

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS
Departamento de Química e Física Molecular
Laboratório de Cromatografia**

Renato Grigolon Capelo

**MICROEXTRAÇÃO EM GOTA ÚNICA (SDME) DE PARABENOS
PROVENIENTES DE AMOSTRA DE ESGOTO**

São Carlos

2017

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS
Departamento de Química e Física Molecular
Laboratório de Cromatografia**

Renato Grigolon Capelo

**MICROEXTRAÇÃO EM GOTAS ÚNICAS (SDME) DE PARABENOS
PROVENIENTES DE AMOSTRA DE ESGOTO**

Monografia apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, para fins de conclusão do curso de Bacharelado em Química.

Orientador: Prof. Dr. Álvaro José dos Santos Neto

São Carlos

2017

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Mauro e Cida, e ao meu irmão, Rafael, por todo esforço, carinho e incentivo nestes anos de graduação.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Mauro e Cida, que não mediram esforços para que eu chegasse até aqui.

Ao meu irmão, Rafael, por sempre incentivar e torcer por mim.

Ao Prof. Dr. Álvaro José dos Santos Neto pela orientação nestes últimos meses.

Ao Doutorando Luiz Felipe Cabal e aos colegas do Grupo de Cromatografia pela grande ajuda neste trabalho.

À Atlética CAASO e ao Futebol CAASO pelos bons momentos que me proporcionaram e por terem me tornado a pessoa que sou hoje.

À minha namorada, Maria Clara, aos meus amigos e à República 29 por me fazerem sentir em casa mesmo longe de casa.

RESUMO

O aumento do uso de conservantes nos últimos anos tem causado graves problemas ambientais. Um grupo de moléculas importantes na constituição dos conservantes são os parabenos, grupo que tem como característica o seu grande potencial de ação antimicrobiana. O uso excessivo desta classe de compostos em produtos cosméticos e alimentícios, traz como consequência a contaminação de águas residuárias. Devido à complexidade dessas matrizes ambientais, a extração e detecção desses contaminantes fica comprometida, exigindo o emprego de técnicas de preparo de amostra para que estes compostos de interesse sejam passíveis de análise. Procedimentos tradicionais como a extração líquido-líquido (LLE) e a extração em fase sólida (SPE) são amplamente utilizados para esta finalidade, entretanto, ambas demandam um grande consumo de solvente durante o procedimento e, por isso, não são técnicas que estão de acordo com os princípios da química verde. Introduzindo uma solução para este problema, o presente trabalho apresenta o desenvolvimento do método automatizado de microextração em gota única (SDME) para extração e detecção de parabenos provindos de águas residuárias. O método pode ser aplicado para a detecção de até $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de parabenos, apenas utilizando a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) com detecção UV-vis. Destaca-se que, para realização de uma extração dos compostos, utiliza-se apenas $300 \mu\text{L}$ de solvente orgânico. Assim, a técnica se encaixa na tendência científica da química verde, reduzindo a geração de resíduos durante a realização das análises. De forma geral, o método mostrou-se reproduzível e com potencial à aplicação de diferentes tipos de matrizes.

Palavras-chave: Microextração em gota única, parabenos, cromatográfica líquida, química verde.

ABSTRACT

The increased use of preservatives in the past years has caused several environmental issues. An important group of preservatives are the parabens. This main characteristic of this group its huge antimicrobial potential. The excessive use of this compounds in cosmetics and food products can bring as a consequence the contamination of wastewater caused by parabens. Due to the complexity of this environmental matrix, the extraction and detection of the contaminants get compromised, requiring the use of sample preparation techniques so that preservatives of interest may be possible of analysis. Traditional procedures such as liquid-liquid extraction (LLE) and solid phase extraction (SPE) are widely used, however, both of them demand huge consume of solvent during the procedure and as a consequence, they are not techniques that are in accordance with the principles of green chemistry. Introducing a solution for this problem, the present work presents the development of the automated single drop micro-extraction (SDME) for the extraction and detection of parabens coming from wastewater. The method can be applied to a detection of up to $100 \mu\text{g L}^{-1}$ of parabens, using only the technique of high performance liquid chromatography (HPLC) with UV-vis detection. It is noted that, for the aim of compound extraction, it was consumed only $300 \mu\text{L}$ of organic solvent. Therefore, the technique fits the scientific trends of green chemistry, reducing the waste during the analysis. In general, the method has shown to be reproducible and has potential to be applied for different types of matrices.

Keywords: single drop micro-extraction, parabens, liquid chromatography, green chemistry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Cromatogramas de análise por HPLC utilizando como fase móvel a mistura metanol/acetato de etila (80:20): A) 40%; B) 60%.	19
Figura 2 - Cromatogramas de análise por HPLC utilizando 25% de acetonitrila na fase móvel	20
Figura 3 – Cromatogramas de análise por HPLC utilizando 35% de acetonitrila na fase móvel	20
Figura 4 - Cromatogramas de análise por HPLC utilizando 45% de acetonitrila na fase móvel	21
Figura 5 - Comparação dos tempos de retenção obtidos para cada percentual de acetonitrila (ACN) na fase móvel	22
Figura 6 - Cromatogramas das extrações realizadas com: A) 20 ciclos; B) 25 ciclos; C) 35 ciclos; D) 45 ciclos	23
Figura 7 - Cromatogramas das amostras ressuspendidas em 100 µL de água.....	25
Figura 8 - Cromatogramas das amostras ressuspendidas em 200 µL de água	25
Figura 9 – Comparação dos valores de área obtidos nos cromatogramas das amostras ressuspendidas em 100 µL e 200 µL de água, com os respectivos desvios padrões	26
Figura 10 - Cromatogramas das amostras ressuspendidas em 200 µL de solução 5% de acetonitrila em água	27
Figura 11 – Comparação dos valores de área obtidos nos cromatogramas das amostras ressuspendidas em 200 µL de água e solução 5% de acetonitrila, com os respectivos desvios padrões	27
Figura 12 - Cromatogramas das amostras extraídas em matriz de esgoto <i>labmade</i> ..	28
Figura 13 - Cromatogramas das amostras extraídas em matriz de amostra de águas residuárias	29
Figura 14 - Cromatogramas das amostras extraídas em matriz de água	30

Figura 15 – Comparação dos valores dos tempos de retenção para os diferentes tipos de matriz 31

Figura 16 – Comparação dos valores das áreas dos picos para os diferentes tipos de matriz 31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Propriedades dos principais parabenos utilizados como conservantes.. 15

Tabela 2 – Composição do esgoto *labmade*. 18

Tabela 3 – Valores de Tempo de Retenção (TR) obtidos das análises por HPLC com 25% de acetonitrila na fase móvel 20

Tabela 4 - Valores de Tempo de Retenção (TR) obtidos das análises por HPLC com 35% de acetonitrila na fase móvel 21

Tabela 5 - Valores de Tempo de Retenção (TR) obtidos das análises por HPLC com 45% de acetonitrila na fase móvel 21

Tabela 6 - Parâmetros ótimos do software Arduino para a extração de parabenos. 24

Tabela 7 – Valores de Tempo de Retenção (TR) e Área (A) obtidos dos cromatogramas das amostras ressuspendidas em 100 µL de água 25

Tabela 8 – Valores de Tempo de Retenção (TR) e Área (A) obtidos dos cromatogramas das amostras ressuspendidas em 200 µL de água 25

Tabela 9 – Valores de Tempo de Retenção (TR) e Área (A) obtidos dos cromatogramas das amostras ressuspendidas em 200 µL de solução 5% de acetonitrila em água 27

Tabela 10 - Valores de Tempo de Retenção (TR) e Área (A) obtidos dos cromatogramas das amostras extraídas em matriz de esgoto *labmade* 29

Tabela 11 - Valores de Tempo de Retenção (TR) e Áreas (A) obtidos dos cromatogramas das amostras extraídas em matriz de amos tra de águas residuárias..... 29

Tabela 12 - Valores de Tempo de Retenção (TR) e Áreas (A) obtidos dos cromatogramas das amostras extraídas em matriz de água 30

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 Parâmetros da SDME	12
1.2 Formas de extração da SDME	13
1.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	13
1.4 Parabenos.....	14
2. OBJETIVOS	16
2.1 Objetivos Gerais	16
2.2 Objetivos Específicos	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1 Reagentes e Soluções	17
3.2 Otimização dos parâmetros da análise por HPLC	17
3.3 Preparo da amostra	17
3.4 Extração por SDME	18
3.5 Secagem e Resuspensão	18
3.6 Estudo do efeito de matriz na extração por SDME	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
4.1 Otimização dos parâmetros da análise por HPLC	19
4.2 Otimização dos parâmetros para a extração por SDME	23
4.3 Otimização das condições de resuspensão dos analitos	24
4.4 Estudo do efeito de matriz na extração por SDME	28
5. CONCLUSÃO	32
6. PERSPECTIVAS FUTURAS	32
7. REFERÊNCIAS	33

1. INTRODUÇÃO

Para emprego da maioria das técnicas analíticas, se faz necessário realizar preparo das amostras como etapa preliminar a análise. Isso se dá quando a amostra, em sua forma bruta, não é passível de ser analisada, tanto pelo fator concentração do analito ou pela natureza complexa da matriz. A amostra também pode não ser compatível com a técnica instrumental empregada, quer seja pela presença componentes que possam interferir no resultado da análise ou até mesmo por serem danosos ao equipamento. Essa etapa prévia, em geral, tem como grande objetivo realizar a pré-concentração da amostra e extrair dela as substâncias de interesse. Como o preparo da amostra corresponde a uma parte considerável do tempo total da análise e demanda um grande consumo de recursos (CHEN et al., 2008), pode-se dizer que esta é uma etapa determinante para a obtenção de resultados confiáveis, além de maximizar o aproveitamento do tempo e diminuir os custos da análise. (PINTO; PEDROSO, 2016)

Para análises cromatográficas, tanto em fase líquida (HPLC) quanto gasosa (GC), o preparo de amostras é normalmente realizado por um número elevado de técnicas amplamente difundidas na análise instrumental. As mais utilizadas, porém, são a extração líquido-líquido (LLE) e a extração em fase sólida (SPE). (LANÇAS, 2008) A LLE clássica é uma técnica constituída de muitas etapas, logo, demanda um tempo considerável para a realização do procedimento e, além disso, faz uso de um volume significativo de solvente orgânico, resultando em grandes quantidades de resíduos (ARTHUR; PAWLISZYN, 1990). Já a SPE, apesar de superar limitações da LLE e ser uma técnica amplamente utilizada, possui desvantagens significativas, como a necessidade de cartuchos e acessórios, que acarreta em um custo adicional ao processo. (PSILLAKIS; KALOGERAKIS, 2002)

Com o intuito de solucionar tais problemas, muitos pesquisadores têm desenvolvido técnicas sofisticadas de preparo de amostras, buscando diminuir o consumo de solventes e a obter resultados em tempos cada vez menores. As chamadas microextrações, que são essencialmente técnicas miniaturizadas baseadas nas extrações por LLE e SPE, começaram a ser desenvolvidas e aplicadas em diversas pesquisas e apresentaram algumas vantagens em relação às técnicas tradicionais. Estando em acordo com os princípios da Química Verde e permitindo ao analista um maior grau de automação, que resultam na redução de

erros durante o preparo da amostra, as microextrações contribuíram para o desenvolvimento das análises cromatográficas. (KOKOSA, 2013)

A microextração em fase sólida (SPME) e microextração em fase líquida (LPME ou LLME) são as técnicas miniaturizadas mais comuns. A LPME possui três principais variações que são utilizadas dependendo da forma na qual a fase líquida extratora se encontra (MARTINS et al., 2012). A primeira delas, a microextração com fibras ocas (HF-LPME), utiliza-se de fibras que possuem muitos poros, os quais são preenchidos e imobilizam um solvente orgânico imiscível em água. A segunda variação é a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME). Nesta, a fase extratora é imiscível com a amostra e dispersa em solução aquosa. Para isso, necessita-se do auxílio de um solvente dispersivo e, então, o sistema passa por uma centrifugação e o solvente extrator é separado da amostra. Finalmente, temos a terceira e mais comum variação da LPME: a microextração em gota única (SDME). Esta técnica possui um solvente extrator imiscível com a amostra, do qual apenas uma única gota é exposta e colocada em contato com a amostra. Essa única gota é a responsável por realizar a extração dos componentes de interesse presentes na amostra. (HU et al., 2013)

A SDME surgiu com a extração de compostos orgânicos presentes em água. O processo de extração se deu através de uma gota de n-octano de 8 µL suspensa no final de um tubo Teflon imerso na solução aquosa. Após certo tempo de contato entre as fases, uma alíquota da gota de solvente contido no interior do tubo foi amostrada com auxílio de uma microseringa e injetada em um GC. A SDME revelou-se rápida e simples e com baixo consumo de solvente orgânico (PINTO; PEDROSO, 2016). Pesquisas posteriores desenvolveram a técnica utilizando a gota do solvente extrator suspensa na ponta de uma microseringa para GC. (HE; LEE, 1997) Durante a extração, a amostra ficou contida em um frasco com tampa com septo de silicone. O septo da tampa era, então, perfurado pela agulha da microseringa e a ponta da agulha imersa na amostra. Lentamente, a gota era exposta na ponta da agulha da microseringa, entrando em contato com a amostra por determinado tempo. Posteriormente, a gota era retraída para dentro da microseringa e introduzida diretamente no injetor do GC. Essa forma mostrou-se vantajosa, minimizando o tempo e problemas de diluição e contaminação do extrato, pois extração e injeção

são realizadas com a mesma microseringa, sem necessidade de etapas intermediárias.

1.1 Parâmetros da SDME

Alguns parâmetros são determinantes para a realização de uma microextração com gota única. Resumidamente, os parâmetros mais influentes para alcançar a otimização de uma extração por SDME são a escolha do solvente extrator, volume da gota, tempo de extração, velocidade de agitação, temperatura e adição de sal. (LÓPEZ-BLANCO et al., 2005)

Conforme esperado, os compostos de interesse devem possuir grau elevado de solubilidade no solvente utilizado para extraí-los. Em contrapartida, o solvente deve ser imiscível em água, uma vez que as amostras brutas são, em geral, soluções aquosas. (KOKOSA, 2013)

O volume da gota extratora interfere na eficiência da extração. Uma gota maior possui maior área superficial e, consequentemente, sua estabilidade fica comprometida. Desta forma, o tempo de exposição e a velocidade de agitação devem ser ajustados a fim de permitir a estabilidade da gota durante todo o processo de extração. (KOKOSA, 2015)

Tempo de extração e velocidade de agitação possuem relação de dependência direta, uma vez que com uma agitação mais intensa, o tempo para atingir o equilíbrio termodinâmico é reduzido. Apesar de a transferência de massa depender do tempo de extração, a taxa de transferência diminui à medida que as concentrações nas duas fases se aproximam do equilíbrio. Assim, a velocidade da agitação, acelera o estágio de equilíbrio entre as fases e diminui o tempo total de extração. (JEANNOT; CANTWELL, 1997; ZHANG et al., 2008)

A temperatura da extração, por sua vez, altera a constante termodinâmica e, portanto, também afeta o equilíbrio entre as fases. Entretanto, não se pode dizer que o aumento sempre favorece a extração. Na SDME um aumento na temperatura, muitas vezes, acarreta na dissolução da gota extratora na amostra. Desta forma, o aumento da temperatura influencia na reproduzibilidade da técnica e raramente é utilizada na SDME.

Por fim, a adição de sais na solução aquosa também pode ser utilizada em extrações deste tipo, pois este parâmetro altera a solubilidade dos analitos através do aumento ou diminuição da força iônica da solução. Porém, a adição de sais também pode provocar o aumento da viscosidade e, desta forma, reduzir a taxa de difusão dos analitos na fase aquosa. (PINTO; PEDROSO, 2016)

1.2. Formas de extração da SDME

A microextração em gota única pode ser subdividida quanto a forma de extração através da constituição do sistema apresentar-se com duas ou três fases. Em extrações nas quais a gota de solvente extrator se encontra imersa na solução aquosa contendo os analitos de interesse, o sistema é considerado bifásico. Já quando não ocorre o contato direto entre a gota e a amostra, considera-se a existência de uma terceira fase, podendo esta ser um segundo solvente ou um *headspace*, um espaço entre gota e amostra no qual os compostos a serem extraídos devem volatilizar para entrarem em contato com o solvente extrator.

Nesta última modalidade, sem o contato entre solvente extrator e amostra, a interferência de demais componentes da matriz é minimizada, entretanto, se faz necessário que os analitos de interesse possuam volatilidade considerável. Já em sistemas bifásicos, para que seja possível realizar este tipo de extração, o solvente deve ser imiscível na amostra (que normalmente encontra-se em meio aquoso) e, em geral, os analitos neutros, apolares e com baixa volatilidade. (JEANNOT; PRZYJAZNY; KOKOSA, 2010)

1.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é uma técnica de separação empregada em muitos métodos analíticos para a realização de determinações qualitativas ou quantitativas.

O processo cromatográfico consiste na partição dos componentes de uma mistura entre a fase móvel e a fase estacionária. No caso da cromatografia líquida o fluido é um solvente e a fase estacionária é constituída de partículas sólidas empacotadas em uma coluna, através da qual flui a fase móvel. As interações

químicas e físicas que atuam entre os solutos e as duas fases são responsáveis pela retenção dos solutos na coluna cromatográfica. (CIOLA, 1998)

Na HPLC utiliza-se uma coluna fechada, a qual pode realizar centenas de análises e possui grande eficiência. Entretanto, essas colunas oferecem uma grande resistência à vazão da fase móvel e, desta forma, se faz necessário o emprego de sistemas de bomba de alta pressão (até 400 bars) que realizam a migração da fase móvel através da coluna. A vazão da fase móvel é controlada na HPLC, resultando em análises mais precisas, uma vez que a reproduzibilidade de seus parâmetros de análise é facilitada.

Quanto aos detectores, vários tipos podem ser empregados na saída da coluna. Estes proporcionam identificação e quantificação continua dos componentes da amostra, através do tempo de retenção dos mesmos na coluna e da intensidade do sinal gerado no detector. Porém, dependendo do detector utilizado, é possível determinar quantidades menores dos analitos de interesse. O detector mais empregado nesta técnica é o UV-vis, que apresenta boa eficiência e facilidade operacional, entretanto, o espectrômetro de massas é o detector com menor limite de detecção, mas que muitas vezes é preferido devido ao alto custo envolvido na técnica.

Dentre as aplicações da cromatografia líquida de alta eficiência, pode-se destacar seu uso na indústria farmacêutica e na área ambiental. Entretanto, sua utilização não fica restrita à estas duas aplicações, já que, segundo estimativas, cerca de 90% dos laboratórios de análise fazem uso da HPLC.

1.4 Parabenos

No presente trabalho, as moléculas de interesse a serem extraídas pela técnica SDME são ésteres de alquil do ácido parahidroxibenzóico, comumente conhecidos como parabenos. Os parabenos são amplamente utilizados como conservantes nos mais variados tipos de produtos, como cosméticos, fármacos, alimentos e bebidas. Estruturalmente, os parabenos possuem um anel benzênico com grupos hidroxila e éster em posição para. Os compostos diferem quanto à

cadeia alquílica, sendo as formas mais comuns metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno, butilparabeno e benzilparabeno. (MACHADO, 2010)

Os parabenos possuem certo grau de solubilidade em água, sendo o metilparabeno o composto mais solúvel, entretanto, possuem maior solubilidade em solventes orgânicos, sendo os compostos de cadeia com maior número de carbonos os mais lipossolúveis. (DERISSO, 2017) Outras características desta classe de compostos podem ser observadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Propriedades dos principais parabenos utilizados como conservantes.

	Metilparabeno	Etilparabeno	Propilparabeno	Butilparabeno	Benzilparabeno
Fórmula Estrutural					
Fórmula Molecular	C ₈ H ₈ O ₃	C ₉ H ₉ O ₃	C ₁₀ H ₁₂ O ₃	C ₁₁ H ₁₄ O ₃	C ₁₄ H ₁₂ O ₃
Massa molecular (g mol⁻¹)	152,16	166,18	180,21	194,23	228,25
Coeficiente de partição octanol-agua (log K_{ow})	1,66	2,19	2,71	3,24	3,56
pK_a	8,17	8,22	8,35	8,37	-
Solubilidade em água a 25 °C (mg L⁻¹)	2500	885	500	207	50

Fonte: HAMAN et al., 2015 e BŁĘDZKA; GROMADZIŃSKA; WĄSOWICZ, 2014.

Os parabenos são utilizados como conservantes por conta de seu elevado potencial antimicrobiano. Esta característica se deve pela presença do grupo éster no anel benzílico e a ação antimicrobiana é diretamente proporcional ao número de

grupos ésteres na cadeia carbônica. Entretanto, a existência deste grupo também implica em diminuição da solubilidade em água, causando complicações no uso dos parabenos em determinadas aplicações. (PIAO; CHEN; WANG, 2014)

Pesquisas recentes têm investigado efeitos danosos do uso excessivo de parabenos como conservantes. Há indícios de efeitos carcinogênicos e atividade estrogênica. E, ainda, como são compostos de elevado Kow, estes podem ser bioacumulados em diversos organismos, especialmente os aquáticos. (DUARTE, 2002)

Estudos mostram que mesmo em baixas concentrações os parabenos podem ser capazes de estimular a proliferação de células mamárias cancerosas. (WRÓBEL; GREGORASZCZUK, 2013) Além disso, segundo estudos, os parabenos podem se concentrar na cadeia alimentar, causando impactos especialmente em organismos aquáticos, entre eles o atraso no desenvolvimento de peixes, metamorfose de sapos e alterações significativas no comportamento e reprodução destes seres. (LI et al., 2007)

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

- Desenvolver um método para análise de parabenos por HPLC através da microextração em gota única (SDME) automatizada.

2.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver o método automatizado de extração de parabenos;
- Otimizar as condições de preparo da amostra;
- Otimizar as condições cromatográficas para a análise simultânea de metil, etil, propil, butil e benzilparabeno;
- Comparar o efeito de matriz para as extrações dos parabenos pelo método desenvolvido.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes e soluções

Os padrões analíticos metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno, butilparabeno e benzilparabeno foram adquiridos da Sigma-Aldrich com 99% de pureza. As soluções de estoque foram preparadas em metanol na concentração de 1 g L⁻¹ e armazenadas à -19 °C. As soluções de trabalho foram preparadas, a partir das soluções de estoque, em água na concentração de 2 mg L⁻¹ de cada parabeno a ser analisado, renovadas a cada 2 semanas e armazenadas à 4 °C.

Também foram utilizados durante o trabalho, os solventes acetato de etila e diclorometano em mistura 1:1 (v/v) para realizar-se a extração dos parabenos.

3.2 Otimização dos parâmetros da análise por HPLC

Os parâmetros da análise por HPLC foram otimizados a partir da análise de uma solução 100 µg L⁻¹ dos parabenos metil, etil, propil, butil e benzil. Realizaram-se diversas análises variando-se o solvente utilizado para fase móvel e a porcentagem do mesmo. Outros parâmetros que foram fixados para as análises são a temperatura da coluna, comprimento de onda do detector e a vazão da fase móvel.

As análises foram realizadas no HPLC Shimadzu Prominence e utilizou-se de uma coluna C18 (150 mm x 0,3 mm d.i. – tamanho das partículas: 2µm).

As amostras posteriormente extraídas por SDME foram analisadas nas condições ótimas determinadas nesta primeira etapa do trabalho.

3.3 Preparo da amostra

O preparo da amostra foi realizado utilizando-se da solução de trabalho, transferindo-se 100 µL desta para um tubo Eppendorf de 2mL. Completou-se o volume do mesmo com 1,9 mL de esgoto produzido em laboratório (*labmade*). A amostra utilizada na extração possuía, então, concentração de 100 µg L⁻¹ de cada parabeno.

O esgoto *labmade* utilizado foi preparado seguindo o método de TORRES, 1992 e possui os componentes descritos na Tabela 2.

Tabela 2 – Composição do esgoto *labmade*.

Substância	Concentração (mg L ⁻¹)
Sacarose	35
Amido	114
Celulose	34
Extrato de carne	208
Óleo de Soja	51
NaCl	250
Detergente Comercial	3 gotas
MgCl ₂ .6H ₂ O	7
CaCl ₂ .6H ₂ O	4,5
NaHCO ₃	200

Fonte: TORRES, 1992.

3.4 Extração por SDME

Os parâmetros do software Arduino foram otimizados através de sucessivas extrações realizadas e posteriormente analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Realizaram-se extrações com 1, 10, 20, 25, 35 e 45 ciclos de exposição. Um ciclo de exposição é definido como o tempo no qual a gota de solvente extrator fica exposta em contato com a amostra. Após as análises apresentadas na seção 4.2 deste trabalho definiram-se os valores ideais para o número de ciclos da extração, o tempo de duração de cada ciclo, o tempo entre ciclos e o volume da gota de solvente exposta durante a extração.

3.5 Secagem e resuspensão

Após a extração, o solvente extrator foi transferido para um *vial* e seco com o auxílio de N₂ inserido no meio. Quanto à condição de resuspensão da amostra, foram feitos testes em três condições diferentes: em 100 µL de água, 200 µL de

água e 200 μL de uma solução 5% de acetonitrila em água. Por fim, agitou-se o vial por 5 min para homogeneização da amostra.

3.6 Estudo do efeito de matriz na extração por SDME

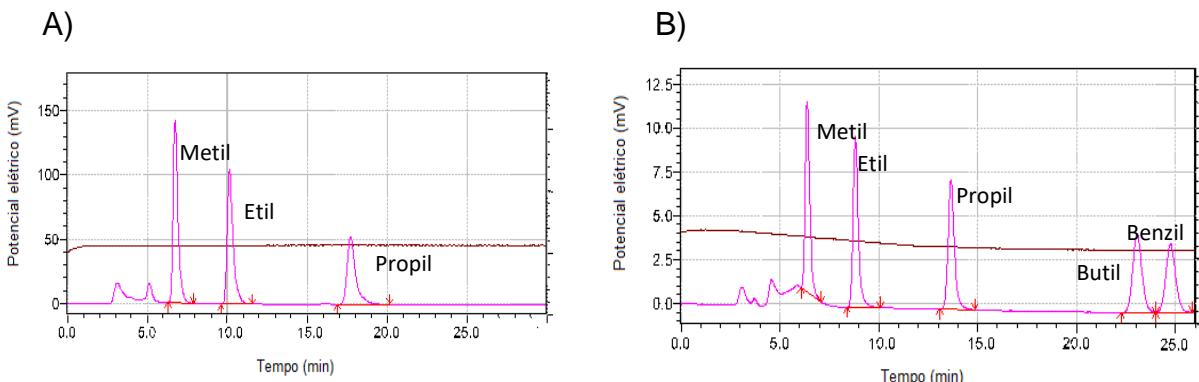
Por fim, realizou-se o estudo sobre a influência da matriz no processo de extração por SDME. Realizaram-se em triplicata, extrações em esgoto *labmade*, amostra real de águas residuárias e água deionizada, todas com concentração de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de parabenos, por meio da adição de 100 μL da solução de trabalho.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Otimização dos parâmetros da análise por HPLC

Inicialmente, as análises por HPLC utilizaram uma mistura metanol/acetato de Etila 80:20 (v/v), seguindo testes realizados previamente no grupo de pesquisa. Entretanto, conforme pode ser observado nos cromatogramas da Figura 1, os resultados observados não foram satisfatórios. Inicialmente, utilizou-se uma porcentagem de 40 % da mistura de solvente orgânico na fase móvel (o restante foi completado com água) e, posteriormente, utilizou-se uma porcentagem de 60 %. Porém, apesar da evidente separação apresentada em ambos os cromatogramas, o tempo para análise foi considerado elevado. Destaque para o segundo, no qual os 5 picos apresentaram boa resolução, mas o último deles teve um tempo de detecção próximo à 25 min. Desta forma, a análise não se mostra interessante por demandar um tempo muito elevado.

Figura 1 - Cromatogramas de análise por HPLC utilizando como fase móvel a mistura metanol/acetato de etila (80:20): A) 40%; B) 60%.



Assim, realizaram-se testes com o solvente acetonitrila nas proporções 25%, 25%, 35% e 45% da fase móvel. Os cromatogramas obtidos para 25% de acetonitrila na fase móvel encontram-se na Figura 2 e os resultados obtidos estão descritos na tabela 3. Em seguida, encontram-se os cromatogramas para 35% de acetonitrila na fase, expostos na Figura 3 e seus respectivos valores de tempo de retenção encontram-se na Tabela 4; por fim, os resultados obtidos para 45% de acetonitrila na fase móvel encontram-se na Figura 4 e Tabela 5.

Figura 2 - Cromatogramas de análise por HPLC utilizando 25% de acetonitrila na fase móvel.

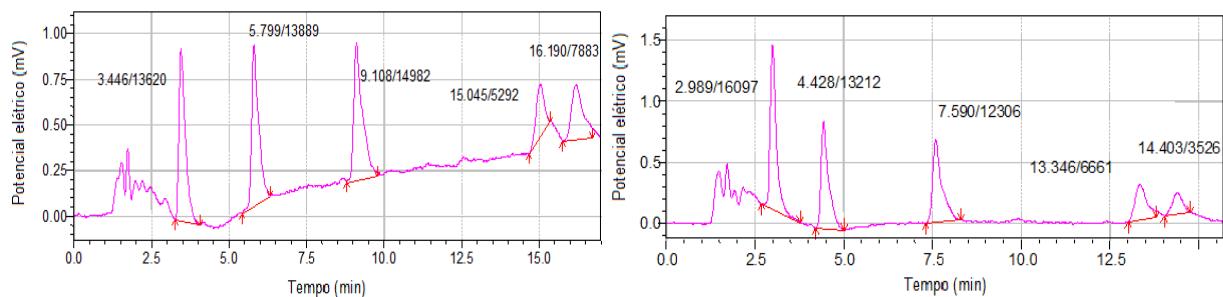


Tabela 3 – Valores de Tempo de Retenção (TR) obtidos das análises por HPLC com 25% de acetonitrila na fase móvel.

Parabeno	TR1	TR2	TR médio	TR erro (%)
Metil	3,446	2,989	3,218	10,04
Etil	5,799	4,428	5,114	18,96
Propil	9,108	7,590	8,349	12,86
Butil	15,045	13,346	14,196	8,46
Benzil	16,190	14,403	15,297	8,26

Figura 3 - Cromatogramas de análise por HPLC utilizando 35% de acetonitrila na fase móvel.

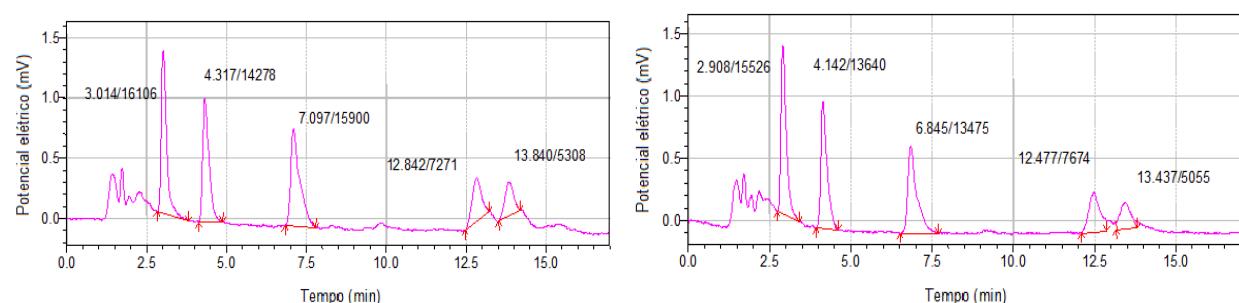


Tabela 4 – Valores de Tempo de Retenção (TR) obtidos das análise por HPLC com 35% de acetonitrila na fase móvel.

Parabeno	TR1	TR2	TR médio	TR erro (%)
Metil	3,014	2,908	2,961	2,53
Etil	4,317	4,142	4,230	2,93
Propil	7,097	6,845	6,971	2,56
Butil	12,842	12,477	12,660	2,04
Benzil	13,840	13,437	13,639	2,09

Figura 4 - Cromatogramas de análise por HPLC utilizando 45% de acetonitrila na fase móvel.

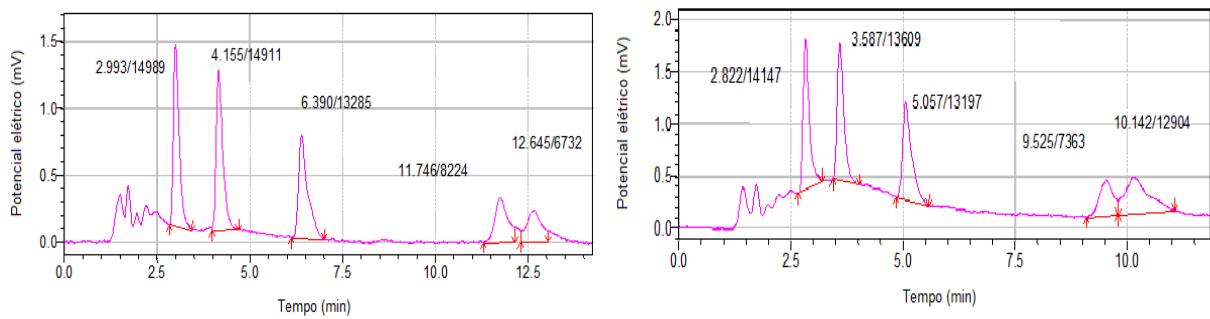


Tabela 5 – Valores de Tempo de Retenção (TR) obtidos das análises por HPLC com 45% de acetonitrila na fase móvel.

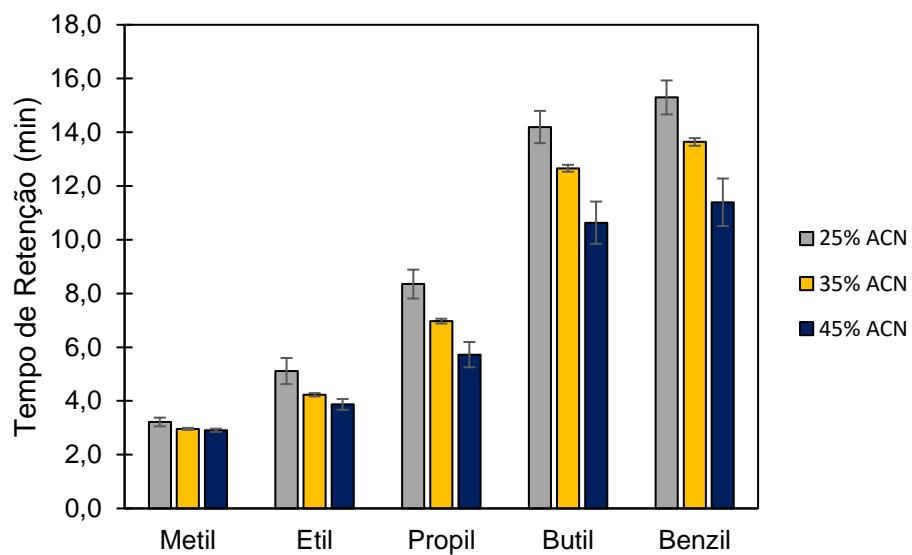
Parabeno	TR1	TR2	TR médio	TR erro (%)
Metil	2,822	2,993	2,908	4,16
Etil	3,587	4,155	3,871	10,38
Propil	5,057	6,390	5,724	16,47
Butil	9,525	11,746	10,636	14,77
Benzil	10,142	12,645	11,394	15,53

Conforme observado, com 25% de acetonitrila na fase móvel, o tempo total de análise é o maior entre os três testes realizados, uma vez que os parabenos apresentam maior tempo de retenção nesta condição. Com 35% de acetonitrila na fase móvel, obteve-se uma análise mais rápida em relação a condição anterior e todos os cinco picos referentes aos parabenos estão bem definidos nos dois cromatogramas. Já com 45% de acetonitrila, o tempo total de análise é ainda menor que com 35%. Porém, observa-se em um dos cromatogramas que a separação entre os dois últimos picos (correspondentes ao butil e benzilparabeno) é muito

pequena. Além disso, com 35% de acetonitrila, a taxa de erro obtida é a menor entre as três condições, enquanto para 45% observa-se uma grande variação no tempo de retenção entre as duas análises realizadas. Desta forma, determinou-se que a condição ótima para a realização da análise de parabenos por HPLC se dá ao utilizar 35% de acetonitrila na fase móvel.

Para efeito de comparação entre as condições de fase móvel analisadas, apresenta-se um gráfico de barras na Figura 5 que evidencia a relação entre tempo de retenção e percentual de acetonitrila na fase móvel, bem como a variação dos mesmos obtida nas análises.

Figura 5 – Comparação dos tempos de retenção obtidos para cada percentual de acetonitrila (ACN) na fase móvel.



Além de utilizar 35% de acetonitrila na fase móvel, estabeleceu-se outras condições de análise por HPLC como a temperatura da coluna em 40 °C, vazão da fase móvel de 0,20 mL min⁻¹, volume de injeção da amostra de 5 µL e comprimento de onda do detector UV-vis em 250 nm.

4.2 Otimização dos parâmetros para a extração por SDME

Os parâmetros do software Arduino para a extração de parabenos por SDME foram otimizados a partir de uma sucessão de testes nos quais se variava a quantidade de ciclos da extração. Os testes com 1 e 10 ciclos não resultaram em picos correspondentes aos parabenos na análise por HPLC, indicando que até esta quantidade de ciclos não foi possível extrair tais moléculas. Em seguida realizou-se as extrações com 20, 25, 35 e 45 ciclos e os resultados estão expostos na Figura 6. O tempo de exposição da gota em cada ciclo, bem como o tempo entre cada ciclo e o volume da gota foram mantidos constantes ao longo dos testes e estão descritos na Tabela 6. Além disso, todas as extrações foram realizadas à temperatura de 25 °C e com amostras preparadas conforme a seção 3.3 deste trabalho.

Figura 6 - Cromatogramas das extrações realizadas com: A) 20 ciclos; B) 25 ciclos; C) 35 ciclos; D) 45 ciclos.

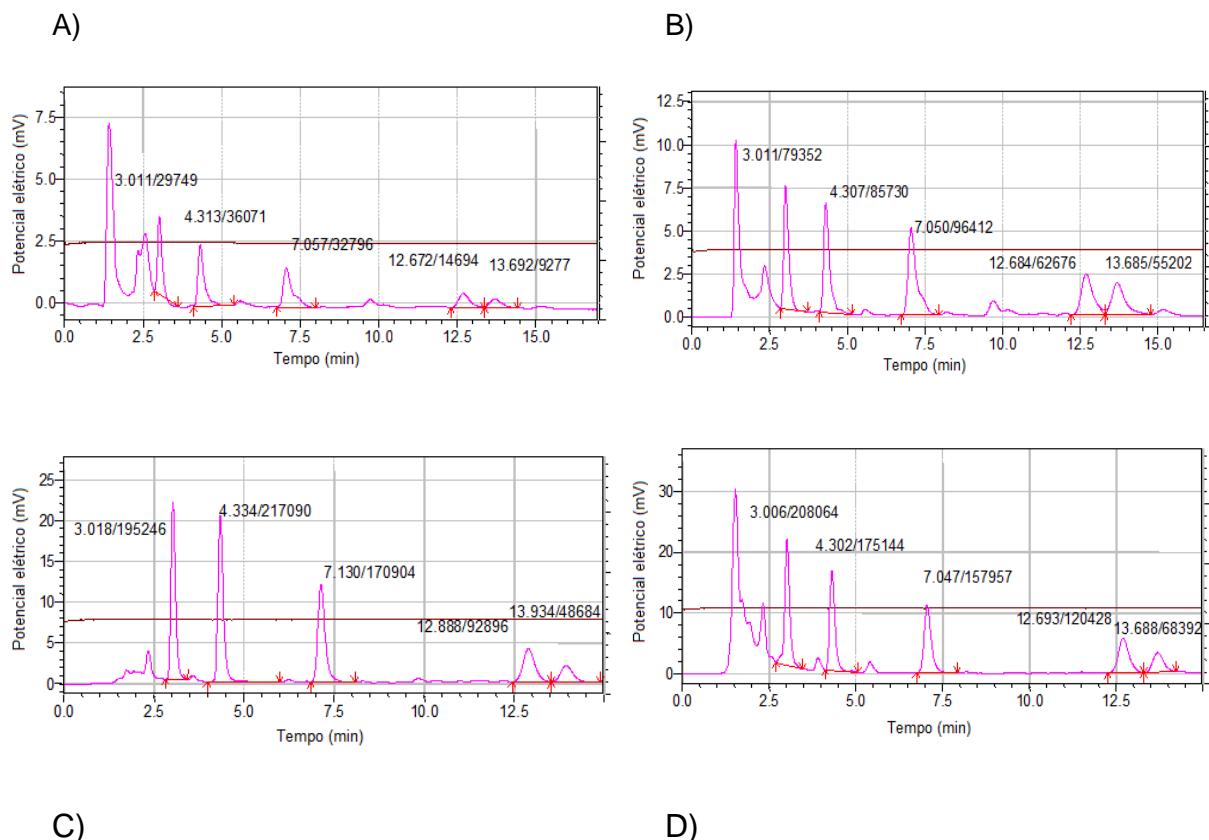


Tabela 6 – Parâmetros ótimos do software Arduino para a extração de parabenos.

Parâmetros Software Arduino	
NÚMERO DE CICLOS	35
TEMPO DE EXPOSIÇÃO DA GOTA	30 segundos
TEMPO ENTRE GOTAS	2,5 segundos
VOLUME DA GOTA	65 µL

Conforme observado nos cromatogramas da Figura 6, a partir de 35 ciclos não há um aumento significativo no valor das áreas integradas, sendo que para alguns picos, o valor é maior na extração realizada com 35 ciclos em comparação com a feita com 45 ciclos. Em valores menores que 35 ciclos, notam-se valores de integrais menores e, portanto, conclui-se que a quantidade extraída de parabenos também foi menor. Entretanto, a partir de 35 ciclos não foi constatado um aumento significativo de extração. Desta forma, adotou-se o número de 35 ciclos como número ótimo para este tipo de extração, uma vez que demanda de menos tempo em relação a extração com 45 ciclos.

É valido ressaltar que, nesta etapa do trabalho, já pode-se considerar que o método de extração automatizado desenvolvido pelo grupo de pesquisa é capaz de realizar a extração de parabenos por SDME.

4.3 Otimização das condições de resuspensão dos analitos

Inicialmente realizou-se a resuspensão dos parabenos extraídos em 100 µL de água e fez-se a análise por HPLC utilizando os parâmetros descritos na seção 4.1. A fim de otimizar a condição de resuspensão, ou seja, resuspender a maior quantidade de parabenos contidas no *vial* após a secagem do solvente extrator, variou-se o volume de água utilizado para a resuspensão para 200 µL. O intuito do aumento do volume é permitir um maior contato entre a água e as paredes do *vial* e com isso, ressuspender uma quantidade maior de parabenos. E como observado nas Figuras 7 e 8 e na Tabela 7 e 8, as áreas dos picos são, em geral, um pouco maiores quando o volume de água no *vial* foi aumentado.

Figura 7 - Cromatogramas das amostras ressuspendidas em 100 µL de água.

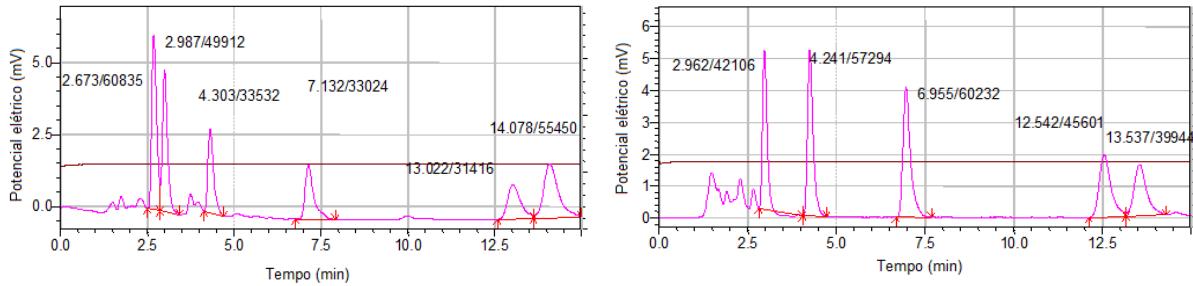


Figura 8 - Cromatogramas das amostras ressuspendidas em 200 µL de água.

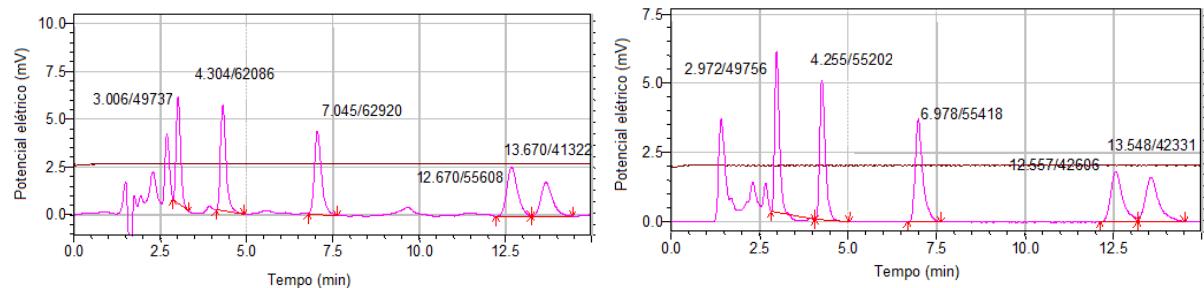


Tabela 7 – Valores de Tempo de Retenção (TR) e Área (A) obtidos dos cromatogramas das amostras ressuspendidas em 100 µL de água.

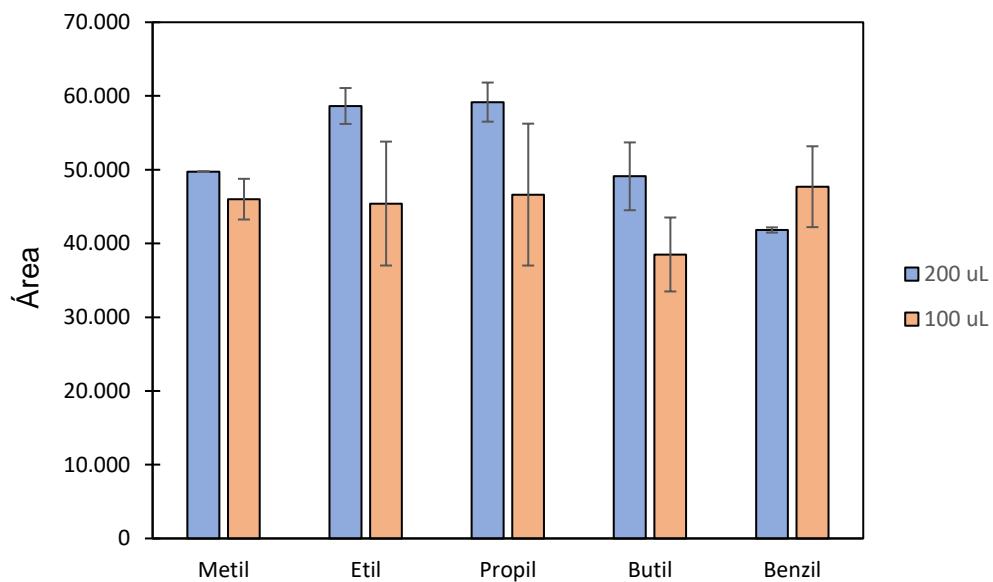
Parabeno	TR1	A1	TR2	A2	TR médio	A média	TR erro (%)	A erro (%)
Metil	2,987	49912	2,962	42106	2,9745	46009,0	0,59	12,00
Etil	4,303	33532	4,241	57294	4,2720	45413,0	1,03	37,00
Propil	7,132	33024	6,955	60232	7,0435	46628,0	1,78	41,26
Butil	13,022	31416	12,542	45601	12,7820	38508,5	2,66	26,05
Benzil	14,078	55450	13,537	39944	13,8075	47697,0	2,77	22,99

Tabela 8 – Valores de Tempo de Retenção (TR) e Área (A) obtidos dos cromatogramas das amostras ressuspendidas em 200 µL de água.

Parabeno	TR1	A1	TR2	A2	TR médio	A média	TR erro (%)	A erro (%)
Metil	3,006	49737	2,972	49756	2,9890	49746,5	0,80	0,03
Etil	4,304	62086	4,255	55202	4,2795	58644,0	0,81	8,30
Propil	7,045	62920	6,978	55418	7,0115	59169,0	0,68	8,97
Butil	12,670	55608	12,557	42606	12,6135	49107,0	0,63	18,72
Benzil	13,670	41322	13,548	42331	13,6090	41826,5	0,63	1,71

O gráfico de barras com os valores das médias das áreas de cada condição de resuspensão, é representado na Figura 9, e neste fica claro que a melhor condição para resuspensão se dá na segunda situação. Apesar dos valores serem próximos, decidiu-se adotar o volume de 200 μL para a realização dos próximos testes, uma vez que este apresentou resultados ligeiramente melhores.

Figura 9 – Comparação dos valores de área obtidos nos cromatogramas das amostras ressuspendidas em 100 μL e 200 μL de água, com os respectivos desvios padrões.



Por fim, fez-se a resuspensão com uma solução 5% de acetonitrila em água, a fim de facilitar a solubilidade dos parabenos na solução e, consequentemente, aumentar a quantidade de parabenos a ser injetada no cromatógrafo. Os resultados obtidos estão expressos na Figura 10 e Tabela 9 e, em seguida, fez-se uma comparação com a resuspensão em mesmo volume utilizando-se apenas água, correspondente à Figura 11.

Figura 10 - Cromatogramas das amostras ressuspendidas em 200 μL de solução 5% de acetonitrila em água.

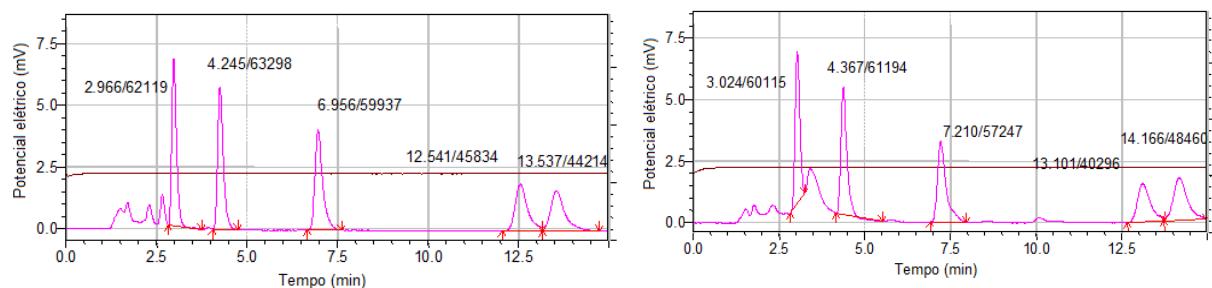
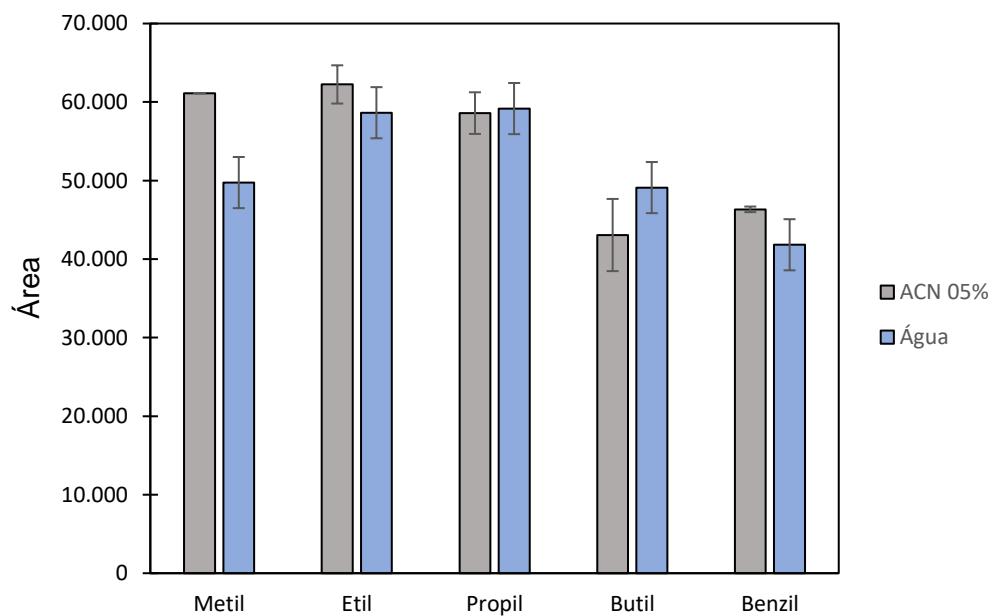


Tabela 9 – Valores de Tempo de Retenção (TR) e Área (A) obtidos dos cromatogramas das amostras ressuspendidas em 200 µL de solução 5% de acetonitrila em água

Parabeno	TR1	A1	TR2	A2	TR médio	A média	TR erro (%)	A erro (%)
Metil	3,024	60115	2,966	62119	2,9950	61117,0	1,37	2,32
Etil	4,367	61194	4,245	63298	4,3060	62246,0	2,00	2,39
Propil	7,210	57247	6,956	59937	7,0830	58592,0	2,54	3,25
Butil	13,101	40296	12,541	45834	12,8210	43065,0	3,09	9,09
Benzil	14,166	48460	13,537	44214	13,8515	46337,0	3,21	6,48

Figura 11 – Comparação dos valores de área obtidos nos cromatogramas das amostras ressuspendidas em 200 µL de água e solução 5% de acetonitrila, com os respectivos desvios padrões.



Através da análise do cromatograma obtido e da comparação com os valores das áreas obtidos na análise feita com resuspensão apenas em água, observa-se que a adição de acetonitrila auxilia na resuspensão dos parabenos, obtendo áreas maiores dos picos referentes aos mesmos. Portanto, definiu-se como condição ótima para a resuspensão a adição de 200 µL de solução 5% de acetonitrila.

4.4 Estudo do efeito de matriz na extração por SDME

O efeito de matriz foi analisado realizando-se extrações em esgoto *labmade*, amostra real de águas residuárias e em água. Nas Figuras 12, 13 e 14 e nas Tabelas 10, 11 e 12, pode-se observar o comportamento das 3 matrizes e vemos que os picos se deslocam pouco em relação ao tempo de retenção, fator melhor ilustrado na Figura 15, que compara a média dos tempos de retenção nos três casos. Entretanto, na Figura 16, observa-se a comparação do valor das integrais de cada pico em cada caso e, com relação à este fator, é perceptível algumas diferenças que podem ser atribuídas aos efeitos das diferentes matrizes.

Figura 12 - Cromatogramas das amostras extraídas em matriz de esgoto *labmade*.

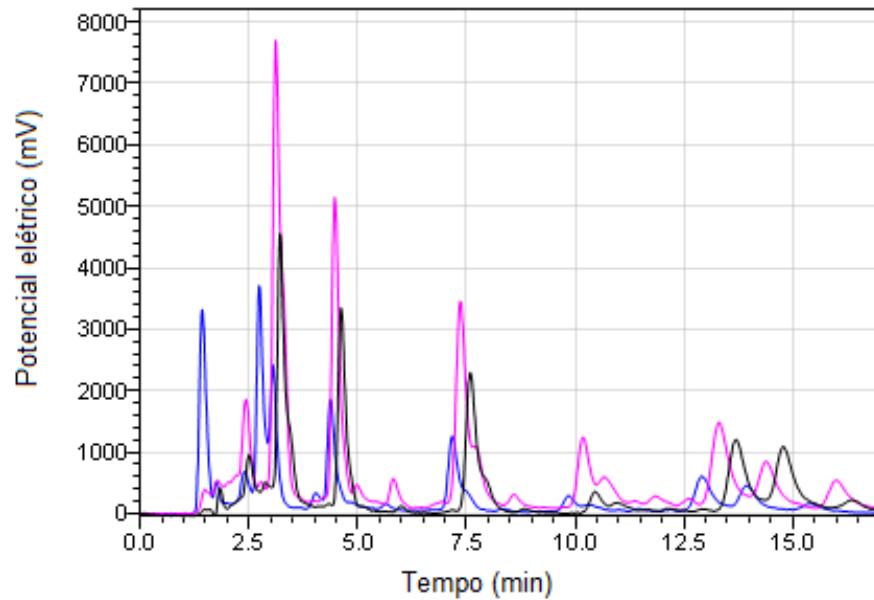


Tabela 10 - Valores de Tempo de Retenção (TR) e Área (A) obtidos dos cromatogramas das amostras extraídas em matriz de esgoto *labmade*.

Parabeno	TR1	A1	TR2	A2	TR3	A3	TR médio	A média	TR erro (%)	A erro (%)
Metil	3,213	57465	3,111	107043	3,049	28817	3,1243	64441,7	2,65	61,42
Etil	4,615	51788	4,473	75480	4,372	25560	4,4867	50942,7	2,72	49,02
Propil	7,587	56526	7,360	80353	7,172	28966	7,3730	55281,7	2,82	46,52
Butil	13,700	40259	13,313	45110	12,916	18221	13,3097	34530,0	2,95	41,50
Benzil	14,782	41212	14,390	28164	13,922	15113	14,3647	28163,0	3,00	46,34

Figura 13 - Cromatogramas das amostras extraídas em matriz de águas residuárias.

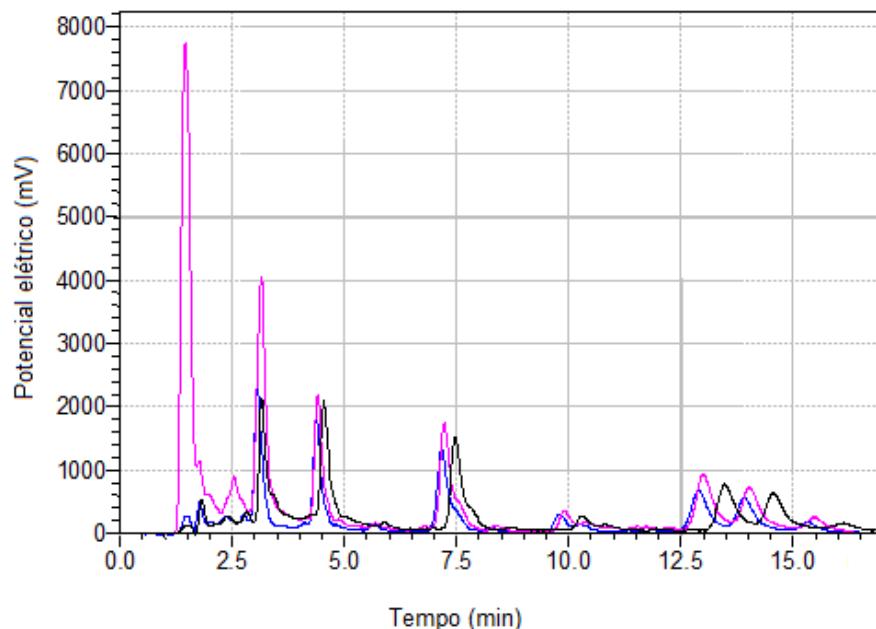


Tabela 11 - Valores de Tempo de Retenção (TR) e Área (A) obtidos dos cromatogramas das amostras extraídas em matriz de águas residuárias.

Parabeno	TR1	A1	TR2	A2	TR3	A3	TR médio	A média	TR erro (%)	A erro (%)
Metil	3,161	29057	3,135	45314	3,062	27595	3,1193	33988,7	1,65	28,94
Etil	4,544	29268	4,404	31183	4,378	27499	4,4420	29316,7	2,01	6,28
Propil	7,472	34629	7,227	40211	7,164	30538	7,2877	35126,0	2,23	13,82
Butil	13,483	24530	13,009	28761	12,888	20958	13,1267	24749,7	2,40	15,78
Benzil	14,560	21832	14,003	24781	13,919	19237	14,1607	21950,0	2,46	12,64

Figura 14 - Cromatogramas das amostras extraídas em matriz de água.

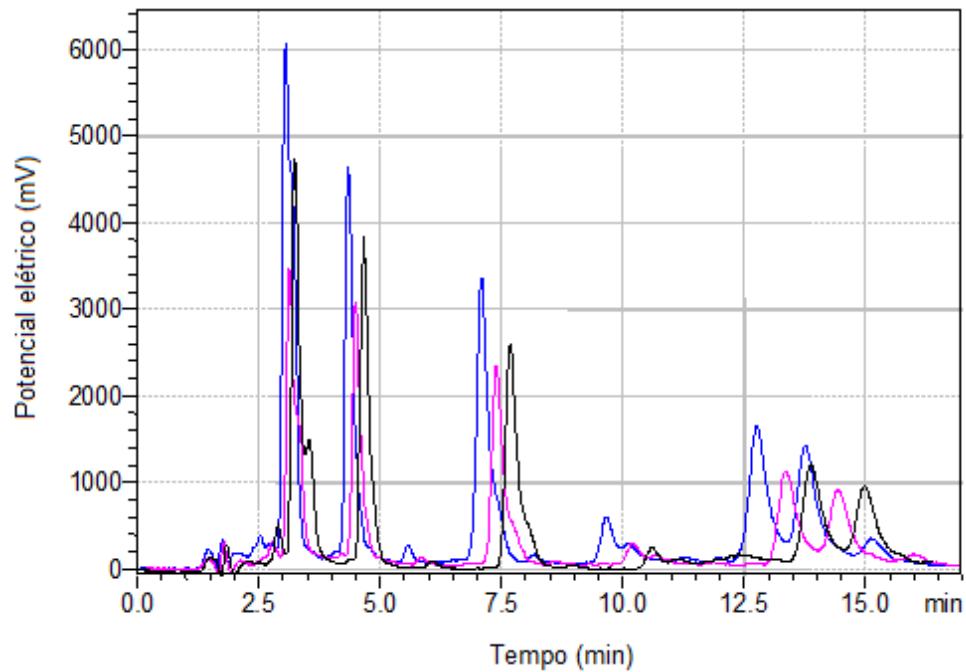


Tabela 12 - Valores de Tempo de Retenção (TR) e Área (A) obtidos dos cromatogramas das amostras extraídas em matriz de água.

Parabeno	TR1	A1	TR2	A2	TR3	A3	TR médio	A média	TR erro (%)	A erro (%)
Metil	3,243	63359	3,130	53119	3,049	93799	3,1407	70092,3	3,10	30,19
Etil	4,655	61751	4,495	47344	4,346	70555	4,4987	59883,3	3,44	19,57
Propil	7,682	61525	7,396	51429	7,088	73998	7,3887	62317,3	4,02	18,14
Butil	13,877	37997	13,365	36475	12,766	50820	13,3360	41764,0	4,17	18,87
Benzil	14,980	29158	14,427	33005	13,759	48852	14,3887	37005,0	4,25	28,21

Figura 15 – Comparação dos valores dos tempos de retenção para os diferentes tipos de matriz.

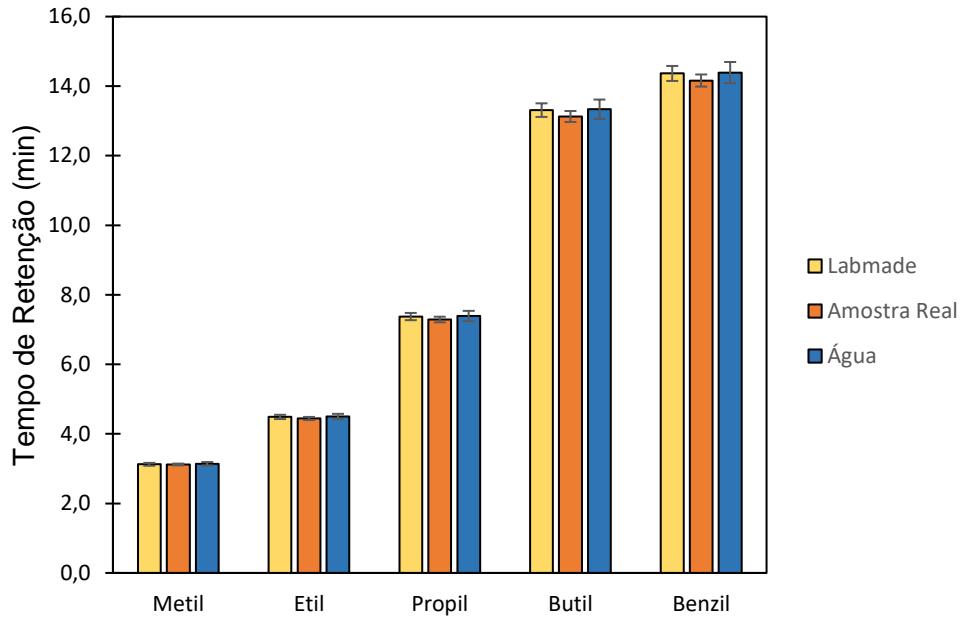
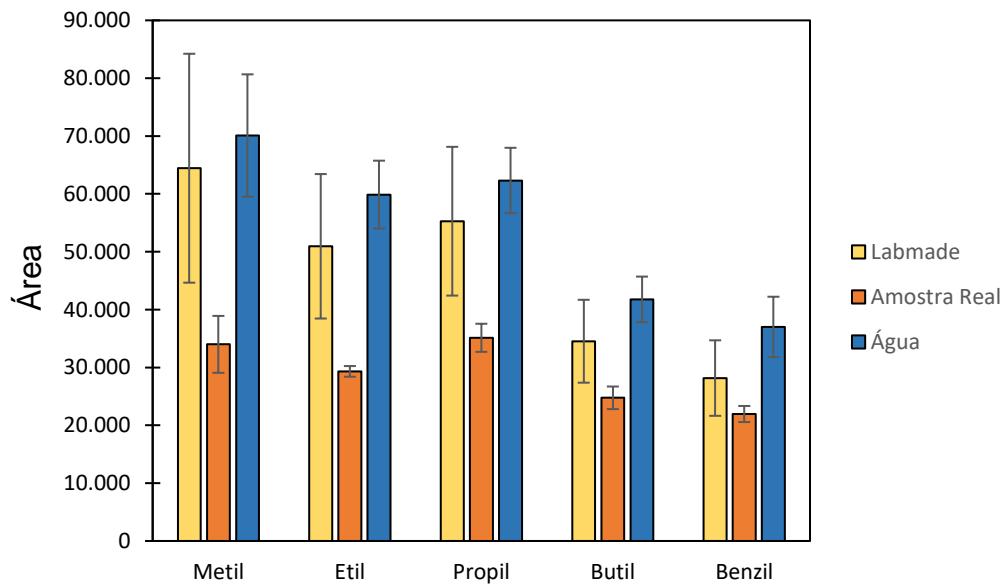


Figura 16 – Comparação dos valores das áreas dos picos para os diferentes tipos de matriz.



De maneira geral, vemos que o comportamento dos picos segue uma tendência quanto ao tamanho das áreas nos três diferentes tipos de matrizes. De acordo com a figura 5, o tamanho das áreas segue a ordem: Metil > Propil > Etil > Butil > Benzil, nos três casos analisados. Entretanto, quanto ao comportamento

individual de cada matriz, observa-se que a extração em amostra real é a que possui menos quantidade de parabenos extraída. Entre as extrações feitas em esgoto *labmade* e água, vemos uma pequena diferença. Porém, de maneira geral, as áreas dos picos são maiores para as extrações feitas em água.

Assim, pode-se dizer que quanto maior a presença de interferentes na matriz, menor é a quantidade de parabenos extraída no processo. Desta forma, é natural esperar que em água se obtenha os maiores picos na análise por HPLC, seguido do esgoto *labmade* e da amostra real.

Outro ponto a se destacar é que as maiores variações nos valores dos picos obtidos ocorreram no pico referente ao metilparabeno. Este fato pode ser justificado pela maior quantidade de interferentes que também possuem tempos de retenção baixos e, com isso, podem interferir no sinal correspondente à este composto.

Quanto ao tempo de retenção dos compostos, vemos que este apresenta pouca variação nas diferentes matrizes e, portanto, o efeito de matriz não exerce influência no mesmo em nenhum dos casos.

5. CONCLUSÃO

O método de microextração em gota única se mostrou aplicável para a realização da extração de parabenos em águas resíduárias, fazendo o uso de um pequeno volume de amostra (2,0 mL) e de um volume ainda menor de solvente orgânico (300 µL). A baixa produção de resíduos é o grande diferencial desta técnica em relação a extração líquido-líquido convencional e apresenta-se em acordo com os princípios da química verde.

O método foi desenvolvido e diversos parâmetros de suas diferentes etapas foram otimizados. Além disso, o método foi avaliado em diferentes tipos de matrizes, inclusive em uma matriz ambiental, comprovando sua aplicabilidade na detecção e quantificação de parabenos.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Como complemento ao trabalho desenvolvido, deve-se realizar a validação do método de quantificação dos parabenos extraídos a partir da técnica desenvolvida em suas condições ótimas. Para tal, deve-se utilizar técnicas mais seletivas de análise e com melhor detectabilidade, como por exemplo, o

espectrômetro de massas acoplado ao HPLC, a fim de se obter um limite de detecção menor. Além disso, deverão ser considerados parâmetros analíticos que não foram abordados neste trabalho, tais como linearidade, seletividade, precisão, exatidão e robustez.

7. REFERÊNCIAS

- ARTHUR, C. L.; PAWLISZYN, J. Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers. **Analytical Chemistry**, v. 62, n. 19, p. 2145–2148, 1990.
- BŁĘDZKA, D.; GROMADZIŃSKA, J.; WĄSOWICZ, W. Parabens. From environmental studies to human health. **Environment International**, v. 67, p. 27–42, 2014.
- CHEN, Y. et al. Sample preparation. **Journal of Chromatography A**, v. 1184, n. 1–2, p. 191–219, 2008.
- CIOLA, R. **Fundamentos da Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho**. São Paulo: [s.n.].
- DE SOUSA, G. **Medição da Comunicação em Crianças Portadoras de Deficiência Neuromotora**. [s.l.] Universidade do Vale do Itajaí, 2006.
- DERISSO, C. R. **Análise de parabenos em amostras de água de rios e de esgoto sanitário da cidade de São Carlos/SP**. [s.l.] Universida de São Paulo, 2017.
- DUARTE, M. A. I. **Poluentes orgânicos persistentes**. [s.l.] Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2002.
- HAMAN, C. et al. Parabens. From environmental studies to human health. **Water Research**, v. 67, p. 27–42, 2015.
- HE, Y.; LEE, H. K. Liquid-Phase Microextraction in a Single Drop of Organic Solvent by Using a Conventional Microsyringe. **Analytical Chemistry**, v. 69, n. 22, p. 4634–4640, 1997.

- HU, B. et al. Liquid phase microextraction for the analysis of trace elements and their speciation. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 86, p. 14–30, 2013.
- JEANNOT, M. A.; CANTWELL, F. F. Mass Transfer Characteristics of Solvent Extraction into a Single Drop at the Tip of a Syringe Needle. **Analytical Chemistry**, v. 69, n. 2, p. 235–239, 1997.
- JEANNOT, M. A.; PRZYJAZNY, A.; KOKOSA, J. M. Single drop microextraction-Development, applications and future trends. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2326–2336, 2010.
- KOKOSA, J. M. Advances in solvent-microextraction techniques. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 43, p. 2–13, 2013.
- KOKOSA, J. M. Recent trends in using single-drop microextraction and related techniques in green analytical methods. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 194–204, 2015.
- LANÇAS, F. M. Avanços Recentes e Tendências Futuras das Técnicas de Separação: uma visão pessoal. **Scientia Chromatographica**, v. 0, n. 0, p. 17–44, 2008.
- LI, W. et al. Occurrence and behavior of four of the most used sunscreen UV filters in a wastewater reclamation plant. **Water Research**, v. 41, n. 15, p. 3506–3512, 2007.
- LÓPEZ-BLANCO, C. et al. Determination of carbamates and organophosphorus pesticides by SDME-GC in natural water. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 383, n. 4, p. 557–561, 2005.
- MACHADO, T. D. L. **Potencial alérgico de conservantes cosméticos**. [s.l.] Universidade do Centro Sul Catarinense - UNESC, 2010.
- MARTINS, M. L. et al. Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME): fundamentos e aplicações. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 1, p. 35–51, 2012.
- PIAO, C.; CHEN, L.; WANG, Y. A review of the extraction and chromatographic determination methods for the analysis of parabens. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 969, p. 139–

148, 2014.

PINTO, I. P. DE; PEDROSO, M. P. Microextração em gota única (SDME): fundamentos e aplicações. v. 7, n. 3, p. 183–198, 2016.

PSILLAKIS, E.; KALOGERAKIS, N. Developments in single-drop microextraction. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 21, n. 1, p. 53–63, 2002.

TORRES, P. **Desempenho de um reator anaeróbico de manta de Lodo (UASB) de bancada no tratamento de substrato sintético simulando esgotos sanitários.** 1992. Tese de Mestrado - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1992.

WRÓBEL, A.; GREGORASZCZUK, E. L. Effects of single and repeated in vitro exposure of three forms of parabens, methyl-, butyl-And propylparabens on the proliferation and estradiol secretion in MCF-7 and MCF-10A cells. **Pharmacological Reports**, v. 65, n. 2, p. 484–493, 2013.

ZHANG, M. et al. Mixed liquids for single-drop microextraction of organochlorine pesticides in vegetables. **Talanta**, v. 74, n. 4, p. 599–604, 2008.