

Universidade de São Paulo
Instituto de Química de São Carlos

Determinação eletroanalítica e cromatográfica de Metilparabeno. Uma comparação estatística

Camila Domingues Mendonça

São Carlos - SP
2015

Camila Domingues Mendonça

Determinação eletroanalítica e cromatográfica de Metilparabeno. Uma comparação estatística

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

Área de concentração: Química Analítica e Inorgânica

Orientador: Prof^a. Dr^a. Sergio Antonio Spinola Machado

São Carlos - SP
2015

Aos meus pais, Goretti e Aroldo, dedico com amor.

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo ao meu Deus, pelo dom da vida; pela saúde, força, coragem e todos os ensinamentos que me ajudaram a superar as dificuldades que apareceram ao longo desses anos. Agradeço, Senhor, por ter tornado a minha fé uma rocha forte e inabalável!

À Universidade de São Paulo, pela oportunidade do desenvolvimento profissional e pessoal.

Ao CNPq, pela bolsa concedida, que me possibilitou adquirir objetos materiais de grande importância para meu crescimento profissional.

À minha mãe, minha melhor amiga, minha companheira que tanto admiro e que sempre esteve presente em todas as etapas de mais esse trabalho; ao meu pai, pela dedicação e apoio jamais negados. Agradeço muito a vocês pela oportunidade que sempre me deram de me formar profissionalmente. Amo muito vocês!

Ao Raphael Verbinnen, meu companheiro, amigo e cúmplice. Muito obrigada sempre pelo papel que tens exercido em minha vida!

A todos da minha família Guedes, em especial a minha avózinha Júlia, pessoa guerreira que sempre admirarei e à minha tia Marciana, pelo apoio imensurável.

A todos da minha família Domingues, pelos momentos maravilhosos compartilhados.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Sergio Machado, pela ética, compreensão e paciência, que sempre me auxiliou com sugestões e esclarecimentos de dúvidas, tornando-me capaz de desenvolver este trabalho.

A todos do GMEME, pelos momentos de descontração; em especial à amiga Naiza pelas nossas conversas e conselhos. Agradeço, também, à Vanessa e ao Paulo por seus apoio e auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas do LAQUAAE, em especial a Prof^ª. Dr^ª. Eny Vieira.

As minhas amigas, Thiessa e Gleyciara pelas conversas, sugestões e pelo apoio moral e sentimental.

A todos aqueles que contribuíram direta e indiretamente para a realização de mais este sonho... o meu muito obrigado!

*“Feliz aquele que transfere o que
sabe e aprende o que ensina.”*

Cora Coralina

RESUMO

A cromatografia a líquido de alta eficiência e a voltametria de onda quadrada foram estudadas e comparadas estatisticamente para a detecção do contaminante emergente metilparabeno (MePa). Os parabenos vêm sendo amplamente utilizados como conservantes em cosméticos, alimentos e remédios. É crescente o número de estudos que visam à detecção dos parabenos em virtude dos males causados à saúde humana, devido às suas características de serem carcinogênicos e interferentes endócrinos. Para determinação cromatográfica, foi desenvolvido um método analítico que utilizou filtração à vácuo seguida de análise cromatográfica acoplada a um detector UV. O eletrodo de diamante dopado com boro (BDD) foi utilizado para determinação eletroanalítica de MePa pela técnica voltamétrica. Para a análise cromatográfica, foi observada boa linearidade (0,999) na faixa de 0,5 a 30 mgL⁻¹, com limite de detecção e quantificação de 0,49 mgL⁻¹ e 0,73 mgL⁻¹, respectivamente, para amostra de água natural superficial e para a amostra de cosmético 1,26 mgL⁻¹ e 1,88 mgL⁻¹, respectivamente. A dependência da corrente pelo pH e os parâmetros eletroquímicos (frequência, amplitude e step) foram estudados para obtenção de condições experimentais ótimas na determinação de MePa. Foi observado que o eletrólito suporte ideal é o tampão PBS 0,1 molL⁻¹ (pH 7,5). Linearidade adequada (0,998), na mesma faixa de trabalho, com limite de detecção e quantificação de 0,43 mgL⁻¹ e 1,44 mgL⁻¹, respectivamente, foram encontrados para a técnica voltamétrica. Os métodos utilizados em ambas as técnicas foram validados em uma amostra de água natural superficial, coletada em região pouco impactada, e em uma amostra de cosmético. Utilizando o método cromatográfico, foram obtidos intervalos de recuperação entre 95,6% e 101,6% com RSD inferior a 4,8% (n = 3) e entre 78,0% e 99,8% com RSD inferior a 2,2% (n = 3) para amostras de água natural superficial e de cosmético, respectivamente. Na determinação eletroanalítica, soluções fortificadas daquelas amostras mostraram intervalo de recuperação entre 92,6% e 106,4%, com um desvio-padrão relativo (RSD) inferior a 9,76% (n = 3), para amostra de água superficial natural, e entre 90,0% e 112,6% com RSD inferior a 7,4% (n = 3), para amostra de cosmético. Os resultados das detecções cromatográfica e eletroanalítica foram comparados e analisados estatisticamente segundo um método estatístico. Através do teste t de Student pareado, demonstrou-se que a metodologia eletroanalítica é capaz de determinar MePa com boa precisão tal como a técnica padrão de detecção, a cromatografia, na faixa de trabalho de 1,0 a 30 mgL⁻¹.

Palavras-chave: Eletroanalítica. Cromatografia líquida. Comparação estatística. Metilparabeno.

ABSTRACT

The high performance liquid chromatography and square wave voltammetry have been studied and compared statistically to detect the emerging contaminant methylparaben (MePa). Parabens have been widely used as preservatives in cosmetics, food and drugs. It is increasing the number of studies that aimed the detection of parabens because of its possible hazardous effect in the human health, as probably being carcinogenics and endocrine disruptors. For chromatographic determination, an analytical method that used vacuum filtration followed by chromatographic analysis coupled to a UV detector was developed. The boron doped diamond electrode (BDD) was used to electroanalytical determination to MePa by voltammetric technique. The chromatographic analysis showed good linearity (0.999) in the range from 0.5 to 30 mgL⁻¹, with detection and quantification limit of 0.49 mgL⁻¹ and 0.73 mgL⁻¹, respectively, for natural surface water sample and to the cosmetic sample 1.26 mgL⁻¹ and 1.88 mgL⁻¹, respectively. The dependence of the current to pH and electrochemical parameters (frequency, amplitude and step) were studied to obtain the optimal experimental conditions in determining MePa. It has been observed that the ideal supporting electrolyte is PBS 0.1 molL⁻¹ (pH 7.5). Adequate linearity (0.998), in the same working range, with detection and quantification limit of 0.43 mgL⁻¹ and 1.44 mgL⁻¹, respectively, were found for the voltammetric technique. The methods used in both techniques were validated in a sample of natural surface water, collected in little impacted region, and a cosmetic sample. Using the chromatographic method were obtained recovery intervals between 95.6% and 101.6% with RSD less than 4.8% (n = 3) and between 78.0% and 99.8% with RSD less than 2.2% (n = 3) for samples of natural surface water and cosmetic, respectively. In electroanalytical determination, fortified solutions of those samples showed a recovery range between 92.6% and 106.4% with a relative standard deviation (RSD) less than 9.76% (n = 3) for natural surface water sample and between 90.0% and 112.6% with RSD less than 7.4% (n = 3), for cosmetic sample. The results of chromatographic and electroanalytical detections were compared and statistically analyzed by a statistical method. Using the Student's paired t-test, it was demonstrated that electroanalytical methodology is able to determine MePa with good accuracy as standard detection technique, chromatography, on working range of 1.0 to 30 mgL⁻¹.

Keywords: Electroanalysis. Liquid chromatography. Statistical comparison. Methylparaben.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fórmulas moleculares dos parabenos mais comuns.	9
Figura 2 - Regressão linear para comparação de duas metodologias analíticas: (a) mostra perfeita concordância entre as duas metodologias para todas as amostras; (b)-(f) ilustra os resultados de vários tipos de erro sistemáticos.	19
Figura 3 - Representação esquemática e de fluxo de um sistema cromatográfico.	23
Figura 4 - Representação esquemática da célula eletroquímica.	24
Figura 5 - Imagem obtida pelo SEM da superfície do eletrodo BDD modificado com Pt-RuO _x	24
Figura 6 - Definições de limite de decisão e limite de detecção.	31
Figura 7 - Cromatograma do MePa na concentração de 5,0 mgL ⁻¹ . Condições cromatográficas otimizadas: FM metanol:água-ácido acético (1%) (65:35, v/v) (isocrático), vazão de 1,0 mLmin ⁻¹ , volume de injeção de 20 µL e temperatura ambiente (~ 25 °C).	39
Figura 8 - Cromatogramas obtidos para amostra de água natural superficial, demonstrando a seletividade do método. FM: metanol:água-ácido acético (1%) (65:35, v/v) (isocrático); vazão: 1,0 mLmin ⁻¹ ; volume de injeção: 20 µL e temperatura ambiente (~ 25 °C). t _R = 4,86 min.	40
Figura 9 - Cromatogramas obtidos para amostra de cosmético, demonstrando a seletividade do método. FM: metanol:água-ácido acético (1%) (65:35, v/v) (isocrático); vazão: 1,0 mLmin ⁻¹ ; volume de injeção: 20 µL e temperatura ambiente (~ 25 °C). t _r = 4,86 min.	41
Figura 10 - Gráfico da média das curvas analíticas (n = 3) para amostra de água natural superficial fortificada com concentrações crescentes de MePa (0,5, 0,75, 1,0, 5,0, 10, 15, 20, 25 e 30 mgL ⁻¹). FM: metanol:água-ácido acético (1%) (65:35, v/v) (isocrático); vazão: 1,0 mLmin ⁻¹ ; volume de injeção: 20 µL e temperatura ambiente (~ 25 °C).	42
Figura 11 - Gráfico da média das curvas analíticas (n = 3) para amostra de cosmético fortificada com concentrações crescentes de MePa (1,0, 5,0, 10, 15, 20, 25 e 30 mgL ⁻¹). FM: metanol:água-ácido acético (1%) (65:35, v/v) (isocrático); vazão: 1,0 mLmin ⁻¹ ; volume de injeção: 20 µL e temperatura ambiente (~ 25 °C).	42
Figura 12 - Efeito de matriz na análise cromatográfica das amostras de água natural superficial e de cosmético.	45
Figura 13 - Voltamograma cíclico do comportamento do BDD frente à solução de MePa a 50 mgL ⁻¹ em PBS 0,1 molL ⁻¹ , pH 7,5, a partir das soluções estoque em (a) etanol (linha cheia) e em (b) ACN:PBS (50:50, v/v) (linha tracejada), a v = 50 mVs ⁻¹	46
Figura 14 - Gráfico Nyquist do BDD em 0,1 molL ⁻¹ KCl contendo 5,0 x 10 ⁻³ molL ⁻¹ do par redox K ₄ [Fe(CN) ₆]/K ₃ [Fe(CN) ₆], em potencial de circuito aberto.	47
Figura 15 - Voltamograma de onda quadrada de oxidação do MePa a 5,1 mgL ⁻¹ em PBS 0,1 molL ⁻¹ a diferentes valores de pH. Parâmetros da SWV: a = 50 mV, f = 20 Hz e ΔE _s = 2 mV.	48
Figura 16 - Representação dos parâmetros experimentais (I _p e E), obtidos da Figura 15 relacionados à variação do pH.	48

Figura 17 - Voltamograma de onda quadrada para seleção do eletrólito suporte tampão PBS (-) ou BR (-) ($0,1 \text{ molL}^{-1}$, pH 7,5), com concentrações crescentes de MePa (5,1, 6,4 e $8,7 \text{ mgL}^{-1}$).	49
Figura 18 - Efeito da variação da frequência no pico de corrente da SWV a uma amplitude de 50 mV e um incremento de potencial de 2 mV para uma solução de PBS $0,1 \text{ molL}^{-1}$ contendo $1,0 \text{ mgL}^{-1}$ de MePa.	50
Figura 19 - Efeito da variação da amplitude no pico de corrente da SWV a uma frequência de 35 Hz e um incremento de potencial de 2 mV em PBS $0,1 \text{ molL}^{-1}$ contendo $1,0 \text{ mgL}^{-1}$ de MePa.	51
Figura 20 - Efeito da variação do incremento de potencial no pico de corrente da SWV a uma frequência de 35 Hz e uma amplitude de 30 mV, para PBS $0,1 \text{ molL}^{-1}$ contendo $1,0 \text{ mgL}^{-1}$ de MePa.	52
Figura 21 - SWV do eletrodo BDD para concentrações crescentes de MePa em tampão PBS, pH 7,5, $0,1 \text{ molL}^{-1}$ ($f = 35 \text{ Hz}$; $a = 30 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$): (a) Branco; (b) 0,5; (c) 0,75; (d) 1,0; (e) 2,5; (f) 5,0; (g) 7,5; (h) 10; (i) 15; (j) 20; (k) 25 e (l) 30 mgL^{-1}	53
Figura 22 - Gráfico da média das curvas analíticas ($n = 5$) para concentrações crescentes de MePa (0,5, 0,75, 1,0, 5,0, 10, 15, 20, 25 e 30 mgL^{-1}) em tampão PBS, pH 7,5, $0,1 \text{ molL}^{-1}$ ($f = 35 \text{ Hz}$; $a = 30 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$).	54
Figura 23 - Gráfico da média das curvas analíticas ($n = 5$) para concentrações crescentes de MePa (1,0, 5,0, 10, 15, 20, 25 e 30 mgL^{-1}) em tampão PBS, pH 7,5, $0,1 \text{ molL}^{-1}$ ($f = 35 \text{ Hz}$; $a = 30 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$).	54
Figura 24 – Sobreposição dos voltamogramas obtidos para amostra de água natural superficial, demonstrando a seletividade do método. ($f = 35 \text{ Hz}$; $a = 30 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$).	55
Figura 25 – Sobreposição dos voltamogramas obtidos para amostra de cosmético, demonstrando a seletividade do método. ($f = 35 \text{ Hz}$; $a = 30 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$).	55
Figura 26 – Efeito de matriz na análise eletroanalítica das amostras de água natural superficial e de cosmético.	59
Figura 27 – Gráfico de regressão linear dos valores obtidos pelas técnicas de SWV e cromatografia líquida, para detecção de MePa em amostra de água natural superficial.	60
Figura 28 – Gráfico de regressão linear dos valores obtidos pelas técnicas de SWV e cromatografia líquida, para detecção de MePa em amostra de cosmético.	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características físicas e químicas do MePa.....	11
Tabela 2 - Procedência e pureza dos reagentes utilizados.....	22
Tabela 3 - Condições cromatográficas otimizadas	38
Tabela 4 - Resultados dos parâmetros de validação de método cromatográfico.....	44
Tabela 5 - Resultados dos parâmetros de validação de método	57
Tabela 6 - Comparação de vários métodos para determinação de MePa	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BDD	eletrodo de diamante dopado com boro	MePa	metilparabeno
BePa	benzilparabeno	MIPs	polímeros molecularmente impressos
BuPa	butilparabeno	MWCN	nanotubo de carbono de paredes múltiplas
BR	Britton-Robinson	PBS	tampão fosfato salino
DAD	detector de arranjo de diodos	PPCPs	Pharmaceuticals and Personal Care Products
EtPa	etilparabeno	PrPa	propilparabeno
FE	fase estacionária	PTFE	politetrafluoretileno
FM	fase móvel	RC	celulose reconstituída
GL	graus de liberdade	RP	fase reversa
GMEME	Grupo de Materiais Eletroquímicos e Métodos Eletroanalíticos	RSD	desvio padrão relativo
GPES	General Purpose Electrochemical System	SD	desvio padrão
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	SEM	microscopia de varredura eletrônica
IQSC	Instituto de Química de São Carlos	SPE	extração em fase sólida
I _p	corrente de pico	SWV	voltametria de onda quadrada
LD	limite de detecção	t _R	tempo de retenção
LLE	extração líquido-líquido	UV	ultravioleta
LQ	limite de quantificação		

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	3
LISTA DE TABELAS	5
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	6
1 INTRODUÇÃO	7
2 PARABENOS	8
2.1 Metilparabeno	11
2.2 Toxicidade	12
3 TÉCNICAS ANALÍTICAS DE DETECÇÃO DE MEPA	13
3.1 Técnica Cromatográfica	13
3.2 Técnica Eletroquímica	14
3.2.1 Voltametria de Onda Quadrada.....	15
3.2.2 Eletrodo de Diamante Dopado com Boro (BDD).....	16
4 VALIDAÇÃO UTILIZADA PARA COMPARAÇÃO	17
5 OBJETIVOS	20
5.1 Geral	20
5.2 Específicos	20
6 MATERIAIS E MÉTODOS	21
6.1 Reagentes	21
6.2 Instrumentação e Materiais	22
6.2.1 Análise HPLC – UV.....	22
6.2.2 Análise Eletroanalítica.....	23
6.3 Procedimento Analítico	24
6.3.1 Cromatográfico.....	24
6.3.2 Eletroquímico.....	25
6.4 Preparo das Amostras na Análise Cromatográfica	25
6.5 Preparo das Amostras na Análise Eletroanalítica	26
6.6 Validação dos Métodos	27
6.6.1 Seletividade.....	27
6.6.2 Sensibilidade, Linearidade e Faixa de Trabalho.....	27
6.6.3 Precisão.....	28

6.6.4 Exatidão e Recuperação	29
6.6.5 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)	30
6.7 Estudo do Efeito de Matriz	36
6.8 Análise Estatística	36
7 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
7.1 Análise Cromatográfica.....	38
7.1.1 Quantificação de MePa em Amostras Reais	39
7.1.2 Validação.....	41
7.1.3 Efeito de Matriz.....	44
7.2 Análise Eletroanalítica	45
7.2.1 Comportamento Eletroquímico do BDD.....	45
7.2.2 Eficiência do Procedimento de Limpeza.....	46
7.2.3 Influência do pH no Processo de Oxidação do MePa	47
7.2.4 Otimização dos Parâmetros da SWV	49
7.2.5a <i>Efeito da Concentração do MePa na Resposta da SWV</i>	52
7.2.5b <i>Quantificação de MePa em Amostras Reais</i>	54
7.2.6 Efeito de Matriz.....	58
7.3 Comparação Estatística.....	59
8 CONCLUSÃO.....	62
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	64

1 INTRODUÇÃO

Quando o assunto é beleza uma gama de fatores circunda este tema. Inúmeros procedimentos, técnicas e produtos estão no mercado a fim de trazer para o ser humano em geral um toque a mais nas suas características físicas, proporcionando mudanças radicais em sua aparência. Não obstante, o uso excessivo de produtos de cuidados pessoais (PPCPs – *Pharmaceuticals and Personal Care Products*) vem causando polêmica no âmbito clínico acadêmico, por possuírem compostos eficazes em suas funções, porém prejudiciais à saúde de todos que são expostos a essa classe de contaminantes emergentes.

Esses produtos são utilizados diariamente em grandes quantidades e descartados no ambiente aquático sob diversas formas. Estudos realizados indicam que muitos são ambientalmente persistentes, bioativos e possuem o potencial para bioacumulação (PECK, 2006; MACKAY; BARNTHOUSE, 2010). Devido à sua estabilidade, estes contaminantes emergentes permanecem no ambiente por longo período, sendo prejudiciais à saúde humana, pois penetram na pele e se depositam nas glândulas, indo para a corrente sanguínea e alterando os níveis de estrogênio (DARBRE, 2003).

Dentre os PPCPs mais utilizados estão os parabenos, família de ésteres sintéticos do ácido p-hidroxibenzóico comumente usados como conservantes em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos e protegendo-os de ataques microbianos e fúngicos. Tradicionalmente, os parabenos são considerados compostos de baixa toxicidade, porém estudos revelam que alguns deles exibem efeito de interferência endócrina, levando a um crescimento potencial na incidência do câncer de mama feminino ou ao desenvolvimento de melanoma maligno, entre outros efeitos. Esses riscos são agravados devido à facilidade da sua absorção na pele humana sem a degradação pelas enzimas esterases (ROUTLEDGE, et al., 1998; GOLDEN; GANDY; VOLLMER, 2005; DARBRE; HARVEY, 2008).

Técnicas cromatográficas têm sido aplicadas para determinação de parabenos em diversas matrizes (CANOSA et al., 2007; PIETROGRANDE; BASAGLIA, 2007; SARAJI; MIRMAHDIEH, 2009). Dentre elas, a mais comumente utilizada é a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*) (LEE; PEART; SVOBODA, 2005; REBBECK et al., 2006; NUÑEZ et al., 2008). Contudo, esta técnica analítica

requer etapas de *clean-up* e pré-extração do analito, além de demandar uso excessivo de solventes orgânicos de custo elevado e tempo considerável para as análises.

Em contrapartida, os métodos eletroquímicos oferecem vantagens de usar uma técnica mais simples e com alta sensibilidade. Sua principal desvantagem está na utilização de eletrodos inertes, usualmente de metais nobres como platina ou ouro, ambos suscetíveis ao bloqueio da superfície pela adsorção de moléculas orgânicas, presentes em amostras ambientais (RADOVAN et al., 2008; SOUZA et al., 2008). Esta característica indesejável pode ser minimizada através do uso de eletrodos com superfície modificada, um campo de pesquisa que vem crescendo em eletroanálises. Tais superfícies são pouco suscetíveis à adsorção de compostos orgânicos.

Dada à ação nociva destas moléculas orgânicas, torna-se necessário o seu monitoramento constante em produtos medicinais e no meio ambiente. Para isto, técnicas analíticas específicas devem ser desenvolvidas. Neste contexto, este trabalho apresenta resultados da detecção do contaminante emergente MePa pelas técnicas voltamétrica de onda quadrada e cromatográfica em duas matrizes distintas, amostra de água natural superficial e amostra de cosmético. Os resultados eletroquímicos foram validados em relação àqueles obtidos por HPLC, através da técnica estatística de comparação por regressão linear.

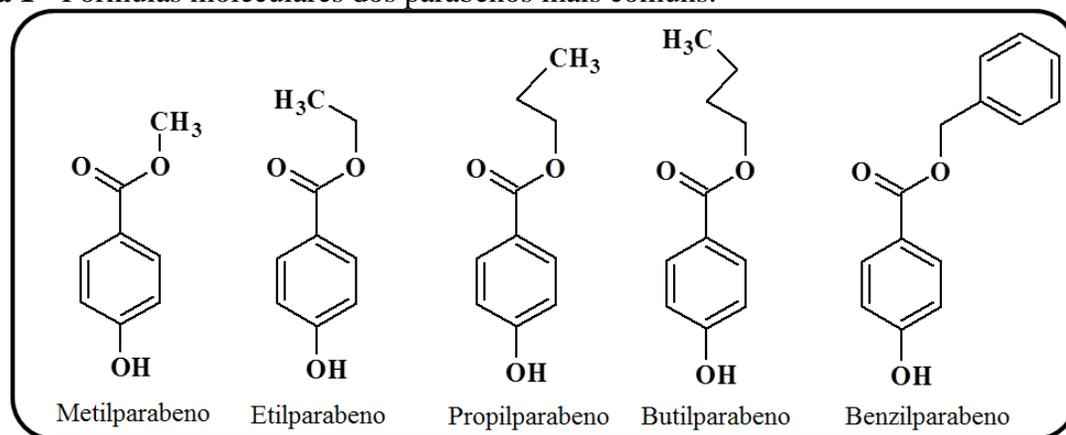
2 PARABENOS

Devido a suas propriedades antimicrobiana e antifúngica, os parabenos são uma classe de compostos que tem sido usado extensivamente por aproximadamente 100 anos. Sua primeira utilização, em meados de 1920, foi como conservante em produtos farmacêuticos não demorando a expandir-se este uso para alimentos e cosméticos (SONI; CARABIN; BURDOCK, 2005; ANDERSEN, 2008; GUO et al., 2010; GUO; KANNAN, 2013). Já em 1987, mais de 7 toneladas de parabenos eram utilizadas em PPCPs (SONI; CARABIN; BURDOCK, 2005) e o crescimento desse número tem sido constante ao longo dos últimos 20 anos (BRAUSCH; RAND, 2011). A sua popularidade é devido a suas inúmeras vantagens quando comparadas a alternativas de conservação. São compostos de baixo custo que apresentam amplo espectro de atividade contra leveduras, fungos e bactérias, possuem estabilidade química e térmica, permitindo sua aplicação em uma extensa faixa de pH (de 4,5 a 7,5) e em produtos que são submetidos a processo de

autoclave. Adicionalmente, apresentam suficiente solubilidade em água (permitindo obter concentrações efetivas), sem odor e gosto perceptíveis e não causam mudanças na consistência ou na coloração dos produtos (SONI; CARABIN; BURDOCK, 2005; ERIKSSON; ANDERSEN; LEDIN, 2008; BŁĘDZKA; GROMADZIŃSKA; WAŚOWICZ, 2014).

Parabenos ou p-hidroxibenzoatos são ésteres do ácido p-hidroxibenzóico. Essa classe de compostos possui a mesma estrutura química com um anel benzênico, um grupo hidroxila e um grupo éster na posição para do anel aromático, diferenciados apenas pelo tamanho da cadeia alquílica. Os parabenos incluem metilparabeno (MePa), etilparabeno (EtPa), propilparabeno (PrPa), butilparabeno (BuPa) e benzilparabeno (BePa) (Figura 1) e são frequentemente encontrados em combinação de duas ou mais substâncias em quase todos os tipos de cosméticos (maquiagens, desodorantes, géis, cremes ou loções para a pele).

Figura 1 - Fórmulas moleculares dos parabenos mais comuns.



Fonte: Autoria própria.

O processo de produção sintética dos parabenos é realizado pela esterificação do ácido p-hidroxibenzóico com um álcool correspondente e na presença de um ácido catalisador, como ácido sulfúrico. O ácido é neutralizado com soda cáustica e o seu produto é cristalizado por resfriamento, obtendo um sólido que posteriormente é centrifugado, lavado, seco e triturado (ANDERSEN, 2008; BŁĘDZKA; GROMADZIŃSKA; WAŚOWICZ, 2014).

Todavia, os parabenos podem ser produzidos naturalmente por certos organismos, tais como bactérias e plantas. Um estudo relatou que a bactéria marinha do gênero *Microbulbifer* é capaz de biossintetizar o ácido p-hidroxibenzóico e seus ésteres alquílicos, produzindo quantias

elevadas desses compostos: 10 mgL⁻¹ do ácido, juntamente com seu butil (24 mgL⁻¹), heptil (0,4 mgL⁻¹) e nonil (6 mgL⁻¹) éster. Os ésteres alquílicos do ácido p-hidroxibenzóico produzidos pela bactéria são eficientes contra fungos, leveduras e bactérias gram-positivas (PENG et al., 2006). Também foram detectadas concentrações a nível de traços (0,8 µgg⁻¹) de MePa em ervas *Andrographis paniculata*, sendo desconhecida sua origem no tecido da planta (LI et al., 2003; BŁĘDZKA; GROMADZIŃSKA; WĄSOWICZ, 2014).

Na Europa, parabenos são encontrados em produtos que possuem baixos volumes de produção, sendo a maioria produzidos na China ou Índia e importados (HAMAN et al., 2015). No início de 2000, a produção e a subsequente importação de parabenos pela União Européia variou entre 10 e 1000 t por ano (ERIKSSON; ANDERSEN; LEDIN, 2008). Depois da água, os parabenos são considerados os ingredientes mais comuns na composição de cosméticos (CASHMAN; WARSHAW, 2005; JANJUA et al., 2007), estando presente em aproximadamente 80% de PPCPs (POUILLOT; POLLA; POLLA, 2006). Contudo, em uma pesquisa realizada pelo mercado dinamarquês somente 36% dos 751 produtos estudados continham parabenos (BŁĘDZKA GROMADZIŃSKA; WĄSOWICZ, 2014). Em um estudo realizado na Noruega foram encontrados parabenos em 32% de 117 PPCPs destinado a crianças (ERIKSSON; ANDERSEN; LEDIN, 2008).

Devido à polêmica de serem carcinogênicos e de a atividade estrogênica ter sido revelada por estudos (DARBRE, 2003; DARBRE et al, 2004; DARBRE; HARVEY, 2008), alguns produtos já não utilizam os parabenos em sua composição, sendo trocados por outros compostos tão eficientes quanto eles. Esses produtos são chamados de “*paraben free*”. Contudo, esses compostos ainda são utilizados em muitos PPCPs na sua composição e o seu descarte diário prejudica também o meio ambiente. Estudos comprovam a presença de parabenos em ambientes aquáticos, bem como em águas residuais urbanas, com valores acima de 30 µgL⁻¹ e 20 µgL⁻¹, de MePa e PrPa, respectivamente (HAMAN et al., 2015). Concentrações menores têm sido encontradas em água superficial com concentrações na faixa de 15 a 400 ngL⁻¹ dependendo do parabeno, enquanto que em estudos realizados com efluentes foram obtidas concentrações ainda menores, na faixa de 50 a 85 ngL⁻¹ (BENIJTS; LAMBERT; DE LEENHEER, 2004; LEE; PEART; SVOBODA, 2005; GREGORY; MARK, 2006; KASPRZYK-HORDERN; DINSDALE; GUWY, 2008; JONKERS et al., 2010).

2.1 Metilparabeno

Considerado o menos tóxico dos parabenos, metilparabeno (MePa) é o que possui menor cadeia alquílica e por isso é mais facilmente solúvel em água. Juntamente com o propilparabeno (PrPa) são os mais utilizados em cosméticos, normalmente sendo coaplicados para aumentar o poder de conservação nos produtos (PECK, 2006). A Tabela 1 mostra as principais características físicas e químicas do MePa.

Tabela 1 - Características físicas e químicas do MePa

Propriedades	Valores
Massa Molecular (gmol^{-1})	152,15
Pressão de vapor à 25 °C (Pa)	0,114
Solubilidade em água à 25 °C (mgL^{-1})	2500
Ponto de fusão (°C)	131
Ponto de ebulição (°C)	275
Log do coeficiente de partição octanol-água ($\log K_{ow}$)	1,96
Log da constante ácida de dissociação (pK_a)	8,17

Fonte: BŁĘDZKA; GROMADZIŃSKA; WAŚOWICZ, 2014, p. 28 e HAMAN et al., 2015, p. 4.

MePa possui caráter hidrofóbico ($\log K_{ow}$ 1,96), se comparado a outras interações, sendo mais solúvel em solventes apolares. Estando o MePa em uma amostra de água que contenha suspensões sólidas e sedimentos, pode ocorrer maior afinidade com estas suspensões dependendo do teor de matéria orgânica presente na matéria sólida (HAMAN et al., 2015). Em soluções ácidas o MePa é estável, entretanto em soluções fortemente alcalinas ele se hidrolisa no seu ácido carboxílico correspondente. Segundo Madsen et al., 2001, sob condições anaeróbicas o MePa atinge o maior grau de biodegradabilidade comparado com os outros parabenos. Estudos relatam que o MePa também pode sofrer biodegradação sob condições aeróbicas (MADSEN et al., 2001; PETERSEN; RASMUSSEN; GUSTAVSON, 2007; LEAL et al., 2010).

Devido ao seu constante uso e descarte, o MePa tem sido detectado em aproximadamente

100% das mais variadas amostras ambientais analisadas. Haman et al. (2015) relatam que a presença de MePa em águas de rio é 9% maior que o segundo parabeno mais utilizado nas composições cosméticas, o PrPa. Em outros estudos, MePa foi detectado em concentrações de 476 ngg^{-1} também em sedimentos (CARMONA; ANDREU; PICÓ, 2014), em água de torneira na Espanha de 17 e 40 ngL^{-1} (BLANCO et al., 2009; FERREIRA; MÖDER; LAESPADA, 2011) e em água marinha do noroeste de Portugal, na faixa de 2,1 a 51 ngL^{-1} (JONKERS et al., 2010). Ademais, tem sido relatada a presença de MePa em amostras de urina, leite e soro do leite obtidos de mulheres no período de amamentação (HINESA et al., 2014).

2.2 Toxicidade

Os parabenos possuem a característica de serem perturbadores endócrinos, bioacumuláveis, comumente conhecidos como contaminantes emergentes, trazendo sérios riscos para saúde humana. Ademais, sua contribuição potencial para a incidência do câncer de mama tem ganhado destaque, visto que foram detectadas ínfimas concentrações de parabenos em tumores de mama (ROUTLEDGE et al., 1998; OISHI, 2002; DARBRE, 2003; DARBRE et al., 2004; GOLDEN; GANDY; VOLLMER, 2005; DARBRE; HARVEY, 2008). Eles possuem ações biológicas múltiplas, mas é comumente relatado que seus efeitos inibitórios sobre transporte através das membranas celulares e processos de função mitocondrial são a chave para suas ações (SONI; CARABIN; BURDOCK, 2005).

As substâncias desreguladoras imitam, bloqueiam ou provocam colapso dos hormônios essencialmente esteróides, ocasionando o efeito de interferência endócrina e acarretando em um sinal irregular do organismo (LINTELMANN et al., 2003; NOGUEIRA, 2003; GHISELLI; JARDIM, 2007).

Segundo Darbre (2003), a relação entre o câncer de mama e os parabenos pode ser originada pela utilização de desodorantes antitranspirantes que, além de inibirem glândulas sudoríparas, inibem também as mamas, resultando na geração de cistos mamários. A carcinogênese mamária pode resultar de uma combinação de constituintes químicos, danificando primeiramente o DNA e então promovendo o crescimento das células danificadas. Esses cosméticos são facilmente absorvidos por serem aplicados em áreas adjacentes à mama.

Dos sete diferentes tipos de parabenos que atualmente são utilizados como conservantes, o benzilparabeno (BePa) aparece como o mais tóxico devido à sua cadeia alquílica. Além de serem prejudiciais à saúde humana, existe também um potencial efeito sobre organismos aquáticos que são continuamente expostos a esses compostos. Dobbins et al. (2009), afirma que BePa e o BuPa são os parabenos mais tóxicos para organismos invertebrados e peixes; podendo causar leve resposta estrogênica nesses organismos.

Desta forma, a fim de diminuir o perigo destes compostos à saúde humana, o uso de parabenos nas composições de produtos é regulado em diversos países. Na Europa, é regulado pelo Cosmetic Directive 76/768/EEC, e no Brasil, pela ANVISA (RDC n° 29, de 01/06/2012), que determina uma concentração máxima permitida de 0,4% (g/g) no produto final para um éster e de 0,8% (g/g) para mistura de ésteres.

3 TÉCNICAS ANALÍTICAS DE DETECÇÃO DE MEPA

O número de estudos relacionados com a detecção de parabenos tem crescido nos últimos 20 anos, onde a determinação cromatográfica combinada aos diversos métodos de extração (extração ultrassônica assistida, extração com fluido supercrítico, extração com líquido pressurizado, extração utilizando barra de agitação sortiva, extração em fase sólida, microextração em fase sólida, etc.) tem ganhado destaque (PIAO; CHEN; WANG, 2014).

No Instituto de Química de São Carlos (IQSC), métodos para a quantificação e degradação de parabenos em diferentes matrizes têm sido estudados e analisados. Tendo em vista a desregulação endócrina dos parabenos, estudos têm sido desenvolvidos para análise desses contaminantes em tecido de peixes, utilizando a técnica cromatográfica líquida (HPLC-DAD) (RIBEIRO, 2014). Steter et al. (2014) aplicaram processos eletroquímicos ao MePa, com objetivo de mineralizá-lo, empregando um anodo de diamante dopado com boro acoplado ou não à sonólise.

3.1 Técnica Cromatográfica

A técnica cromatográfica é dotada de uma fase móvel (FM) constituída por um líquido e

uma fase estacionária (FE) por onde o líquido passa, possibilitando a separação dos componentes da mistura analisada, através da interação entre ambas as fases. Essa interação ocorre pela afinidade do analito alvo com a FM. Como FE, são utilizadas colunas cromatográficas com revestimento externo metálico, as quais permitem o uso de bombas de alta pressão que por sua vez favorecem uma eficiência elevada na separação. A FM arrasta os componentes da amostra através do sistema cromatográfico e participa do processo de separação. Suas características físico-químicas incluem: apresentar alto grau de pureza; dissolver a amostra sem decompor seus componentes e ser compatível com o tipo de detector utilizado. Na prática, geralmente é utilizada água ultrapura associada ao solvente orgânico metanol ou acetonitrila. É uma técnica que possibilita automação, tempo de análise razoavelmente reduzido, excelente análise qualitativa, porém possui um alto custo (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

O sinal analítico da separação cromatográfica ocorre mediante o registro contínuo de alguma propriedade física ou química da amostra, caracterizando a detecção do analito de interesse. O sinal gerado no detector assim que o efluente sai da coluna é diretamente proporcional à concentração do componente na amostra. Em cromatografia líquida, o detector por absorvância no ultravioleta e no visível é o mais difundido. Usualmente denominado detector UV, baseia-se na quantidade de luz absorvida pela amostra ao ser submetida a uma fonte de radiação eletromagnética, numa faixa de comprimentos de onda que se estende desde o ultravioleta até o infravermelho próximo (300 a 1000 nm) (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006). Esta técnica analítica demanda métodos prévios de pré-extração do analito como, por exemplo, a extração em fase sólida (SPE) e a extração líquido-líquido (LLE).

3.2 Técnica Eletroquímica

Os métodos eletroanalíticos (voltametria cíclica, cronoamperometria, voltametria de pulso diferencial, voltametria de onda quadrada, etc.) oferecem algumas vantagens sobre o cromatográfico, como não requerer extensivo preparo de amostra e possuir curto tempo de resposta, fornecendo alta sensibilidade, simplicidade e seletividade (RADOVAN et al., 2008; SOUZA et al., 2008), sendo conduzidos em equipamentos considerados de baixo custo e portáteis. Além disto, a possibilidade de miniaturização inerente dos equipamentos utilizados

nestas técnicas torna os métodos eletroquímicos próprios para o monitoramento de poluentes no campo (*in situ*) e em tempo real.

3.2.1 Voltametria de Onda Quadrada

A voltametria de onda quadrada é uma técnica eletroquímica onde a corrente que circula num eletrodo de trabalho é monitorada em função do potencial aplicado. A forma de aplicação do potencial define o nome da técnica. Nela, uma programação básica de potenciais é aplicada, na forma de escada, onde este é variado por meio de um salto de potencial, ΔE_p , normalmente com valor entre 1 e 10 mV, que é mantido por um certo tempo, τ , e pela repetição deste procedimento, desde o potencial inicial até o potencial final da varredura. Sobre cada degrau de potencial acima, é aplicado um pulso de potencial (de até 50 mV) no sentido da varredura (*forward*) por metade do tempo do pulso anterior e outro em sentido contrário (*backward*) também por metade do tempo do degrau. O valor destes pulsos de potenciais é conhecido como amplitude (a). A corrente é coletada no final destes pulsos *forward* e *backward*, fornecendo valores de corrente direta e inversa. Se o processo que ocorre no eletrodo for reversível, ambas correntes contribuem para a corrente total, que é a soma dos módulos das contribuições direta e inversa. Se o processo for irreversível, apenas a contribuição direta fornece valores de corrente. Estas correntes são proporcionais à concentração do analito em solução.

A técnica eletroquímica de onda quadrada possui alta sensibilidade comparada a outras técnicas eletroquímicas. O crescimento das taxas de varredura alcançado mediante a aplicação de pulsos de alta frequência permite obter valores de limites de detecção baixos que, em alguns casos especiais, são ainda comparáveis aos obtidos por técnicas cromatográfica e espectroscópica. Além disso, a análise dos parâmetros característicos desta técnica também possibilita a avaliação cinética e mecanística do processo eletródico em estudo (SOUZA et al., 2003).

A combinação de voltametria de onda quadrada e diversos eletrodos, bem como o de carbono vítreo e sensores, tal como MIPs, tem sido utilizada na detecção de compostos orgânicos, obtendo resultados satisfatórios se comparado às técnicas padrão de detecção (WANG et al., 2010; ŁUKASIEWICZ; TARASIEWICZ; NIEDZIELKO, 2011). Portanto, a seleção de um

eletrodo de trabalho compatível com a técnica eletroquímica utilizada e com o tipo de molécula a ser detectada é um fator decisivo. Neste caso, para determinação de moléculas orgânicas, tais como o MePa, o eletrodo de diamante dopado com boro (BDD) vêm se destacando como dispositivo de análise promissor.

3.2.2 Eletrodo de Diamante Dopado com Boro (BDD)

Diamante é uma forma alotrópica do carbono que possui elevada resistência e dureza, porém com nenhuma característica condutora eletrônica que o habilite para ser utilizado como eletrodo. A sua fabricação sintética e a incorporação de boro na sua composição transformaram este isolante em um material semicondutor (BUNDY, 1962).

A fabricação do eletrodo de diamante é dada por diferentes métodos e sua dopagem com boro geralmente é proveniente do gás trimetil-boro, numa concentração que varia entre 10 e 20000 mgL⁻¹, fornecendo ao material as características de um semicondutor ou de um semimetal, dependendo da concentração de dopante utilizada (BANDA, 2006). Os primeiros estudos utilizando este dispositivo foram realizados em 1993, quando descreveram a sua adequação em eletrossíntese (TENNE et al., 1993), eletroanálise (SWAIN; RAMESHAM, 1993) e em tratamento eletroquímico de resíduos (RAMESHAM et al., 1993). Ao longo dos anos tornou-se reconhecido devido a suas propriedades eletrônica, mecânica e química.

O BDD possui alta estabilidade devido à sua inércia em relação à adsorção de espécies químicas e facilidade na limpeza da superfície em comparação ao eletrodo de carbono vítreo. Comparado aos clássicos eletrodos de carbono e outros eletrodos de sólidos metálicos, eletrodos de diamante podem trabalhar em potenciais anódicos extremos, o que amplia a sua utilização em várias aplicações (DOGAN et al., 2007; SHEN et al., 2007; MASHAYEKHI; GHANDFOROUGH-SATTARI; HAIN, 2008; RADOVAN et al., 2008; SOUZA et al., 2008; LOURENÇÃO et al., 2009; MARTINS et al., 2011). Desde a sua invenção, o BDD tem sido utilizado em diversas áreas de estudo, em combinação com outras técnicas de análise como análise de injeção de fluxo (FIA) (JOLLEY et al., 1997) e voltametria cíclica utilizando microeletrodos (COOPER et al., 1998). Cinco anos depois utilizado em eletroforese de zona (CZE) (CVACKA et al., 2003; SHIN et al., 2003). Em estudo realizado por Martins et al. (2011)

foi possível analisar parabenos em amostra de *shampoo* utilizando o BDD acoplado à cromatografia líquida de alta eficiência. Motheo et al. (2014) utilizou o BDD para realizar a oxidação eletroquímica galvanostática do MePa, resultando na mineralização total de 100 mgL^{-1} de MePa em solução aquosa de $0,05 \text{ molL}^{-1} \text{ K}_2\text{SO}_4$ após 300 minutos de eletrólise.

A eficiência do BDD na detecção de paracetamol, penicilina, pesticidas e fungicida, utilizando a voltametria de onda quadrada como técnica eletroanalítica também têm sido reportada por alguns estudos (CODOGNOTO et al., 2004, 2006; ŠVORCA et al., 2012; DORNELLAS et al., 2013). Desta forma, é possível observar que o BDD tem sido extensamente utilizado em diferentes técnicas eletroanalíticas, especialmente associado à voltametria de onda quadrada.

No Grupo de Materiais Eletroquímicos e Métodos Eletroanalíticos (GMEME), o eletrodo dopado com boro vem sendo estudado e aplicado em diferentes processos eletródicos desde os anos 1990. Assim, Avaca et al. (2006) estudaram a eletro-oxidação de metanol e etanol usando um compósito de Pt-RuO₂ fixado no BDD. Ademais, estudos foram realizados e métodos desenvolvidos para determinação de lidocaína em produtos farmacêuticos, N-nitrosaminas em soluções aquosas e de carbaril em água natural, utilizando o eletrodo BDD como eletrodo de trabalho (CODOGNOTO et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2007, 2008).

4 VALIDAÇÃO UTILIZADA PARA COMPARAÇÃO

A validação de um método analítico pode ser realizada sob diversas formas, utilizando uma série de materiais e procedimentos padrão. Qualquer comparação entre duas metodologias analíticas tem como objetivo avaliar os erros sistemáticos e aleatórios, mostrando se os resultados obtidos são significativamente maiores ou menores que o procedimento padrão. Ademais, os procedimentos de pré-tratamento de amostra e de operação são fatores importantes ao se comparar duas técnicas analíticas (MILLER; MILLER, 2005).

Uma das formas mais comuns de se validar um método experimental é a comparação dos resultados obtidos com aqueles providos por um procedimento analítico padrão, adotado pela agência de controle. Entretanto, esta comparação, muitas vezes, não é óbvia. Como comparar resultados obtidos por técnicas diferentes, como por exemplo, voltametria de onda quadrada e

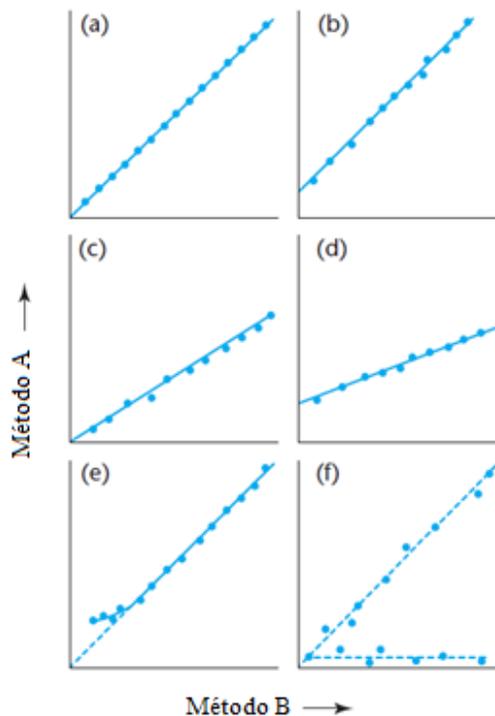
cromatografia? Muitas vezes esta comparação é feita utilizando o rendimento de experimentos de recuperação, como por exemplo, no trabalho de Caetano e Machado (2008) e Moraes et al. (2009). Esta comparação, entretanto, não tem qualquer significado de validação, uma vez que a recuperação é uma das características inerentes das técnicas analíticas, que não interfere na precisão ou exatidão do método.

Segundo Miller e Miller (2005), na análise instrumental, esta comparação pode ser adequadamente conduzida graficando-se os resultados obtidos com ambas as técnicas em amostras contendo diferentes quantidades de analito, por meio das respectivas curvas de calibração. Graficando-se os resultados provenientes da técnica padrão no eixo x e os da nova metodologia no y, espera-se obter uma relação linear. Calcula-se, aplicando métodos estatísticos definidos, o coeficiente linear, a tangente e o coeficiente de correlação desta reta obtida. Se ambas as análises conduzirem aos mesmos resultados, nas diferentes concentrações analisadas, então o coeficiente linear deverá ser zero, a tangente e o coeficiente de correlação deverão ser 1 (Figura 2a). Na prática, isto raramente ocorre. Mesmo se não houver qualquer erro sistemático, os erros aleatórios inevitáveis asseguram que ambos os procedimentos analíticos nunca apresentem exatamente os mesmos valores, para todas as amostras.

Desvios da situação “ideal” ($a = 0$, $b = r = 1$) podem ocorrer por uma série de situações diferentes. Em primeiro lugar, pode-se obter uma reta de regressão que tenha tangente 1, porém não passa pela origem (0,0) (Figura 2b). Isto é, um método de análise pode resultar em resultados maiores ou menores que o outro, por um valor fixo. Tal erro pode ocorrer se, por exemplo, a linha de base (ou o sinal de fundo, ou o ruído) de um método não for avaliada corretamente. Este é um problema muito comum em medidas eletroquímicas devido às correntes capacitivas.

Uma segunda possibilidade é que a tangente da reta de regressão seja significativamente diferente de 1, o que indica a existência de um erro sistemático na tangente de uma das curvas de calibração individual (Figura 2c). Além disto, estes dois erros podem ocorrer simultaneamente (Figura 2d). Contudo, ainda podem ocorrer outros erros como mostrado nas Figuras 2e e 2f.

Figura 2 - Regressão linear para comparação de duas metodologias analíticas: (a) mostra perfeita concordância entre as duas metodologias para todas as amostras; (b)-(f) ilustra os resultados de vários tipos de erro sistemáticos.



Fonte: MILLER; MILLER, 2005.

Para se avaliar se os valores de intercepto e tangente obtidos diferem significativamente de 0 e 1, respectivamente deve-se realizar testes estatísticos de significância com um nível de confiança de, por exemplo, 95%. O teste t pareado de Student é utilizado como uma ferramenta para realizar a comparação entre os dados obtidos por ambas as técnicas e provar se estes são análogos ou não. O teste é realizado a partir do cálculo do desvio padrão dos valores das concentrações detectadas para cada técnica e o resultado obtido deve ser comparado com os valores críticos tabelados a determinado grau de liberdade ($GL = n - 1$, $\alpha = 0,05$).

5 OBJETIVOS

5.1 Geral

Comparação dos resultados obtidos pelas técnicas cromatográfica líquida de alta eficiência e a eletroanalítica de voltametria de onda quadrada, por meio de uma metodologia estatística clássica para a determinação da exatidão.

5.2 Específicos

- ✓ Avaliar a melhor fase móvel e suas respectivas proporções, o fluxo e o volume de injeção nas análises cromatográficas para determinação de MePa.
- ✓ Avaliar o eletrodo de diamante dopado com boro (BDD) para detecção do MePa preparado em etanol e na solução mista de acetonitrila e tampão PBS (50:50, v/v).
- ✓ Avaliar o comportamento da técnica de voltametria de onda quadrada diante do interferente endócrino MePa.
- ✓ Selecionar eletrólito, o pH ótimo e os parâmetros da técnica de voltametria de onda quadrada que obtém maior resposta de corrente.
- ✓ Desenvolver e validar o método em cromatografia líquida com detector UV e em eletroanalítica para determinação de MePa, através dos parâmetros: seletividade, sensibilidade, linearidade, faixa de trabalho, precisão, exatidão, recuperação, limite de detecção e limite de quantificação.
- ✓ Realizar estudo de interferentes em amostras reais por ambas metodologias.
- ✓ Avaliar o efeito de matriz das amostras analisadas referente à curva padrão analítica de MePa.
- ✓ Comparar por meio do método estatístico de regressão linear proposto os resultados da detecção de MePa obtidos por ambas as técnicas nas amostras de água natural superficial e de cosmético, em uma mesma faixa de trabalho.

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Reagentes

Metilparabeno foi obtido da Sigma/Aldrich (99,0% de pureza). A detecção de MePa usando o eletrodo BDD modificado com óxidos de Pt-Ru foi avaliado em etanol e na solução mista de acetonitrila e tampão PBS (NaH_2PO_4 e Na_2HPO_4 , pH 7,5, $0,1 \text{ molL}^{-1}$) (50:50, v/v). Soluções estoque de MePa (1000 mgL^{-1}) foram preparadas em etanol, em acetonitrila:PBS (50:50, v/v) e em metanol, e estocadas em refrigerador a $4 \text{ }^\circ\text{C}$, sendo esta última solução estoque utilizada nas análises cromatográficas. Tampão PBS em diferentes valores de pH (6,0 – 7,8) foram testados durante os testes eletroquímicos para a seleção do pH ótimo e posteriormente realizada uma comparação com o tampão Britton-Robinson (BR), sob as mesmas condições (pH 7,5, $0,1 \text{ molL}^{-1}$) em três níveis diferentes de concentrações de MePa (5,1, 6,4 e $8,7 \text{ mgL}^{-1}$). As soluções padrão de trabalho para análise eletroanalítica foram preparadas através da diluição da solução estoque com tampão PBS, pH 7,5 ($0,1 \text{ molL}^{-1}$). Na análise cromatográfica as soluções padrão de trabalho foram preparadas a partir da diluição da solução estoque com metanol:água-ácido acético (1%) (65:35, v/v). As soluções de trabalho foram preparadas nas concentrações de 0,5, 0,75, 1,0, 5,0, 10, 15, 20, 25 e 30 mgL^{-1} .

Uma solução contendo $0,1 \text{ molL}^{-1}$ $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ e $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, foi preparada para a realização do teste de impedância. Os reagentes utilizados foram de grau analítico e o solvente orgânico metanol de grau HPLC foi obtido da J.T. Baker e Panreac. Todos os solventes utilizados na análise cromatográfica foram filtrados por uma membrana de filtro, com porosidade igual a $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ (Celulose Reconstituída = RC - Unifil). Todas as soluções foram preparadas com água deionizada do sistema Termo Scientific/ Barnstead Nanopure e os reagentes PA da Sigma/Aldrich, usados sem qualquer purificação adicional.

Na Tabela 2 estão os reagentes utilizados e suas respectivas pureza e procedência.

Tabela 2 - Procedência e pureza dos reagentes utilizados

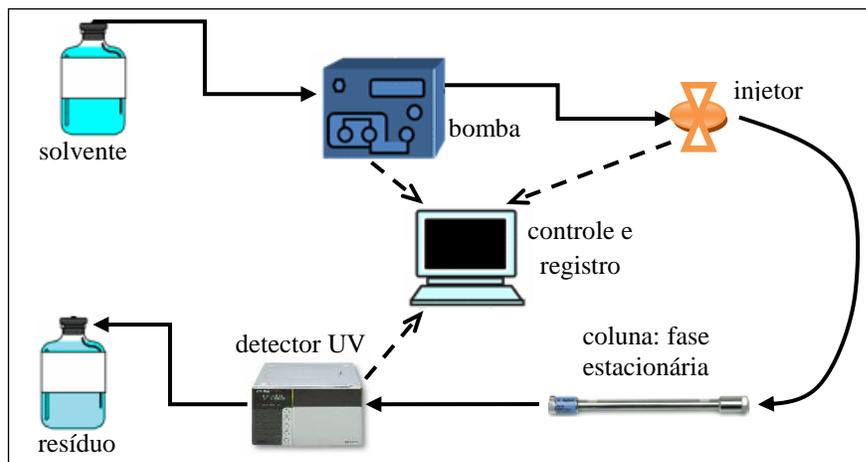
Reagente	Fórmula Química	Fabricante	Pureza (%)
Metilparabeno	$C_8H_8O_3$	Sigma/Aldrich	99
Etanol	C_2H_6O	Synth	99,5
Acetonitrila	C_2H_3N	Vetec	99,8
Fosfato Monossódico	NaH_2PO_4	Sigma/Aldrich	99,0
Fosfato Dissódico	Na_2HPO_4	Sigma/ Aldrich	99,0
Ácido acético	$C_2H_4O_2$	Synth	99,7
Ácido fosfórico	H_3PO_4	Mallinckrodt	99,0
Ácido bórico	H_3BO_3	Sigma/ Aldrich	99,5
Metanol	CH_4O	J.T. Baker/ Panreac	100/ 99,9
Ferrocianeto de Potássio	$K_4[Fe(CN)_6]$	Mallinckrodt	100,5
Ferricianeto de Potássio	$K_3[Fe(CN)_6]$	J.T. Baker	99,4

6.2 Instrumentação e Materiais

6.2.1 Análise HPLC – UV

Todas as medidas foram realizadas utilizando o cromatógrafo Shimadzu série LC-10 com injetor manual, equipado com coluna de fase reversa C18 (25 cm x 4,6 mm ID x 5 μ m de partícula) da Sigma/Aldrich (Ascentis[®] Supelco), pré coluna C18 (2 cm x 4 mm ID x 5 μ m de partícula) da Sigma/Aldrich (Ascentis[®] Supelco) e detector UV (modelo SPD – 10AV) com leitura na região do comprimento de onda 254 nm (NÚÑEZ et al, 2010) (Figura 3).

Figura 3 - Representação esquemática e de fluxo de um sistema cromatográfico.



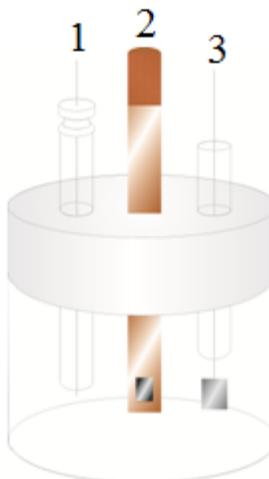
Fonte: Autoria própria.

6.2.2 Análise Eletroanalítica

As medidas eletroanalíticas foram realizadas em um Potenciostato/Galvanostato Autolab[®]/PGSTAT128N (GPES – General Purpose Electrochemical System). Os testes voltamétricos foram realizados em uma célula de vidro de borossilicato de volume 25 mL com uma tampa de PTFE contendo três eletrodos: BDD (8000 mgL⁻¹ de dopagem e modificado com óxidos de Pt-RuO_x como eletrodo de trabalho; Ag/AgCl (3 molL⁻¹ KCl) como eletrodo de referência; e uma lâmina de platina como contra eletrodo (Figura 4). O eletrodo BDD modificado com Pt-RuO_x foi sintetizado em nosso laboratório em estudos anteriores, utilizando o método sol-gel (BANDA, 2006). A Figura 5 mostra a imagem obtida por microscópio eletrônico de varredura (SEM) da superfície do eletrodo de BDD modificado.

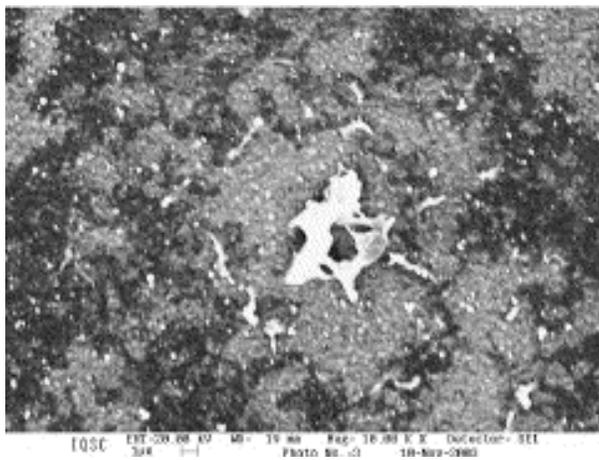
As medidas de pH foram realizadas com pHmetro modelo 8010 (Qualxtron). Todos os experimentos foram realizados a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C).

Figura 4 - Representação esquemática da célula eletroquímica.



1 - eletrodo referência; 2 - eletrodo de trabalho; 3 – eletrodo auxiliar.
Fonte: Autoria própria.

Figura 5 – Imagem obtida pelo SEM da superfície do eletrodo BDD modificado com Pt-RuO_x.



Fonte: SALAZAR-BANDA et al (2006).

6.3 Procedimento Analítico

6.3.1 Cromatográfico

Os seguintes parâmetros cromatográficos foram selecionados para análises: volume de injeção de 20 μ L, sistema de solvente com metanol (A) e água-ácido acético (1%) (B) no modo

isocrático (65% A) durante 10 min, vazão de 1,0 mL/min e os analitos foram monitorados a $\lambda = 254$ nm. Todos os experimentos foram conduzidos em temperatura ambiente, aproximadamente 25 °C (LABAT et al, 2000).

Após a etapa de otimização dos parâmetros da técnica foi obtido uma curva analítica com as concentrações da faixa de trabalho (0,5 a 30 mgL⁻¹), relacionando a área de pico com cada concentração.

6.3.2 Eletroquímico

A fim de obter o melhor desempenho para os experimentos de SWV com o eletrodo BDD, os parâmetros voltamétricos (frequência, amplitude e degrau de potencial) foram otimizados. Como a solubilidade do MePa em água é baixa, as soluções estoque com concentração de MePa de 1000 mgL⁻¹ foram preparadas usando um solvente orgânico. Usando voltametria cíclica a 50 mVs⁻¹, a resposta de 50 mgL⁻¹ de MePa diluído da solução estoque em PBS + acetonitrila ou usando apenas etanol, foi avaliada. Alíquotas da solução estoque foram diluídas em solução PBS pura na célula eletroquímica antes das medidas.

Antes dos experimentos voltamétricos o BDD foi submetido a um pré-tratamento em uma solução de H₂SO₄ 0,5 molL⁻¹ aplicando um potencial anódico (+3,0 V por 10 min.) seguido de potencial catódico (-3,0 V por 10 min.). Previamente a cada varredura voltamétrica, o tratamento catódico (-3,0 V por 10 min.) foi repetido em 0,1 molL⁻¹ de PBS (pH 7,5) para a recuperação da superfície do eletrodo. A eficiência do tratamento catódico entre medidas foi verificada através de experimentos eletroquímicos de impedância faradaica.

A curva analítica de MePa em soluções de laboratório de PBS 0,1 molL⁻¹ (pH 7,5) foi obtida por SWV usando os parâmetros otimizados em uma faixa de concentração de MePa de 0,5 a 30 mgL⁻¹. Pela correlação linear obtida, os limites de detecção e quantificação foram calculados de acordo com um procedimento estatístico discutido por Miller e Miller (2005).

6.4 Preparo das Amostras na Análise Cromatográfica

Na análise cromatográfica as amostras necessitaram de um tratamento rigoroso, sendo

realizado como segue. A amostra de água natural superficial coletada em um riacho da cidade de São Carlos - SP (S 21 59.670 ' / W 047 54.183') foi submetida ao processo de *clean-up*, primeiramente sendo filtrada em um papel de filtro, seguido da filtração com membrana de filtro de 0,45 μm (RC) de porosidade. Com a amostra de cosmético, foi preparada uma solução estoque pesando uma massa equivalente a cerca de 1,5 mgL^{-1} de MePa e dissolvida em metanol em um banho ultrassônico por 15 min até sua completa dissolução, seguido de centrifugação a 3300 rpm durante 1 h e 30 min. O sobrenadante foi filtrado com uma membrana de filtro de porosidade 0,45 μm (RC).

As soluções das amostras purificadas foram preparadas em 9 níveis de concentração (0,5, 0,75, 1,0, 5,0, 10, 15, 20, 25 e 30 mg L^{-1}) para amostra de água natural superficial e em 7 níveis (1,0, 5,0, 10, 15, 20, 25 e 30 mgL^{-1}) para amostra de cosmético, pelo método de adição de padrão. Para amostra de cosmético foram tomadas alíquotas de 1 mL, mais alíquotas adequadas da solução estoque do padrão, seguido de diluição com metanol. O conteúdo nominal de MePa nas amostras foi calculado pela curva analítica obtida para cada amostra.

6.5 Preparo das Amostras na Análise Eletroanalítica

A amostra de água natural superficial foi coletada da mesma região pouco impactada da cidade de São Carlos e submetida apenas a um procedimento de filtração com papel de filtro para remover partículas sólidas presentes. Após a filtração, a amostra de água foi tamponada com a mesma composição de sal (NaH_2PO_4 e Na_2HPO_4) usada para preparar o tampão PBS.

Com a amostra de cosmético, foi preparada uma solução estoque pesando a mesma massa de MePa utilizada na análise cromatográfica (cerca de 1,5 mgL^{-1}) e dissolvida em etanol em um banho ultrassônico por 15 min até sua completa dissolução.

Foram tomadas alíquotas de 1 mL da amostra de cosmético e diluídas com tampão PBS. Para ambas as amostras foram preparadas soluções nos mesmos níveis de concentração utilizados na análise cromatográfica, de 0,5 a 30 mgL^{-1} e de 1,0 a 30 mgL^{-1} , para amostra de água natural superficial e cosmético, respectivamente, tomando alíquotas adequadas de sua respectiva solução estoque. A quantidade necessária da solução foi então transferida para uma célula voltamétrica e voltamogramas SWV foram registrados. O conteúdo nominal de MePa nas amostras foi

determinado a partir da curva analítica correspondente em tampão PBS.

6.6 Validação dos Métodos

Os métodos eletroanalítico e cromatográfico foram validados com base no guia de validação “Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos” (INMETRO, 2011), no livro de Miller e Miller (2005) e no trabalho de Ribeiro et al. (2008). Foram avaliados os parâmetros de validação: seletividade, sensibilidade, linearidade, faixa de trabalho, precisão, exatidão, recuperação, limite de detecção e limite de quantificação.

6.6.1 Seletividade

A seletividade é um parâmetro de análise que demonstra a capacidade do método de identificar e quantificar o analito em amostra reais, na presença de interferentes existentes ou não na matriz. Esse parâmetro foi avaliado através da comparação dos cromatogramas e voltamogramas obtidos a partir da análise do branco das amostras de água natural superficial e de cosmético, com os obtidos para as mesmas amostras fortificadas.

6.6.2 Sensibilidade, Linearidade e Faixa de Trabalho

Os parâmetros de sensibilidade, linearidade e faixa de trabalho foram avaliados para os dois métodos aqui utilizados de forma similar, através da análise do MePa preparado em fase móvel (metanol:água-ácido acético (1%), 65:35, v/v) e etanol/tampão PBS, para as análises cromatográfica e eletroanalítica, respectivamente, em concentrações variando de 0,5 a 30 mgL⁻¹. Após o procedimento de preparo das amostras, estes mesmos parâmetros também foram avaliados em relação às amostras fortificadas, na faixa de concentração de 0,5 a 30 mgL⁻¹ para amostra de água natural superficial e de 1,0 a 30 mgL⁻¹ para amostra de cosmético.

A curva analítica foi determinada a partir da análise da faixa linear de trabalho, com 9 níveis de concentração para amostra de água natural superficial e 7 níveis de concentração para amostra de cosmético, mais o branco para ambas as amostras. A faixa de trabalho para a análise

cromatográfica foi delimitada pela faixa de trabalho obtida na análise eletroanalítica. A linearidade foi verificada por meio da construção dos gráficos que representam a correlação entre a área do pico cromatográfico e a concentração do analito para análise cromatográfica e a altura de corrente do voltamograma e a concentração do analito, para análise eletroanalítica. Posteriormente, foi obtido o coeficiente de correlação, a partir da equação da reta:

$$y = bx + a \quad (1)$$

y : resposta medida;

x : concentração;

a : interseção com o eixo y , quando $x = 0$;

b : inclinação da curva analítica (sensibilidade).

6.6.3 Precisão

A precisão é o parâmetro que avalia a dispersão dos resultados obtidos por várias medidas realizadas na mesma amostra (RIBEIRO et al., 2008). Este parâmetro foi avaliado por meio do desvio padrão relativo (RSD), calculado pela equação (2), sendo SD o desvio padrão, obtido pela equação (3) e \bar{x} a média aritmética dos valores da resposta de cada técnica referente às detecções, estando estes relacionados com a concentração do analito na amostra. A repetitividade foi avaliada através da análise em triplicata de cada concentração da curva de calibração para cada amostra e calculada pela equação (3).

$$RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100 \quad (2)$$

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(x-\bar{x})^2}{(n-1)}} \quad (3)$$

x : resposta de cada técnica para cada amostra analisada;

\bar{x} : média aritmética dos valores da resposta de cada técnica referente às detecções;

n : número total de medidas para cada concentração.

Segundo ANVISA (2012), para análise de resíduos é considerado aceitável valores menores que 15% de RSD.

6.6.4 Exatidão e Recuperação

A exatidão é definida como o nível de concordância entre o valor medido e um valor de referência, estando relacionada com o erro absoluto de uma medida (RIBEIRO et al., 2008). Desta forma, a exatidão e também a recuperação foram avaliadas em todos os níveis de concentração da curva analítica.

Na análise cromatográfica, a exatidão foi calculada relacionando os valores das respostas de cada concentração da curva analítica, antes (*valor medido*) e depois (*valor de referência*) da respectiva etapa de preparo para as amostras, sendo estas fortificadas com a mesma concentração de padrão. Na análise eletroanalítica, a mesma relação foi realizada, porém utilizando como valor de referência os valores das respostas das soluções padrão das concentrações em tampão PBS. A exatidão foi calculada a partir da equação a seguir:

$$exatidão = \frac{valor\ medido}{valor\ de\ referência} \times 100 \quad (4)$$

Segundo INMETRO (2011), resultados próximos a 100% indicam similaridade entre o valor observado e o valor de referência. Valores em torno de 70 a 120% são considerados adequados para métodos analíticos de detecção.

Para análise da exatidão das metodologias desenvolvidas também foi utilizado o teste t de significância para cada nível de concentração realizado em triplicata ($n = 3$) a 95% de confiança e posterior comparação com o valor crítico tabelado para 2 graus de liberdade ($GL = n - 1$; $\alpha = 0,05$). Este teste verifica a proximidade dos valores obtidos experimentalmente e os valores definidos com valores de referência, adotando a hipótese nula de que o método analítico não está sujeito a erros sistemáticos, ou seja, não havendo diferença significativa entre os valores observados e os conhecidos (MILLER; MILLER, 2005). Para cálculo do teste t foi utilizado a equação (5), onde \bar{x} é média aritmética dos valores da resposta de cada técnica referente às

detecções; SD é o desvio padrão, obtido pela equação (3) e n é número total de medidas para cada concentração.

$$t = \sqrt{n} \frac{(\bar{x} - \mu)}{SD} \quad (5)$$

A recuperação da metodologia cromatográfica foi avaliada através da relação entre a amostra fortificada antes e depois da sua etapa de *clean-up*. Na análise eletroanalítica, foi realizada a comparação da amostra fortificada com a solução padrão em tampão PBS, devido à inexistência da etapa de *clean-up* durante esta análise. Este parâmetro foi calculado pela equação (6). A amostra de água natural superficial foi fortificada com o analito nas concentrações de 0,5, 0,75, 1,0, 5,0, 10, 15, 20, 25 e 30 mgL⁻¹ e a amostra de cosmético nas concentrações de 1,0, 5,0, 10, 15, 20, 25 e 30 mgL⁻¹.

$$recuperação = \left(\frac{C1 - C2}{C3} \right) \times 100 \quad (6)$$

$C1$: concentração calculada do analito na amostra fortificada;

$C2$: concentração calculada do analito na amostra não fortificada (cromatografia) ou na solução em tampão PBS (eletroanalítica);

$C3$: concentração do analito adicionada à amostra fortificada.

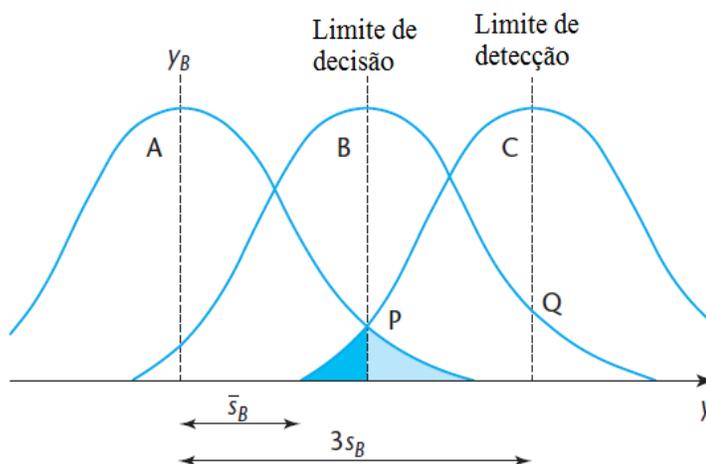
No cálculo de recuperação foram utilizados os valores das concentrações desconhecidas, calculados pela equação da reta do método, obtida em cada técnica, sendo que na análise cromatográfica foi obtida para cada amostra e na análise eletroanalítica apenas para a solução do padrão em tampão PBS.

6.6.5 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

O limite de detecção (LD) é definido como a concentração mínima em que uma substância pode ser medida, diferente do sinal do branco e informada com 95% de confiança.

Esse parâmetro é verificado estatisticamente através da Figura 6, onde a curva A representa a distribuição normal dos valores do sinal do branco; a curva B representa o limite de decisão e a curva C o limite de detecção. A distância $3s_B$ mostra o distanciamento da medida de uma quantidade mínima da amostra contendo o analito, do branco da amostra, representado pela curva A. Nesta distribuição apenas a ponta da calda encontra-se dentro da distribuição dos valores do branco, representando 5% da curva C. Desta forma, é possível definir com 95% de certeza que o LD encontra-se na distribuição de valores da curva C (MILLER; MILLER, 2005).

Figura 6 – Definições de limite de decisão e limite de detecção.



Fonte: MILLER; MILLER (2005).

Com base na Figura 6, o LD pode ser representado pela equação (7), onde y_B e s_B são a concentração do analito com o sinal igual ao do branco e o desvio padrão do branco, respectivamente. Contudo, os valores de y_B e s_B são obtidos, na prática, através da curva de regressão linear analítica, podendo ser trocados pelo coeficiente angular da reta (a) e pelo desvio padrão dos valores de y ($S_{y/x}$) (MILLER; MILLER, 2005).

$$LD = y_B + 3s_B \quad (7)$$

Há quem calcule o LD por meio do desvio padrão de medidas do branco. O branco é constituído por todos os reagentes, sem a presença da amostra e do analito, portanto, ao analisar

somente o branco como forma de obter o LD, não reproduz as condições reais de análise, onde há a participação de ambos (ANALYTICAL, 1987; RIBEIRO et al., 2008). Em especial na análise eletroanalítica, as respostas da análise do branco das amostras sempre contém erros devido à interação superfície do eletrodo/solução analisada, com a ausência do analito. Desta forma, os LDs e LQs da análise eletroanalítica e cromatográfica foram calculados de forma diferente.

Para evitar a inserção de mais erros durante as medidas de LD, Miller e Miller (2005) propõe a utilização de todos os pontos da curva analítica e o desvio padrão do coeficiente angular da reta. O LD na análise eletroanalítica para as soluções padrão de MePa, foi calculado pela equação 14. Os coeficientes angular e linear da reta foram calculados pelas equações 8 e 9. Pelas equações 10, 11 e 12 foram calculados os desvios padrão referente aos coeficientes angular e linear.

$$b = \frac{\sum_i \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2} \quad (8)$$

b : coeficiente angular da curva analítica;

x_i : concentração nominal do nível da curva;

\bar{x} : média aritmética das concentrações de x_i ;

y_i : resposta de cada técnica para cada nível de concentração analisado;

\bar{y} : média aritmética das respostas (y_i) de cada técnica.

$$a = \bar{y} - b\bar{x} \quad (9)$$

a : coeficiente linear da curva analítica;

\bar{y} : média aritmética das respostas (y_i) de cada técnica;

b : coeficiente angular curva analítica, calculado pela equação 8;

\bar{x} : média aritmética das concentrações de x_i .

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}} \quad (10)$$

$S_{y/x}$: desvio padrão dos valores calculados dos coeficientes angular e linear;

y_i : resposta de cada técnica para cada nível de concentração analisado;

\hat{y}_i : valor da resposta de cada técnica calculado pelos coeficientes angular e linear, obtidos pelas equações 8 e 9;

n : número de concentrações utilizadas para construção da curva analítica.

$$S_b = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad (11)$$

S_b : desvio padrão do coeficiente angular;

$S_{y/x}$: desvio padrão dos valores calculados de coeficiente angular e linear, calculado pela equação 10;

x_i : concentração nominal do nível da curva;

\bar{x} : média aritmética das concentrações de x_i ;

$$S_a = S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum_i x_i^2}{n \sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad (12)$$

S_a : desvio padrão do coeficiente linear;

$S_{y/x}$: desvio padrão dos valores calculados de coeficiente angular e linear, calculado pela equação 10;

x_i : concentração nominal do nível da curva;

\bar{x} : média aritmética das concentrações de x_i ;

$$LOD_a = a \pm t_{(n-2)} S_a \quad (13)$$

LOD_a : limite de confiança do intercepto;

a : coeficiente linear, calculado pela equação 9;

$t_{(n-2)}$: valor de t de Student (GL = n - 2 e $\alpha = 0,05$);

S_a : desvio padrão do coeficiente linear, calculado pela equação 12;

No caso da análise eletroanalítica, para amostra de água natural superficial n é igual a 10 e t de Student igual a 2,31 (GL = 8) e para amostra de cosmético n é igual a 8 e t de Student é igual a 2,45 (GL = 6), a 95% de confiança.

$$LD = \frac{LOD_a - a}{b} \quad (14)$$

LOD_a : limite de confiança do intercepto, calculado pela equação 12;

a : coeficiente linear, calculado pela equação 9;

b : coeficiente angular, calculado pela equação 8.

O branco na análise cromatográfica não possui sinal e deve ser desconsiderado nos cálculos de LD e LQ. Portanto, foram utilizadas as definições para cálculo de LD segundo Ribeiro et al. (2008), através das equações 15 e 16, sendo para amostra de água natural superficial n igual a 9 e t de Student igual a 2,31 (GL = 8) e para amostra de cosmético n igual a 7 e t de Student igual a 2,45 (GL = 6), a 95% de confiança.

$$LD = 2 \cdot \frac{S_{y/x} \cdot t}{b} \cdot \sqrt{\left(\frac{1}{n}\right) + 1 + \frac{(y_c - \bar{y})^2}{b^2 \cdot \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad (15)$$

$S_{y/x}$: desvio padrão dos valores calculados de coeficiente angular e intercepto (equação 10);

t : t de Student (GL = $n-1$ e $\alpha = 0,05$);

b : coeficiente angular da curva analítica;

n : número de concentrações utilizadas na construção da curva;

y_c : y crítico, calculado segundo equação 16;

\bar{y} : média das respostas analíticas considerando-se todos os níveis da curva;

x_i : concentração nominal do nível da curva;

\bar{x} : média aritmética das concentrações de x_i .

$$y_c = a + S_{y/x} \cdot t \cdot \sqrt{\left(\frac{1}{n}\right) + 1 + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad (16)$$

Embora, a análise cromatográfica consiga detectar em uma faixa menor de concentração, o objetivo deste trabalho é avaliar o desempenho de ambas as técnicas em uma mesma faixa de trabalho.

O limite de quantificação (LQ) indica qual a menor concentração do analito que a técnica consegue quantificar em soluções puras de laboratório, com a ausência de interferentes (MILLER; MILLER, 2005). Este parâmetro foi calculado pelas equações 10, 17, 18, 19 para a análise cromatográfica.

$$LQ = \left(\frac{y_h - a}{b}\right) + \left(\frac{S_{y/x} \cdot t}{b}\right) \cdot \sqrt{\left(\frac{1}{n}\right) + 1 + \frac{(y_h - \bar{y})^2}{b^2 \cdot \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad (17)$$

y_h : calculado pela equação 16;

a : coeficiente linear da curva analítica;

b : coeficiente angular da curva analítica;

$S_{y/x}$: desvio padrão dos valores calculados de coeficiente angular e intercepto (equação 10);

t : t de Student (GL = $n-1$ e $\alpha=0,05$);

n : número de concentrações utilizadas na construção da curva;

\bar{y} : média das respostas analíticas considerando-se todos os níveis da curva;

x_i : concentração nominal do nível da curva;

\bar{x} : média aritmética das concentrações de x_i .

$$y_h = a + 2 \cdot S_{y/x} \cdot t \cdot \sqrt{\left(\frac{1}{n}\right) + 1 + \frac{(x_c - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad (18)$$

O parâmetro x_c da equação 18 é calculado pela equação 19, onde $S_{y/x}$ é o desvio padrão dos valores calculados de coeficiente angular e intercepto (equação 10); t é o t de Student; b é

coeficiente angular da curva analítica; n é número de concentrações utilizadas na construção da curva e \bar{x} é média aritmética das concentrações de x_i (concentração nominal do nível da curva).

$$x_c = \left(\frac{S_{y/x} \cdot t}{b} \right) \cdot \sqrt{\left(\frac{1}{n} \right) + 1 + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad (19)$$

Para a análise eletroanalítica, o LQ foi calculado através do LD (equação 14), pela equação 20.

$$LQ = 3,333 LD \quad (20)$$

6.7 Estudo do Efeito de Matriz

O efeito de matriz é a denominação dada à interferência dos outros componentes da solução do analito no sinal analítico. Para minimizar esse efeito, são utilizados, dentre outros, os métodos de extração ou *clean up* da amostra. Também são utilizados procedimentos analíticos a fim de promover a compensação do efeito de matriz, como a utilização de analitos protetores e adição de padrão (PINHO et al., 2010).

A avaliação do efeito matriz foi realizada por comparação da resposta dos equipamentos (cromatográfico e eletroanalítico) das soluções padrão do MePa em solvente (metanol para análise cromatográfica, e etanol e eletrólito suporte, para análise eletroanalítica) com aquelas preparadas com as amostras em concentrações na faixa de 1,0 a 30 mgL⁻¹.

6.8 Análise Estatística

Os resultados obtidos por cada técnica analítica foram analisados por meio da metodologia de comparação entre duas técnicas analíticas segundo Miller e Miller (2005). Esta comparação é feita pela avaliação da equação da reta obtida por regressão linear, onde os resultados da detecção eletroanalítica são graficados no eixo das ordenadas e os resultados

obtidos pela metodologia padrão de detecção, cromatografia líquida, são graficados no eixo das abscissas, para cada amostra analisada, em uma mesma faixa de trabalho.

Os resultados deverão se aproximar do ideal ($a = 0$, $b = r = 1$) para que as metodologias sejam análogas. Para isso, os resultados das detecções de ambas as metodologias para cada amostra devem ser avaliados pelo método estatístico t de Student pareado, a partir da equação 18, calculando o desvio padrão (SD) da diferença dos valores das concentrações detectadas. O resultado, então, é comparado com o valor crítico tabelado a 95% de confiança e determinado graus de liberdade, de acordo com o número de concentrações a serem analisadas para cada metodologia e para cada amostra.

$$t = \frac{(\bar{d} \sqrt{n})}{SD} \quad (18)$$

\bar{d} : média aritmética das diferenças entre cada valor de concentração obtido por cada técnica e para cada amostra;

n : número total de concentrações para cada técnica.

SD : desvio padrão calculado pela equação 3;

A média adequada das diferenças entre os valores de detecção obtidos para cada técnica seria zero, se as duas metodologias forem análogas, na faixa de concentração estudada. Valores diferentes de zero são esperados devido aos erros aleatórios, porém um teste t demonstra se esta diferença é pequena o suficiente para ser explicada por erros aleatórios ou se os valores das concentrações obtidas pelas duas metodologias são, realmente, diferentes.

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 Análise Cromatográfica

As condições cromatográficas foram otimizadas para a determinação de MePa. O MePa possui maior afinidade com a fase orgânica (metanol), portanto foram realizados testes variando as proporções da fase móvel orgânica, a fim de se obter um pico bem definido em um menor tempo de retenção. Por se tratar da determinação de apenas um analito, foi utilizado o modo isocrático de análise. Na Tabela 3 são apresentadas as condições cromatográficas selecionadas para prosseguimento com as análises.

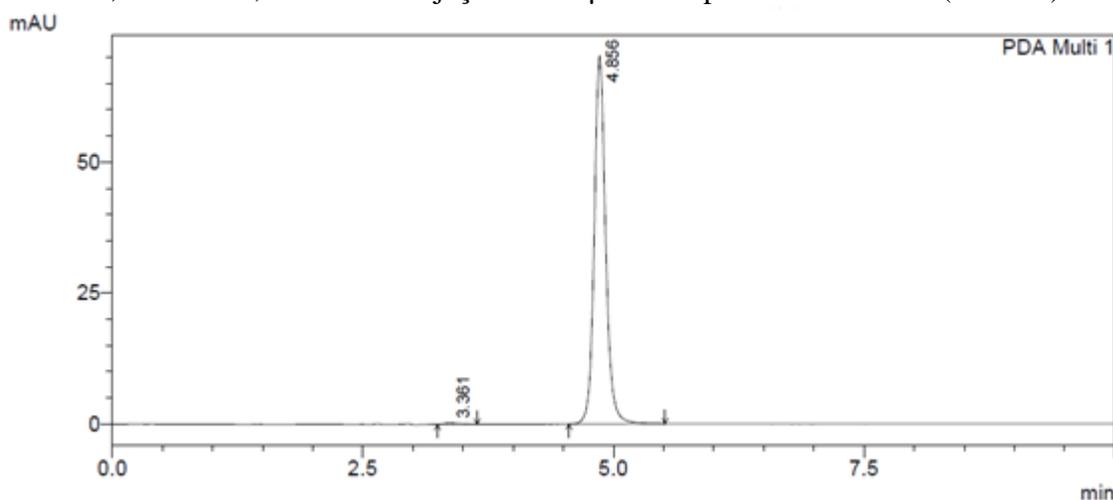
Tabela 3 - Condições cromatográficas otimizadas

Parâmetro	Condições
Coluna	C18 (25 cm x 4,6 mm ID x 5 µm de partícula, Sigma/Aldrich) (Ascentis® Supelco)
Pré-coluna	C18 (2 cm x 4 mm ID x 5 µm de partícula, Sigma/Aldrich) (Ascentis® Supelco)
Temperatura	ambiente (~ 25 °C)
Fase Móvel (FM)	Metanol:Água-Ácido Acético (1%)
Proporção (%)	Isocrático (65:35, v/v)
Vazão	1,0 mLmin ⁻¹
Volume de injeção	20 µL
Tempo de corrida	10 min.
Comprimento de onda	254 nm

Após a otimização das condições cromatográficas, foram realizadas análises das soluções padrão de MePa preparadas a partir da diluição da solução estoque com metanol:água-ácido acético (1%) (65:35, v/v), nas concentrações variando de 0,5 a 30 mgL⁻¹. A Figura 7 apresenta o

cromatograma do MePa obtido sob condições otimizadas para concentração de $5,0 \text{ mgL}^{-1}$, onde é possível observar um pico bem definido no tempo de retenção (t_R) de 4,86 min.

Figura 7 – Cromatograma do MePa na concentração de $5,0 \text{ mgL}^{-1}$. Condições cromatográficas otimizadas: FM metanol:água-ácido acético (1%) (65:35, v/v) (isocrático), vazão de $1,0 \text{ mLmin}^{-1}$, volume de injeção de $20 \mu\text{L}$ e temperatura ambiente ($\sim 25 \text{ }^\circ\text{C}$).



7.1.1 Quantificação de MePa em Amostras Reais

Antes das análises, as amostras foram submetidas a uma etapa de *clean-up*, sendo realizado conforme descrito no item 6.4. As amostras purificadas foram preparadas em 9 níveis de concentração (0,5, 0,75, 1,0, 5,0, 10, 15, 20, 25 e 30 mgL^{-1}), para amostra de água natural superficial e em 7 níveis (1,0, 5,0, 10, 15, 20, 25 e 30 mgL^{-1}), para amostra de cosmético, pelo método de adição de padrão. Posteriormente, foram realizadas as análises cromatográficas de tais amostras fortificadas para obtenção de suas respectivas curvas analíticas.

A seletividade do método foi avaliada pela comparação dos cromatogramas da análise das amostras com os obtidos para as mesmas amostras fortificadas com $5,0 \text{ mgL}^{-1}$ de MePa e, então, comparados com o cromatograma da solução padrão de MePa preparado em metanol:água-ácido acético (1%) (65:35, v/v) na concentração de $5,0 \text{ mgL}^{-1}$. As Figuras 8 e 9 apresentam a comparação dos cromatogramas para amostra de água natural superficial e de cosmético, respectivamente.

Figura 8 - Cromatogramas obtidos para amostra de água natural superficial, demonstrando a seletividade do método. FM: metanol:água-ácido acético (1%) (65:35, v/v) (isocrático); vazão: 1,0 mLmin⁻¹; volume de injeção: 20 µL e temperatura ambiente (~ 25 °C). $t_R = 4,86$ min.

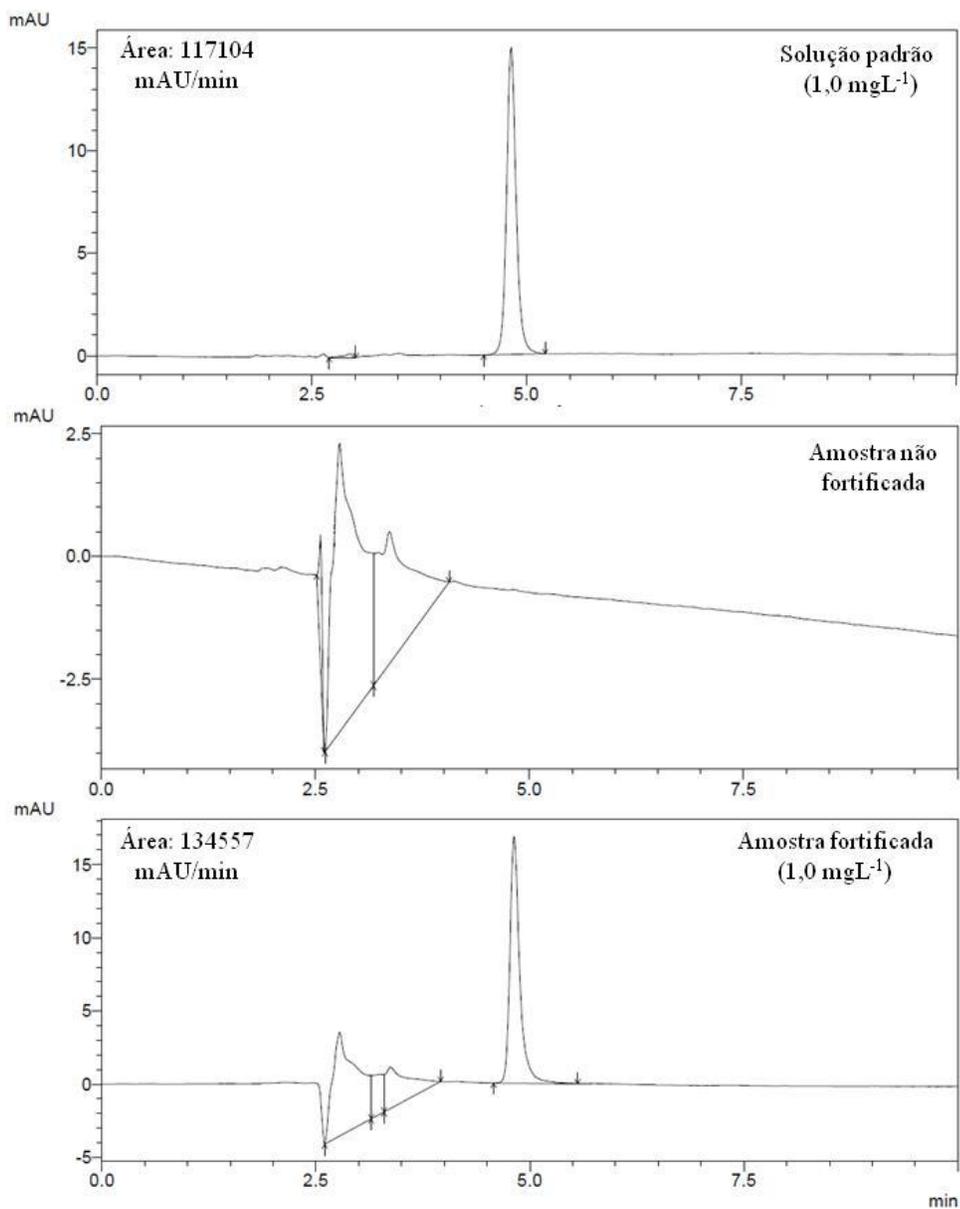
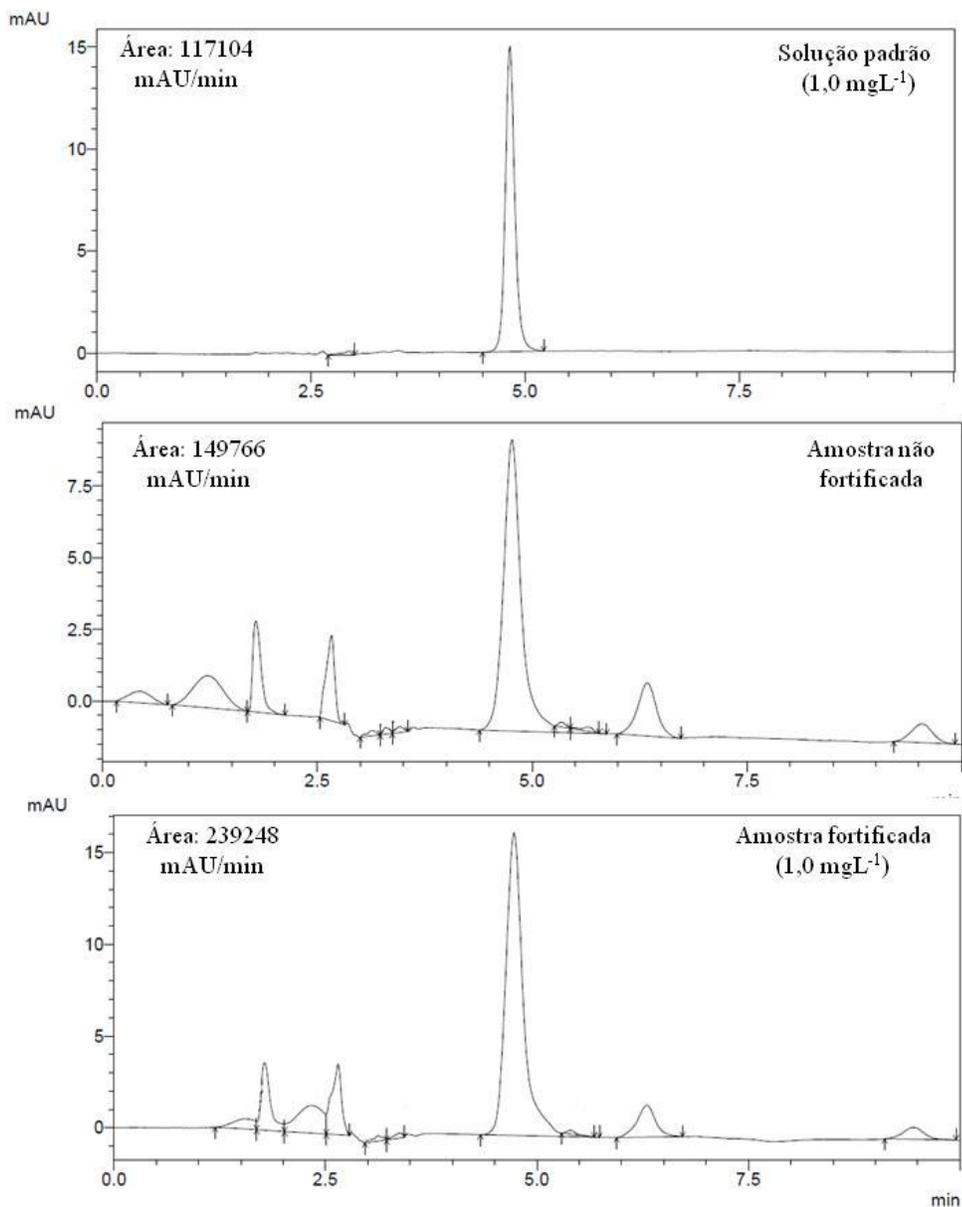


Figura 9 - Cromatogramas obtidos para amostra de cosmético, demonstrando a seletividade do método. FM: metanol:água-ácido acético (1%) (65:35, v/v) (isocrático); vazão: 1,0 mLmin⁻¹; volume de injeção: 20 µL e temperatura ambiente (~ 25 °C). $t_r = 4,86$ min.



7.1.2 Validação

Foram realizadas três repetições para cada concentração de MePa, originando um valor de área médio e o conjunto de valores médios foram calculados e plotados em função da

concentração de MePa. As Figuras 10 e 11 mostram as curvas médias para as amostras de água natural superficial e de cosmético, respectivamente.

Figura 10 - Gráfico da média das curvas analíticas ($n = 3$) para amostra de água natural superficial fortificada com concentrações crescentes de MePa (0,5, 0,75, 1,0, 5,0, 10, 15, 20, 25 e 30 mgL^{-1}). FM: metanol:água-ácido acético (1%) (65:35, v/v) (isocrático); vazão: 1,0 mLmin^{-1} ; volume de injeção: 20 μL e temperatura ambiente ($\sim 25\text{ }^\circ\text{C}$).

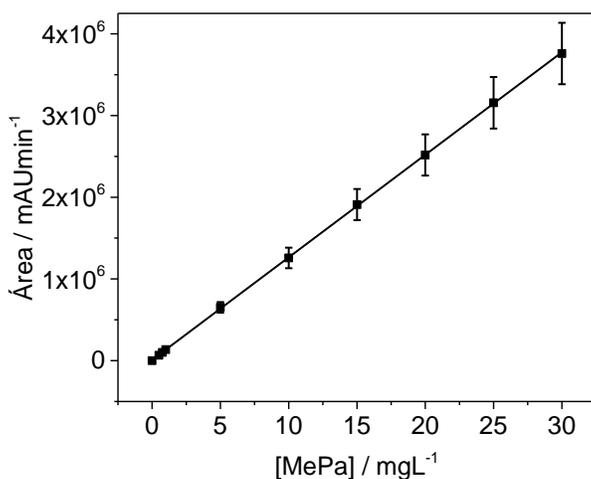
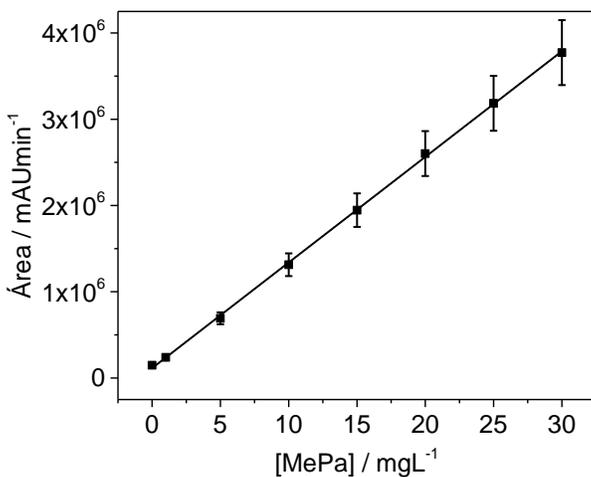


Figura 11 - Gráfico da média das curvas analíticas ($n = 3$) para amostra de cosmético fortificada com concentrações crescentes de MePa (1,0, 5,0, 10, 15, 20, 25 e 30 mgL^{-1}). FM: metanol:água-ácido acético (1%) (65:35, v/v) (isocrático); vazão: 1,0 mLmin^{-1} ; volume de injeção: 20 μL e temperatura ambiente ($\sim 25\text{ }^\circ\text{C}$).



Após a obtenção da curva analítica para cada amostra foram realizados os testes de recuperação, sendo avaliados por meio da comparação entre as amostras fortificadas com concentrações variando de 0,5 a 30 mgL⁻¹, para amostra de água natural superficial e de 1,0 a 30 mgL⁻¹, para amostra de cosmético, antes e depois das suas respectivas etapas de *clean-up*. Foram obtidos valores recuperação na faixa de 95,6 – 101,6% para amostra de água natural superficial, com desvio padrão relativo (RSD) inferior a 4,8%. Para a amostra de cosmético as recuperações variaram na faixa de 78,0 – 99,8%, apresentando RSD inferior a 2,2%.

Segundo a ANVISA (2003) valores de recuperação em torno de 100% são desejáveis, porém são aceitáveis valores menores desde que o método apresente RSD menor que 15%. Portanto, os métodos aqui otimizados para as respectivas amostras de água natural superficial e cosmético, são considerados precisos, com RSD total menor que 4,8%.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) dos métodos aplicados às amostras foram obtidos seguindo o método descrito por Ribeiro et al. (2008), calculados pelas equações 15 e 17, respectivamente. O LD calculado foi de 0,49 mgL⁻¹ e o LQ de 0,73 mgL⁻¹, para amostra de água natural superficial. Para amostra de cosmético foi obtido valor de LD de 1,26 mgL⁻¹ e de LQ de 1,88 mgL⁻¹.

Os resultados obtidos para validação do método cromatográfico podem ser visualizados resumidamente na Tabela 4.

Tabela 4 - Resultados dos parâmetros de validação de método cromatográfico

Parâmetro	Amostra de água natural superficial	Amostra de cosmético
Faixa linear ^a (mgL ⁻¹)	0,51 – 28,80	0,78 – 29,81
Curva analítica linear (mgL ⁻¹)	$y = 125507,45 x + 9381,38$	$y = 122465,92 x + 114470,67$
Coefficiente de correlação (R)	0,9999	0,9996
Precisão (mín-máx) em RSD (%)	1,37 – 4,80	0,53 – 2,20
Exatidão em (%) e em termos de t de Student ^b médios (mín-máx)	95,1 (91,2 – 97,5) 1,74 (1,08 – 2,80)	99,9 (98,1 – 101,4) 1,28 (0,42 – 2,00)
Recuperação média (mín-máx) (%)	97,8 (95,6 – 101,6)	94,1 (78,0 – 99,8)
LD ^c e LQ ^c (mgL ⁻¹)	0,49 e 0,73	1,26 e 1,88

^a Faixa de 0,5 a 30 mgL⁻¹ para água natural superficial e de 1,0 a 30 mgL⁻¹ para cosmético, mais o branco das amostras;

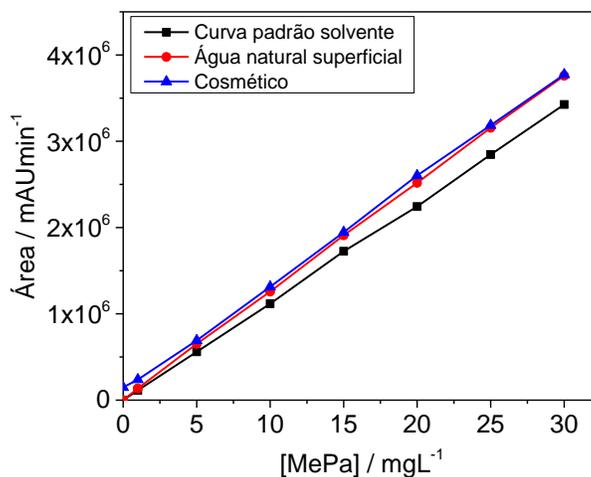
^b t de Student crítico = 4,30 (n = 3; GL = 2; α = 0,05);

^c LD = limite de detecção; LQ = limite de quantificação.

7.1.3 Efeito de Matriz

Na análise cromatográfica o estudo do efeito de matriz foi realizado por meio de comparação das curvas analíticas obtidas para cada amostra com a curva padrão em solvente (metanol:água-ácido acético, 65:35, v/v), na faixa de concentração de 1,0 a 30 mgL⁻¹, e os resultados são apresentados na Figura 12. É possível identificar a presença de interferentes e/ou erros sistemáticos para ambas as amostras, aumentando a resposta da técnica em cada nível de concentração em comparação à curva em solvente. No caso da amostra de cosmético já havia certa quantidade de MePa (~1,5 mgL⁻¹) em sua formulação, por tanto o sinal da resposta referente às concentrações foi pouco maior que a resposta da amostra de água natural superficial.

Figura 12 - Efeito de matriz na análise cromatográfica das amostras de água natural superficial e de cosmético.

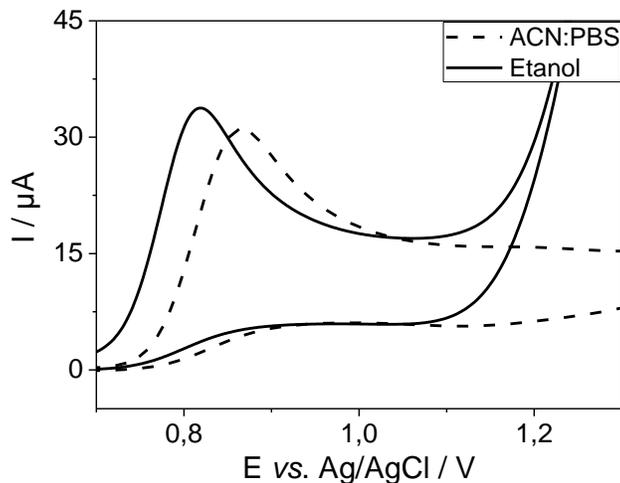


7.2 Análise Eletroanalítica

7.2.1 Comportamento Eletroquímico do BDD

As respostas eletroquímicas de 50 mgL⁻¹ de MePa (a partir de duas diferentes soluções estoque, por exemplo, dissolvida ou em PBS + acetonitrila ou apenas em etanol) com o eletrodo BDD modificado com a mistura de óxidos de Pt-Ru foram obtidos por experimentos de voltametria cíclica a 50 mV s⁻¹ e os resultados estão apresentados na Figura 13. Embora as duas respostas voltamétricas sejam similares, é possível observar que o pico de oxidação com solução em etanol é deslocado em direção a um potencial menos positivo. Este resultado se deve provavelmente aos diferentes efeitos de solventes orgânicos na dupla camada do eletrodo e é adequado para tal determinação para evitar a interferência de outras espécies orgânicas que oxida a potenciais positivos. Desta forma, a solução estoque etanólica foi usada ao longo deste trabalho.

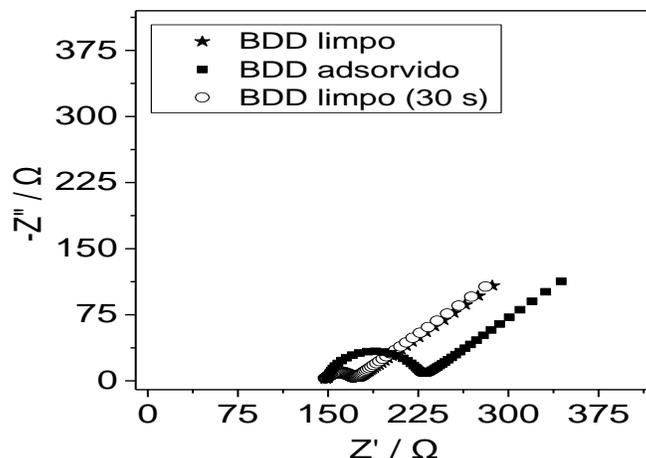
Figura 13 - Voltamograma cíclico do comportamento do BDD frente à solução de MePa a 50 mgL^{-1} em PBS $0,1 \text{ molL}^{-1}$, pH 7,5, a partir das soluções estoque em (a) etanol (linha cheia) e em (b) ACN:PBS (50:50, v/v) (linha tracejada), a $v = 50 \text{ mVs}^{-1}$.



7.2.2 Eficiência do Procedimento de Limpeza

Devido à forte adsorção de espécies de natureza orgânica usadas neste estudo (MePa e etanol) na superfície do eletrodo, um procedimento de limpeza foi necessário, antes de cada varredura voltamétrica, a fim de tornar as medidas eletroquímicas reproduzíveis. Aqui, o procedimento de limpeza consiste na aplicação de um potencial catódico de $-3,0 \text{ V}$ durante 30 s em PBS pH 7,5, entre cada medida. A eficácia de tal procedimento foi seguida por medidas de impedância eletroquímica faradaica, em $0,1 \text{ molL}^{-1} \text{ KCl}$ contendo $5,0 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$ do par redox $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, em condições de circuito aberto. Os resultados experimentais são mostrados na Figura 14 onde é possível observar que, após o procedimento de limpeza a resistência de transferência de carga, definida pelo diâmetro do semicírculo, retorna a seu valor original, indicando a total remoção das espécies adsorvidas durante a oxidação do MePa.

Figura 14 - Gráfico Nyquist do BDD em $0,1 \text{ molL}^{-1}$ KCl contendo $5,0 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$ do par redox $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, em potencial de circuito aberto.



7.2.3 Influência do pH no Processo de Oxidação do MePa

O potencial de pico é deslocado em direção a valores de potencial negativo com o aumento de pH, mostrando que a oxidação do MePa é mais difícil em meio ácido, como indicado pelos dados experimentais mostrados nas Figuras 15 e 16. Em meio alcalino o MePa pode sofrer hidrólise formando o ácido 4-hidroxibenzoico. Além disso, a corrente de pico de oxidação do MePa é também influenciada pela mudança de pH e, na faixa de 6,0 a 7,8, aumenta em soluções mais alcalinas. A maior intensidade de corrente de pico foi observada para o pH 7,5, como observado na Figura 15. O gráfico I_p versus pH (Figura 16) destaca que a corrente de pico é afetada pelo valor do pH. Assim, para os estudos subsequentes, o pH 7,5 foi escolhido como o ideal.

Figura 15 - Voltamograma de onda quadrada de oxidação do MePa a $5,1 \text{ mgL}^{-1}$ em PBS $0,1 \text{ molL}^{-1}$ a diferentes valores de pH. Parâmetros da SWV: $a = 50 \text{ mV}$, $f = 20 \text{ Hz}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$.

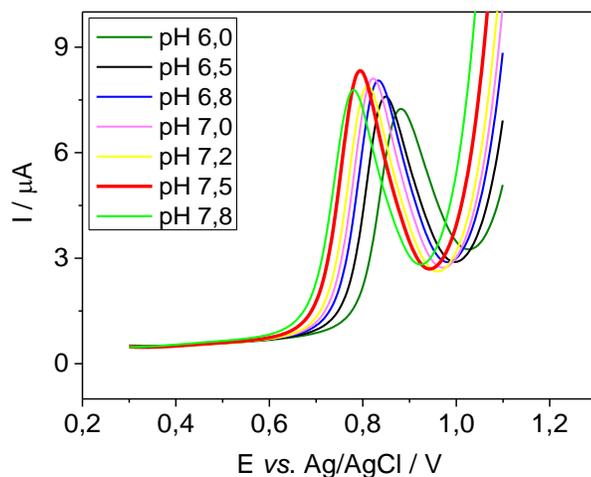
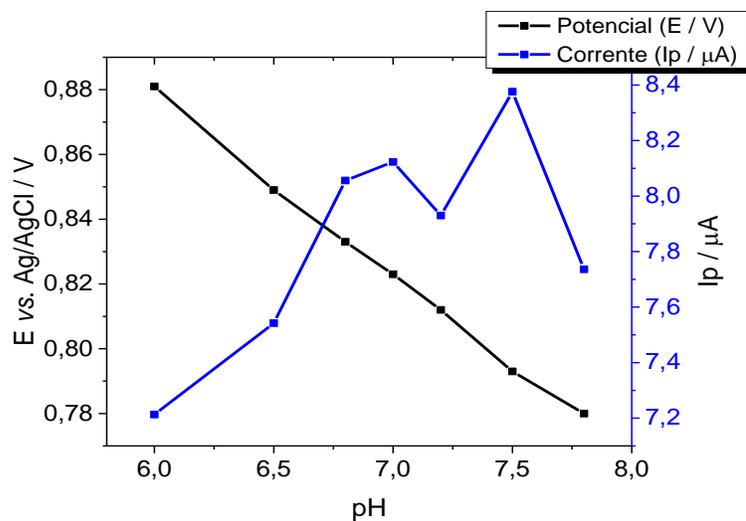
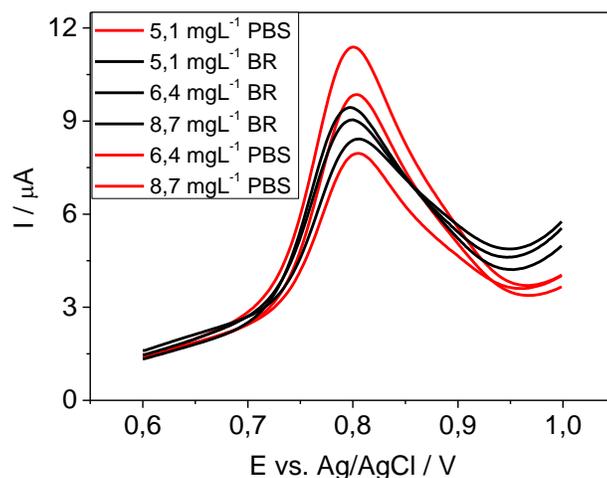


Figura 16 - Representação dos parâmetros experimentais (I_p e E), obtidos da Figura 15 relacionados à variação do pH.



De modo a verificar a influência do eletrólito suporte na oxidação do MePa, estudos usando tampão Britton-Robinson (tampão BR) foram realizados e os resultados comparados com aqueles obtidos com tampão PBS. Três concentrações de MePa foram avaliadas ($5,1$, $6,4$ e $8,7 \text{ mgL}^{-1}$), cujos resultados são mostrados na Figura 17.

Figura 17 - Voltamograma de onda quadrada para seleção do eletrólito suporte tampão PBS (-) ou BR (-) ($0,1 \text{ molL}^{-1}$, pH 7,5), com concentrações crescentes de MePa (5,1, 6,4 e 8,7 mgL^{-1}).



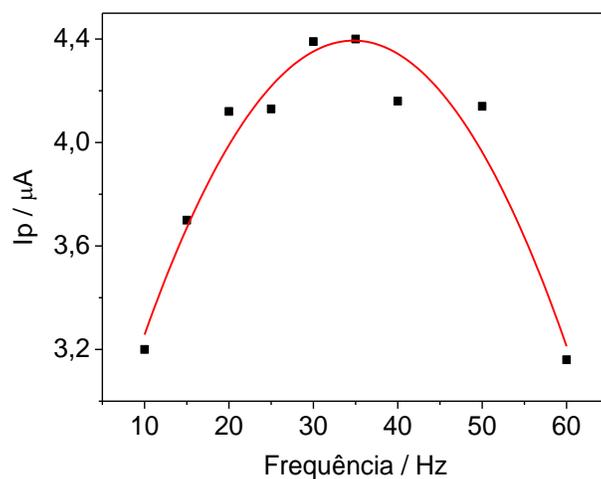
Na Figura 17 é possível observar uma intensidade de corrente maior e mais uniforme para concentrações crescentes de MePa em eletrólito suporte tampão PBS, sendo, portanto, escolhido como eletrólito suporte ideal para as posteriores análises.

7.2.4 Otimização dos Parâmetros da SWV

Como introduzido na seção anterior, a voltametria de onda quadrada é uma poderosa técnica analítica que permite a realização de experimentos em uma ampla faixa de intervalos de tempo. Ela é baseada em alguns parâmetros (amplitude, frequência de pulso da onda quadrada aplicada e incremento de potencial da escada) que podem ser otimizados para toda medida eletroquímica, visando um melhor desempenho. Desta forma, a resposta ótima para a variação de cada parâmetro foi obtida e apresentada abaixo. Inicialmente, em uma amplitude ($a = 50 \text{ mV}$) e incremento de potencial ($\Delta E_s = 2 \text{ mV}$) fixos, o efeito da variação da frequência na corrente de pico de SWV foi calculado pela representação da corrente de pico em função da frequência, em uma solução de PBS $0,1 \text{ molL}^{-1}$ contendo $1,0 \text{ mgL}^{-1}$ de MePa (Figura 18). É evidente que o valor máximo da corrente de pico foi obtido para uma aplicação de pulso de frequência de 35 Hz no

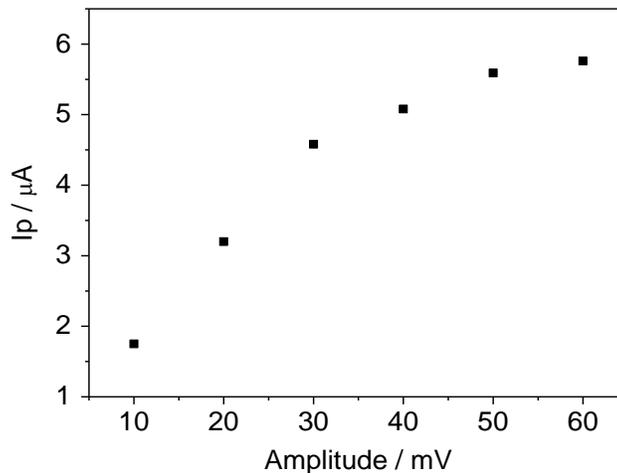
eletrodo, sendo este o seu valor ótimo.

Figura 18 - Efeito da variação da frequência no pico de corrente da SWV a uma amplitude de 50 mV e um incremento de potencial de 2 mV para uma solução de PBS $0,1 \text{ molL}^{-1}$ contendo $1,0 \text{ mgL}^{-1}$ de MePa.



O mesmo procedimento foi empregado para a influência da amplitude na corrente de pico. Usando o valor ótimo da frequência (35 Hz) e fixando o valor de $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, a variação da corrente de pico é mostrada na Figura 19, sob as mesmas condições experimentais usadas na Figura 18.

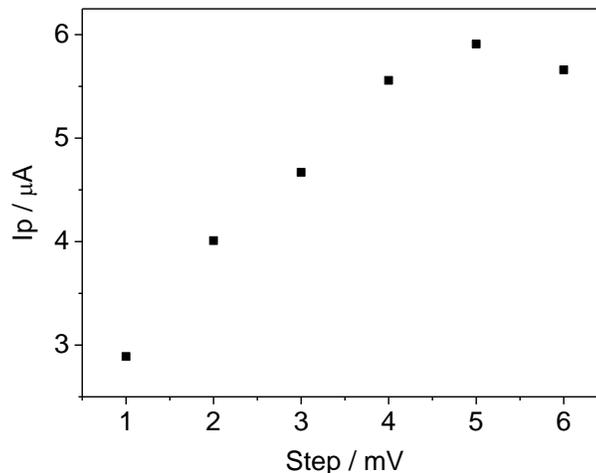
Figura 19 - Efeito da variação da amplitude no pico de corrente da SWV a uma frequência de 35 Hz e um incremento de potencial de 2 mV em PBS 0,1 molL⁻¹ contendo 1,0 mgL⁻¹ de MePa.



A corrente de pico cresce linearmente com o crescimento da amplitude até aproximadamente 30 mV, onde a taxa de variação diminui. Desta forma, o valor de 30 mV foi selecionado para os estudos posteriores em relação à oxidação do MePa com o eletrodo BDD modificado.

Finalmente, para uma frequência de 35 Hz e amplitude de 30 mV, o efeito do incremento de potencial foi avaliado nas mesmas condições experimentais e os resultados estão plotados na Figura 20.

Figura 20 - Efeito da variação do incremento de potencial no pico de corrente da SWV a uma frequência de 35 Hz e uma amplitude de 30 mV, para PBS 0,1 molL⁻¹ contendo 1,0 mgL⁻¹ de MePa.



A dependência mostrada na Figura 20 sugere que, após aproximadamente 4 mV nenhuma influência do crescimento do incremento de potencial pode ser detectado na corrente de pico. Então este valor foi considerado como ótimo para as medidas seguintes.

7.2.5a Efeito da Concentração do MePa na Resposta da SWV

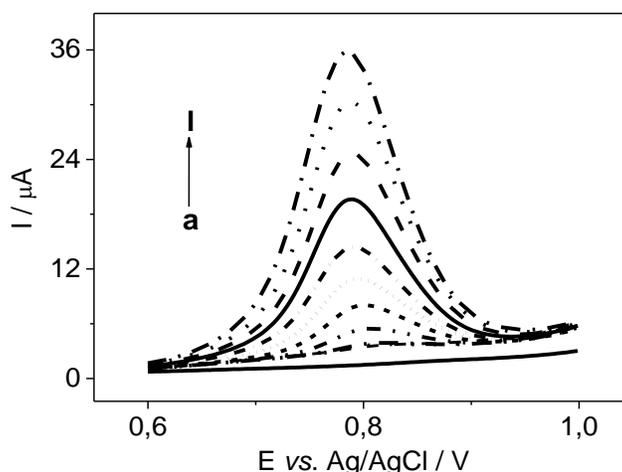
O comportamento eletroquímico de MePa utilizando o BDD modificado como eletrodo de trabalho e tampão PBS 0,1 molL⁻¹ (pH 7,5) como eletrólito suporte, foi investigado com a técnica SWV. Sob as condições otimizadas ($f = 35$ Hz; $a = 30$ mV e $\Delta E_s = 4$ mV) o MePa mostrou um pico de oxidação bem definido em torno de 0,8 V, cujas as correntes de pico são linearmente proporcionais à concentração de MePa na faixa de concentração explorada (0,5 a 30 mgL⁻¹). Os voltamogramas de onda quadrada obtidos são exibidos na Figura 21.

O processo de condicionamento da superfície foi aplicado com sucesso aqui e foi repetido cinco vezes em cada varredura obtendo resultados similares. A fim de quantificar tal comportamento, as correntes de pico foram medidas em cinco curvas repetidas para cada concentração obtendo um desvio padrão médio de 10,5%.

As cinco repetições para cada concentração de MePa, usando o sinal do branco como a

linha de base, originou um valor de corrente de pico médio e o conjunto de valores médios foram calculados e plotados em função da concentração de MePa. Embora a adsorção de reagentes ou produtos na superfície do eletrodo possa alterar a área disponível para os processos eletroquímicos, uma excelente correlação linear foi obtida, o qual pode ser usada como a curva de calibração para posterior determinação de MePa em diferentes matrizes.

Figura 21 - SWV do eletrodo BDD para concentrações crescentes de MePa em tampão PBS, pH 7,5, $0,1 \text{ molL}^{-1}$ ($f = 35 \text{ Hz}$; $a = 30 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$): (a) Branco; (b) 0,5; (c) 0,75; (d) 1,0; (e) 2,5; (f) 5,0; (g) 7,5; (h) 10; (i) 15; (j) 20; (k) 25 e (l) 30 mgL^{-1} .



Usando as condições ótimas descritas acima foi obtida uma curva de calibração linear para o MePa na faixa de $0,5$ a 30 mgL^{-1} e de $1,0$ a 30 mgL^{-1} , mostradas nas Figuras 22 e 23, juntamente com as barras de erro. As equações lineares foram, $I_p (\mu\text{A}) = 1,00368 \times 10^{-6} [\text{MePa} / \text{mgL}^{-1}] + 2,75906 \times 10^{-6}$; $R = 0,9983$, para a faixa de $0,5$ a 30 mgL^{-1} e $I_p (\mu\text{A}) = 1,012 \times 10^{-6} [\text{MePa} / \text{mgL}^{-1}] + 2,577 \times 10^{-6}$; $R = 0,9981$, para a faixa de $1,0$ a 30 mgL^{-1} . Algum desvio da linearidade foi observado para soluções mais concentradas, provavelmente devido à adsorção do MePa ou do seu produto de oxidação na superfície do eletrodo, bloqueando parcialmente os sítios ativos necessários para a reação eletroquímica.

Figura 22 - Gráfico da média das curvas analíticas ($n = 5$) para concentrações crescentes de MePa (0,5, 0,75, 1,0, 5,0, 10, 15, 20, 25 e 30 mgL^{-1}) em tampão PBS, pH 7,5, 0,1 molL^{-1} ($f = 35 \text{ Hz}$; $a = 30 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$).

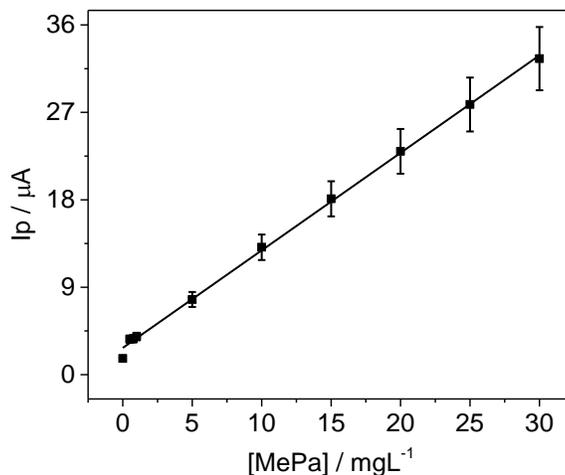
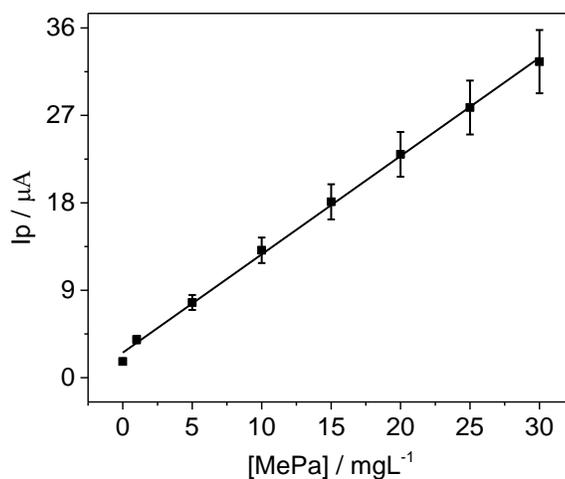


Figura 23 - Gráfico da média das curvas analíticas ($n = 5$) para concentrações crescentes de MePa (1,0, 5,0, 10, 15, 20, 25 e 30 mgL^{-1}) em tampão PBS, pH 7,5, 0,1 molL^{-1} ($f = 35 \text{ Hz}$; $a = 30 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$).



7.2.5b Quantificação de MePa em Amostras Reais

A seletividade do método foi avaliada por meio da comparação dos voltamogramas da análise do branco das amostras, com os obtidos para as mesmas amostras fortificadas a 5,0 mgL^{-1}

e, então, comparados com o voltamograma da solução padrão de MePa a $5,0 \text{ mgL}^{-1}$. Esta comparação pode ser observada nas Figuras 24 e 25, para amostra de água natural superficial e de cosmético, respectivamente.

Figura 24 – Sobreposição dos voltamogramas obtidos para amostra de água natural superficial, demonstrando a seletividade do método. ($f = 35 \text{ Hz}$; $a = 30 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$).

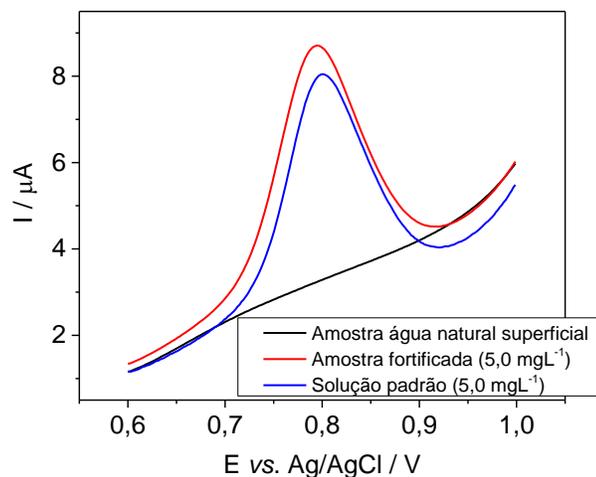
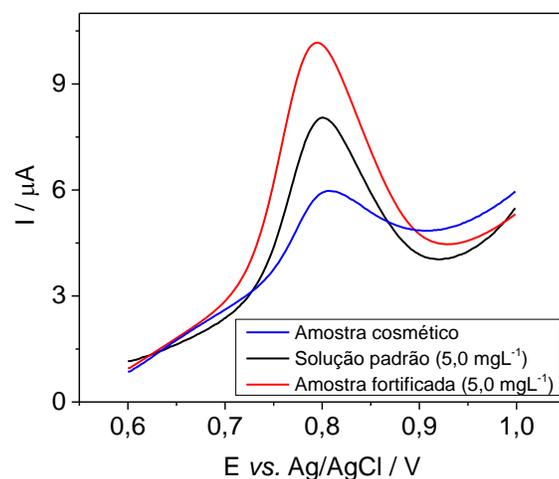


Figura 25 – Sobreposição dos voltamogramas obtidos para amostra de cosmético, demonstrando a seletividade do método. ($f = 35 \text{ Hz}$; $a = 30 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$).



Para a amostra de cosmético foi possível observar um aumento significativo da corrente devido ao fato de que a amostra já contém cerca de $1,5 \text{ mgL}^{-1}$ de MePa em sua formulação.

Ademais, a existência de interferentes na amostra e a dupla camada do eletrodo contribuem para este fenômeno.

O método proposto foi validado para determinação de MePa em amostras reais de água natural superficial e cosmético. Após a definição da faixa linear de trabalho, de 0,5 a 30 mgL⁻¹ para amostra de água natural superficial e de 1,0 a 30 mgL⁻¹ para amostra de cosmético, as curvas analíticas mostradas na seção anterior foram utilizadas para estas determinações. Todas as medidas foram realizadas em triplicata (n= 3) e o valor médio foi analisado.

O teste de recuperação para amostra de água natural superficial foi realizado na faixa de 0,5 a 30 mgL⁻¹ através da adição de quantidades conhecidas do analito à amostra de água que, a seguir, foi filtrada e tamponada. Os valores de recuperação obtidos foram na faixa 92,6 – 106,4%, com desvio padrão relativo (RSD) inferior a 9,76%.

A aplicabilidade da técnica de SWV na determinação de MePa em amostra de cosmético também foi investigada. A solução da amostra foi preparada conforme descrito no item 6.5, por meio da sua simples dissolução em etanol, sem a necessidade de qualquer tratamento prévio. Em seguida, o teste de recuperação foi realizado com as concentrações relativas ao intervalo linear da curva (n = 3 para cada determinação). As soluções foram preparadas na faixa de 1,0 - 30 mgL⁻¹, pela adição de quantidades conhecidas do MePa. As recuperações variaram na faixa de 90,0 – 112,6%, mostrando RSD inferior a 7,40%.

Os valores obtidos indicam nenhuma tendência a sub ou a superestimação da concentração real do analito presente nas amostras analisadas (INMETRO, 2011). Ademais, em concordância com a ANVISA (2012) o método mostrou-se preciso, com um RSD total menor que 10%.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) da técnica voltamétrica foram obtidos seguindo o método estatístico descrito por Miller e Miller (2005), calculados pelas equações 14 e 20, respectivamente. O LD calculado foi de 0,43 mgL⁻¹ e o LQ de 1,44 mgL⁻¹. As equações 14 e 20 também foram utilizadas para o cálculo das menores quantidades detectável e quantificável nas amostras de água natural superficial e cosmético.

Os resultados obtidos para validação da metodologia eletroanalítica podem ser visualizado resumidamente na Tabela 5.

Tabela 5 - Resultados dos parâmetros de validação de método

Parâmetro	Amostra de água natural superficial	Amostra de cosmético
Faixa linear ^a (mgL ⁻¹)	0,52 – 29,2	1,13 – 27,10
Faixa de concentração determinada ^b (mgL ⁻¹)	1,12 – 29,8	3,25 – 29,23
Curva analítica linear (mgL ⁻¹)	$y = 1,00368e^{-6} x + 2,75906e^{-6}$	$y = 1,01201e^{-6} x + 2,57701e^{-6}$
Coefficiente de correlação (R)	0,9983	0,9981
Precisão média (mín-máx) em RSD (%)	5,93 (2,26 – 9,76)	5,43 (1,19 – 7,40)
Exatidão em (%) e em termos de t de Student ^c médios (mín-máx)	106,6 (100,3 – 112,4) 1,26 (0,25 – 2,30)	80,6 (71,0 – 89,4) 2,25 (0,16 – 4,08)
Recuperação média (mín-máx) (%)	100,9 (92,6 – 106,4)	101,2 (90,0 – 112,6)
Menor quantidade detectável e quantificável na amostra (mgL ⁻¹)	0,45 e 1,5	1,44 e 4,79
LD ^d e LQ ^d da técnica SWV	0,43 e 1,44	

^a Faixa de 0,5 a 30 mgL⁻¹ para água natural superficial e de 1,0 a 30 mgL⁻¹ para cosmético, mais o branco das amostras;

^b Referente à faixa linear;

^c t de Student crítico = 4,30 (n = 3; GL = 2; α = 0,05);

^d LD = limite de detecção; LQ = limite de quantificação.

Os valores de LD calculados podem ser comparados a valores obtidos por outras técnicas analíticas, como a cromatografia líquida, reportados na literatura (Tabela 6). Os valores encontrados neste trabalho são comparáveis aos encontrados para tal determinação em diferentes amostras. Estas características indicam que o eletrodo de diamante dopado com boro modificado com Pt-RuO_x é um dos dispositivos mais adequados para o monitoramento de MePa.

Tabela 6 - Comparação de vários métodos para determinação de MePa

Método	Faixa Linear (mgL⁻¹)	Limite de Detecção (mgL⁻¹)	Referência
HPLC com detecção por MWCN	5,2 – 400	2,13	Sillero et al. (2010)
Eletrodo de carbono vítreo (SWV)	1,67 – 30,4	0,5	Łukasiewicz; Tarasiewicz; Niedzielko (2011)
Nanopartículas de hidróxido-Zn (DPV)	0,6 – 190,9	0,49	Hasanzadeh et al. (2012)
Eletroforese Capilar	0,46 – 7,3	0,32	Uysal; Guray (2008)
RP-HPLC	2,89 – 98,9	0,29	Saad et al. (2005)
RP-HPLC-UV	0,5 - 30	0,49 ^a	Presente estudo
Eletrodo de diamante dopado com boro modificado com Pt-RuO _x (SWV)	0,5 – 30	0,43 ^b	Presente estudo

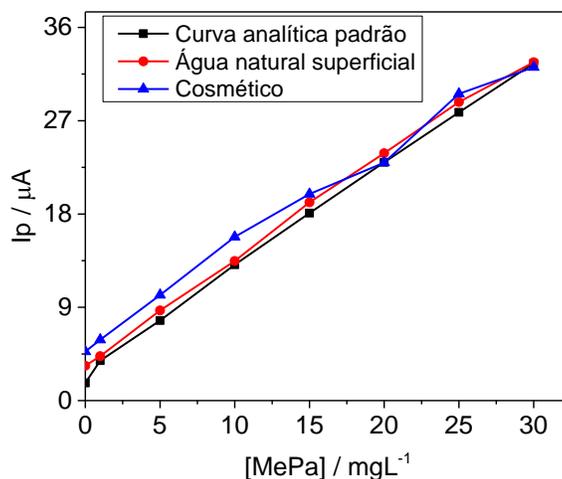
^a Menor valor de LD obtido, calculado pelo método segundo o INMETRO (2011).

^b LD calculado pelo método segundo Miller e Miller (2005).

7.2.6 Efeito de Matriz

O estudo do efeito de matriz foi realizado pela comparação das curvas obtidas para cada amostra com a curva analítica padrão, na faixa de concentração de 1,0 a 30 mgL⁻¹, e os resultados são apresentados na Figura 26. É possível identificar a presença de interferentes e/ou erros sistemáticos para ambas as amostras, que aumentam a resposta da técnica em cada nível de concentração. Ademais, no caso da amostra de cosmético já havia certa quantidade de MePa (~1,5 mgL⁻¹) em sua formulação, aumentando ainda mais o sinal eletroquímico se comparado com a curva analítica padrão. Também foi possível observar que as curvas são relativamente paralelas e, portanto, a curva padrão em tampão PBS foi utilizada como curva linear de trabalho para as determinações em amostras.

Figura 26 – Efeito de matriz na análise eletroanalítica das amostras de água natural superficial e de cosmético.



7.3 Comparação Estatística

A comparação dos resultados de cada técnica analítica foi realizada pela avaliação da regressão linear da equação da reta, onde os resultados da detecção eletroanalítica foram graficados no eixo das ordenadas e os resultados da metodologia padrão de detecção, cromatografia líquida, foram graficados no eixo das abscissas, para cada amostra analisada, em uma mesma faixa de trabalho. Para ambas as determinações de MePa em amostra de água natural superficial e cosmético, encontrou-se uma excelente correlação entre as duas técnicas aqui analisadas, conforme evidenciado nas Figuras 27 e 28.

Figura 27 – Gráfico de regressão linear dos valores obtidos pelas técnicas de SWV e cromatografia líquida, para detecção de MePa em amostra de água natural superficial.

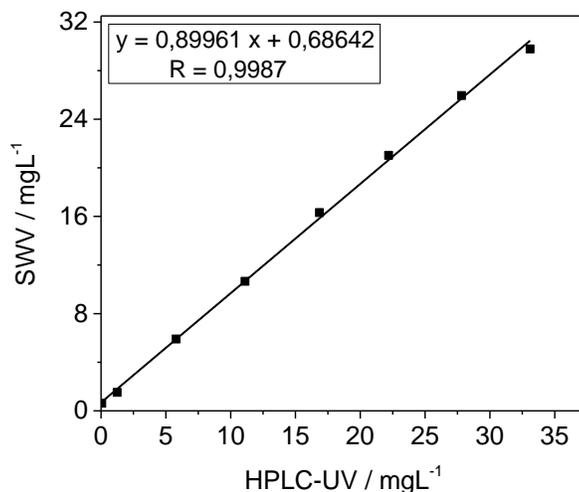
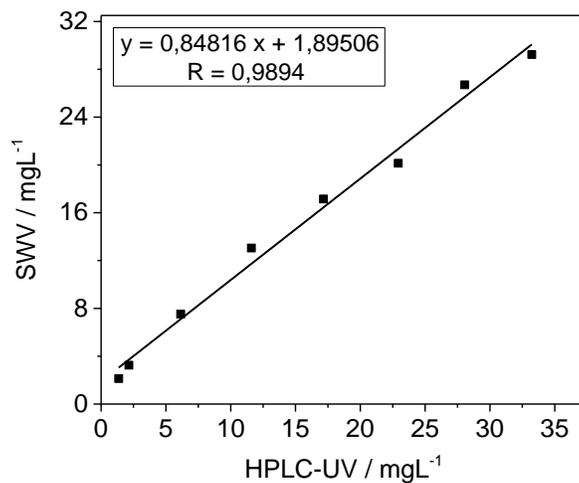


Figura 28 – Gráfico de regressão linear dos valores obtidos pelas técnicas de SWV e cromatografia líquida, para detecção de MePa em amostra de cosmético.



A fim de provar que as duas técnicas são análogas para detecção de MePa, na faixa de concentração de 0,06 a 33,23 mgL⁻¹, foi realizado uma avaliação dos resultados das detecções de

ambas as metodologias para cada amostra pelo método estatístico t de Student pareado, a partir da equação 18, calculando o desvio padrão (SD) da diferença dos valores das concentrações detectadas. Os resultados foram de 1,72 para amostra de água natural superficial e de 0,59 para amostra de cosmético. Portanto, os valores do teste t calculados são menores que o valor crítico tabelado, de 2,36 a 95% de confiança para $n = 8$ ($GL = 7$; $\alpha = 0,05$).

Desta forma, a metodologia eletroanalítica utilizando a técnica voltamétrica de onda quadrada é análoga à técnica cromatografia líquida de alta eficiência, a 95% de confiança e 7 graus de liberdade.

8 CONCLUSÃO

A determinação do contaminante emergente MePa foi avaliada por duas metodologias distintas, sendo a cromatografia líquida utilizada como técnica padrão de análise. As metodologias cromatográfica e eletroanalítica foram validadas, apresentando seletividade, linearidade, precisão e exatidão adequados para detecção de MePa em amostras de água natural superficial e de cosmético, com margem de confiança de 95%.

A técnica de *clean-up* utilizada na análise cromatográfica, juntamente com o HPLC com detecção UV e o emprego de BDD modificado com Pt-RuO_x na análise eletroanalítica com a técnica SWV, mostraram-se adequados para as determinações MePa em águas naturais, bem como em formulações cosméticas, sem qualquer interferência significativa dos componentes das matrizes. A metodologia cromatográfica apresentou recuperação na faixa de 95,6 – 101,6% para amostra de água natural superficial e de 78,0 – 99,8% para amostra de cosmético, com RSD inferior a 4,8%. Na análise eletroanalítica foram obtidos valores de recuperação na faixa de 92,6 – 106,4% e de 90,0 – 112,6%, para amostra de água natural superficial e de cosmético, respectivamente, com RSD inferior a 10%.

O LD para a metodologia cromatográfica foi calculado segundo Ribeiro et al. (2008), obtendo valores de 0,49 mgL⁻¹ para amostra de água natural superficial e de 1,26 mgL⁻¹ para amostra de cosmético. Já para metodologia eletroanalítica o LD, calculado através das correntes de pico de oxidação de experimentos SWV para soluções padrão de MePa, foi de 0,43 mgL⁻¹, seguindo a metodologia descrita por Miller e Miller (2005). Os LDs calculados para ambas as metodologias foram comparáveis com os valores encontrados na literatura, permitindo determinações em faixas a níveis de traços.

A metodologia eletroanalítica também foi comparada estatisticamente com a metodologia cromatográfica pelo método de regressão linear e posterior avaliação dos resultados das detecções de ambas as metodologias para cada amostra pelo método estatístico t de Student pareado.

Demonstrou-se que a metodologia eletroanalítica é capaz de determinar MePa com boa precisão tal como a técnica padrão de detecção, a cromatografia, na faixa de trabalho de 1,0 a 30

mgL⁻¹. Obteve-se t calculado de 1,72 para amostra de água natural superficial e de 0,59, para amostra de cosmético.

Desta forma, os valores obtidos pelo teste t são menores que o valor crítico tabelado a 95% de confiança e 7 graus de liberdade, confirmando assim que os resultados da determinação de MePa em amostras de água natural superficial e de cosmético obtidos por eletroanalítica são análogos aos obtidos por cromatografia.

Ademais, a metodologia eletroanalítica possui vantagens em relação à cromatográfica: baixo custo de análise; possibilidade de aplicação "*in situ*" e de monitoramento, em tempo real, em caso de contaminação ambiental e equipamentos de fácil manipulação.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ANALYTICAL methods committee (Royal Society of Chemistry). **Analyst**, v. 112, p 199-204, 1987.

ANDERSEN, F.A. Final amended report on the safety assessment of methylparaben, ethylparaben, propylparaben, isopropylparaben, butylparaben, isobutylparaben, and benzylparaben as used in cosmetic products. **International Journal of Toxicology**, v. 27, n. 4, p. 1-82, 2008.

AVACA, L.A.; SUFFREDINI, H.B.; VATISTAS, N.; TRICOLI, V. Electro-oxidation of methanol and ethanol using a Pt-RuO₂/C composite prepared by the sol gel technique and supported on boron-doped diamond. **Journal of Power Sources**, v. 158, n. 1, p. 124-128, 2006.

BANDA, G.R.S. **Estudos da eletroquímica do diamante dopado com boro e da sua superfície modificada com catalisadores para a oxidação de metanol e etanol**. 2006. 191 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Carlos. 2006.

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.

BLANCO, E.; CASAIS, M.D.C.; MEJUTO, M.D.C.; CELA, R. Combination of off-line solid-phase extraction and on-column sample stacking for sensitive determination of parabens and p-hydroxybenzoic acid in waters by non-aqueous capillary electrophoresis. **Analytica Chimica Acta**, v. 647, n. 1, p. 104-111, 2009.

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

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. Resolução nº. 27 de 17 de maio de 2012. **Diário Oficial da União**, Brasília, 22 de maio de 2012. Seção 5, p. 7.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. Resolução nº 29 de 01 de junho de 2012. **Diário Oficial da União**, Brasília, 21 de agosto de 2006. Seção 1, p. 5.

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.

BUNDY, F. P. Direct conversion of graphite to diamond in static pressure apparatus. **Journal of Chemical Physics**, v. 137, n. 3535, p. 1057-1058, 1962.

CAETANO, J.; MACHADO, S.A.S. Determination of carbaryl in tomato “in natura” using an amperometric biosensor based on the inhibition of acetylcholinesterase activity. **Sensors and Actuators B**, v. 129, p. 40–46, 2008.

CANOSA, P.; PÉREZ-PALACIOS, D.; GARRIDO-LÓPEZ, A.; TENA, M.T.; RODRÍGUEZ, I.; RUBÍ, E.; CELA, R. Pressurized liquid extraction with in-cell clean-up followed by gas chromatography–tandem mass spectrometry for the selective determination of parabens and triclosan in indoor dust. **Journal of Chromatography A**, v. 1161, n. 1-2, p. 105-112, 2007.

CARMONA, E.; ANDREU, V.; PICÓ, Y. Occurrence of acidic pharmaceuticals and personal care products in Turia River Basin: from waste to drinking water. **Science of The Total Environment**, v. 484, p. 53-63, 2014.

CASHMAN, A.L.; WARSHAW, E.M. Parabens: a review of epidemiology, structure, allergenicity, and hormonal properties. **Dermatitis**, v. 16, n. 2, p. 57–66, 2005.

CODOGNATO, L.; TANIMOTO, S.T.; PEDROSA, V.A.; SUFFREDINI, H.B.; MACHADO, S.A.S.; AVACA, L.A. Electroanalytical determination of carbaryl in natural waters on boron doped diamond electrode. **Electroanalysis**, v. 18, n. 3, p. 253-258, 2006.

CODOGNATO, L.; ZUIN, V.; DE SOUZA, D.; YARIWAKE, J. H.; MACHADO, S.A. S.; AVACA, L.A. Electroanalytical and chromatographic determination of pentachlorophenol and related molecules in a contaminated soil: a real case example. **Microchemical Journal**, v. 77, n. 2, p. 177-184, 2004.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas: Editora da UNICAMP, 2006. 456 p.

COOPER, J.B.; PANG, S.; ALBIN, S.; ZHENG, J.L.; JOHNSON, R.M. Fabrication of boron-doped CVD diamond microelectrodes. **Analytical Chemistry**, v. 70, n. 3, p. 464–467, 1998.

CVACKA, J.; QUAISEROVA, V.; PARK, J.; SHOW, J.; MUCK, A.; SWAIN, G.M. Boron-doped diamond microelectrodes for use in capillary electrophoresis with electrochemical detection. **Analytical Chemistry**, v. 75, p. 2678–2687, 2003.

DARBRE, P.D. Underarm cosmetics and breast cancer. **Journal of Applied Toxicology**, v. 23, p. 89-95, 2003.

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

DARBRE, P.D.; HARVEY, P.W. Paraben esters: review of recent studies of endocrine toxicity, absorption, esterase and human exposure, and discussion of potential human health risks. **Journal of Applied Toxicology**, v. 28, n. 5, p. 561–578, 2008.

DOBBINS, L.L.; USENKO, S.; BRAIN, R.A.; BROOKS, B.W. Probabilistic ecological hazard assessment of parabens using *Daphnia magna* and *Pimephales promelas*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 28, n. 12, 2744–2753, 2009.

DOGAN, B.; TUNCEL, S.; USLU, B.; OZKAN, S.A. Selective electrochemical behavior of highly conductive boron-doped diamond electrodes for fluvastatin sodium oxidation. **Diamond and Related Materials**, v. 16, p. 1695–1704, 2007.

DORNELLAS, R.M.; FRANCHINI, R.A.A.; SILVA, A.R.; MATOS, R.C.; AUCELIO, R.Q. Determination of the fungicide kresoxim-methyl in grape juices using square-wave voltammetry and a boron-doped diamond electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 708, p. 46–53, 2013.

ERIKSSON, E.; ANDERSEN, H.R.; LEDIN, A. Substance flow analysis of parabens in Denmark complemented with a survey of presence and frequency in various commodities. **Journal of Hazardous Materials**, v. 156, n. 1, p. 240–259, 2008.

EUROPEAN COMMISSION. **The Council Directive 76/768/EC**. 1976. Disponível em: <<http://ec.europa.eu/consumers/sectors/cosmetics/documents/directive/>> Acesso em: 11 abr. 2014.

FERREIRA, A.M.C.; MÖDER, M.; LAESPADA, M.E.F. GC-MS determination of parabens, triclosan and methyl triclosan in water by in situ derivatisation and stir-bar sorptive extraction. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 399, n. 2, p. 945–953, 2011.

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

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

GREGORY, A.L.; MARK, E.P. Seasonal variations in concentrations of pharmaceuticals and personal care products in drinking water and reclaimed wastewater in southern California. **Environmental Science & Technology**, v. 40, n. 3, p. 687–695, 2006.

GUO, R.; SIM, W.-J.; LEE, E.-S.; LEE, J.-H.; OH, J.-E. Evaluation of the fate of perfluoroalkyl compounds in wastewater treatment plants. **Water Research**, v. 44, n. 11, p. 3476–3486, 2010.

GUO, Y.; KANNAN, K. A survey of phthalates and parabens in personal care products from the United States and its implications for human exposure. **Environmental Science & Technology**, v. 47, n. 24, p. 14442-14449, 2013.

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

HASANZADEH, M.; SHADJOU, N.; SAGHATFOROUSH, L.; MEHDIZADEH, R.; SANATI, S. Electrocatalytic oxidation of selected parabens on zinc hydroxide nanoparticles. **Catalysis Communications**, v. 19, p. 10, 2012.

HINESA, E.P.; MENDOLAB, P.; VONEHRENSTEINC, O.S; YED, X.; CALAFATD, A.M.; FENTONE, S.E. Concentrations of environmental phenols and parabens in milk, urine and serum of lactating North Carolina women. **Reproductive Toxicology**, 2014. In press.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO). **Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos**. DOQ-CGCRE-008 – Revisão 04 – Jul/2011. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/organismos/doc_organismos.asp?tOrgtOrgan=CalibEnsaio> Acesso em: 24 abr. 2015.

JANJUA, N.R.; MORTENSEN, G.K.; ANDERSSON, A.M.; KONGSHOJ, B.; SKAKKEBAEK, N.E.; WULF, H.C. Systemic uptake of diethyl phthalate, dibutyl phthalate, and butyl paraben following wholebody topical application and reproductive and thyroid hormone levels in humans. **Environmental Science & Technology**, v. 41, n. 15, p. 5564–5570, 2007.

JOLLEY, S.; KOPPANG, M.; JACKSON, T.; SWAIN, G.M. Flow injection analysis with diamond thin-film detectors. **Analytical Chemistry**, v. 69, p. 4099–4107, 1997.

JONKERS, N.; SOUSA, A.; GALANTE-OLIVEIRA, S.; BARROSO, C.M.; KOHLER, H.-P.; GIGER, W. 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.

KASPRZYK-HORDERN, B.; DINSDALE, R.M.; GUWY, A.J. The occurrence of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs in surface water in South Wales, UK. **Water Research**, v. 42, n. 13, p. 3498–3518, 2008.

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

LEAL, L.H.; VIENO, N.; TEMMINK, H.; ZEEMAN, G.; BUISMAN, C.J.N. Occurrence of Xenobiotics in Gray water and removal in three biological treatment systems. **Environmental Science & Technology**, v. 44, n. 17, p. 6835-6842, 2010.

LEE, H.-B.; PEART, T.E.; SVOBODA, M.L. Determination of endocrine-disrupting phenols, acidic pharmaceuticals, and personal-care products in sewage by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1094, n. 1-2, p. 122–129, 2005.

LI, W.; SUN, Y.; JOSEPH, J.; FITZLOFF, J.F.; FONG, H.H.S.; BREEMEN, R.B. p-Hydroxybenzoic acid alkyl esters in *Andrographis paniculata* herbs, commercial extracts, and formulated products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 2, p. 524–529, 2003.

LINTELMANN, J.; KATAYAMA, A.; KURIHARA, N.; SHORE, L.; WENZEL, A. Endocrine disruptors in the environment (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 75, n. 5, p. 631–681, 2003.

LOURENÇÃO, B.C.; MEDEIROS, R.A.; ROCHA-FILHO, R.C; MAZO, L.H.; FATIBELLO-FILHO, O. Simultaneous voltammetric determination of paracetamol and caffeine in pharmaceutical formulations using a boron-doped diamond electrode. **Talanta**, v. 78, n. 3, p. 748-752, 2009.

ŁUKASIEWICZ, K.M.; TARASIEWICZ, H.P.; NIEDZIELKO, A. Electrooxidation of some antifungal agents and their square-wave voltammetric determination in cosmetics and pharmaceuticals. **Analytical Letters**, v. 44, n. 6, p. 955-967, 2011.

MACKAY, D.; BARNTHOUSE, L. Integrated risk assessment of household chemicals and consumer products: addressing concern about triclosan. **Integrated Environmental Assessment and Management**, v. 6, n. 3, p. 390–392, 2010.

MADSEN, T.; BOYD, H.B.; NYLEN, D.; PEDERSEN, A.R.; PETERSEN, G.I.; SIMONSEN, F. Environmental and health assessment of substances in household detergents and cosmetic detergent products. **Environmental Project**, n. 615, p. 240, 2001.

MARTINS, I.; CARREIRA, F.C.; CANAES, L.S.; CAMPOS JUNIOR, F.A.S.; CRUZ, L.M.S.; RATH, S. Determination of parabens in shampoo using high performance liquid chromatography with amperometric detection on a boron-doped diamond electrode. **Talanta**, v. 85, n. 1, p. 1-7, 2011.

MASHAYEKHI, S.O.; GHANFOROUSH-SATTARI, M.; HAIN, R.D.W. Rapid and sensitive quantitation of morphine using HPLC with electrochemical detection. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 33, n. 4, p. 419-427, 2008.

MILLER, J.N.; MILLER, J.C. **Statistics and chemometrics for analytical chemistry**. 5th ed. Harlow: Prentice Hall, 2005. 268 p.

MORAES, F.C.; TANIMOTO, S.T.; SALAZAR-BANDA, G.R.; MACHADO, S.A.S.; MASCARO, L.H. A. New indirect electroanalytical method to monitor the contamination of natural waters with 4-nitrophenol using multiwall carbon nanotubes. **Electroanalysis**, v. 21, n. 9, p. 1091–1098, 2009.

MOTHEO, A.J.; STETER, J.R.; ROCHA, R.S.; DIONÍSIO, D.; LANZA, M.R.V. Electrochemical oxidation route of methyl paraben on a boron-doped diamond anode. **Electrochimica Acta**, v. 117, p. 127–133, 2014.

NOGUEIRA, J. M. F. Desreguladores endócrinos: efeitos adversos e estratégias para monitorização dos sistemas aquáticos. **Química**, n. 88, p. 65-71, 2003.

NÚÑEZ, L.; TADEO, J.L.; GARCÍA-VALCÁRCEL, A.I.; TURIEL, E. Determination of parabens in environmental solid samples by ultrasonic-assisted extraction and liquid chromatography with triple quadrupole mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1214, n. 1-2, p. 178 -182, 2008.

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

OISHI, S. Effects of propyl paraben on the male reproductive system. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, n. 12, p. 1807-1813, 2002.

OLIVEIRA, R.T.S.; SALAZAR-BANDA, G.R.; FERREIRA, V.S.; OLIVEIRA, S.C.; AVACA, L.A. Electroanalytical determination of lidocaine in pharmaceutical preparations using boron-doped diamond electrodes. **Electroanalysis**, v. 19, n. 11, p. 1189-1194, 2007.

OLIVEIRA, R.T.S.; SALAZAR-BANDA, G.R.; MACHADO, S.A.S.; AVACA, L.A. Electroanalytical determination of n-nitrosamines in aqueous solution using a boron-doped diamond electrode. **Electroanalysis**, v. 20, n. 4, p. 396-401, 2008.

PECK, A.M. Analytical methods for the determination of persistent ingredients of personal care products in environmental matrices. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 386, n. 4, p. 907–939, 2006.

PENG, X.; ADACHI, K.; CHEN, C.; KASAI, H.; KANO, K.; SHIZURI, Y.; MISAWA, N. Discovery of a marine bacterium producing 4-hydroxybenzoate and its alkyl esters, parabens. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 8, p. 5556–5561, 2006.

PETERSEN, G.I.; RASMUSSEN, D.; GUSTAVSON, K. **Study on enhancing the endocrine disrupter priority list with a focus on low production volume chemicals**. Disponível em: <http://ec.europa.eu/environment/chemicals/endocrine/pdf/final_report_2007.pdf> Acesso em: 12 mar. 2015.

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

PIETROGRANDE, M.C.; BASAGLIA, G. GC-MS analytical methods for the determination of personal-care products in water matrices. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 11, p. 1086-1094, 2007.

PINHO, G.P.; SILVÉRIO, F.O.; NEVES, A.A.; QUEIROZ, M.E.L.R.; STARLING, M.A.V.M. Influência dos constituintes químicos dos extratos de diferentes matrizes na resposta cromatográfica de agrotóxicos. **Química Nova**, v. 33, n. 4, p. 909-913, 2010.

POUILLOT, A.; POLLA, B.S.; POLLA, A.S. Conservateurs en cosmetology mise au point sur les parabenes. **Journal of Médecine Esthétique et de Chirurgie Dermatologique**, v. 33, n. 131, p. 187-190, 2006.

RADOVAN, C.; CINGHITĂ, D.; MANEA, F.; MINCEA, M.; COFAN, C.; OSTAFE, V. Electrochemical sensing and assessment of parabens in hydro-alcoholic solutions and water using a boron-doped diamond electrode. **Sensors**, v. 8, n. 7, p. 4330-4349, 2008.

RAMESHAM, R.; ASKEW, R.F.; ROSE, M.F.; LOO, B.H. Growth of polycrystalline diamond over glassy-carbon and graphite electrode materials. **Journal of the Electrochemical Society**, v. 140, n. 10, p. 3018-3020, 1993.

REBBECK, C.; HAMMOND, R.; WONG, J.; NAIR, L.; RAGHAVA, N. Solid-phase extraction and HPLC analysis of methylparaben and propylparaben in a concentrated antibiotic suspension. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 32, n. 9, p. 1095-1102, 2006.

RIBEIRO, F. A. L.; FERREIRA, M. M. C.; MORANO, S. C.; DA SILVA, L. R.; SCHNEIDER, R. P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 164-171, 2008.

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

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

SAAD, B.; BARI, M.F.; SALEH, M.I.; AHMAD, K.; TALIB, M.K.M. Simultaneous determination of preservatives (benzoic acid, sorbic acid, methylparaben and propylparaben) in foodstuffs using high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1073, n. 1-2, p. 393-397, 2005.

SALAZAR-BANDA, G.R.; EGUILUZ, K.I.B.; AVACA, L.A. Boron-doped diamond powder as catalyst support for fuel cell applications. **Electrochemistry Communications**, v. 9, n. 1, p. 59-64, 2007.

SALAZAR-BANDA, G.R.; SUFFREDINI, H.B.; CALEGARO, M.L.; TANIMOTO, S.T.; AVACA, L.A. Sol-gel-modified boron-doped diamond surfaces for methanol and ethanol electro-oxidation in acid medium. **Journal of Power Sources**, v. 162, n. 1, p. 9-20, 2006.

SARAJI, M.; MIRMAHDIEH, S. Single-drop microextraction followed by in-syringe derivatization and GC-MS detection for the determination of parabens in water and cosmetic products. **Journal of Separation Science**, v. 32, n. 7, p. 988-995, 2009.

SHEN, H.Y.; JIANG, H.L.; MAO, H.L.; PAN, G.; ZHOU, L.; CAO, Y.F. Simultaneous determination of seven phthalates and four parabens in cosmetic products using HPLC-DAD and GC-MS methods. **Journal of Separation Science**, v. 30, n. 1, p. 48-54, 2007.

SHIN, D.C.; SARADA, B.V.; TRYK, D.A.; FUJISHIMA, A.; WANG, J. Application of diamond microelectrodes for end-column electrochemical detection in capillary electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 75, p. 530-534, 2003.

SILLERO, I.M.; HERRADOR, E.A.; CÁRDENAS, S.; VALCÁRCEL, M. Determination of parabens in cosmetic products using multi-walled carbon nanotubes as solid phase extraction sorbent and corona-charged aerosol detection system. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 1, p. 1-6, 2010.

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.

SOUZA, D.; MACHADO, S.A.S.; AVANCA, L.A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 81-89, 2003.

SOUZA, C.D.; BRAGA, O.C.; VIEIRA, I.C.; SPINELLI, A. Electroanalytical determination of sulfadiazine and sulfamethoxazole in pharmaceuticals using a boron-doped diamond electrode. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 135, n. 1, p. 66-73, 2008.

STETER, J.R.; DIONISIO, D.; LANZA, M.R.V.; MOTHEO, A.J. Electrochemical and sonoelectrochemical processes applied to the degradation of the endocrine disruptor methyl paraben. **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 44, n. 12, p. 1317-1325, 2014.

ŠVORCA, L.; SOCHRA, J.; TOMCIK, P.; RIEVAJA, M.; BUSTINA, D. Simultaneous determination of paracetamol and penicillin V by square-wave voltammetry at a bare boron-doped diamond electrode. **Electrochimica Acta**, v. 68, p. 227–234, 2012.

SWAIN, G.M.; RAMESHAM, R. The electrochemical activity of boron-doped polycrystalline diamond thin-film electrodes. **Analytical Chemistry**, v. 65, n. 4, p. 345–351, 1993.

TENNE, R.; PATEL, K.; HASHIMOTO, K.; FUJISHIMA, A. Efficient electrochemical reduction of nitrate to ammonia using conductive diamond film electrodes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 347, n. 1-2, p. 409–415, 1993.

UYSAL, U.D.; GURAY, U.D.T. Determination of parabens in pharmaceutical and cosmetic products by capillary electrophoresis. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 63, n. 10, p. 982–986, 2008.

WANG, Y.; CAO, Y.; FANG, C.; GONG, Q. Electrochemical sensor for parabens based on molecular imprinting polymers with dual-templates. **Analytica Chimica Acta**, v. 673, n. 2, p. 145–150, 2010.