinados nas condições do método conforme apresentados na TABELA 1.3 representa o sistema de válvulas utilizados que permite carregamento e limpeza do cartucho seguido por eluição e condicionamento.

TABELA 1.3: Parâmetros da SPE *On-line*.

Tempo	Função	Parâmetro
0,00 min	Bombeamento por tempo (Limpeza da amostra carregada em SPE)	90s, Vazão: 1mL/min, Canal A1 e B1 (Água: Metanol – 95:5)
1,75 min	Posição da Válvula	Alterar a posição da válvula
1,80 min	Bombeamento por tempo (Regeneração / limpeza da coluna de SPE)	200s, Vazão: 1mL/min, Canal B2 (Metanol)
5,55 min	Bombeamento por tempo (Condicionamento)	230s, Vazão: 1mL/min, Canal A e B1 (Água: Metanol – 95:5)

FIGURA 1.9: Válvula de SPE *on-line* na posição 1.

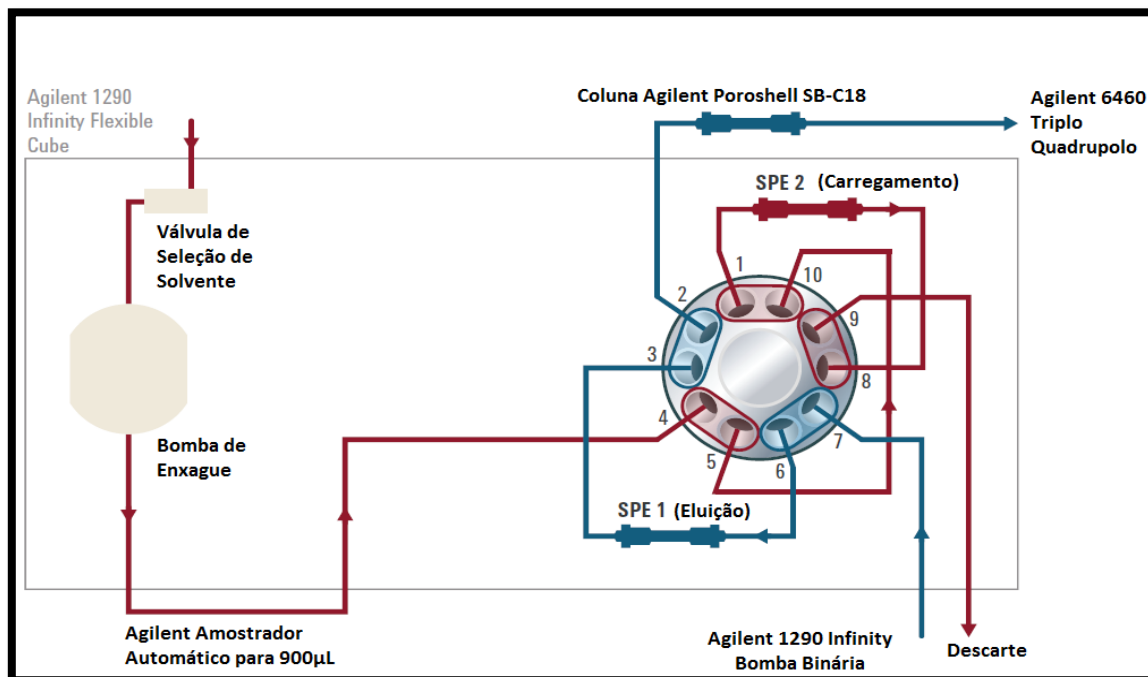


FIGURA 2.1: Válvula de SPE *on-line* na posição 2.

A coluna Poroshell SB-C18 2,1 x 50mm x 2,7µm foi utilizada e as condições do método estão sumarizadas na TABELA 1.4. O tempo de análise é de 8 minutos com pós corrida de 1,5 minutos, fazendo um total de 9,5 minutos por amostra. Outro solvente como metanol e aditivos como ácido fórmico, formiato de amônio e ácido acético foram testados, o acetonitrila sem aditivos foi o que se mostrou mais promissor.

TABELA 1.4: Parâmetros do cromatógrafo líquido.

Tempo	Água	Acetonitrila	Vazão	Temperatura do forno da coluna	DAD
	A	B			
	%	%			
1,76 min	95	5	0,4 mL/min	50°C	254nm
5,86 min	33	67			
6,26 min	0	100			
8,00 min	0	100			

3.2.3. Espectrômetro de massas

Os parâmetros das condições de ionização para cada um dos analitos foram ajustados na função *optimizer* do software *MassHunter* (Agilent Technologies). Soluções de cada analito na concentração de 10 mg/L foram injetadas na fonte de ionização nas condições cromatográficas estabelecidas, e as condições finais do método estão conforme as TABELAS 1.5 e 1.6. O Monitoramento de Reações Múltiplas (*MRM*) no sistema QqQ foi o utilizado.

TABELA 1.5: Parâmetros da fonte de Ionização ESI.

Parâmetros	Valor
Temperatura do gás (°C)	300
Vazão (L/min)	10
Nebulizador (psi)	50
Aquecedor do revestimento de gás	350
Vazão do revestimento de gás	12
Capilar (V)	3500
Tensão da câmara	500
Acelerador da cela (V)	7

TABELA 1.6: Parâmetros do triplo quadrupolo.

Analito	PI?*	Íon	Q1	Íon	Q2	Dwell	Frag (V)	CE (V)	Polaridade
		Precursor	Resolução	Produto	Resolução				
¹³ C ₆ BP	Sim	199	Wide	98	Wide	20	60	20	Negativa
	Não	193	Wide	136	Wide	25	60	12	Negativa
	Não	193	Wide	92	Wide	25	60	20	Negativa
¹³ C ₆ PP	Sim	185	Wide	98	Wide	20	80	20	Negativa
	Não	179	Wide	137	Wide	25	80	7	Negativa
	Não	179	Wide	92	Wide	25	80	20	Negativa
¹³ C ₆ EP	Sim	171	Wide	98	Wide	20	65	18	Negativa
	Não	165	Wide	137	Wide	25	65	6	Negativa
	Não	165	Wide	92	Wide	25	65	18	Negativa
¹³ C ₆ MP	Sim	157	Wide	98	Wide	20	85	16	Negativa
	Não	151	Wide	136	Wide	25	85	8	Negativa
	Não	151	Wide	92	Wide	25	85	16	Negativa

*Padrão interno, MP ¹³C₆ : Referência para metilparabeno EP ¹³C₆ : Referência para etilparabeno PP ¹³C₆ : Referência para propilparabeno BP ¹³C₆ : Referência para butilparabeno

3.2.4. Parâmetros de validação do método

O protocolo de validação foi baseado no guia bioanalítico de validação EMA (EUROPEAN MEDICINES AGENCY).⁷⁵ Foram avaliados: efeito memória, curva de calibração, seletividade, recuperação, precisão e exatidão, limites de quantificação e de detecção, integridade de diluição, efeito matriz e estabilidade.

3.2.4.1. Efeito memória

Foi avaliado a presença de efeito memória no método de análise por injeções de brancos antes e após o ponto mais alto da curva de calibração e o valor representativo de até 20 % da concentração do primeiro ponto de cada curva de calibração foi aceito levando-se em conta a precisão e exatidão.

3.2.4.2. Curva de calibração

As soluções foram preparadas em triplicata para a validação, sendo utilizadas as respectivas concentrações 15,6; 31,25; 62,5; 125,0; 250,0; 500,0 e 1000,0 ng / L para metilparabeno e propilparabeno; 31,25; 62,5; 125,0; 250,0; 500,0 e 1000,0 ng / L para etilparabeno e 3,9; 7,8; 15,6; 31,25; 62,5; 125,0; 250,0; 500,0 e 1000,0 ng / L para butilparabeno.

Um mínimo de seis concentrações diferentes foi utilizado em cada curva de calibração para obter o coeficiente de correlação de regressão linear através da concentração e razão do sinal de resposta do analito de interesse com sinal de resposta do padrão interno a 50 ng / L de cada parabeno.

3.2.4.3. Seletividade

O monitoramento da ausência dos analitos de interesse na matriz da nascente do Rio Monjolinho para garantir que a identificação dos parabenos não está sendo afetada por compostos não monitorados foi avaliado. A seletividade do método também foi avaliada pela capacidade em diferenciar a ionização do padrão interno do analito alvo nas amostras.

3.2.4.4. Recuperação

A eficiência de extração foi avaliada comparando os resultados das soluções de controle de qualidade (n=5) em amostras preparadas em água da

nascente do Rio Monjolinho com os resultados dos controles preparados em água ultra purificada.

3.2.4.5. Precisão e exatidão

Utilizando as amostras de controle de qualidade do método (n=15 e n=30), a precisão inter e intra-lotes e a exatidão foram avaliadas em análises realizadas pelo mesmo analista em três dias diferentes e por dois analistas diferentes em três diferentes dias, a água da nascente do Rio Monjolinho foi utilizada. A precisão do método foi expressa pelo coeficiente de variação (CV %) das replicatas e a exatidão foi calculada através da razão da média das concentrações encontradas e expressas em porcentagem em relação ao valor médio das concentrações nominais. Sendo aceitáveis valores inferiores a 15% para todas as concentrações.

3.2.4.6. Limite de detecção e quantificação do método

A precisão e a exatidão foram avaliadas para estabelecer o limite de quantificação do método (LQM). Sendo, a precisão expressa pelo coeficiente de variação (CV %) que não excedeu o valor de 20 % (n=5) e a exatidão com valores nominais não superiores a 20 % (n=5). O limite de detecção do método (LDM) foi estabelecido como a menor concentração confiável capaz de ser diferenciado do sinal de fundo, mais detalhes serão apresentados em resultados e discussão.

O Limite de detecção do instrumento (LDI) é a menor concentração equivalente ao sinal que pode ser distinguido do ruído de fundo por um instrumento em particular, calculado estatisticamente. O LDI deve estar sempre abaixo ou igual ao limite de detecção do método e não deve ser usado para reportar resultados de amostras, mas a análise deste dado estatístico pode ser utilizada para comparar diferentes instrumentos. Algumas organizações como IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) e EPA utilizam o intervalo de confiança 99% da distribuição de *t-Student* (*t*) e n-1 (número de replicatas injetadas menos 1) graus de liberdade para realizar tal comparação.⁷⁶⁻⁸²

O LDI pode informar estatisticamente a concentração a ser mensurada por:

$$\text{LDI} = t \times (\text{CV}/100 \%) \times \text{a concentração medida}$$

Em caráter informativo, padrões dos parabenos na concentração do LQ e/ou CQB injetados em quadruplicatas tiveram os dados automaticamente calculados via *software MassHunter quantitative* e os resultados estatístico do LDI reportado em resultados e discussão.

3.2.4.7. Integridade de diluição

A amostra da nascente do Rio Monjolinho com adição de padrão (n=5) na concentração de 2000 ng / L foi diluída 20x (100 ng / L) com água ultrapura para avaliação de precisão e exatidão.

3.2.4.8. Efeito matriz

O efeito de matriz foi avaliado nas águas superficiais urbanas dos pontos (2), (3) e (4) nas concentrações dos CQB, CQM e CQA de cada parabeno e o CV inferior a 15% foi aceitável. A área do padrão interno ($^{13}\text{C}_6$) de concentração fixa 50ng / L em água ultrapura, nascente do rio e na presença de matrizes de água superficiais urbanas foram monitoradas para avaliação de possível supressão iônica ou aumento de sinal em amostras que possuem mais interferentes.

3.2.4.9. Estabilidade

A estabilidade das amostras controle de qualidade do método (baixo e alto, n=2) do ponto (4) e a solução da curva de calibração de 125 ng / L foram utilizados para verificar a estabilidade 4 e 24h após o tempo zero das amostras recém-preparadas (t = 0 hora) no auto injetor e após 8 dias de refrigeração entre 6 - 8°C. O

período de 24 horas foi baseado no tempo excedente de duração das análises para a obtenção da curva analítica.

3.2.5. Coleta e pré-tratamento das amostras

Um litro de amostra de cada ponto conforme mencionado em FIGURA 1.8 foi coletado da cidade de São Carlos - SP e estas foram filtradas em membranas de celulose regenerada de 0,45 μm e adicionado volume de metanol equivalente a 0,5 % na concentração final da amostra.

3.2.6. Aplicação do método

Após o pré-tratamento as amostras dos pontos de coleta (2), (3) e (4) foram preparadas em duplicatas e padrão interno foi adicionado, em seguida estas foram injetadas diretamente no sistema de SPE *on-line* acoplada ao LC-MS/MS. As coletas e análises foram realizadas no dia 02 de novembro de 2016, neste mês houve precipitação aproximada de 120 mm na cidade de São Carlos-SP de acordo com o Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) sendo o sexto mês de maior acúmulo de chuva de 2016 conforme apresenta a FIGURA 2.2 no dia da coleta a temperatura mínima e máxima foi de 16 a 28°C, umidade relativa do ar superior a 80 % e sem chuva, estes dados também estão disponíveis no item oficial do INMET. As amostras tiveram as injeções intercaladas com os controles de qualidade para verificar se a precisão e exatidão se mantinham. Os resultados foram obtidos da interpolação com as curvas de calibração construídas pela concentração e razão do sinal de resposta do analito com o sinal do padrão interno.

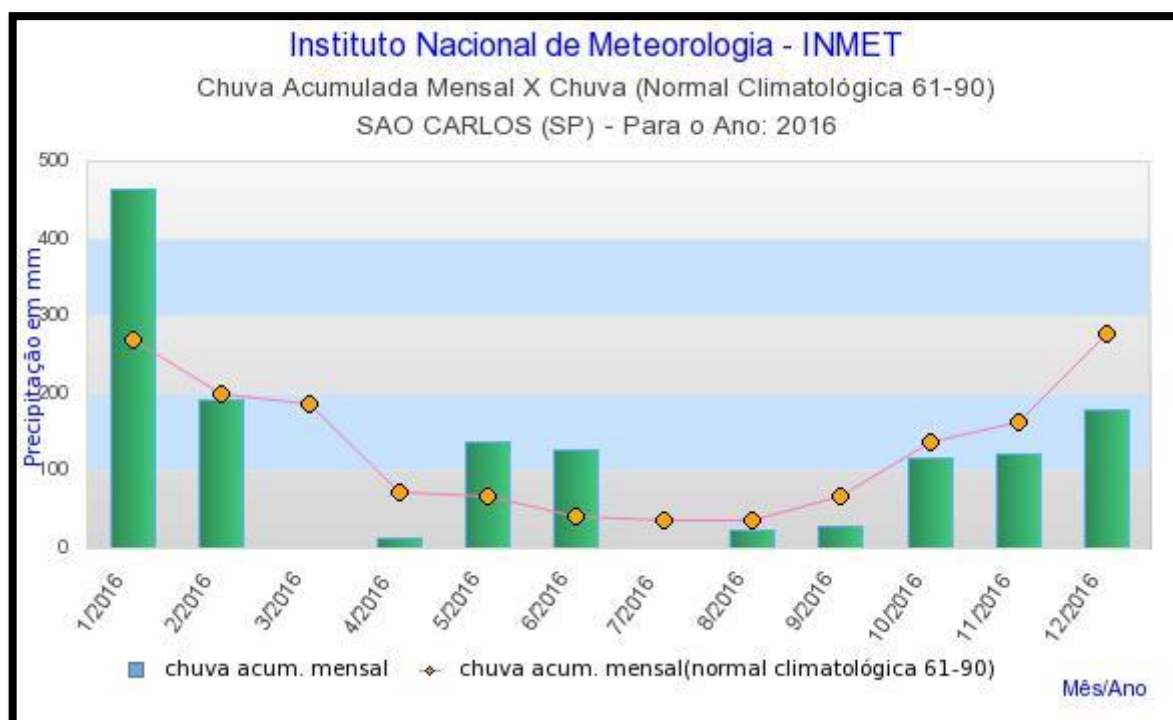


FIGURA 2.2: Chuva acumulada no ano de 2016 por mês. (fonte: <http://www.inmet.gov.br/portal/>)

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Desenvolvimento do método SPE *on-line* e LC-MS/MS

Para laboratórios ambientais, a SPE *on-line* tem se mostrado uma técnica atrativa devido a possibilidade de redução de volume de amostras coletadas, resultado em menor espaço de armazenamento requerido em câmara fria ou geladeira, mínimo pré-tratamento, redução de tempo de preparo de amostra e com isto aumento de produtividade.²⁰⁻²⁴

A sequência de eventos avaliados no desenvolvimento das condições cromatográficas e de espectrometria de massas (QqQ) para os analitos MP, EP, PP, BP e os padrões internos ($^{13}\text{C}_6$) utilizados conforme a FIGURA 2.3 apresenta foram: ionização dos analitos (a) incluindo a seleção do modo de ionização, ajustes na voltagem do cone, energia de colisão e voltagem do capilar; seleção da fase móvel (b) que envolveu testes com diferentes solventes, vazões e aditivos na presença da

coluna analítica sem e com o acoplamento da coluna de SPE ao detector DAD e QqQ; seguido pelo ajuste dos parâmetros da fonte de ionização (c) e seleção de solventes para a remoção/exclusão dos interferentes da amostra via SPE *on-line* (d).

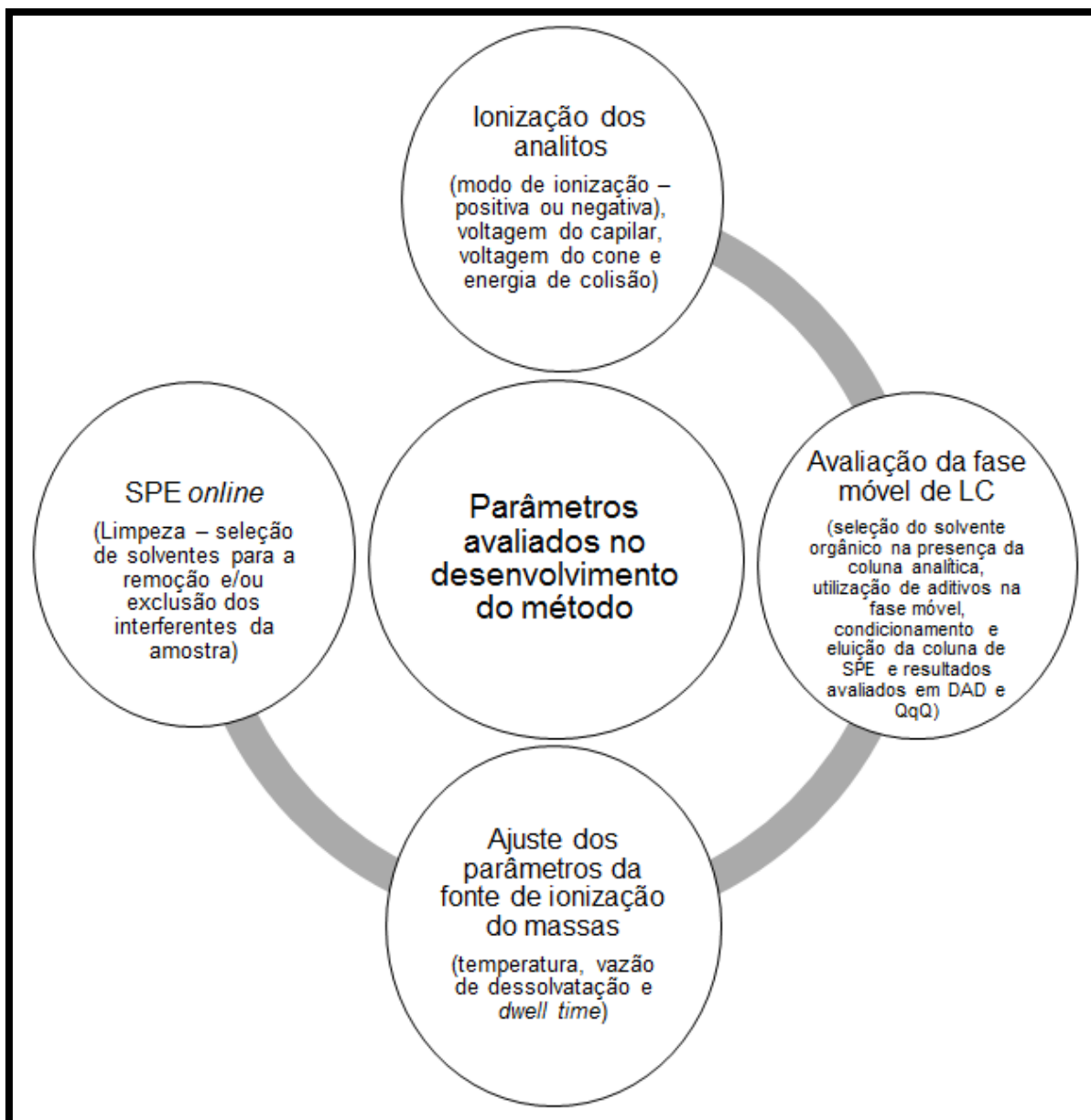


FIGURA 2.3: Ciclo dos parâmetros de desenvolvimento do método de SPE *on-line* acoplada ao cromatógrafo líquido e triplo quadrupolo.

a) Avaliação das condições de ionização dos analitos

Os modos de ionização positiva e negativa foram os primeiros parâmetros avaliados. Para a seleção do modo de ionização, uma mistura dos quatro parabenos preparada em água ultrapura (10 mg/L) foi injetada no sistema no modo combinado com vazão de 0,4 mL/min. Intensidade do sinal da mistura com os analitos de interesse foi maior na polaridade negativa e por isso este foi o modo de ionização selecionado para o método dos parabenos. A FIGURA 2.4 apresenta os cromatogramas obtidos pelo espectrômetro de massas nos dois modos de ionização por injeção direta (sem coluna de SPE e analítica).

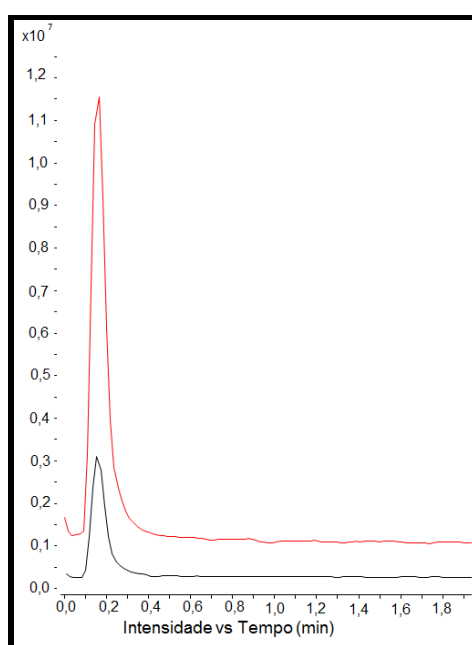


FIGURA 2.4: Comparação da intensidade de sinais no modo *scan* em polaridade positiva (preto) e negativa (vermelho) no LC-MS por injeção direta, sem SPE e coluna analítica. Vazão de 0,4 mL/min de acetonitrila e água (1:1)

Para o ajuste das condições de ionização dos parabenos, seleção dos íons monitorados por *Multiple Reaction Monitoring (MRM)* ocorreu via *software Optimizer*, onde após cinco injeções gerou relatório com diferentes voltagens (V) do cone e energias de colisão (CE) testadas e duas transições de cada analito foram selecionadas para quantificação e confirmação. A principal via de fragmentação dos compostos desprotonados consiste na perda da cadeia alquila ligada ao éster seguido pela perda de CO₂, conforme pode ser observada na FIGURA 2.5.⁸³ As voltagens que

apresentaram melhores sinais para a solução padrão de 10mg/L foram utilizadas no método conforme a TABELA 1.5.

Usualmente para pequenas moléculas, os valores da voltagem do capilar entre 3000 – 4000 são utilizados. Não foram observadas alterações significativas no sinal dos íons monitorados com diferentes voltagens, por isto a voltagem intermediária de 3500 foi utilizada.

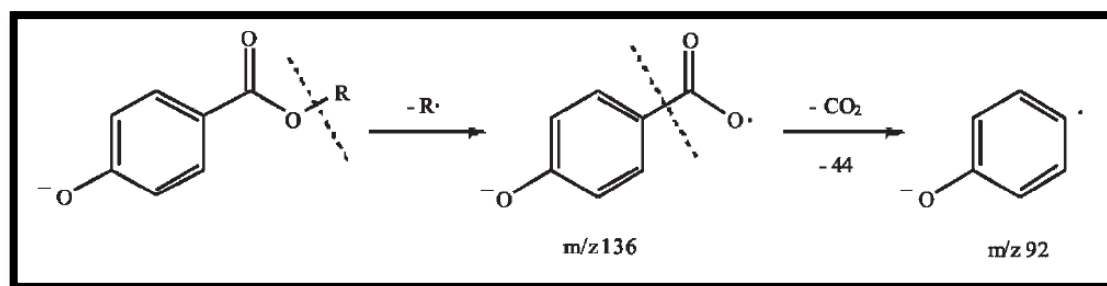


FIGURA 2.5: Principal via de fragmentação para os parabenos.

b) Seleção de fase móvel para eluição da coluna de SPE e analítica

A fase móvel do LC tendo como composição mistura de metanol/água e acetonitrila/água foram avaliados separadamente em eluição isocrática e gradiente em detector DAD e QqQ. O modo isocrático nas condições 40:60, 50:50 e 70:30 (metanol/água e acetonitrila/água) foram insuficientes quando a coluna de SPE foi acoplada, apresentando alto fator de cauda nas bandas cromatográficas. Em modo gradiente, os melhores parâmetros cromatográficos (resolução e fator cauda) foi obtido com rampa linear a aproximadamente 15% por minuto de início 5% e final a 100% em acetonitrila, sendo este o selecionado para o método conforme apresentado na TABELA 1.4 do item 3.2.2 do procedimento experimental. Na FIGURA 2.6 é possível visualizar o cromatograma obtido via detector DAD a 254nm da fase móvel selecionada.

Como todos os parabenos estudados possuem pKa ~ 8 e log P entre 1,6 – 3,2; avaliação da fase móvel também teve os resultados no espectrômetro de massas verificados, os testes demonstraram fácil ionização para os analitos estudados em sua forma molecular. Experimentos com e sem os aditivos: ácido acético, fórmico e formiato de amônio na fase móvel para aumentar a ionização foram

realizados. Os resultados não apresentaram melhora significativa de intensidade do sinal para ácido fórmico e ácido acético, o ganho foi inferior a 10% e na presença do formiato de amônio houve redução de sinal quando comparado as áreas dos analitos sem a adição de aditivo na fase móvel. Baseado nestes resultados e para evitar o favorecimento de ionização de interferentes presentes na matriz o eluente selecionado foi na ausência dos aditivos.

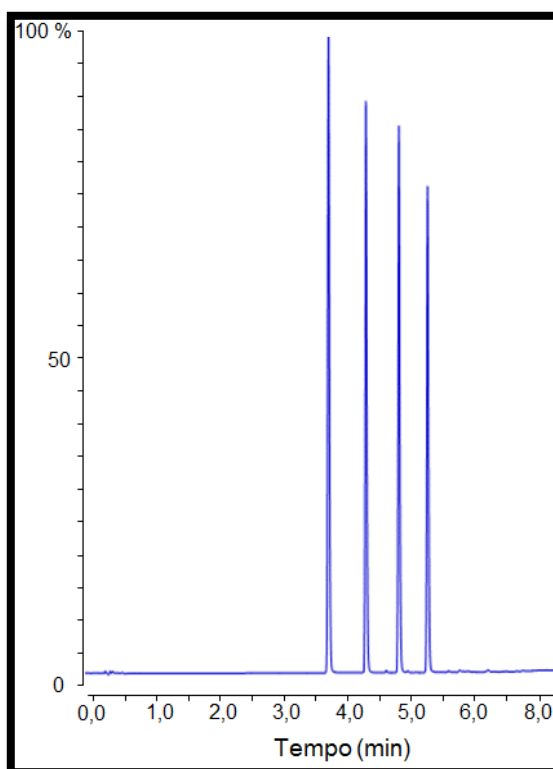


FIGURA 2.6: Cromatograma da mistura dos parabenos na concentração de 10 mg/mL a 0,4 mL / min no LC-DAD a 254nm.

Testes para avaliação da melhor vazão comparando 0,4; 0,5 e 0,6 mL/min, mostraram resultados aceitáveis para todos. Levando em consideração que para o analisador de massas baixas vazões são mais adequadas para volatilização dos eluentes e analitos de interesse, a escolhida foi de 0,4 mL/min

A seleção do condicionamento da coluna de SPE se dá pela característica da fase. Para fase polimérica como utilizada neste estudo, usualmente se aplica solventes orgânicos como metanol ou acetonitrila seguido de água. Para o método desenvolvido foi selecionado o solvente metanol e solução de 5% de metanol em água, mais detalhes serão apresentados no item (d).

c) Ajuste dos parâmetros da fonte de ionização do massas

O método desenvolvido utilizou a fonte *ESI AJT*, esta tem revestimento de nitrogênio superaquecido para melhorar a dessolvatação do nebulizador e direcionar mais íons para o analisador. Devido a característica desta fonte de ionização os parâmetros de temperatura e vazão do nitrogênio foram ajustados via software *Source Optimizer* e se aplicam apenas ao modelo conforme ilustra a FIGURA 2.7. Os valores ajustados para este método foram apresentados na TABELA 1.6.

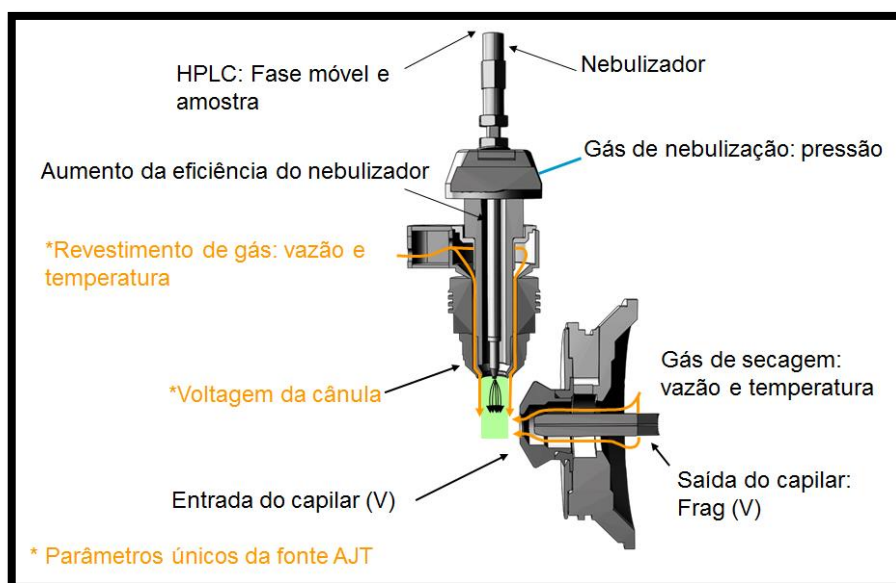


FIGURA 2.7: Representação esquemática da fonte de ionização *ESI Agilent JetStream* (AJT).

A taxa de aquisição de dados foi avaliada manualmente por meio da função *Dwell Time* e os valores que apresentaram melhores formatos dos picos foram adotados conforme apresentado na TABELA 1.7.

d) Remoção de interferentes da amostra e regeneração da coluna de SPE

Para a etapa de remoção de interferentes da amostra por SPE *on-line*, os solventes metanol e acetonitrila diluídos em água nas concentrações de 5 – 20 % foram avaliados. A acetonitrila por ter maior força de eluição, afetou a extração do MP

resultando em perdas de sinal de no mínimo 10% na intensidade do sinal do cromatograma. Assim, a solução aquosa de metanol a 5% foi selecionada para etapa de limpeza e a mesma foi utilizada na etapa de condicionamento. Neste experimento água da nascente do Rio Monjolinho foi utilizada.

A válvula utilizada no módulo de SPE *on-line* foi de 10 pórticos e 2 posições, e conforme ilustrado nas FIGURAS 1.9 e 2.1 enquanto uma coluna de SPE estava acoplada a coluna analítica, a outra estava sendo carregada com a amostra. A análise ocorreu em eluição gradiente de até 100% acetonitrila conforme já discutido no item (b), isto também proporcionou limpeza da coluna SPE acoplada a coluna analítica. Para complementar esta etapa, o metanol por ser de diferente polaridade ao solvente da fase móvel foi selecionado para regeneração.

O tempo de limpeza da amostra em coluna de SPE após o carregamento foi investigado via detector DAD e sem o acoplamento da coluna analítica. Conforme ilustra a FIGURA 2.8 o tempo inferior a dois minutos em vazão de 1,0 mL/min da solução de 95:5 (água:metanol) foi considerada suficiente para eliminar os interferentes mais polares para as amostras do ponto (1), (2), (3) e (4) utilizadas neste estudo.

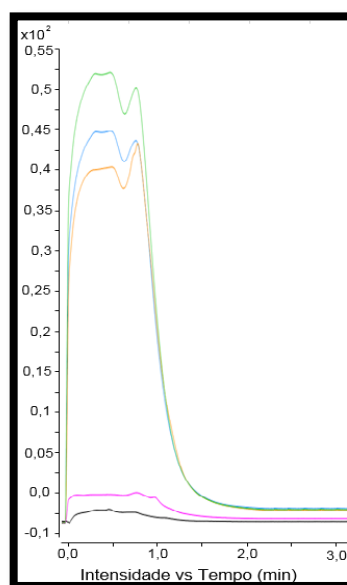


FIGURA 2.8: Cromatograma a 254nm com a coluna polimérica (PLRP) de SPE *on-line* acoplada a 95:5 água e metanol dos pontos de coleta (1) - rosa, (2) - verde, (3) - azul, (4) - laranja e o de cor preta água ultra purificada, sendo entre as amostras a nascente do Rio Monjolinho o de menor intensidade.

Para o método ficou definido que durante o período de 1,75 minutos a coluna de SPE carregada com a amostra fosse mantida em direção ao descarte, após esta etapa ocorreu a troca de posição da válvula acoplando a coluna carregada com os analitos de interesse a coluna analítica para eluição conforme apresentado na TABELA 1.3, e enquanto a análise ocorria a segunda coluna de SPE era regenerada e condicionada para o próximo carregamento.

Separação com baixa resolução para os parabenos na concentração de 2000 ng / L foi observado em coluna de SPE *on-line* quando não havia o acoplamento da coluna analítica, a FIGURA 2.9 ilustra o cromatograma obtido no detector QqQ. Devido a isto, a coluna analítica foi mantida para o método desenvolvido.

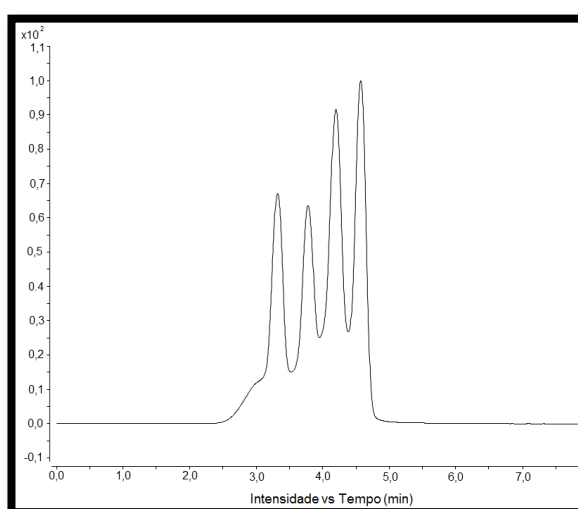


FIGURA 2.9: Cromatograma dos parabenos obtidos por *MRM* em coluna SPE *on-line* sem coluna analítica, condições cromatográficas: 0,4 mL / min e gradiente de água e acetonitrila conforme selecionado e apresentado na TABELA 1.4.

Após a etapa de desenvolvimento e otimizações, o cromatograma da FIGURA 3.1 foi obtido no método de SPE *on-line* acoplada ao LC-MS/MS, sendo (A) o *MRM* dos parabenos e seus respectivos padrão interno, e (B) *MRM* extraído dos parabenos e seus íon quantificador o de maior sinal de resposta e os de menor sinal o íon confirmador. A FIGURA 3.2 apresenta o *MRM* extraído do íon quantificador dos parabenos em concentração de 2000 ng / L para os analitos alvo e *MRM* em concentração de 50 ng / L para os analitos na forma ¹³C₆.

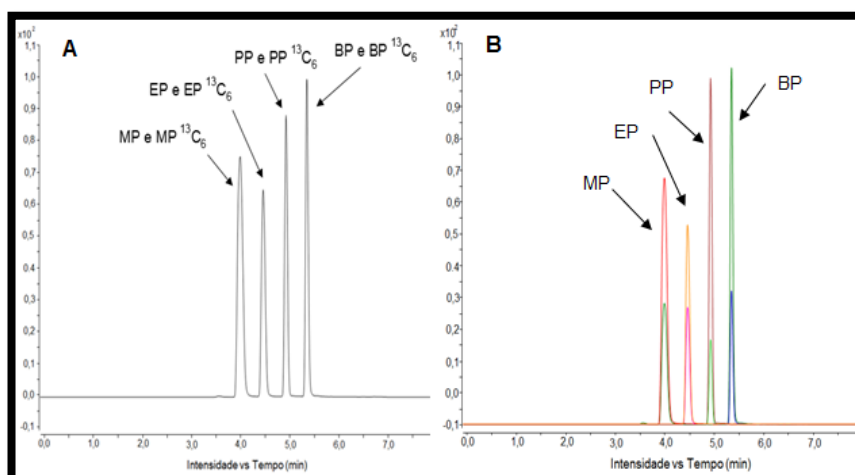


FIGURA 3.1: *MRM* de cada parabenos e padrão interno (A) e *MRM* extraído dos parabenos, sendo selecionado como íon quantificador os de maior intensidade e o confirmador de menor intensidade (B).

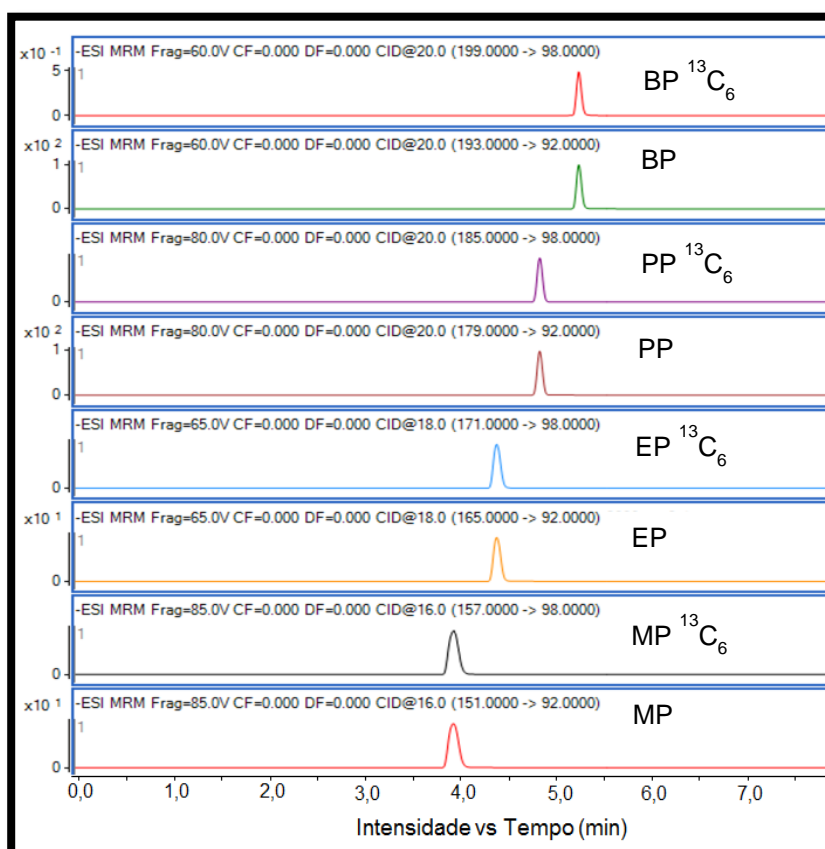


FIGURA 3.2: *MRM* extraído do íon quantificador dos parabenos e respectivo padrão interno.

4.2. Validação do método

O método analítico desenvolvido foi validado seguindo o guia *EMA* conforme mencionado no item 3.2.4 e teve os seguintes parâmetros avaliados: efeito memória, seletividade, coeficiente da curva de calibração, precisão e exatidão, recuperação (eficiência da extração), limite de quantificação e detecção do método, integridade de diluição, estabilidade e efeito matriz.

4.2.1. Efeito memória

Nesta etapa de avaliação do efeito memória, brancos (n=10) provenientes de água ultra purificada e isentos dos analitos de interesse passaram pelo mesmo tratamento das amostras e foram analisadas pelo método proposto. Os resultados apresentaram contaminação para os parabenos. Com isso, iniciou-se investigação na tentativa de descobrir de onde vinham e como eliminar esta contaminação. Diferentes solventes para limpeza do sistema de LC como isopropanol, metanol, acetonitrila e água com e sem ácido fórmico foram avaliados, estes mesmos solventes foram utilizados como teste para limpeza de agulha do amostrador e regeneração da coluna de SPE. Contudo, nenhuma das diferentes limpezas do sistema apresentaram redução no sinal da contaminação.

O volume de injeção também foi verificado, redução de 800 μL para 400 μL apresentou redução de sinal do efeito memória proporcional ao volume injetado dos brancos. Menores volumes introduzidos no sistema trazem menor sensibilidade e por isto a quantidade de 800 μL foi mantido. Foram realizadas troca das colunas de *SPE* e agulha do injetor por novos, porém não foi observado redução de intensidade de sinal com estes testes.

Corridas analíticas do método com e sem injeção de branco também foram investigados, quando não ocorria as injeções dos brancos (sistema de válvula de injeção não era utilizado) a contaminação não era apresentada conforme mostra a FIGURA 3.3.

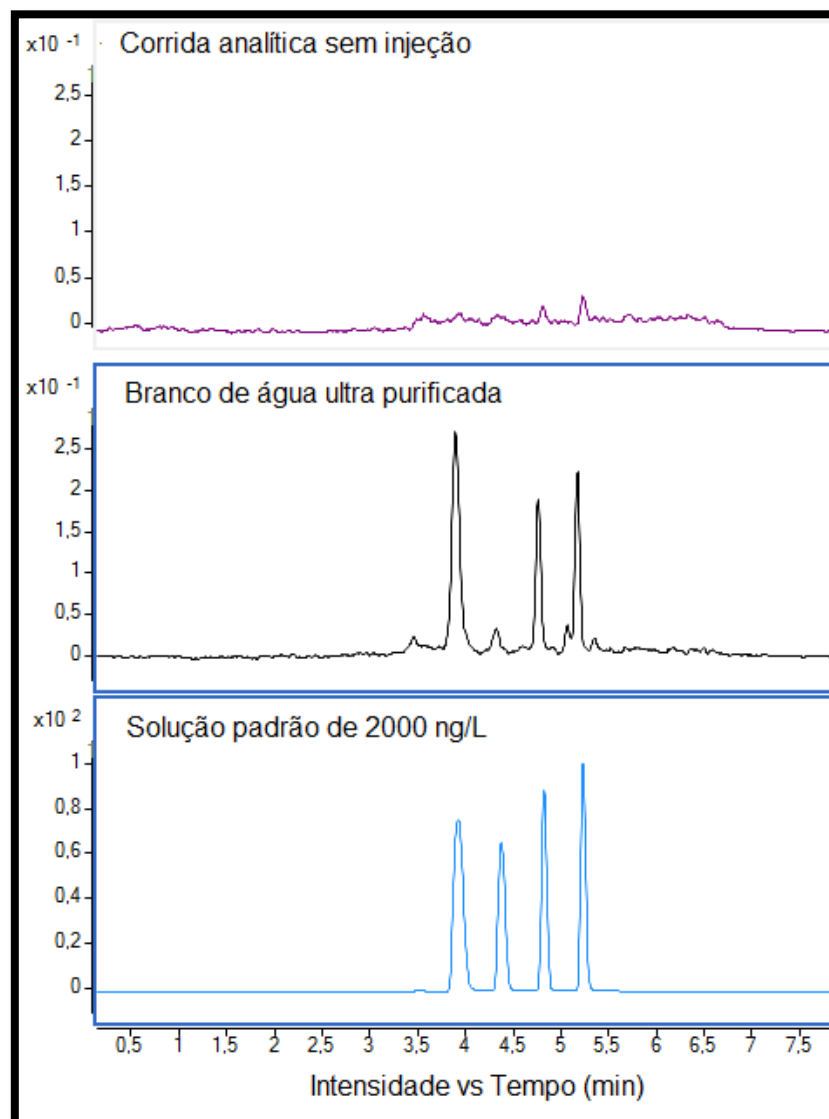


FIGURA 3.3: Corrida analítica com e sem injeção do branco e comparação de intensidade de sinal do *MRM* obtido na injeção do padrão na concentração de 2000ng / L dos parabenos.

Baseado nos resultados da investigação, conclui-se que o efeito memória é proveniente do amostrador (*loop* e válvula) após utilizar a solução padrão de alta concentração 10.000.000 ng / L (10mg/L) na etapa de desenvolvimento do método quando avaliado os parâmetros de ionização dos analitos. Assim, a contaminação se tornou randômica por se tratar de um sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC), onde os diâmetros internos da válvula de injeção e capilares são menores, aumentando o contato com a amostra sendo mais propenso

a contaminações. Desta forma, foi avaliado a intensidade e área do sinal do efeito memória dos compostos quando injetado 800 µL de brancos de água ultrapura (n=10) e este não pode ultrapassar o valor de 20% em relação ao primeiro ponto da curva de calibração.

Avaliação do efeito memória após injeção das soluções padrão de maior concentração a ser utilizado em rotina 1000 ng / L – n = 3, e concentração duas vezes maior que o último ponto da curva de calibração (2000 ng / L – n = 2) foi avaliado, e não houve efeito memória nesta etapa.

4.2.2. Seletividade, curva de calibração, precisão e exatidão

A cada lote de amostras, dois brancos isentos dos compostos de interesse, tendo um com e outro sem o padrão interno mostrou que o método foi capaz de diferenciar o padrão interno dos analitos alvo e não houve resultado quantificáveis na matriz da nascente do Rio Monjolinho.

As curvas de calibração em triplicata relativas às concentrações mencionadas no item 3.2.5.2 para os parabenos foram plotadas em função da regressão linear através da concentração e razão do sinal de resposta do analito de interesse com sinal de resposta do padrão interno a 50 ng / L de cada parabeno. Os coeficientes de determinação (R^2) foram acima de 0,99 para todos os analitos.

As curvas analíticas, obtidas através de regressão linear e seu coeficiente de determinação (R^2) estão na TABELA 1.7.

TABELA 1.7: Parâmetros da curva de calibração dos parabenos.

Analitos	Faixa (ng / L)	Equação de Calibração	R^2
MP	15,6 – 1000,0	$Y = 0,025450 * X + 0,154160$	0,9981
EP	31,2 – 1000,0	$Y = 0,026428 * X - 0,134412$	0,9982
PP	15,6 – 1000,0	$Y = 0,033017 * X + 0,115954$	0,9976
BP	3,9 – 1000,0	$Y = 0,103970 * X + 0,253234$	0,9977

O coeficiente de variação (CV%) das triplicatas da curva foram inferiores a 10% demonstrando precisão. A exatidão apresentou um desvio menor que 15% do valor nominal em todas as concentrações das curvas, exceto para o limite de quantificação do butilparabeno onde o desvio encontrado foi de 16%. Todos os valores obtidos são aceitáveis de acordo com os critérios estabelecidos para a validação do método mencionados no item 3.2.4.2.

A precisão e exatidão do método foi avaliado através da repetibilidade inter e intra-lotes pelos CQB, CQM e CQA e os resultados obtidos estão apresentados na TABELA 1.8. Os valores de exatidão e precisão intermediária obtidos para os controles de qualidade do método foram de 92-115% do valor nominal com CV entre 1,3-7,8%, respectivamente.

TABELA 1.8: Precisão e exatidão intra-lotes (n=15).

	Conc.	Exatidão	CV (n=5)
Analito	ng / L	(%)	%
MP	40	105	2,9
	400	96,4	1,7
	800	94,5	3,4
EP	90	92,7	3,0
	400	96,8	2,0
	800	94,7	1,3
PP	40	115	4,7
	400	98,2	1,6
	800	98,3	1,9
BP	10	107	7,8
	400	94,0	2,6
	800	97,1	2,2

A exatidão e a precisão intermediária inter-lotes por dois analistas e três dias diferentes apresentaram exatidão entre 95-107% e CV menor que 10%. Os valores estão apresentados na TABELA 1.8.

TABELA 1.8: Precisão intermediária inter-lotes e exatidão (n=30).

Analito (ng / L)	Dia	Analista 1		Analista 2		3 dias (n=30)	
		Exatidão	CV (n=5)	Exatidão	CV (n=5)	Média	
		(%)	(%)	(%)	(%)	Exatidão (%)	CV (%)
MP	1	98,3	1,6	102	2,0	101	5,6
	2	95,5	1,1	107	7,0		
	3	96,5	2,0	110	8,0		
EP	1	98,3	1,3	102	2,1	100	3,7
	2	97,0	1,8	104	2,9		
	3	96,0	1,5	108	3,2		
PP	1	97,4	1,6	103	3,6	102	4,9
	2	99,1	2,2	106	5,4		
	3	98,2	2,0	109	5,0		
BP	1	98,0	3,3	104	2,6	101	4,8
	2	97,7	2,6	102	6,5		
	3	99,7	3,1	105	5,8		

4.2.3. Eficiência do processo

A eficiência de extração do método foi avaliada pela comparação das amostras de CQB, CQM, CQA preparadas com água da nascente do Rio Monjolinho e em água ultrapura. Os resultados obtidos mostram valores de eficiência de extração que variam entre 92-113% e estão descritos na TABELA 1.9.

TABELA 1.9: Eficiência de extração dos controles de qualidade para cada parabeno e concentração avaliada (n=15).

Analito	Conc. ng / L	Eficiência de
		extração (%) n=3
MP	40	106
	400	95,9
	800	93,7
EP	90	103
	400	97,5
	800	95,0
PP	40	111
	400	99,2
	800	97,0
BP	10	113
	400	92,6
	800	96,0

4.2.4. Limite de quantificação e detecção do método

O limite de quantificação do método (LQ) é a primeira concentração da curva de calibração com exatidão e precisão que variaram de 86-111% e 1-18% respectivamente, para os quatro parabenos. Para o limite de detecção do método (LD), verificado experimentalmente, a solução padrão de menor concentração confiável que se diferenciou do efeito memória discutido no item 4.2.1 variaram entre 2,0-15,6 ng / L.

Os resultados obtidos foram comparados com intuito informativo e o valor calculado a base de t (t-Student) com intervalo de confiança 99% como mencionado no item 3.2.4.6. Desta forma, o LDI (limite de detecção do instrumento) teve o menor sinal distinguível calculado a partir de replicadas (n=4) dos padrões 15,6 (MP); 80,0 (EP); 20,0 (PP) e 6,0 (BP) ng / L. Conforme apresenta a TABELA 2.1 o LDI e o LQ estatístico tiveram valores inferiores aos encontrados experimentalmente e

ratifica os valores obtidos como LD e LQ, a provável razão de o LDI ter sido inferior é a contaminação constante já discutida no item 4.2.1.

TABELA 2.1: Limite de detecção e quantificação do método determinado experimentalmente.

	LD	LDI LD*	LQ	LDI LQ*
Analitos	(ng / L)	(ng / L)	(ng / L)	(ng / L)
MP	10,0	4,9	15,6	13,3
EP	15,6	9,4	31,2	29,8
PP	10,0	4,9	15,6	10,9
BP	2,0	1,0	3,9	3,2

*O limite de detecção e quantificação do instrumento (LDI LD e LQ) foram calculados estatisticamente a partir das concentrações 15,6 (MP); 80,0 (EP); 20,0 (PP) e 6,0 (BP) ng / L (n = 4).

4.2.5. Integridade de diluição e estabilidade

A integridade da diluição avaliada em um dia da validação, se deu por diluir 20 vezes a água da nascente do Rio Monjolinho na concentração de 2000 ng / L (100 ng / L) em água ultrapura. A exatidão foi de 93-103% e o CV de 3,8%.

Avaliação de estabilidade se deu pela comparação de média das áreas da amostra e padrão injetados no tempo zero, 4 e 24h no auto injetor e após 8 dias de refrigeração. A amostra do ponto (4) em concentrações do CQB e CQA foi utilizada por ser a matriz que apresentou maior supressão iônica para o método, estas concentrações foram avaliadas em comparação com a solução padrão de 125 ng / L foram utilizadas nesta etapa. Os valores obtidos estão apresentados na TABELA 2.2. Com relação à estabilidade em tempo zero, 24 e 48 horas após o preparo das amostras, os valores de exatidão entre 88-106% e precisão inferior a 15%, mostraram que é satisfatório o período de até 24 horas.

Os resultados da solução padrão refrigerada por 8 dias teve exatidão entre 114-118%, a amostra analisada em mesma condição apresentou exatidão de

12-20% para MP, 74-77% para EP, 202-210% para PP e 140-144% para BP, sendo considerado insatisfatório este período de armazenamento para a condição proposta.

TABELA 2.2: Estabilidade da amostra do ponto (4) e solução padrão de 125 ng / L.

Estabilidade (n=2), Conc. ng / L									
Exatidão (%)					Exatidão (%)				
Ponto 4	MP				Solução padrão	MP			
	4h	24h	8dias	4h		24h	8dias		
	40	92,5	90,2	12,0		125	88,8	90,4	114
	800	95,0	93,4	20,5					
	EP					EP			
	90	99,9	105,4	74,6		125	91,2	96,4	118
	800	97,7	94,5	77,5					
	PP					PP			
	40	102	98,5	202		125	99,6	104	118
	800	100	105,6	210					
BP				BP					
10	103	97,7	140	125	100	98,2	115		
800	104	99,5	144						

4.2.6. Efeito matriz

O método proposto foi desenvolvido e validado utilizando padrão interno para cada analito de interesse. Assim, a quantificação por padronização interna corrigiu os desvios causados por efeito matriz do ponto (2), (3) e (4). Desta forma, avaliação de precisão e exatidão por meio dos CQB, CQM e CQA demonstraram precisão no coeficiente de variação inferior a 15% e exatidão entre 85-115% (n=3) para os pontos coletados.

Ao avaliar a média das áreas dos picos em soluções padrão preparados em água ultrapura com o ponto (1), o da nascente do Rio Monjolinho, os resultados foram exatos como apresentado no item 4.2.3 (eficiência da extração) e de CV < 15%, porém, redução de áreas das bandas cromatográficas dos padrões internos (n=10) adicionados nos pontos (2), (3) e (4) foram observados ao comparar com a amostra coletada na nascente.

Os valores percentuais de supressão iônica variaram de (-69,9) a (-16,8) para os pontos de matrizes mais complexas conforme apresenta a TABELA 2.3 e os percentuais estão representados por (-) para supressão, e no caso de aumento de sinal representados por (+), a forma $^{13}\text{C}_6$ de cada analito foi utilizado para correção dos resultados quando estes foram calculados pela interpolação com curva de calibração. A TABELA demonstrou o efeito matriz por redução ou aumento de sinal de cada analito estudado, os valores exatos e precisos verificados nos controles de qualidades mencionados no início da discussão deste tópico ratificam que o comportamento do $^{13}\text{C}_6$ foram iguais para os componentes que representam.

TABELA 2.3: Porcentagem de supressão iônica e aumento de sinal nas amostras dos quatro pontos de coleta (n=10).

	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4
Analito	%	%	%	%
MP	-1,4	-48,8	-41,5	-47,3
EP	-1,5	-41,1	-39,6	-40,9
PP	+ 2,5	-16,8	-57,2	-69,9
BP	+1,3	-27,1	-29,4	-43,6

Ao ser constatado a supressão iônica os resultados adquiridos a 254nm pelo detector DAD foram verificados e nos cromatogramas ilustrados na FIGURA 3.4, é possível notar aumento da linha de base para as amostras mais complexas (pontos 2, 3 e 4), diferente do que ocorreu com a água da nascente (ponto 1) utilizada para o desenvolvimento e validação do método. Deste modo, corridas de ácidos fúlvicos (AF) e húmicos (AH) preparados em água ultra purificada nas respectivas concentrações de 14,5 e 2,9 mg/L foram analisados pelo mesmo método desenvolvido e os cromatogramas comparados com a amostra do ponto 4 por detector DAD conforme apresenta a FIGURA 3.5.

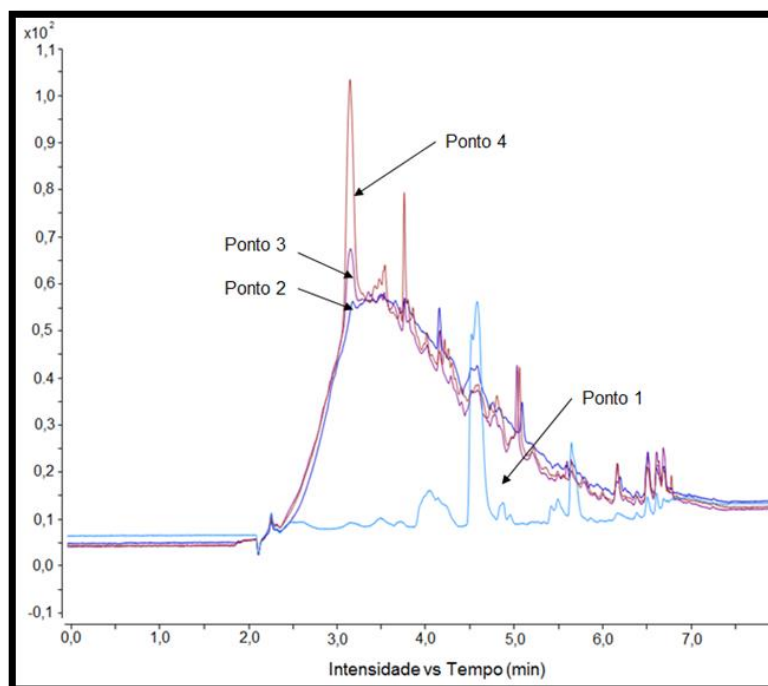


FIGURA 3.4: Cromatogramas obtidos a 254nm nas mesmas condições do método aplicado na análise mostram agregados de moléculas para as amostras coletadas nos pontos (1), (2), (3) e (4) ao longo do Rio Monjolinho.

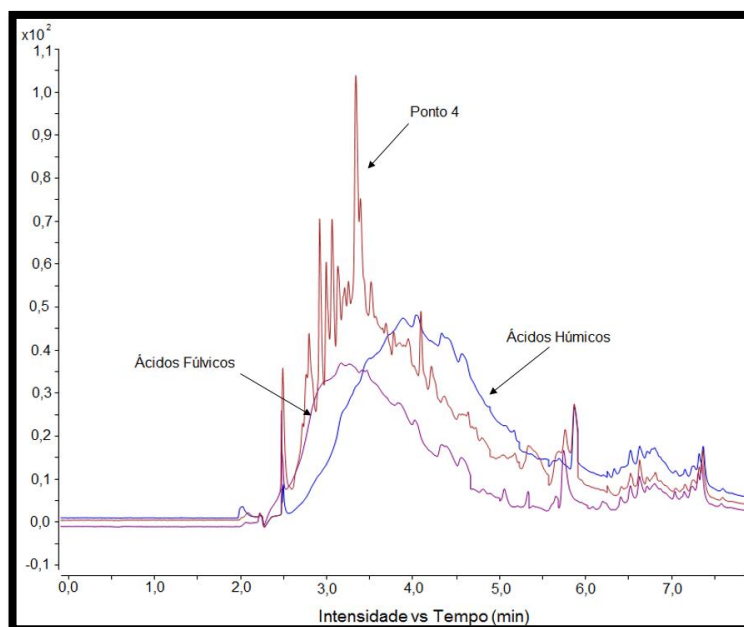


FIGURA 3.5: Cromatogramas obtidos a 254nm nas mesmas condições do método aplicado na análise para solução de ácidos fúlvicos e húmicos analisados separadamente e comparados com ponto (4).

Pesquisas científicas demonstraram que extrair contaminantes orgânicos em pH próximo ao neutro limita a influência dos AH e AF por SPE.⁸⁴⁻⁸⁷ Porém, esta ação não elimina completamente o efeito destes interferentes quando a concentração deles são altas. Correlação entre o teor de carbono orgânico total (TOC) e as substâncias húmicas mostram que quanto maior a concentração de TOC em águas maior é a sua influência na análise. Amostras com baixo teor de TOC como a nascente do Rio Monjolinho^{15, 52, 74} tem os efeitos analíticos minimizados conforme observado neste trabalho, para as amostras de água superficiais urbanas avaliadas, a concentração de matéria orgânica dissolvida é maior^{19, 74} e por isto tiveram os resultados pelo presente método afetado por supressão iônica.

Baseado nos perfis cromatográficos obtidos, ficou evidente que o efeito matriz se dá pela alta concentração de ácidos húmicos e fúlvicos nestas amostras. Embora o método tenha determinado condições para minimizar este efeito, não foi possível eliminá-lo devido as características da fase utilizada para extração e limitação da configuração usada para o SPE *on-line*.

4.2.7. Análises dos parabenos em amostras de águas superficiais urbanas

O método foi aplicado em amostras coletadas no município de São Carlos-SP e teve o mapa das amostras apresentado na FIGURA 1.8. As análises das coletas apresentaram os seguintes resultados <LQ e pH 7,0 (ponto 2), 20,0 ng / L de MP e pH 7,5 (ponto 3) e 18,0 ng / L de MP e 4,1 ng / L de BP e pH 7,5 (ponto 4). Os perfis cromatográficos das amostras de resultado positivo para os parabenos com o *MRM* do íon quantificador à esquerda, confirmador ao centro e espectros de massas à direita adquiridos são ilustradas na FIGURA 3.6.

Comparação dos resultados obtidos com países como China⁸⁸, Índia⁸⁹, Portugal⁹⁰ e Suíça⁵⁸ foram avaliados. Estes países utilizaram diferentes métodos para determinação dos parabenos, indo de extração líquido-líquido a SPE *off-line* para posterior análise em GC-MS ou por SPE *off-line* e a análise em LC-MS/MS. Os resultados variaram de menor que o limite de quantificação a 9880 ng / L para metilparabeno, 719 ng / L para etilparabeno, 1540 ng / L para propilparabeno e 2142

para butilparabeno. Os destaques são China e Suíça que apresentaram as concentrações mais altas, a explicação para isso pode ser a alta densidade demográfica dos pontos coletados, a região de coleta da China foi de 12 milhões de pessoas com 70 % do esgoto tratado; a Suíça embora com número menor de habitantes, teve coletas na região onde apenas 10-21 % do esgoto são tratados e de 160 mil habitantes. Os resultados encontrados neste estudo foram próximos dos valores em Portugal que embora tivessem a região com 700 mil habitantes foram amostras de alta concentração salina o que pode ter ocasionado supressão de sinal ou contribuído para menor eficiência na extração, quanto menor a porcentagem de salinidade na amostra maiores foram as concentrações obtidas.

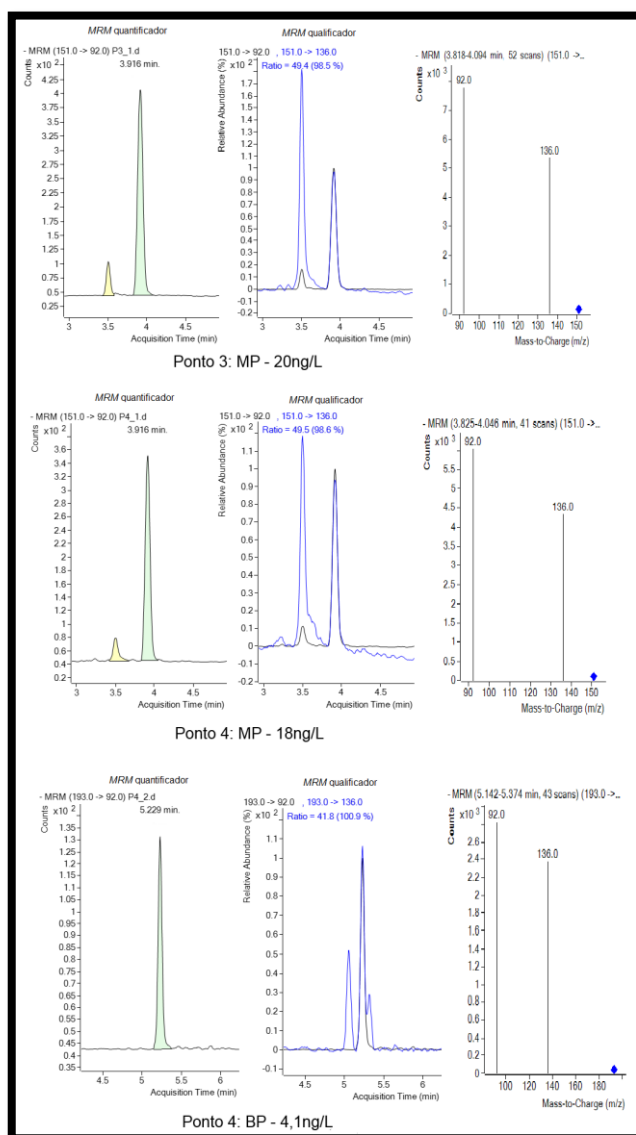


FIGURA 3.6: Cromatogramas dos resultados encontrados em amostras de águas superficiais urbanas dos pontos (3) e (4) com *MRM* extraído e os espectros de massas adquiridos.

5. CONCLUSÕES

Neste trabalho foi apresentado o desenvolvimento, validação e aplicação do método com injeção direta de amostra no sistema SPE-LC-MS/MS para quantificação de metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno e butilparabeno em amostra de água de efluente ao longo do Rio Monjolinho no município de São Carlos-SP.

O método foi validado e atendeu aos critérios de aceitação do guia utilizado. Efeito matriz foi observado devido a ineficiência da depleção das substâncias húmicas quando presentes em alta concentração nas amostras. O uso do padrão interno para cada parabeno, no entanto, corrigiu os desvios causados pelo efeito matriz permitindo limites de quantificação em ordem de ng / L com boa exatidão e precisão mesmo para as amostras com os interferentes. O método foi considerado rápido pelo tempo de análise total ser de 9,5 min incluindo a etapa de extração e corrida cromatográfica e utilizou menor volume de solvente comparado a técnicas de SPE *off-line* para matrizes aquosas podendo assim ser considerado um método verde.

O metilparabeno foi encontrado nos pontos de coleta 2, 3 e 4 com valores inferiores ao LQ até 20,0 ng / L no ponto 3. O butilparabeno foi encontrado somente no ponto 4 de coleta em concentração de 4,1 ng / L.

A coluna de SPE PLRP-S (*Polymer Reversed Phase for Small Molecule*) se mostrou de bom desempenho e com resultados de qualidade após 500 injeções (800 µL cada).

6. REFERÊNCIAS

- 1 RIBEIRO, C.; RIBEIRO, A. R; MAIA, A. S.; GONÇALVES, V. M. F.; TIRITAN, M. E. New Trends in Sample Preparation Techniques for Environmental Analysis. *Critical Reviews In Analytical Chemistry*, v. 44, n. 2, p. 142–185, 2014.
- 2 CABAN, M; LIS, W; KUMIRSKA, J; STEPNOWSKI, P. Determination of pharmaceutical residues in drinking water in Poland using a new SPE-GC-MS(SIM) method based on Speedisk extraction disks and DIMETRIS derivatization. *Science of the Total Environment*, v. 538, p. 402–411, 2015.
- 3 LIU, Z. HUA; LU, G. NING; YIN, H; DANG, Z; LITTIER, H, LIU, Y. Sample-preparation methods for direct and indirect analysis of natural estrogens. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, v. 64, p. 149–164, 2015.
- 4 METHOD EPA 552, "Determination of Haloacetic Acids in Drinking Water By Liquid-Liquid Extraction, Derivatization and Gas Chromatography With Capture Detection Office of Research and Development", 1990.
- 5 METHOD EPA 551, "Determination of Chlorination Disinfection Byproducts , Chlorinated Solvents , and Halogenated Pesticides / Herbicides in Drinking Water By Liquid-Liquid Extraction and Gas Chromatography". 1995.
- 6 METHOD EPA 525.2 "Determination of Organic Compounds in Drinking Water by Liquid-Solid Extraction and Capillary Column Gas Chromatography/Mass Spectrometry", 1994.
- 7 METHOD EPA 515.4 Dertermination of Chlorinated Acids in Drinking by Liquid-Liquid Microextraction, Derivatization, and fas Gás chromatography with Electron Capture Detection", 2000.
- 8 METHOD EPA 508.1 "Determination of Chlorinated Pesticides, Herbicides, and organohalides by Liquid – Solid Extraction and Electron Capture Gas Chromatography," 1995.
- 9 METHOD EPA 506 "Determination of Phthalate and Adipate Esters in Drinking Water by Liquid-Liquid Extraction or Liquid-Solid Extraction and Gas Chromatography with Photoionization Detection", 1995.
- 10 MAJORS, R.E. Sample preparation fundamentals for chromatography. Agilent Technologies, Inc. 5991-3326EN; 2013.

- 11 CHIRILA, E. S.; DRAGHICI, C.; DOBRINAS, S. Sampling and sample pretreatment for environmental analysis. *Chemicals as Intentional and Accidental Global Environmental Threats*, p. 7–28, 2006.
- 12 PETROVIC, M; FARRÉ, M; ALDA, M. L; PEREZ, S; POSTIGO, C; KOCK, M; RADJENOVIC, J; GROS, M; BARCELO, D. Recent trends in the liquid chromatography–mass spectrometry analysis of organic contaminants in environmental samples. *Journal of Chromatography A*, v. 1217, n. 25, p. 4004–4017, 2010. ISSN 00219673.
- 13 RAMOS, L. Critical overview of selected contemporary sample preparation techniques. *Journal of Chromatography A*, v. 1221, p. 84–98, 2012.
- 14 POOLE, C. F. New trends in solid-phase extraction. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, v. 22, n. 6, p. 362–373, 2003.
- 15 BARREIRO, J. C.; VANZOLINI, K. L.; MADUREIRA, T. V.; TIRITAN, M. E.; CASS, Q. B. A column-switching method for quantification of the enantiomers of omeprazole in native matrices of waste and estuarine water samples. *Talanta*, v. 82, n. 1, p. 384–391, 2010.
- 16 VALLS-CANTENYS, C.; SCHEURER, M; IGLESIAS, M; SACHER, F; BRAUCH, H-JURGEN; SALVADÓ, V. A sensitive multi-residue method for the determination of 35 micropollutants including pharmaceuticals, iodinated contrast media and pesticides in water. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 408, n. 22, p. 6189–6200, 2016.
- 17 PORTARIA 2914, ‘Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade,’ 2011.
- 18 CONAMA 357, “Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências”, 2011.
- 19 METHOD EPA 3535A (SW 846) “Solid-Phase Extraction (SPE)”, 1998.
- 20 METHOD EPA 528 ” Determination of phenols in Drinking water by Solid Phase Extraction and capillary column gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS)”, 2000.
- 21 POOLE, C. F.; GUNATILLEKA, A. D.; SETHURAMAN, R. Contributions of theory to method development in solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A*, v. 885, n. 1–2, p. 17–39, 2000.

- 22 HENNIO, M.-C. Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 856, p. 3–54, 1999.
- 23 GILART, N.; BORRULL, F.; FONTANALS, N.; MARCÉ, R.M. Selective materials for solid-phase extraction in environmental analysis. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, v. 1, 2014.
- 24 FUMES, B. H.; SILVA, M. R.; ANDRADE, F. N.; NAZARIO, C. E. D.; LANÇAS, F. M. Recent advances and future trends in new materials for sample preparation. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, v. 71, p. 9–25, 2015.
- 25 BYLDA, C.; THIELE, R.; KOBOLD, U.; VOLMER, D. A. Recent advances in sample preparation techniques to overcome difficulties encountered during quantitative analysis of small molecules from biofluids using LC-MS/MS. *The Analyst*, v. 139, p. 2265–76, 2014.
- 26 LOPES, B. R.; BARREIRO, J. C.; CASS, Q. B. Bioanalytical challenge: A review of environmental and pharmaceuticals contaminants in human milk. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 130, p. 318–325, 2016.
- 27 BARCIELA-ALONSO, M. C.; OTERO-LAVANDEIRA, N.; BERMEJO-BARRERA, P. Solid phase extraction using molecular imprinted polymers for phthalate determination in water and wine samples by HPLC-ESI-MS. *Microchemical Journal*, v. 132, p. 233–237, 2017.
- 28 CASSIANO, N. M.; BARREIRO, J. C.; CASS, Q. B. New trends in sample preparation in Brazil: An overview of bioanalytical applications by liquid chromatography. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 25, n. 1, p. 9–19, 2014.
- 29 MOGHIMI, A.; HOSSEINI, S. A.; FAR, A. M. Solid phase extraction for trace amount Cu (II) by C18 modified carbon nano tube and cupferron ligand in waste water sample and determination it by flame atomic adsorption. *Oriental Journal of Chemistry*, v. 31, n. 1, p. 263–270, 2015.
- 30 GOŁĘBIEWSKI, M.; STEPNOWSKI, P.; LESZCZYŃSKA, D. Application of carbon nanotubes as solid-phase extraction sorbent for analysis of chlorophenols in water samples. *Chemical Papers*, v. 71, n. 4, p. 831–839, 2017.
- 31 BUSZEWSKI, B.; SZULTKA, M. Past, Present, and Future of Solid Phase Extraction: A Review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, v. 42, n. 3, p. 198–213, 2012.

- 32 LISKA, I. On-line versus off-line solid-phase extraction in the determination of organic contaminants in water. *Journal of Chromatography A*, v. 655, n. 2, p. 163–176, 1993.
- 33 TLILI, I.; CARIA, G.; OUDDNAE, B.; GHORBEL-ABID, I.; TERNANE, R.; TRABELSI-AYADI, M.; NET, S.. Simultaneous detection of antibiotics and other drug residues in the dissolved and particulate phases of water by an off-line SPE combined with on-line SPE-LC-MS/MS: Method development and application. *Science of the Total Environment*, v. 563–564, p. 424–433, 2016.
- 34 KUKLENYIK, Z.; CALAFAT, M. A.; BARR, J. R.; PIRKLE, J. L. Design of online solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry (SPE-LC-MS/MS) hyphenated systems for quantitative analysis of small organic compounds in biological matrices. *Journal of Separation Science*, v. 34, n. 24, p. 3606–3618, 2011.
- 35 HEUETT, N. V.; RAMIREZ, C. E.; FERNANDEZ, A.; GARDINALI, P. R. Analysis of drugs of abuse by online SPE-LC high resolution mass spectrometry: Communal assessment of consumption. *Science of the Total Environment*, v. 511, p. 319–330, 2015.
- 36 HERNÁNDEZ-RAMOS, C.; ŠATÍNSKÝ, D.; SOLICH, P. New method for the determination of carbamate and pyrethroid insecticides in water samples using on-line SPE fused core column chromatography. *Talanta*, v. 129, p. 579–585, 2014.
- 37 GARCÍA-GALÁN, M. J.; DÍAZ-CRUZ, M. S.; BARCELÓ, D. Determination of 19 sulfonamides in environmental water samples by automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry (SPE-LC-MS/MS). *Talanta*, v. 81, n. 1–2, p. 355–366, 2010.
- 38 BONES, J.; THOMAS, K.; NESTERENKO, P, N.; PAULL, B.;. On-line preconcentration of pharmaceutical residues from large volume water samples using short reversed-phase monolithic cartridges coupled to LC-UV-ESI-MS. *Talanta*, v. 70, n. 5, p. 1117–1128, 2006.
- 39 CASS, Q.B. & CASSIANO, N.M., *Cromatografia Líquida: Novas tendências e aplicações*. 2015, Rio de Janeiro: Elsevier.

- 40 SUNEETHA, A.; RAJA, R. K. Comparison of LC-UV and LC-MS methods for simultaneous determination of teriflunomide, dimethyl fumarate and fampridine in human plasma: application to rat pharmacokinetic study. *Biomedical Chromatography*, v. 30, n. 9, p. 1371–1377, 2016.
- 41 HOFFMANN, E & STROOBANT, V, “Mass Spectrometry”, 2007.
- 42 RIBEIRO, A. R.; PEDROSA, M.; MOREIRA, N. F .F.; PEREIRA, M. F .R.; SILVA, A. M. T. S. Environmental friendly method for urban wastewater monitoring of micropollutants defined in the Directive 2013/39/EU and Decision 2015/495/EU. *Journal of Chromatography A*, v. 1418, p. 140–149, 2015.
- 43 DIMPE, K. M.; NOMNGONGO, P. N. Current sample preparation methodologies for analysis of emerging pollutants in different environmental matrices. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, v. 82, p. 199–207, 2016. Hird, S. J., et al. (2014).
- 44 ARPINO, P. Combined liquid chromatography mass spectrometry. Part III. Applications of thermospray. *Mass Spectrometry Reviews*, v. 11, n. 1, p. 3–40, 1992.
- 45 YOST, R. A.; ENKE, C. G. Triple quadrupole mass spectrometry for direct mixture analysis and structure elucidation. *Analytical chemistry*, v. 51, n. 12, p. 1251–64, 1979.
- 46 HIRD, S. J.; LAU, B. P. -Y.; SCHMUMACHER, R.; KRŠKA, R. Liquid chromatography-mass spectrometry for the determination of chemical contaminants in food. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 59, p. 59–72, 2014.
- 47 PITT, J. J. Principles and Applications of Liquid Chromatography- Mass Spectrometry in Clinical Biochemistry. *Clinical Biochemical Review*, v. 30, n. February, p. 19–34, 2009.
- 48 TULI, L.; RESSOM, W. H. NIH Public Access. “LC-MS Based Detection of Differential Protein Expression.” *J Proteomics Bioinform Ratio*, n. 2, p. 416-438, 2009.
- 49 COTTER; R.J, Time-of-flight mass spectrometry. American Chemical Society, 1994.
- 50 JUNIOR, E.S.; ROCHA, J.C.; ROSA, A.H.; ZARA, LF & DOS SANTOS, A.; “Substâncias Húmicas Aquáticas: fracionamento molecular e caracterização de rearranjos internos após complexação com íons metálicos”. *Química Nova*. 24 (3):339,2001.

- 51 WU, F.C., EVANS, R.D., DILLON, P.J & CAI, Y.R, "Rapid quantification of humic and fulvic acids by HPLC in natural waters". *Applied Geochemistry*. 22: 1598, 2007.
- 52 VANZOLINI, L.K, "Métodos para determinação enantiomérica dos fármacos omeprazol, lansoprazol e pantoprazol em águas residuais e de estuário". UFSCar, 2009.
- 53 SAUNDERS, L. J.; MAZUMDER, A.; LOWE, C. J. Pharmaceutical concentrations in screened municipal wastewaters in Victoria, British Columbia: A comparison with prescription rates and predicted concentrations. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 35, n. 4, p. 919–929, 2016.
- 54 DAUGHTON, C. G. et al. "Personal Care Products in the Environment by Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Agents of Subtle Change Environ Health Perspect, 108(Suppl 3): 598, 1999.
- 55 BŁĘDZKA, D.; GROMADZIŃSKA, J.; WĄSOWICZ, W. Parabens. From environmental studies to human health. *Environment international*, v. 67, p. 27–42, 2014.
- 56 BRAUSCH, J. M.; RAND, G. M. A review of personal care products in the aquatic environment: Environmental concentrations and toxicity. *Chemosphere*, v. 82, n. 11, p. 1518–1532, 2011.
- 57 RAMASWAMY, B. R.; SHANMUGAN, G.; VELU, G.; RENGARAJAN, B.; LARSSON, D. G. J. GC-MS analysis and ecotoxicological risk assessment of triclosan, carbamazepine and parabens in Indian rivers. *Journal of Hazardous Materials*, v. 186, n. 2–3, p. 1586–1593, 2011.
- 58 JONKERS, N.; KOHLER, H-PETER. E.; DAMMSHAUSER, A.; GIGER, W.. Mass flows of endocrine disruptors in the Glatt River during varying weather conditions. *Environmental Pollution*, v. 157, n. 3, p. 714–723, 2009.
- 59 KANG, S.; KIM, SUNMI.; PARK, J.; KIM, H-JOONG.; LEE, J.; CHOI, G.; CHOI, S.; KIM, S.; KIM, S. Y.; MOON, H-BANG.; KIM, S.; KHO, Y. L.; CHOI, K. Urinary paraben concentrations among pregnant women and their matching newborn infants of Korea, and the association with oxidative stress biomarkers. *Science of the Total Environment*, v. 461–462, p. 214–221, 2013.
- 60 CABALEIRO, N.; CALLE, I. D. L.; LAVILLA, I. An overview of sample preparation for the determination of parabens in cosmetics. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, v. 57, p. 34–46, 2014.

- 61 LI, X. J.; TANG, X.; ZHOU, X.; CHEN, M.; DAI, J.; XIONG, W.; ZOU, Z.; LIU, H.; LV, S.; LIN, H.; LIAN. Determination of Eight Parabens in Water-Based Food Simulants Migrated from Antibacterial Plastic Packaging by LC/MS/MS. *Applied Mechanics and Materials*, v. 333–335, p. 1993–1997, 2013.
- 62 TERASAKI, M.; TAKEMURA, Y.; MAKINO, M. Paraben-chlorinated derivatives in river waters. *Environmental Chemistry Letters*, v. 10, n. 4, p. 401-406, 2012. ISSN 1610-3653 1610-3661.
- 63 MADUREIRA, T. V.; BARREIRO, J. C.; ROCHA, M. J.; CASS. Q. B.; TIRITAN, M. E. Pharmaceutical trace analysis in aqueous environmental matrices by liquid chromatography-ion trap tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1216, n. 42, p. 7033–7042, 2009.
- 64 ZHANG, D.; GERSBERG. R. M.; NG, W. J.; TAN, S. K. Removal of pharmaceuticals and personal care products in aquatic plant-based systems: A review. *Environmental Pollution*, v. 184, p. 620–639, 2014.
- 65 SONI, M. G.; CARABIN, I. G.; BURDOCK, G. A. Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens). *Food and Chemical Toxicology*, v. 43, n. 7, p. 985–1015, 2005.
- 66 WANG, J.; CHU, L. Irradiation treatment of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) in water and wastewater: An overview. *Radiation Physics and Chemistry*, v. 125, p. 56–64, 2016.
- 67 NOVELLI, A. "Estudo limnológico e ecotoxicológico da água e sedimento do rio Monjolinho - São Carlos (SP), com ênfase nas substâncias de referência cádmio e cobre." UFSCar. 2015
- 68 REZENDE, G. A. Estudo do sub-bacia hidrográfica do rio Monjolinho, São Carlos – SP, utilizando o modelo matemático de qualidade da água. QUAL-2E, ANAP, vol. 07, n.02, 2011
- 69 CAMPANHA, M.B. Contaminantes emergentes: ocorrência e distribuição espaço-temporal no rio Monjolinho e avaliação da remoção pela estação de tratamento de esgotos de São Carlos, 2015 pp. 37-41. Disponível em: <<https://repositorio.ufscar.br/handle/ufscar/6344>>. Acesso em: 26 de novembro de 2016.
- 70 BARRETTO, A. DOS S. Estudo da distribuição de metais em ambiente lótico, com ênfase na assimilação pelas comunidades biológicas e na sua quantificação no sedimento e água.EESC/USP - São Carlos - SP, 1999.

- 71 SAAE – Serviço Autônomo de Água e Esgoto. Estação de tratamento de esgoto de São Carlos 2016. Disponível em: <<http://www.saaesaocarlos.com.br/joomla4/index.php/estogomenutop/etesmenud>>. Acesso em: 26 de novembro de 2016.
- 72 SÉ, J.A.S. O Rio do Monjolinho e sua bacia hidrográfica como integradores de sistemas ecológicos. EESC/USP – São Carlos -SP, 1992.
- 73 DENADAI, M. “Fluoroquinolonas em amostras aquosas ambientais e em teleósteos: quantificação, avaliação de toxicidade e ensaios de biotransformação.” UFSCar – São Carlos/SP. 2015.
- 74 EMA, "European Medicines Agency - Guideline on bioanalytical method validation". 2011.
- 75 ANALYTICAL METHODS COMMITTEE. Recommendations for the definition, estimation and use of the detection limit. *The Analyst*, v. 112, n. 2, p. 199–204, 1987.
- 76 THOMSEN, V.; SCHATZLEIN, D.; MERCURO, D. Limits of Detection in Spectroscopy. *Pure and Applied Chemistry*, v. 18, n. 12, p. 112–114, 2003.
- 77 WISCONSIN DEPARTMENT OF NATURAL RESOURCES. Analytical Detection Limit Guidance & Laboratory Guide for Determining Method Detection Limits. Laboratory Certification Program, n. April, p. 1–33, 1996.
- 78 US EPA. IDL, MDL, PQL, What the L is going on? What does all this alphabet soup really mean? n. 2.5, 2006.
- 79 PARRA, N. P.; TAYLOR, L. Why Instrument Detection Limit (IDL) Is A Better Metric For Determining The Sensitivity of Triple Quadrupole LC/MS Systems. n. *Idl*, 5991-4089EN p. 1–4, 2014.
- 80 WAYMAN, C.; GORDON, E.; KING, G. the Method Detection Limit and Practical Quantitation Level: Their Derivations and Regulatory Implications. *WM Confrence*, n. 1, 1990.
- 81 SWIFT, J. Method Detection Limit (MDL) Development and Standardization. n. *Mdl*, 2009.

- 83 BENIJTS, T.; LAMBERT, W.; DE LEENHEER, A. Analysis of Multiple Endocrine Disruptors in Environmental Waters via Wide-Spectrum Solid-Phase Extraction and Dual-Polarity Ionization LC-Ion Trap-MS/MS. *Analytical Chemistry*, v. 76, n. 3, p. 704–711, 2004.
- 84 CARDER, K. L.; STEWARD, R. G.; HARVEY, G. R.; ORTNER, P. B. Marine humic and fulvic acids: Their effects on remote sensing of ocean chlorophyll. *Limnology and Oceanography*, v. 34, n. 1, p. 68–81, 1989.
- 85 WEIGEL, S.; KALLENBORN, R.; HÜHNERFUSS, H. Simultaneous solid-phase extraction of acidic, neutral and basic pharmaceuticals from aqueous samples at ambient (neutral) pH and their determination by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1023, n. 2, p. 183–195, 2004.
- 86 GUENU, S.; HENNION, M. C. Evaluation of new polymeric sorbents with high specific surface areas using an on-line solid-phase extraction-liquid chromatographic system for the trace-level determination of polar pesticides. *Journal of Chromatography A*, v. 737, n. 1, p. 15–24, 1996.
- 87 LIN, W. C.; CHEN, H. C.; DING, W. H. Determination of pharmaceutical residues in waters by solid-phase extraction and large-volume on-line derivatization with gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1065, n. 2, p. 279–285, 2005.
- 88 PENG, X.; YUA, Y.; TANGA, C.; TANA, J.; HUANGA, Q.; WANG, Z. 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. 1–3, p. 158–166, 2008.
- 89 RAMASWAMY, B. R.; SHANMUGAMA, G.; VELUA, G.; RENGARAJANA, B.; LARSSONB, D.G.J. GC-MS analysis and ecotoxicological risk assessment of triclosan, carbamazepine and parabens in Indian rivers. *Journal of Hazardous Materials*, v. 186, n. 2–3, p. 1586–1593, 2011.
- 90 JONKERS, N.; SOUSA, A.; GALANTE-OLIVEIRA, S.; BARROSO, C.M.; KOHLER, H-P. E.; GIGER. Occurrence and sources of selected phenolic endocrine disruptors in Ria de Aveiro, Portugal. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 17, n. 4, p. 834–843, 2010.