



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ**

**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS**

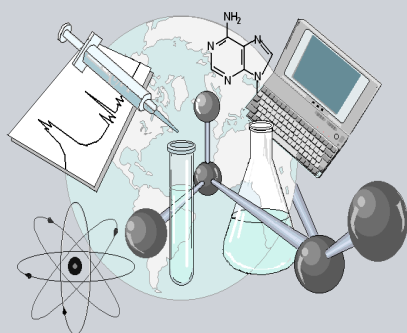
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS LIMPOS PARA A  
EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE TRICLOSAN E  
ETILHEXILMETOXICINAMATO**

Tese apresentada por  
**Valquiria de Moraes Silva** ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Química do Departamento de  
Química do Centro de Ciências  
Exatas da Universidade Estadual de  
Maringá como parte dos requisitos  
para a obtenção do título de Doutor  
em Química.

**CEE**



**Centro de  
Ciências Exatas**

**MARINGÁ, NOVEMBRO/2013**



**Universidade Estadual de Maringá**  
**Centro de Ciências Exatas**  
**Departamento de Química**  
**Programa de Pós-graduação em**  
**Química**

**Desenvolvimento de métodos limpos para a extração e determinação de Triclosan e Etilhexilmetoxicinamato.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Química.

Doutoranda: Valquíria de Moraes Silva  
Orientador: Prof. Dr Cláudio Celestino de Oliveira

Maringá, novembro de 2013.

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central – UEM, Maringá – PR., Brasil)

S586d	<p>Silva, Valquíria de Moraes Desenvolvimento de métodos limpos para a extração e determinação de Triclosan e Etilhexilmetoxicinamato / Valquíria de Moraes Silva. -- Maringá, 2013. 107 f.: il.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Cláudio Celestino de Oliveira. Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2013.</p> <p>1. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). 2. Extração em fase sólida. 3. Produtos de higiene pessoal. I. Oliveira, Cláudio Celestino de, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.</p> <p>CDD 22.ed. 543.089</p>
-------	--



**Universidade Estadual de Maringá**

Centro de Ciências Exatas  
Departamento de Química  
Programa de Pós-Graduação em Química

Este é o exemplar definitivo da Tese apresentada por **Valquíria de Moraes Silva**, perante a Comissão Julgadora do Programa de Pós-Graduação em Química em 16 de agosto de 2013.

**COMISSÃO JULGADORA:**

.....  
**Prof. Dr. Cláudio Celestino de Oliveira**  
PRESIDENTE - DQI/UEM

.....  
**Prof. Dr. Edivaldo Egea Garcia**  
MEMBRO - DQI/UEM

.....  
**Prof. Dr. Nilson Evelázio de Souza**  
MEMBRO - DQI/UEM

.....  
**Profa. Dra. Maria Cristina Bisinoti**  
MEMBRO - UNESP

.....  
**Profa. Dra. Suzana Lucy Nixdorf**  
MEMBRO - UEL

*“Somos o que repetidamente fazemos.  
A excelência, portanto, não é um feito,  
mas um hábito.”*

*Aristóteles*

**Dedicatória**

*Ao meu bom Deus, uma luz que nunca se apaga!*

*Aos meus pais, Paulo e Lusia, pela vida, por todo o amor!*

*Aos meus irmãos, cunhados e sobrinhos, pela alegria!*

*Ao Fernando, “volta tempo, tempo bom”!*

## **Agradecimentos**

**Ao professor Cláudio, pela orientação, paciência, ensinamentos e amizade, nestes anos trabalhados juntos;**

**Ao professor Willian pela amizade, carinho, paciência;**

**Ao programa de pós-graduação em química pela oportunidade e a CAPES, pelo apoio financeiro.**

**Aos secretários da pós-graduação Cris e Claudemir;**

**As companheiras (os) de laboratório, pelas tardes de café, pelas conversas na hora certa: Aline, Danielle, Marina, Rafaela Takako, Lucas, Mirian.**

**As amigas de república: Dr<sup>a</sup>. Valéria Aquilino Barbosa e Dr<sup>a</sup>. Solange Maria Cottica.**

**Aos amigos Janksyn Bertozzi, Vanessa Kienen, Lucas Ulisses, Rafaela Takako, Silvia Luciana Fávaro, Juliana Piai, Eduardo Delmonico, George Brand, pelo apoio incentivo e principalmente pela amizade, muito obrigada!**

**A minha família (Paulo, Lusia, Roberto, Vagner, Ilsa, Sandro, Cidinha, Renata, Yuji, Laura, Junior, Vitor e Fernando) pelo incentivo e por acreditarem em mim.**

**Enfim, a todas as pessoas que de forma direta ou indireta colaboraram com o desenvolvimento deste trabalho.**

**Muito Obrigada!**

## Sumário

<b>Lista de figuras .....</b>	<b>i</b>
<b>Lista de tabelas .....</b>	<b>iv</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>v</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>vi</b>
<b>1. Introdução .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Revisão Bibliográfica.....</b>	<b>3</b>
2.1. Produtos de higiene pessoal .....	3
2.2. Bactérias e os Bactericidas .....	5
2.2.1. <i>Triclosan</i> .....	6
2.3. Filtro solar .....	14
2.3.1 <i>Etilhexilmetoxicinamato</i> .....	15
2.4. Extração em fase sólida.....	20
2.4.1. <i>Adsorção em fase sólida</i> .....	22
2.4.2. <i>Parâmetros da extração em fase sólida</i> .....	22
2.5. Métodos Cromatográficos .....	23
2.5.1. <i>Parâmetros Cromatográficos</i> .....	25
2.6. Química Limpa.....	29
2.7. Eficiência da remoção de triclosan durante tratamento de água potável.....	31
<b>3. Objetivo geral.....</b>	<b>37</b>
3.1 Objetivos específicos.....	37
<b>4.0. Parte experimental .....</b>	<b>37</b>
4.1 Padrões e solventes.....	37
4.2. Equipamentos e acessórios.....	38



4.2.1. Sistema de extração .....	38
4.2.2. Espectrofotômetro .....	39
4.2.3. Cromatógrafo .....	39
4.3. Procedimentos .....	40
4.3.1. <i>Determinação Cromatográfica</i> .....	40
4.3.2. <i>Extração em Fase Sólida</i> .....	40
4.3.3. <i>Método comparativo</i> .....	41
4.3.4. <i>Método comparativo: Extração em fase Sólida</i> .....	42
4.4. Eficiência do tratamento de água potável .....	42
4.4.1. <i>Construção do filtro</i> .....	42
4.4.2. <i>Coagulação e decantação</i> .....	43
4.4.3. <i>Determinação de Triclosan</i> .....	44
4.5. Aplicação dos métodos desenvolvidos na análise de amostras reais .....	44
4.5.1. <i>Amostras Comerciais de creme dental e protetor solar</i> .....	44
4.5.2. <i>Amostras de Água</i> .....	45
4.6. Validação da Metodologia .....	50
<b>5. Resultados e discussão.....</b>	<b>53</b>
5.1. Otimização das condições cromatográficas .....	53
5.2. Figuras de Mérito para o método proposto .....	62
5.3. Figuras de Mérito para o método Convencional .....	64
5.4. Otimização da Etapa de Extração.....	66
<b>6. Avaliação do sistema de tratamento de água potável.....</b>	<b>78</b>
6.1. Coagulação e decantação .....	79
6.2. Determinação de Triclosan na água tratada .....	81
<b>7. Aplicação dos métodos análise de amostras ambientais .....</b>	<b>85</b>
7.1. Validação da Metodologia .....	92

<b>8. Conclusões .....</b>	<b>95</b>
<b>9. Referências .....</b>	<b>96</b>

## Lista de figuras

Figura 1. Estrutura química do Triclosan. ....	7
Figura 2. Espectro Solar UV e espectro UV de Triclosan em dois pHs diferentes. ....	9
Figura 3. Esquema de ação dos interferentes endócrinos. ....	11
Figura 4. Estruturas químicas do TCS e da tetraiodotironina. ....	12
Figura 5. Espectro de absorção no UV-vis para as moléculas de E-EHMC e Z-EHMC. ....	16
Figura 6. Ilustração de cartucho utilizado na extração em fase sólida. ....	21
Figura 7. Medidas relacionadas à determinação da resolução [61]. ....	26
Figura 8. Medidas relacionadas ao cálculo do fator de assimetria e fator de alargamento [61]. ....	27
Figura 9. Proposta do caminho da degradação de TCS na presença de cloro livre. ....	36
Figura 10. Ilustração do sistema de extração em fase sólida. ....	39
Figura 11. Ilustração do cromatógrafo líquido de alta eficiência. ....	40
Figura 12. Mapa da cidade de Maringá e as áreas onde estão os rios onde as amostras foram coletadas. ....	45
Figura 13. Mapa do ponto de coleta de amostra no Ribeirão Maringá. ....	46
Figura 14. Mapa do ponto de coleta de amostra no Córrego Cleópatra. ....	47
Figura 15. Mapa do ponto de coleta de amostra no Córrego Mandacaru. ....	48
Figura 16. Mapa do ponto de coleta no Ribeirão Morangueiro. ....	49
Figura 17. Ilustrações do sistema de preparo da amostra. ....	50
Figura 18. Espectro de absorção UV-Vis de solução de TCS 5,0 mg L <sup>-1</sup> . ....	54
Figura 19. Espectro de absorção UV-Vis para solução de EHMC 10,0 mg L <sup>-1</sup> . ....	54
Figura 20. Espectro de absorção UV-Vis para solução de E-EHMC submetido à presença da luz solar por diferentes intervalos tempo. ....	55
Figura 21. Cromatograma de uma solução padrão do TCS e EHMC. ....	56
Figura 22. Cromatograma obtido para solução contendo TCS e EHMC. ....	57

Figura 23. Cromatograma obtido para solução TCS e EHMC em diferentes concentração de etanol na fase móvel..	58
Figura 24. Cromatograma obtido para o branco. Injeção	60
Figura 25. Cromatograma obtido para solução TCS e EHMC.	61
Figura 26. Efeito da luz no cromatograma da solução EHMC 1,0 mg L <sup>-1</sup> .	62
Figura 27. Curva analítica para EHMC pelo método proposto.	63
Figura 28. Curva analítica para TCS pelo método proposto.	63
Figura 29. Curva analítica para TCS pelo método convencional.	65
Figura 30. Curva analítica para EHMC pelo método convencional.	65
Figura 31. Percentagem de recuperação para TCS e EHMC com a utilização de diferentes misturas de solventes como eluentes no procedimento de extração em fase sólida.	68
Figura 32. Percentagem de recuperação para TCS e EHMC com a utilização de diferentes misturas de solventes como eluentes no procedimento de extração em fase sólida.	69
Figura 33. Percentagem de recuperação para TCS e EHMC com a utilização de diferentes misturas de solventes como eluentes no procedimento de extração em fase sólida.	70
Figura 34. Percentagem de recuperação para TCS e EHMC com a utilização de diferentes misturas de solventes como eluentes no procedimento de extração em fase sólida.	71
Figura 35. Percentagem de recuperação para TCS e EHMC com a utilização de diferentes volumes do eluente no procedimento de extração em fase sólida.	72
Figura 36. Percentagem de recuperação para TCS e EHMC com a utilização de diferentes vazões do eluente no procedimento de extração em fase sólida.	73
Figura 37. Percentagem de recuperação para TCS e EHMC para diferentes tempos de secagem do cartucho de extração.	74
Figura 38. Percentagem de recuperação para TCS e EHMC quando da utilização de etanol e metanol para limpeza do cartucho.	75
Figura 39. Percentagem de recuperação para TCS e EHMC para diferentes massas de sorbente.	76

Figura 40. Curva de extração para TCS nas concentrações de 0,012, 0,025 e 0,05 mg L <sup>-1</sup> .....	77
Figura 41. Curva de extração para TCS e EHMC nas concentrações de 0,012, 0,025 e 0,050 mg L <sup>-1</sup> . . . . .	77
Figura 42. Cromatograma obtido para o branco após procedimento de extração.. . . .	78
Figura 43. Amostra após procedimentos de floculação/sedimentação. ....	80
Figura 44. Filtro utilizado na etapa de filtração para limpeza física da água. ....	81
Figura 45 Cromatograma de uma alíquota da amostra de água tratada após adição de hipoclorito de sódio.. . . .	83
Figura 46. Monitoramento da degradação do TCS pelo hipoclorito de sódio.....	84
Figura 47. Cromatograma de amostra de creme dental (0,10 gL <sup>-1</sup> ) monitorado no comprimento de onda de 282 nm. ....	87
Figura 48. Cromatograma de uma amostra de creme protetor solar (0,10g L <sup>-1</sup> ) obtido no comprimento de onda de 309 nm. ....	88
Figura 49. Cromatograma da amostra do Rio Mandacaru.....	90

## Lista de tabelas

Tabela 1. Padrão microbiológico de potabilidade da água para consumo humano.....	33
Tabela 2. Padrão de potabilidade para substâncias químicas que representam risco à saúde.....	34
Tabela 3. Parâmetros cromatográficos obtidos para os compostos TCS, Z-EHMC e Z-EHMC em uma coluna recheada com C18. ....	60
Tabela 4. Características do método cromatográfico para a determinação do TCS (282 nm) e EHMC (309 nm).....	64
Tabela 5. Características do método cromatográfico convencional para a determinação de TCS e EHMC.....	66
Tabela 6. Eficiência de extração (%) dos compostos para diferentes matrizes em duas concentrações (0,025 e 0,050 mg L <sup>-1</sup> ) .....	86
Tabela 7. Eficiência de extração (%) dos compostos TCS e EHMC para diferentes matrizes para o método proposto e o método convencional após a adição de padrão 0,05 mg L <sup>-1</sup> . ....	89
Tabela 8. Concentração (µg L <sup>-1</sup> ) de TCS e EHMC encontrados nas amostras de água. ....	91
Tabela 9. Concentrações de TCS e EHMC encontradas em amostras de água.....	92
Tabela 10. Amostras de água adicionadas de 3 concentrações diferentes dos analitos [0,0125, 0,025 e 0,050 mg L <sup>-1</sup> ]......	93
Tabela 11. Ensaio de repetibilidade para três concentrações diferentes (0,012, 0,025 e 0,050 mgL <sup>-1</sup> ) durante 5 dias consecutivos. ....	95

## Resumo

Os produtos de cuidado e higiene pessoal e os fármacos são conhecidos como poluentes emergentes e vêm ganhando destaque como os mais novos contaminantes ambientais. A preocupação com estes poluentes é justificada pelo fato destes produtos conterem em sua formulação compostos que podem ser prejudiciais ao meio ambiente e principalmente, porque muitos deles estão sendo apontados como causadores de danos à saúde humana.

Considerando a importância ambiental e a grande quantidade de produtos que os contêm nesta tese são propostos métodos analíticos para a extração, a separação, identificação e determinação cromatográfica dos compostos Triclosan (TCS), um bactericida, e do Etilhexilmetoxicinamato (EHMC), utilizado em cremes para a proteção solar. Para todos os métodos desenvolvidos procurou-se obedecer aos princípios da Química limpa que, tem como prioridade o desenvolvimento e implementação de métodos que prezam em reduzir ou eliminar o uso ou geração de substâncias tóxicas.

Para a extração em fase sólida utilizou-se cartucho contendo fase estacionária C18 e como eluente uma mistura de etanol:metanol (90:10, v/v) atingindo-se taxas de recuperação de 80,0 e 83,0 % para TCS e EHMC, respectivamente. Na etapa de determinação utilizou-se a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com coluna C18 e como fase móvel uma mistura de etanol:solução ácido fosfórico 0,01% (75:25, v/v). O método cromatográfico desenvolvido é de baixo custo e permitiu a análise dos compostos em apenas 15 min com limites de detecção e limite de quantificação de 0,021 e 0,091 mg L<sup>-1</sup> para o TCS e 0,0011 e 0,0066 mg L<sup>-1</sup> para o EHMC, respectivamente; os quais foram adequados para aplicação do método para análises de amostras de águas.

Quando o método foi aplicado às análises de águas da cidade de Maringá, PR, observou-se que o contaminante TCS foi encontrado na faixa de concentração de 3,40 a 23,0 µg L<sup>-1</sup> em amostras de água de rio, não sendo observada sua presença em amostras de água potável. O contaminante EHMC foi encontrado na faixa de concentração de 17,0 e 40,0 µg L<sup>-1</sup> em amostras de água de rio e na concentração de 1,70 µg L<sup>-1</sup> em amostras de água potável, indicando que o tratamento convencional de água de abastecimento público não é eficiente para eliminação deste composto.

## Abstract

Personal-care products, pharmaceuticals among others products are known as emerging pollutants and have been gaining prominence as the newest environmental contaminants. The concern with these pollutants is justified by the fact that these products contain compounds in their formulation that can accumulate in the environment and be harmful to species that live there, especially because many of the emerging pollutants are known to cause damage to human health.

Considering the environmental importance and the large number of products that contain the emerging pollutants in the present work are proposed analytical methods for extraction, separation, identification and chromatographic determination of compounds Triclosan (TCS), a widely used bactericide, and EthylhexylMethoxycinnamate (EHMC), a compound used as UV-filter. All the developed methods sought to obey the principles of Green Chemistry, which prioritizes the development and implementation of methodologies that reduce or eliminate the use of toxic organic solvents or generation of substances harmful to human health and to the environment.

For solid phase extraction was used cartridge containing C18 stationary phase and as eluant a mixture of ethanol: methanol (90:10, v/v), reaching recovery rates of 80.0 and 83.0% for TCS and EHMC, respectively. For the determination step was used high performance liquid chromatography (HPLC) with a C18 column and as mobile phase a mixture of ethanol: 0.01% phosphoric acid solution (75:25, v/v). The developed chromatographic method is inexpensive and allows the analysis of compounds in 15 min with limits of detection and quantitation of 0,021 and 0,091 mg L<sup>-1</sup> to TCS and of 0,0011 and 0.0066 mg L<sup>-1</sup> for EHMC, respectively; which able the method to be applied to water samples analysis.

When the method was applied to analysis in urban wastewater of Maringa, PR, it was observed that the contaminant TCS was found in the concentration range of 3.40 up to 23.0 µg L<sup>-1</sup> in river-water samples and, the pollutant was not found in treated drinking water samples. The UV-filter EHMC was found in the concentration range of 17.0 up to 40,0 µg L<sup>-1</sup> in river-water samples and in the concentration of 1.70 µg L<sup>-1</sup> in drinking-water samples, indicating that the conventional drinking water treatment is not efficient to eliminates this pollutant.



## 1. Introdução

Química analítica é a ciência que estuda os princípios e a teoria dos métodos de análise química, sendo um conjunto de idéias e métodos eficientes para determinar a composição qualitativa e quantitativa de uma amostra, ou seja, identificar as espécies químicas que constituem uma amostra e também a quantidade [1].

Para o desenvolvimento dos métodos analíticos deve-se levar em consideração seu impacto no ambiente, ou seja, devem seguir os preceitos da química limpa, também conhecida como química verde que, indicam que as novas metodologias devem ser eficientes e ao mesmo tempo diminuir ou eliminar a quantidade de resíduos tóxicos produzidos após a análise.

Além dos benefícios ambientais, o desenvolvimento de métodos analíticos limpos apresenta um menor impacto econômico graças à diminuição de gastos com o armazenamento, tratamento de resíduos e a remediação de áreas contaminadas. Esta preocupação ecológica surgiu no final da década de 1960 e tomou forte impulso nos anos 70; sendo um assunto de grande relevância e enorme repercussão na sociedade [2].

Uma classe de compostos que vem ganhando destaque entre os novos contaminantes, são os produtos de cuidado e higiene pessoal. Esta preocupação é justificada pelo fato destes produtos conterem em sua formulação compostos que podem acumular no meio ambiente, sendo prejudiciais as espécies ali existentes e principalmente, porque muitos deles estão sendo apontados como causadores de danos à saúde humana [3].

Estes contaminantes estão presentes em grande quantidade de produtos comerciais e, normalmente, são utilizados com grande frequência. Estes fatores despertam o interesse em estudá-los, objetivando esclarecer quais os verdadeiros danos causados ao ambiente e à saúde humana, o que demanda o desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação destas espécies.

Assim, esta tese tem como objetivo o desenvolvimento de método de extração e determinação de Triclosan e Etilhexilmetoxicinamato em amostras comerciais e ambientais, priorizando a diminuição e/ou eliminação de solventes orgânicos tóxicos utilizados nas análises. Os métodos aqui desenvolvidos foram validados levando em

consideração os seguintes parâmetros: exatidão, precisão, seletividade, limite de quantificação, limite de determinação e linearidade [4].

## **2. Revisão Bibliográfica**

Como nesta tese objetivou-se o desenvolvimento de método analítico limpo para a extração utilizou-se extração em fase sólida e para a determinação de triclosan e etilhexilmetoxicinamato em amostras ambientais a cromatografia líquida de alta eficiência. Tendo sempre em vista os preceitos da Química Limpa, esta revisão bibliográfica está subdividida nos seguintes tópicos: produtos de higiene pessoal, características do bactericida triclosan e do filtro solar etilhexilmetoxicinamato, fundamentos do método de preparação de amostras utilizando a extração em fase sólida, fundamentos da cromatografia, princípios da química verde e sistemas de tratamento de água potável.

### ***2.1. Produtos de higiene pessoal***

A higiene e hidratação da pele, cabelos e saúde bucal exigem que as pessoas utilizem uma gama de produtos que são chamados de produtos de cuidado e higiene pessoal, mais conhecidos como cosméticos. Nesta classe de produtos estão inseridos shampoos, condicionadores, cremes hidratantes, cremes dentais, batons, perfumes, sabonetes, filtros solares, dentre muitos outros. Normalmente, na formulação destes produtos são incorporados substâncias químicas que agem como filtros solares ou mesmo bactericidas, gerando produtos, como por exemplo os hidratantes que são complementados com os filtros solares; passando assim a ter duas funções, a de proteção e a de hidratação. Outro exemplo são os cremes dentais que podem conter bactericidas que atuam para evitar a propagação de placas e odores bucais [5] que, após o seu uso, são descartados no esgoto e na sequência no ambiente, principalmente nos corpos hídricos.

Segundo a ANVISA, podem ser considerados produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes, preparações constituídas por substâncias naturais ou sintéticas, de uso externo nas diversas partes do corpo tais como pele, sistema capilar, unhas, lábios, órgãos genitais externos, dentes e membranas mucosas da cavidade oral, com o

objetivo exclusivo ou principal de limpá-los, perfumá-los, alterar sua aparência e ou corrigir odores corporais, e/ou protegê-los ou mantê-los em bom estado [6]. Dentre estes produtos de cuidado pessoal, há uma subdivisão entre produtos de Grau 1 e os produtos de Grau 2:

**Grau 1** - são os produtos que se caracterizam por possuírem propriedades básicas ou elementares, cuja comprovação não seja inicialmente necessária, e não requeiram informações detalhadas quanto ao seu modo de usar, e suas restrições de uso. Enquadram-se nesta definição, batom, bases para rosto, cremes para rosto e mãos (desde que não contenham filtro solar ou algum tipo de bactericida), entre outros.

**Grau 2** - são produtos de higiene pessoal que possuem indicações específicas, cujas características exigem comprovação de segurança e/ou eficácia, bem como informações e cuidados, modo e restrições de uso. Enquadram-se nesta definição os clareadores de pelos e cabelo, bloqueador solar/anti-solar, protetor solar, desodorantes, dentifrício anticárie e antiplaca, entre outros.

Para ambas as classes de cosméticos, a ANVISA estabelece que seja apresentado no rótulo dos produtos, todos os componentes especificados por suas denominações INCI, do inglês “Internacional Nomenclature of Cosmetic Ingredients” ou Nomenclatura Internacional de Ingredientes Cosméticos, e as quantidades de cada um expressas percentualmente (m/m) através do sistema métrico decimal, além de ser citada a função de cada componente na fórmula [6].

O INCI é uma tentativa de facilitar e uniformizar a identificação de ingredientes em cosméticos. Essa uniformização foi necessária, visto que há mais de 16 mil ingredientes usados nas formulações cosméticas e, cada ingrediente pode ser nomeado de diferentes maneiras, pois além da denominação química, muitos possuem mais de um nome comercial, podendo chegar a um número grande de sinônimos para o mesmo ingrediente; a falta de padronização da nomenclatura pode gerar dúvidas e confundir o consumidor [7].

## **2.2. Bactérias e os Bactericidas**

As bactérias são os seres mais antigos da Terra e estão presentes em quase todos os lugares como o ar, água, solo e poeira, podendo ser encontradas até mesmo nos lugares mais inóspitos como os vulcões; e por isso são consideradas os seres vivos mais abundantes do planeta[8,9].

Estes microrganismos apresentam importante papel na manutenção da vida e do equilíbrio dos ecossistemas, atuando como decompositores fixadores de nitrogênio e desnitrificantes. Em nosso organismo, estes microrganismos atuam em nosso intestino, e por competição, outras bactérias patogênicas não encontram um meio adequado para se instalar. Graças a elas também conseguimos absorver determinados nutrientes por elas produzidos durante a fermentação dos alimentos que ingerimos.

Existem também as bactérias que são maléficas a nossa saúde, causando um grande número de doenças, como a tuberculose, hanseníase, pneumonia bacteriana, tétano, sífilis, cólera, febre tifóide, dentre muitas outras [8].

As bactérias podem ser classificadas em dois tipos através do método de Gram utilizado para corar microorganismos: Gram-positivos são os micróbios corados por esse método e os Gram-negativos não são corados por este método. Essa separação se dá por uma diferença na estrutura das paredes celulares dos dois tipos de microorganismos que são atingidas de diferentes maneiras frente aos bactericidas [8].

A célula de uma bactéria gram-positiva é circundada pela parede celular onde se encontra o peptidoglicano em todas as formas de bactérias, com exceção dos micoplasmas. A célula de uma bactéria gram-negativa além de apresentar as estruturas da gram-positiva, possui de fora para dentro, uma membrana externa à parede celular, com dupla camada de lipídios, contendo proteína, semelhante à membrana plasmática, possuindo também polissacarídeos que diferem nas diferentes cepas de bactérias, sendo importantes fatores que determinam a antigenicidade da bactéria, constituindo as endotoxinas que, podem desencadear reações inflamatórias, ativar o sistema complemento, provocar a febre e/ou outros aspectos da inflamação.

Os bactericidas são produtos que agem com efeito letal e irreversível sobre microorganismos sensíveis que estão em tecidos vivos como a pele; portanto estes devem ser tóxicos para os microorganismos invasores e inócuos para os seres humanos,

sendo de extrema importância o conhecimento das diferenças estruturais e bioquímicas entre o microrganismo e o hospedeiro. Produtos para a lavagem das mãos para manipulações assépticas (cirurgias, alimentos, etc.), geralmente, são adicionados deste grupo de biocidas [8].

Os principais pontos de ação dos antibióticos são a inibição da síntese do peptidoglicano da parede celular bacteriana, lesão da membrana citoplasmática e interferência na síntese de ácido nucléico e proteínas. Os antibióticos podem ser bactericidas (matam) ou bacteriostáticos (impedem o crescimento). A essência da quimioterapia antimicrobiana é a toxicidade seletiva: matar ou inibir o microrganismo sem afetar o hospedeiro e esta toxicidade se baseia nas diferenças entre a estrutura e a composição química das células procarióticas nas bactérias e eucarióticas nos seres humanos [8].

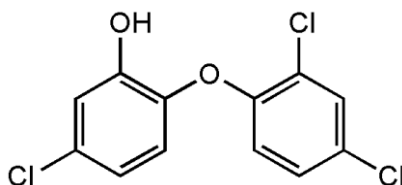
### **2.2.1. Triclosan**

O composto orgânico Triclosan (TCS), também conhecido como: Irgasan DP 300, Irgacare MP, Lexol 300, Ster-Zac, Cloxifenolum, Irgagard B 1000 e 5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxi) [10] é uma substância química com propriedade antibacteriana e antimicrobiana de baixa toxicidade e largo espectro antimicrobiano (gram positivo, gram negativo) [11], cujo principal sítio de atividade é a membrana citoplasmática da bactéria [12,13]. Por causa destas propriedades, ele tem sido muito utilizado em produtos de higiene pessoal, sendo encontrado em cremes e enxaguantes bucais, shampoos, desodorantes, sabonetes e sabonetes de uso hospitalar, dentre outros produtos [5,11,14,15]. O TCS também pode ser utilizado como agente conservante, sendo incorporado em polímeros e fibras e até mesmo em tecidos, resultando em materiais que apresentam propriedades antibacterianas [16].

Devido a essas propriedades, produtos cosméticos que contenham TCS são considerados de *grau 2* pela ANVISA, necessitando de comprovação de sua eficácia e também instrução para uso [6].

O TCS é uma molécula com características lipofílicas, apresentando  $pK_a$  de 7,1 e log  $K_{ow}$  de 5,4, valor considerado alto [17,18]; em pH neutro apresenta um forte potencial para sorção em particulados orgânicos e é estável; porém em pH básico ocorre

a ionização da molécula, sendo que nesta forma perde a estabilidade [11]. Ainda, o TCS tem baixa solubilidade em água,  $10 \text{ mg L}^{-1}$  a  $20^\circ \text{ C}$ , é hidroliticamente estável e relativamente não-volátil [17,18]. Na figura 1 é mostrada a estrutura química do TCS (Fig. 1).



**Figura 1.** Estrutura química do Triclosan.

A EPA (Environmental Protection Agency) e FDA (Food and Drug Administration) compartilham a responsabilidade pela regulamentação de produtos que contenham o antimicrobiano TCS nos Estados Unidos. Em geral, a EPA regula os produtos onde o TCS é usado como conservante fungicida ou biocida, enquanto o FDA regula todos os usos em alimentos e drogas, incluindo seu uso em sabonetes, desodorantes, cremes e medicamentos contra acne [13].

O FDA classifica-o como droga de classe III, enquanto que a EPA registra como pesticida [19], o TCS é considerado de risco para a saúde humana e o ambiente, em virtude de sua formulação química e da estrutura molecular ser similar à de alguns produtos químicos tóxicos ao ambiente como dioxinas e PCB.

No Brasil, a ANVISA estabelece um máximo de 0,30% de TCS em produtos de higiene pessoal [20], mesmo valor estipulado pela União Européia. Na Europa são produzidos em torno de 350 toneladas de TCS anualmente, que são utilizados em aplicações comerciais. Nos Estados Unidos da América um estudo realizado entre os anos de 1999 e 2000 com diferentes tipos de produtos de higiene pessoal, para os itens sabonetes em barra e sabonete líquido, chegou à conclusão que cerca de 76% dos produtos estudados continham em sua formulação o bactericida TCS como aditivo [21].

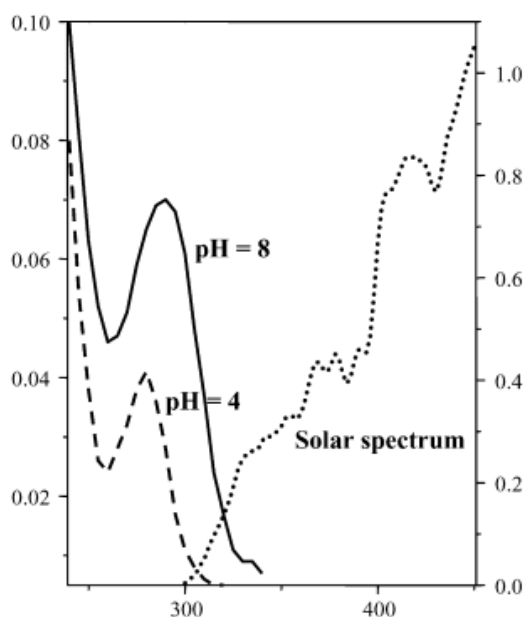
Devido à grande quantidade de produtos que contém o TCS e a alta dosagem em que é encontrado, este passou a ser alvo de estudos para averiguar a influência deste bactericida no meio ambiente. Este contaminante emergente pode atingir o ecossistema

através da eliminação imprópria de produtos utilizados em limpezas domésticas e hospitalares, produtos de higiene pessoal, descarte industrial e por meio de excreção de seres vivos; contudo o descarte como ingrediente de produtos de higiene pessoal se destaca como sendo umas das principais vias de contaminação do meio ambiente [17].

MESCUA *et al.* realizaram um estudo para verificar indícios da fototransformação de TCS em dioxinas, compostos que são ainda mais tóxicos que o composto em estudo. Neste trabalho foi adicionado padrão de TCS à água desionizada e também em matrizes de efluente e influente de uma estação de tratamento de esgoto da Espanha. Estas amostras foram irradiadas com luz solar natural por diferentes intervalos de tempo e os compostos formados foram isolados com o auxílio da extração em fase sólida e analisados por cromatografia em fase gasosa acoplado ao detector de espectrometria de massas. O estudo comprovou que em valores de pH mais elevados havia o desaparecimento do TCS com simultâneo aparecimento da 2,7 e da 2,8-dibenzodictloro-p-dioxina (Fig. 2), confirmando a hipótese de que a interação de fótons solares com a estrutura química do composto permite a fotodegradação potencial de TCS e sua transformação em uma substância ainda mais tóxica.

O estudo ainda analisou a estação de tratamento com relação à total eliminação destes compostos da água tratada, porém foi confirmada a presença do analito antes da etapa de tratamento, com concentrações variando entre 2,3  $\mu\text{g L}^{-1}$  em abril a 562  $\mu\text{g L}^{-1}$  no mês de janeiro. Após a etapa de tratamento da água os valores da concentração de TCS variaram entre 0,10  $\mu\text{g L}^{-1}$  em abril e 269  $\mu\text{g L}^{-1}$  no mês de janeiro, demonstrando a ineficiência do sistema de tratamento de água de esgoto na eliminação completa do TCS, sendo esse remanescente descartado em águas naturais [16].





**Figura 2. Espectro Solar de emissão UV e espectro de absorção UV de triclosan em pH 4 e 8.**Fonte:MESCUA M. et. al. [16].

No trabalho de LATCH *et al.*, foram realizados estudos da transformação do TCS em outras moléculas em diferentes pHs, porém, neste caso, ficou evidenciado somente a formação da 2,8-dibenzodictoro-p-dioxina, que foi facilitada pela presença da forma aniônica da molécula de TCS que, em pH 8,0 estava próxima de 48% .

O TCS pode originar uma série de alterações ambientais devido a sua toxicidade para a vida dos microorganismos, inclusive levando ao aumento da concentração de dioxinas no ambiente que, como visto, pode ser formada através da fotodegradação do TCS. As dioxinas são substâncias muito tóxicas para seres humanos e ambiente[22].

Alguns autores [14,16,17,23,24,25] têm mencionado a presença deste contaminante em efluentes de estações de tratamento de água, estações de tratamento de esgoto, águas superficiais, águas residuais também em sedimentos [26]; com os consequentes efeitos aos seres aquáticos.

Lameira estudou o efeito de TCS em uma espécie planctônica filtradora, a *Daphniasimilis*, e constatou que TCS tem efeito teratogênico para este microorganismo a partir da concentração de 0,05 mg L<sup>-1</sup>[27]. Estudos mais recentes mostraram que TCS pode afetar o desempenho do nado em larvas de alevinos expostos ao bactericida, um

efeito possivelmente atribuível às deficiências musculares cardíacas e esqueléticas provocadas pela presença do contaminante [28]. Mohamed Nassefet *al.* observaram diminuição na velocidade com que os peixe medaka ou peixe arroz nadavam quando submetidos a uma dose de  $0,17 \text{ mg L}^{-1}$  de TCS[29].

Existem estudos que demonstram os efeitos tóxicos do TCS em peixes de água doce da espécie “*Xiphophorus helleri*” [30]. Estes estudos comprovam que a presença deste contaminante no meio ambiente pode afetar de maneira significativa a população dessas espécies de peixe, e deduz que, talvez, possa também apresentar algum efeito nos seres humanos.

Em outro estudo foi tomado como exemplo o uso de cremes dentais contendo o bactericida [31]. Como os dentistas recomendam fazer uso da escovação de dentes após todas as refeições, ou seja, no mínimo três vezes ao dia, Silva et. al. demonstraram que, uma pessoa que acaba de escovar os dentes com um creme dental contendo até 0,30% do bactericida em sua composição, apresenta uma concentração de  $1,60 \text{ mg L}^{-1}$  do composto em sua saliva e que após 12 h da utilização do creme dental, ainda há resquícios de TCS numa concentração de  $26,5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  [32]. Levando-se em consideração que uma pessoa escova os dentes no mínimo três vezes ao dia e que ainda utiliza diariamente sabonetes, desodorantes, cremes e perfumes que podem conter em sua formulação o composto em estudo, e que a água também pode estar contaminada por estes compostos, torna-se preocupante a quantidade que pode ser ingerida deste produto diariamente.

Nos seres humanos o TCS vem sendo apontado como um disruptor endócrino [15]. Disruptores ou interferentes endócrinos são compostos que têm a capacidade de simular ou mesmo bloquear a ação natural dos hormônios no corpo humano, podendo aumentar ou diminuir as quantidades de hormônios e, portanto alterar as funções endócrinas [33].

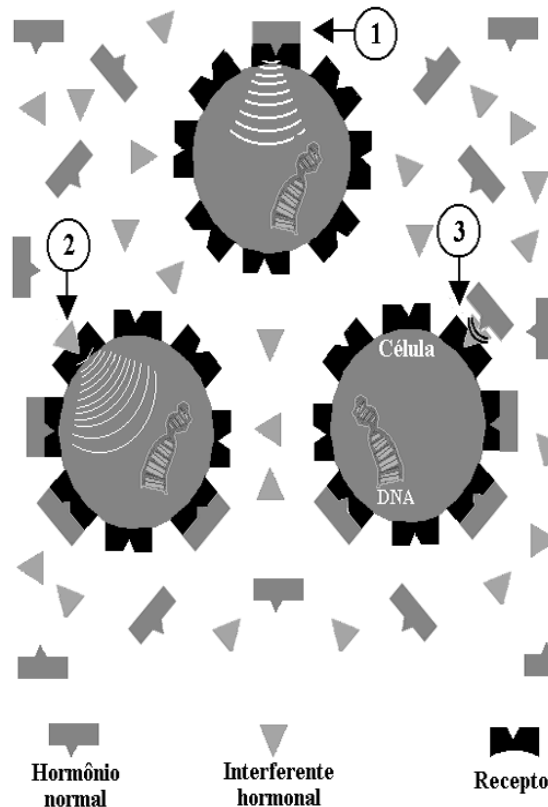
Na Figura 3 é mostrado o mecanismo pelo qual os interferentes endócrinos podem agir no organismo:

1-Em um organismo livre de interferentes endócrinos, os hormônios se encaixam perfeitamente nos receptores e transmitem os sinais indispensáveis as células;

2-Em um organismo onde há a presença dos interferentes endócrinos, estes podem agir de duas maneiras: os interferentes hormonais ocupam o lugar dos

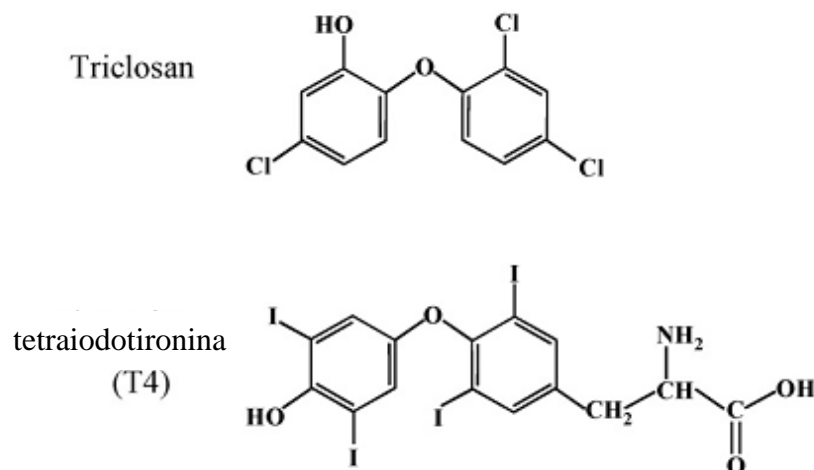
hormônios encaixando-se perfeitamente nos receptores e na sequência enviam sinais diferentes e fora do tempo das células ou;

3- Os interferentes endócrinos podem atuar como bloqueadores dos sinais normais dos hormônios que seriam enviados às células.



**Figura 3. Esquema de ação dos interferentes endócrinos.** Fonte: GUIMARÃES, J.R [33].

CROFTON et. al. observaram uma grande semelhança entre as estruturas químicas do TCS e da tetraiodotironina (T4) ou tiroxina (Fig. 4), o que os levaram a investigar se havia a diminuição do hormônio natural na presença do bactericida. Os resultados demonstraram claramente que a presença de TCS diminui as concentrações circulantes de T4 em ratos, no entanto, os mecanismos pelos quais o TCS reduz a concentração sérica de T4 ainda são desconhecidos [15].



**Figura 4. Estruturas químicas do TCS e da tetraiodotironina.** Ambas moléculas são éteres halogenadosbifenílicos. FONTE: CROFTON *et al.*[15].

A presença de TCS também foi investigada em amostras de leite humano, sendo encontrados níveis na faixa de 3,39 a 14,5 ngmL<sup>-1</sup> de TCS, além de outros contaminantes [34]. Estas substâncias se fixam no leite materno através da afinidade que possuem pela gordura que é encontrada no leite, podendo ser passadas ao bebê por ingestão, justamente o alimento natural considerado como ideal, tanto do ponto de vista alimentar quanto imunológico. Este efeito ocorre devido à biomagnificação, sendo transferidos da mãe agentes químicos tóxicos que se acumularam em seu organismo por muitos anos, mas que são passados ao bebê, que possui peso corpóreo bem inferior ao da mãe, em curto intervalo de tempo [33], o que pode intensificar os efeitos destas substâncias no recém-nascido.

Como exposto, as possibilidades de contaminação do TCS justificam o interesse e à necessidade de se desenvolver métodos analíticos para determinação deste composto, tanto no meio ambiente, quanto em amostras fisiológicas para que sirvam de ferramenta para conhecer melhor os mecanismos de ação deste contaminante no ambiente, bem como as implicações que podem resultar ao ser humano quando exposto ao TCS.

A grande maioria dos métodos para quantificação de TCS é baseada na CLAE [32,5,34,35] e na cromatografia em fase gasosa [CG] [14,24,16,36]; sendo a espectrometria de massas, muito utilizada para a sua identificação. Deve-se ressaltar que a espectrometria de massas é uma técnica destrutiva, ou seja, não se pode recuperar a

amostra após a análise, visto que esta é bombardeada por um feixe de elétrons de alta energia, a fim de fragmentar as moléculas em íons com diferentes relações carga/massa (m/z). Apesar de ser uma técnica muito difundida, os equipamentos e o custo de manutenção são elevados.

A detecção utilizando espectrofotometria com arranjo de fotodiodo também têm sido bastante utilizada para detecção deste composto. Esta técnica é bastante eficiente para compostos que absorvem radiação no UV-Vis e apresenta vantagens como o custo e o fácil manuseio e manutenção, porém não é conclusiva para a identificação da espécie química que está sendo separada. Um arranjo de diodos consiste em uma série de fotodiodos posicionados lado a lado num cristal de silício, de tal forma que cada comprimento de onda, após difratado pela grade, possa atingir um ponto deste arranjo e, conseqüentemente, um detector de arranjo de diodos, originando um sinal. Desta forma, este detector permite que a absorbância de uma amostra seja registrada simultaneamente em vários comprimentos de onda.

SILVA *et al.* determinaram TCS em amostras ambientais e em produtos de beleza utilizando a CLAE com detector de arranjo de diodos, tendo como fase móvel uma mistura de acetonitrila e água adicionada de 0,1% de ácido fosfórico na proporção de 80:20 (v/v), obtendo limites de quantificação e determinação de 0,1 e 0,4  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente [32].

PICOLI *et al.* fizeram a determinação de TCS por CLAE em produtos de higiene pessoal; utilizaram como fase móvel uma mistura de acetonitrila e fosfato de trietanolamina (70 mmol; pH 3.5) numa proporção de 55:45 (v/v) e obtiveram limite de detecção de 2,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  [18].

MEADE *et al.* realizaram estudo e demonstraram que algumas bactérias são capazes de inativar o bactericida TCS, possibilitando o crescimento de bactérias. Nesse estudo, a separação e determinação do TCS foi realizada utilizando a CLAE acoplada ao detector UV-Vis com arranjo de diodos e como fase móvel acetonitrila:solução de ácido acético nas proporções de (60:40, v/v) [35].

Com relação aos métodos de preparo de amostra para determinação de TCS a extração em fase sólida tem sido muito utilizada [5,36,11], sendo que os eluentes mais utilizados foram metanol, acetona, acetonitrila e diclorometano.

Observa-se que existem vários métodos de determinação e extração de TCS na literatura, principalmente devido à preocupação com a contaminação do ambiente e seus efeitos na saúde humana; porém ainda há grande utilização de solventes orgânicos tóxicos durante essas análises que geram grande quantidade de resíduos que necessitam de tratamento. Neste sentido, o desenvolvimento de métodos analíticos que contemplem os preceitos da química limpa é uma necessidade, inclusive na etapa de preparo das amostras.

### **2.3. Filtro solar**

Os filtros solares são produtos utilizados para proteger a pele da radiação ultravioleta solar, estes são adicionados a diversos tipos de produtos como bases e cremes para rosto, batom, xampu, repelentes entre outros. São adicionados também às embalagens de vários produtos para proteção da cor ou mesmo para evitar a degradação. Segundo a ANVISA, produtos que contenham filtro solar, são considerados de grau 2 e é obrigatório comprovar a eficácia do fator de proteção do produto em questão [31].

A radiação solar que atinge a superfície da terra é formada em sua maioria por radiação ultravioleta (UV) (100–400 nm), radiação visível (400–800 nm) e infravermelha (acima de 800 nm). A radiação UV pode ser subdividida em UVA - 320 a 400 nm, UVB - 280 a 320 nm e UVC - 100 a 280 nm. As frações que atingem a Terra são a UVA e UVB, a atmosfera terrestre bloqueia a passagem da radiação UVC que é portadora de elevadas energias, extremamente lesiva aos seres vivos [37].

Em nosso organismo os raios UV podem estimular a produção de melanina, cuja manifestação é visível sob a forma de bronzeamento da pele, ou pode levar desde a produção de simples inflamações até graves queimaduras, existindo inclusive a possibilidade de causar mutações genéticas e comportamentos anormais das células, ocorrências que têm aumentado nos últimos anos [38]. Sendo assim, os filtros solares são indicados para minimizar os efeitos nocivos da radiação solar.

Os filtros solares são classificados em orgânicos e inorgânicos. Os filtros inorgânicos atuam refletindo ou desviando a radiação solar, sendo os principais agentes protetores o dióxido de titânio, óxido de zinco, silicatos e óxidos de ferro [39]. Não são tão bem aceitos pela população em função da aparência esbranquiçada que deixam na

pele, tendo esse aspecto justamente por se tratar de um bloqueador de raios solares e não um protetor que absorve a radiação. São indicados para fabricação de protetores para crianças e pessoas com a pele muito sensível, principalmente devido à baixa absorção pela pele e alta proteção[37,38].

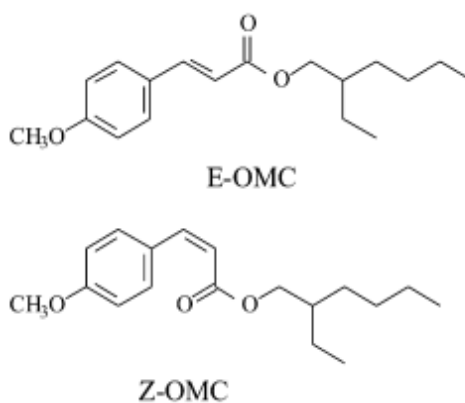
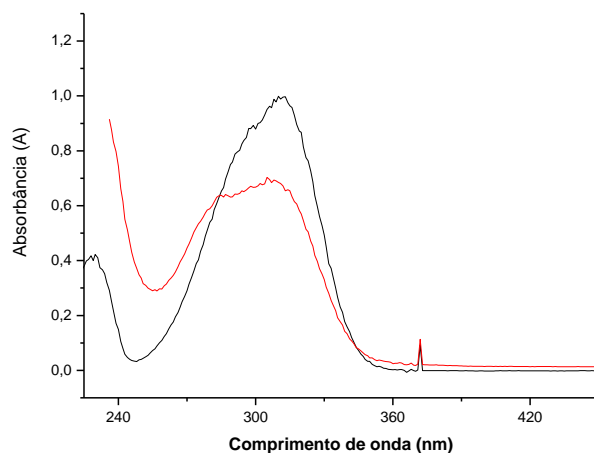
Os filtros orgânicos são formados por moléculas capazes de absorver a radiação UV (alta energia) e transformá-la em radiações com energias menores e inofensivas aos seres humanos [38]. Em geral, sua estrutura química consiste em compostos com um ou mais anéis aromáticos e grupos funcionais atuando como doadores ou receptores de elétrons [40]. A molécula tende a deslocar os elétrons a um estado mais alto de energia e essa excitação causada pela absorção da luz UV é o estado favorecido da molécula [38].

### **2.3.1 Etilhexilmetoxicinamato**

Etilhexilmetoxicinamato (EHMC) ou 2-etil exil-3-(4-metoxifenil)-2-propanato (CAS 5466-77-3) é uma substância utilizada em filtros solares orgânicos que absorve radiação na faixa UVB (320-280nm). Foi originalmente desenvolvido no ano de 1950 e tem sido um dos protetores solares mais amplamente utilizados ao longo de décadas [38, 41-46]. EHMC é um derivado de ácido cinâmico que tem um grupo metoxi na posição para. Suas principais características são: grande eficácia na absorção da radiação UVB, baixa solubilidade em água e de custo relativamente baixo [43].

Trata-se de uma molécula com características lipofílicas, apresentando solubilidade em água na faixa de 750 a 41  $\mu\text{g L}^{-1}$  e apresenta-se como um óleo incolor [41]. O EHMC quando exposto a luz sofre isomerização, passando do E-EHMC [ $\lambda=309$  nm,  $\epsilon=24000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  em etanol] para Z-EHMC ( $\lambda=301$  nm,  $\epsilon=11900 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  em etanol) [47]. A estrutura e o espectro de absorção na região do UV-Vis dos isômeros do EHMC são mostradas na figura 5.

Estudos mostraram que quando exposto à luz cerca de 54% do E-EHMC se isomeriza para o Z-EHMC, sendo que a capacidade de absorção dos raios UV pelo isômero formado é significativamente inferior a capacidade de absorção do composto original, ocasionando uma menor proteção aos usuários deste produto [48].



**Figura 5. Espectro de absorção molecular na região do UV-Vis para as soluções do composto E-EHMC e Z-EHMC em solução etanol:ácido fosfórico.** A concentração era de  $1,0 \text{ mgL}^{-1}$ . Sem a presença E-EHMC (linha preta) e após 45 min de luz solar (linha vermelha).

A ANVISA estabelece um limite máximo de até 10,0 % de EHMC para produtos destinados a proteção solar, o mesmo valor estipulado pela União Européia e Japão, enquanto que os Estados Unidos Z-EHMC estipula um máximo de 7,5% de EHMC em filtros solares [49]. Devido aos altos níveis destes compostos em cosméticos o EHMC tem sido tratado como um poluente emergente, existindo na literatura vários



estudos para verificar quais os danos que podem ser causados por este composto quando exposto no ambiente.

FENT *et al.* e colaboradores realizaram um trabalho para verificar a presença de EHMC e outras substâncias utilizadas em filtros solares em rios e nos organismos aquáticos. O EHMC foi encontrado nas amostras de água, em 48 amostras de macroinvertebrados e em peixes dos 6 rios analisados. Nos peixes as concentrações encontradas estavam acima de  $337 \text{ ng g}^{-1}$ , enquanto que para os corvos marinhos analisados as concentrações estavam acima de  $701 \text{ ng g}^{-1}$ . Esses resultados sugerem uma bioacumulação na cadeia alimentar, visto que para o corvo, que seria o topo da cadeia alimentar, houve a ocorrência das maiores concentrações de EHMC [50].

AXELSTAD *et al.* e colaboradores realizaram um amplo estudo para verificar os efeitos do EHMC em ratos. Fêmeas em período gestacional foram expostas ao filtro solar em 3 tratamentos com concentrações diferentes e testes foram realizados para verificar os efeitos do produto nos recém nascidos. Observou-se que durante a gestação, principalmente para as duas maiores concentrações de EHMC, houve uma grande perda de peso das mães; enquanto que o peso das ninhadas para esses dois grupos também foi menor quando comparado com o grupo controle. Foi verificada uma diminuição nos níveis de T4 no sangue tanto para as fêmeas quanto para os machos.

Testes das atividades motoras dos ratos recém nascidos mostraram que as fêmeas eram mais sensíveis ao filtro, apresentando uma grande diminuição em suas atividades, enquanto que para os machos não houve diferença comportamental. Os resultados dos testes em ratos mostram que, o teste comportamental de interferentes da tireoide com múltiplos modos de ação fornece informações complementares e úteis, contribuindo para uma compreensão mais ampla de como se dá a toxicidade dos poluentes emergentes como o EHMC e, ajuda a esclarecer a maneira como estes podem agir nos organismos humanos, principalmente quando se leva em consideração a grande exposição a estes contaminantes [42].

Foram realizados estudos para se verificar a eficiência do tratamento de água para a retirada desse contaminante. Para tanto, utilizou-se uma estação de tratamento de esgoto da China que, conta com três etapas de limpeza da água: coagulação-floculação seguida de micro filtração contínua e ozonização, de onde foram retiradas alíquotas

após cada etapa e levadas para a análise dos contaminantes: benzofenona-3, 4-metilbenzilideno, canfor, etilhexilmetoxicinamato, e octocrileno.

Para a etapa de coagulação seguida de floculação a máxima remoção conseguida foi de 7,6 a 21%. O tratamento por filtração contínua foi a etapa que apresentou a mais baixa retirada dos contaminantes, com remoção máxima de 3,6 a 8,2%, enquanto que a ozonização conseguiu uma maior eliminação dos contaminantes que as demais etapas, com retirada de 16 a 28% das substâncias utilizadas nos filtros UV. Contudo, observou-se que em nenhuma etapa dos tratamentos houve a completa retirada dos contaminantes, revelando que os sistemas convencionais de tratamento de água não estão preparados para receber e eliminar contaminantes emergentes [40].

Um programa para o controle de poluentes em água foi realizado na Espanha, esse estudo se entendeu para águas de superfície, águas residuais e potáveis durante as quatro estações dos anos de 2007 e 2008. Foi estudada uma série de poluentes emergentes de diferentes classes como farmacêuticos, plastificantes, triclosan, herbicidas, repelentes de insetos e filtros UV entre outros [51].

TCS foi encontrado em 82% das amostras de influentes com média de concentração de  $57,0 \text{ ng L}^{-1}$ . Após a etapa de tratamento do influente, a taxa de remoção do TCS foi de 57%, sendo a média de concentração de  $16,0 \text{ ng L}^{-1}$ . TCS foi encontrado em apenas uma das amostras de água superficial na concentração de  $10 \text{ ng L}^{-1}$  e não foi encontrado em água potável. Neste trabalho, em nenhuma das amostras foi encontrada a substância EHMC. A ausência desta substância foi justificada pelo fato de se tratar de composto com característica lipofílica, não sendo o método utilizado para preparo das amostras capaz de extraí-la da matriz [51].

Os efeitos que EHMC pode desencadear nos seres humanos ainda são muito controversos, estudos realizados mostraram que quando ratos são expostos ao EHMC há uma redução significativa nos níveis de alguns hormônios e um aumento nos níveis de hormônios estimulantes da tireóide ou TSH; sendo observado que o EHMC reduziu as atividades das enzimas desidasesiodotironina, importantes na ativação e desativação de hormônios da tireóide do tipo I no fígado; o que reduz a conversão do hormônio tireoidiano tetraiodotironina (T4) que é a forma inativa para à forma de triiodotironina (T3) que é a forma ativa do hormônio [46].

Sem dúvida, existe a necessidade de mais estudo nesta área para descobrir quais os danos que podem ser causados ao seres humanos; como por exemplo, descobrir o quanto desses contaminantes são passados para o leite materno e o mal que eles podem causar às crianças que o ingerirem em doses diárias através do leite. Em um estudo que recrutou 54 mulheres com filhos em fase de lactação, e analisou-se vários contaminantes no leite, como poluentes organoclorados, pesticidas, bifenilas policloradas. Dentre os contaminantes, o EHMC apresentou grande destaque pela gama de produtos em que foi encontrado e pela grande percentagem de mulheres que os usavam.

Dentre as mães estudadas, 60,38% afirmaram utilizar produtos que contêm protetores solares, sendo que o EHMC apareceu como o filtro solar utilizado por 66,0% das mulheres, principalmente porque é encontrado em uma maior quantidade de produtos, tais como: protetores UV, batons, maquiagem, perfumes e produtos para cuidado da pele. O EHMC foi encontrado na concentração de 27,50 ng g<sup>-1</sup> de lipídio no leite materno. Fazendo-se uma previsão de quanto um recém-nascido estaria ingerindo de EHMC diariamente juntamente com o leite materno, chegou-se a concentração de 178,9 ng g<sup>-1</sup> lipídio, um valor considerado elevado. Das 54 amostras analisadas em 42 foi encontrado o EHMC [52].

Os métodos de determinação de EHMC são baseados na CLAE com detecção no ultravioleta. SAMEONE *et al.* descreveram um método para a determinação deste composto que utiliza coluna C-18 e como fase móvel metanol–acetoneitrila–tetraidrofurano–água na proporção de 40:10:10:40 (v/v/v/v), todos contendo 0,5 % de ácido acético. Sob estas condições foi possível separar 7 substâncias presentes em filtros solares em apenas 16 min [37].

Em outro estudo conseguiu-se efetuar a determinação de 5 tipos diferentes de substâncias utilizadas em filtros solares, incluindo também o EHMC, utilizando coluna cromatográfica C-18 e como fase móvel metanol:água na proporção de 88:12 (v/v). Foi possível a separação dos 5 compostos em 16 min com limites de detecção e quantificação adequados para análises em amostras ambientais [53].

É possível verificar na literatura trabalhos que levam em consideração os princípios da química limpa e prezam pela diminuição da utilização de solventes orgânicos tóxicos na preparação da fase móvel. Chisvert *et al.* propuseram metodologia

para determinação de 6 tipos diferentes de substâncias utilizadas em filtros solares em amostras de cremes protetores, tendo tempo de corrida de 18 min. Para tanto, foi utilizada como fase móvel uma mistura de etanol:água:ácido acético 70:29,5:0,5 (v/v/v) contendo 65.4 mM de hidroxipropil - beta - ciclodextrina que, trata-se de um modificador orgânico quiral. No meio hidroalcoólico a ciclodextrina tem uma ação similar à de um surfactante, a molécula apresenta uma cavidade hidrofóbica e uma parte exterior hidrofílica, concedendo um aumento da solubilidade de compostos orgânicos em água e facilita e melhora a separação analítica [49].

Dentre as aplicações que envolvem métodos de extração e pré-concentração, a extração em fase sólida é muito utilizada para EHMC em matrizes aquosas [54]; sendo que os solventes mais utilizados para a dessorção do analito foram acetato de etila: diclorometano [40] e metanol:diclorometano[39]. Devido ao elevado volume utilizado na fase de eluição do analito, estes métodos contam com uma etapa adicional que é a evaporação do solvente que, pode contribuir para adicionar erros na análise e aumentar o tempo e o custo da mesma.

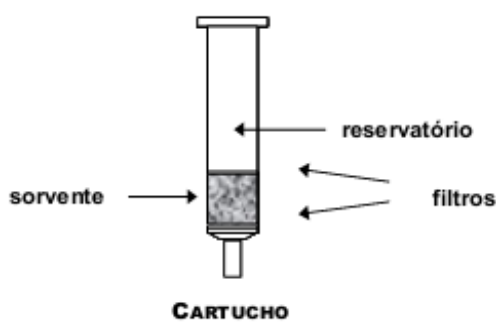
#### ***2.4. Extração em fase sólida***

O princípio da extração em fase sólida é similar ao da extração líquido-líquido, porém ao invés de ser uma partição entre dois líquidos imiscíveis, há a partição entre e um líquido (amostra ou solvente fortificado com o analito) e um sólido (que pode ser um líquido quimicamente ligado ao sorvente) [55]. Os mecanismos de retenção dos analitos nos sorventes são baseados nas forças de van der Waals, ligações de hidrogênio, interações dipolo-dipolo e interações de dupla troca [55].

Esta técnica de extração utiliza colunas recheadas com sorventes, comumente empacotados em cartuchos, por onde se passa a amostra líquida com o propósito de que o analito de interesse fique retido no sorvente[55] ou que os interferentes fiquem retidos e o analito possa ser separado. Quando esta técnica é utilizada para fins de pré-concentração, é desejável recuperar os analitos em um pequeno volume de solvente e para isso é necessário encontrar um solvente no qual os analitos tenham um mínimo fator de retenção [56]. Esta metodologia é simples e versátil devido à possibilidade de

modificação tanto do eluente como da fase estacionária, sendo semelhante ao princípio da cromatografia em fase líquida, porém em proporções menores [56,57].

Normalmente, utiliza-se uma pequena coluna contendo sorvente com partículas entre 50 -60  $\mu\text{m}$  que ficam entre dois discos porosos, numa seringa de polipropileno [56](Fig. 6). Antes de iniciar a análise, a fase estacionária deve ser condicionada através das seguintes etapas: 1- ativação do sorvente para deixar os sítios ativos disponíveis; 2- condicionamento do sorvente com o solvente adequado para ajustar as forças do solvente de eluição com o solvente da amostra; 3- introdução da amostra, quando ocorre a retenção do analito e também de alguns interferentes; 4- limpeza da coluna para retirar os interferentes menos retidos que o analito; 5- eluição e coleta do analito[55,56,58].



**Figura 6. Ilustração de cartucho utilizado na extração em fase sólida.**

A extração em fase sólida pode utilizar como sorventes carvão ativado, sílica gel, silicato de magnésio (Florisil), fases quimicamente ligadas e polímeros, dentre outros. Dependendo do sorvente utilizado a fase pode ser classificada como: fase reversa, quando o sorvente é mais apolar que o solvente; fase normal quando o sorvente é mais polar que o solvente e também uma fase de troca iônica [55].

A EFS apresenta vantagens em relação à extração líquido-líquido devido ao menor consumo de solventes orgânicos, reduzindo o volume de resíduos tóxicos gerados, apresenta uma fácil automação e é uma técnica de baixo custo. É aplicada em pré-concentração e limpeza, também conhecida como “clean up”, de matrizes ambientais, alimentícias, farmacêuticas e biológicas [58].

### ***2.4.1. Adsorção em fase sólida***

Os materiais adsorventes utilizados para preencher os cartuchos de extração são substâncias naturais ou sintéticas, geralmente com estrutura monocristalina, com microporos de pequena variação nos diâmetros e superfície interna acessível a uma combinação seletiva entre o sólido e o soluto que se deseja extrair.

Para que um material possa ser considerado um bom sorvente, ele deve apresentar um grande área interfacial (área externa mais a área dos poros), além de baixo custo, resistência mecânica, inércia química e densidade adequada.

Os mecanismos de adsorção à fase sólida são: adsorção e partição

**Adsorção** – trata-se de um fenômeno de superfície, ou seja, há uma concentração de um componente na superfície ou interfase de duas fases, sendo uma delas sólida. O carvão foi o primeiro sólido utilizado como sorvente para retirada de compostos orgânicos da água, atualmente polímeros orgânicos têm sido utilizados para essa finalidade.

A dessorção dos compostos retidos na superfície do material sorvente é baseada no coeficiente de partição do analito entre o sorvente e o eluente [58].

**Partição**- é a distribuição do soluto entre o solvente e a fase sólida recoberta por um fino filme líquido através de solubilização. A partição é regulada pela diferença de potencial químico entre as duas fases e as energias dos solventes em ambas as fases.

Os grupos orgânicos ligados a sílica mais amplamente utilizados são cadeias de hidrocarbonetos, chamados de fase reversa, por apresentar uma fase sólida com característica mais apolar que a fase líquida. Estas fases são produzidas através da reação da sílica gel com grupos orgânicos mono, di ou tricloro-silano orgânico, o que acarreta em uma superfície coberta de material orgânico que irá substituir os grupamentos hidroxila da superfície da sílica [58].

### ***2.4.2. Parâmetros da extração em fase sólida***

Alguns cuidados devem ser tomados ao utilizar a técnica de extração em fase sólida. Um dos fatores que prejudicam a extração é a presença de material particulado nas amostras ambientais. Isso ocorre devido à competição entre os grupos hidrofóbicos presentes na água pelos sítios ativos do adsorvente. A presença de surfactantes e substâncias húmicas pode aumentar a solubilidade de compostos orgânicos na água, diminuindo assim, a taxa de recuperação do método [59].

Outro fator de grande importância é o volume da amostra passado pelo cartucho. Se o volume da amostra exceder em muitas vezes o volume da coluna, o próprio solvente da amostra começa a retirar os compostos de interesse do sorvente, fazendo com que as percentagens de recuperação se tornem menores. Volume de saturação da fase sólida, do inglês *Breakthrough*, é o volume máximo de amostra que deve ser passado por um cartucho; a partir deste volume, o eluato passa a ser retirado do cartucho pelo próprio solvente da amostra, sendo a concentração do analito na saída do cartucho, igual a concentração na amostra [56,60]. Alguns problemas podem ocorrer e o volume de quebra ser muito pequeno, isso ocorre quando há uma amostra com alta concentração do analito, ou mesmo quando os interferentes da matriz têm afinidade pela fase sólida, podendo ocorrer falta de pratos teóricos e o analito não permanecer retido [56].

O pH do meio deve ser controlado, principalmente para analitos que podem sofrer ionização; para estes casos, deve-se verificar qual a forma mais retida no sorvente e ajustar o pH para que o composto permaneça na forma que apresenta maior afinidade pela fase sólida.

## **2.5. Métodos Cromatográficos**

A cromatografia é um método físico-químico de separação baseada na interação dos analitos com a fase estacionária e a fase móvel, sendo as separações alcançadas por diferentes mecanismos como partição, adsorção, troca iônica, exclusão por tamanho ou interação estereoquímicas, dependendo do tipo de fase estacionária utilizada [61]. Trata-se de uma das técnicas analíticas mais poderosas e versáteis, pois em uma única análise pode-se separar uma mistura de substâncias em seus componentes individuais e

simultaneamente realizar a determinação quantitativa e qualitativa de cada espécie química presente na amostra [62,63].

A cromatografia foi desenvolvida em 1906 pelo botânico MikhelSemenovichTswett. As primeiras análises realizadas por Tswett foram conseguidas recheando uma coluna de vidro com vários sólidos com a intenção de separar componentes de folhas usando éter de petróleo como eluente, sendo os componentes da amostra eluidos a pressão atmosférica. A separação ocorria devido às diferentes interações dos analitos com a fase estacionária e fase móvel, sendo então, os analitos eluidos da coluna cromatográfica em tempos de retenção diferentes [61,64].

A cromatografia sofreu várias alterações desde a sua criação, porém o princípio básico da separação continua o mesmo. As partículas que preenchem a coluna cromatográfica agora são muito pequenas, na ordem de micrometros, essa diminuição faz com que se aumente a superfície de contato entre a fase móvel e a fase estacionária melhorando a separação; porém, isso tornou necessário o uso de bombas de alta pressão para fazer a fase móvel fluir através da coluna cromatográfica.

Anteriormente, a separação era visualizada pela coloração do eluente, como o próprio nome da técnica já diz “chrom” (cor) e “graphe” (escrever) [61], hoje os detectores utilizados podem ser de índice de refração (detector universal), fluorescência e absorção molecular na região do UV-Vis, eletroquímicos, condutividade iônica, espectrometria de massas, ressonância magnética nuclear e espectrofotometria UV-Vis.

Os detectores espectrofotométricos apresentam uma célula de fluxo localizada logo após a coluna, sendo que a radiação passa constantemente na célula de fluxo e é recebida no detector. Com a eluição da substância de interesse, ocorre alteração no nível de energia radiante que chega ao detector, sendo possível a medida do sinal analítico proporcional à concentração do composto de interesse. Existem detectores UV-Vis de comprimento de onda fixo e os de comprimento de onda variável. Os de comprimento de onda fixos operam em um único valor, enquanto que o de comprimento de onda variável opera em dois ou mais comprimentos de onda que podem ser escolhidos pelo operador. Nos detectores espectrofotométricos com arranjo de fotodiodos, a radiação eletromagnética é transmitida através da célula de fluxo, absorvida pela amostra e então separada em seus componentes originais, que são detectados individualmente pelo



detector de fotodiodos, registrando dados de absorvância em toda a faixa do espectro da luz incidente [65].

Na cromatografia em fase líquida, podem ser realizadas determinações onde a composição da fase móvel é modificada durante a análise, ou seja, há um gradiente de composição da fase móvel, o que ajuda na separação e diminui o tempo de análise; porém muitos métodos são realizados sem a variação da composição da fase móvel durante a análise e estes são conhecidos como isocráticos.

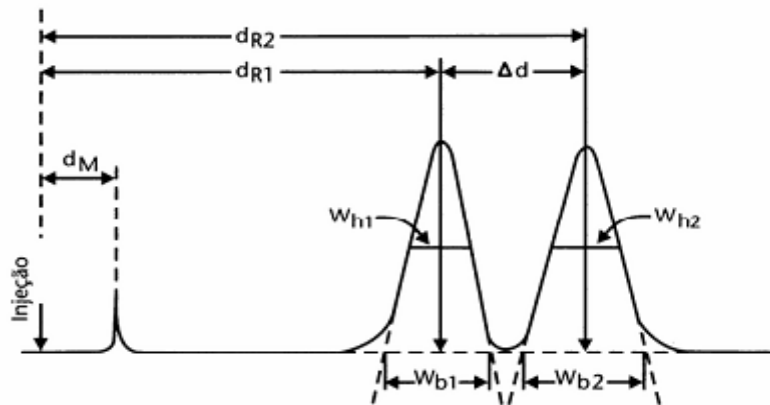
Observa-se que na maioria dos métodos de preparo de amostras e em separações seguidas de determinação utilizando a cromatografia líquida há utilização de solventes orgânicos tóxicos; nesta tese visa-se desenvolver um método analítico limpo para a extração e determinação do bactericida TCS e do filtro solar EHMC.

### ***2.5.1. Parâmetros Cromatográficos***

Os parâmetros cromatográficos são utilizados para comprovar a eficiência de uma separação. Estes parâmetros são obtidos a partir do cromatograma (Fig. 7) e são calculados para o pico de interesse [61].

Para avaliar a eficiência da metodologia analítica proposta, os sinais analíticos no cromatograma devem atender a alguns parâmetros como:

**Resolução** – é calculada a partir da distância que separa os pontos máximos dos picos e da média das larguras de suas respectivas bases, ou seja, para a medida da largura da base, toma-se sempre a distância entre as tangentes traçadas nas laterais do pico (Fig.7) [61].



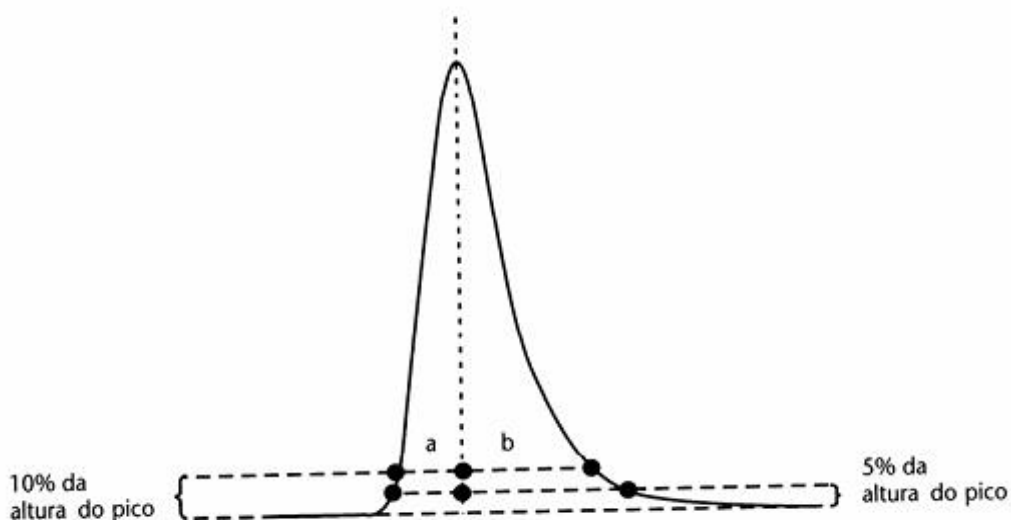
**Figura 7. Medidas relacionadas à determinação da resolução [61].** Sendo:  $d_M$  tempo morto,  $d_{R1}$  tempo de retenção para os picos 1 e 2,  $w_{b1}$  e  $w_{b2}$  largura da base para o pico 1 e 2,  $w_{h1}$  e  $w_{h2}$  largura do pico 1 e 2 a meia altura.

A resolução é um termo sem unidades, o que implica na necessidade de utilizar sempre as mesmas unidades para as distâncias (tempos) de retenção e para as larguras de base. Dessa forma tem-se que a resolução entre dois picos ( $R_s$ ) pode ser apresentado pela equação 1:

$$R_s = 2 \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{(w_{b2} + w_{b1})}$$

A resolução entre dois picos depende das características de retenção de cada componente, a capacidade da fase estacionária reter seletivamente cada componente e também, da eficiência da coluna ( $N$ ). Para fins quantitativos, a resolução mínima requerida é de 1,5 para todos os picos de interesse [61].

**Simetria dos picos** – o fator de assimetria,  $A_s$ , é normalmente calculado a 10,0% da altura do pico sendo satisfatórios valores entre 0,8 e 1,5; e o fator de alargamento,  $TF$ , é calculado a 5,0% de sua altura (Fig.8) [61].



**Figura 8. Medidas relacionadas ao cálculo do fator de assimetria e fator dealargamento [61].**

Assim temos que  $A_s$  e  $TF$  são calculados pelas seguintes equações:

$$A_s = \frac{b}{a}$$

$$TF = \frac{(a + b)}{2a}$$

Picos com uma baixa simetria podem resultar em análises quantitativas imprecisas e, também, em menor resolução, bandas menores não detectadas na cauda de outro pico, além de problemas com reprodutibilidade na retenção [61].

**Fator de retenção** – também conhecido como fator de capacidade, que corresponde à máxima quantidade a ser injetada. Este fator é determinado pela razão das quantidades das moléculas que ficam retidas na fase estacionária ( $n_S$ ) ou solubilizadas na fase móvel ( $n_M$ ). O fator de retenção também está relacionado à razão dos tempos que as moléculas ficam na fase estacionária e na fase móvel. Esse termo é calculado por:

$$k = \frac{n_S}{n_M} = \frac{(t_R - t_M)}{t_M}$$

Este parâmetro é importante para avaliar o tempo de retenção ( $t_R$ ) de um pico no sistema cromatográfico em relação ao tempo de retenção de um composto não retido no processo cromatográfico ( $t_M$ ) ou tempo morto. Valores pequenos de  $k$  indicam que o soluto é pouco retido na fase estacionária tendo maior afinidade pela fase móvel [61].

**Constante de distribuição** – está relacionada à distribuição do soluto entre a fase estacionária e a fase móvel, onde  $C_{FE}$  é a concentração do soluto na fase estacionária e  $C_{FM}$  é a concentração do soluto na fase móvel [24], assim tem-se:

$$K = \frac{C_{FE}}{C_{FM}}$$

Os fatores que influenciam a constante de distribuição ( $K$ ) de um soluto no sistema cromatográfico são: (a) forças intermoleculares entre o soluto e as fases móvel e estacionária; (b) composição e propriedade da fase móvel; (c) tipo e propriedades da fase estacionária e (d) temperatura [61].

**Eficiência da coluna** – a eficiência representada por um cromatograma é medida em termos do número de pratos ( $N$ ) gerados. Um prato pode ser considerado equivalente a uma etapa de equilíbrio entre as duas fases, quanto maior o número de pratos mais equilíbrios existirão, maior será a eficiência e, portanto, melhor a separação [6]. Assim tem-se a seguinte equação:

$$N = 16 \left( \frac{t_R}{w} \right)^2$$

O número de pratos obtidos pode ser afetado por vários fatores, incluindo as condições da análise, o tamanho da amostra, o tipo de soluto e, principalmente, o comprimento da coluna, fato que torna difícil uma comparação do número de pratos entre diferentes colunas. Por isso, a avaliação comparativa entre colunas é feita utilizando a medida da altura equivalente da coluna ( $L$ ) e o número de pratos, eliminando a influência dos diferentes comprimentos da coluna. O valor da altura equivalente a um prato ( $H$ ) é dado por:

$$H = \frac{L}{N}$$

A finalidade mais importante de qualquer separação cromatográfica é a de considerar os parâmetros experimentais que influenciam na resolução. Desta forma, uma baixa eficiência e seletividade resultam em uma baixa resolução. Já quando a seletividade é alta, pode-se compensar a baixa eficiência, obtendo uma adequada resolução. O ideal é uma boa resolução conquistada com boa eficiência e seletividade [61].

Quando se deseja desenvolver uma nova metodologia de análise de preparo de amostra ou mesmo de quantificação e qualificação, há a necessidade de uma validação do método, ou seja, deve-se garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados [66,67,68,69,4]. Portanto, o método desenvolvido deve ainda ser avaliado considerando parâmetros como exatidão, precisão, seletividade, limite de quantificação, limite de determinação, linearidade e robustez adequados à análise.

## ***2.6. Química Limpa***

Química limpa ou química verde tem como prioridade o desenvolvimento e implementação de processos para reduzir ou eliminar o uso ou geração de substâncias nocivas à saúde humana e ao ambiente. Esta idéia, ética e politicamente correta, representa a suposição de que processos químicos que geram problemas ambientais possam ser substituídos por alternativas menos poluentes ou não poluentes. Tecnologia limpa, prevenção primária, redução na fonte, química ambientalmente benigna, ou ainda “greenchemistry”, são termos que surgiram para definir esta importante idéia. Do inglês “Green Chemistry” é o termo mais utilizado atualmente e foi adotado pela IUPAC, pois visa o desenvolvimento auto-sustentável aliado à redução do impacto da atividade química no ambiente [70].

A filosofia da Química Limpa está baseada atualmente em doze princípios básicos:

**1. Prevenção** – evitar a produção do resíduo é melhor do que tratá-lo ou “limpá-lo” após sua geração;

**2. Economia de Átomos** - deve-se procurar desenvolver métodos sintéticos que possam maximizar a incorporação de todos os materiais de partida no produto final;

**3. Síntese de Produtos Menos Perigosos** - sempre que praticável, a síntese de um produto químico deve utilizar e gerar substâncias que possuam pouca ou nenhuma toxicidade à saúde humana e ao ambiente;

**4. Desenvolvimento de Produtos Seguros** - os produtos químicos devem ser desenvolvidos de tal modo que realizem a função desejada e ao mesmo tempo não sejam tóxicos;

**5. Solventes e Auxiliares mais Seguros** - o uso de substâncias auxiliares (solventes, agentes de separação, secantes e entre outros) deve ser, sempre que possível, evitado; se utilizadas, estas substâncias devem ser inócuas;

**6. Busca pela Eficiência de Energia** - a utilização de energia pelos processos químicos precisa ser reconhecida pelos seus impactos ambientais e econômicos e deve ser minimizada. Se possível, os processos químicos devem ser conduzidos à temperatura e pressão ambiente;

**7. Uso de Fontes Renováveis de Matéria-Prima** - sempre que a técnica possibilitar e for economicamente viável, a utilização de matérias-primas renováveis deve ser escolhida em detrimento de fontes não renováveis;

**8. Evitar a Formação de Derivados** - a derivatização desnecessária (uso de grupos bloqueadores, proteção, desproteção, modificação temporária por processos físicos e químicos) deve ser minimizada ou, se possível, evitada, porque estas etapas requerem reagentes adicionais e podem gerar resíduos;

**9. Catálise** - reagentes catalíticos, tão seletivos quanto possível, são melhores que reagentes estequiométricos;

**10. Planejamento para a Degradação** - os produtos químicos precisam ser desenvolvidos de tal modo que, ao final de sua função, se fragmentem em produtos de degradação inócuos e não persistam no ambiente;

**11. Prevenção da Poluição** - desenvolvimento de metodologias analíticas que viabilizem um monitoramento e controle dentro do processo, em tempo real, antes da formação de substâncias nocivas;

**12. Prevenção de Acidentes** - as substâncias, bem como a maneira pela qual uma substância é utilizada em um processo químico, devem ser escolhidas a fim de minimizar o potencial para acidentes químicos, incluindo vazamentos, explosões e incêndios [70].

Cada vez que se consegue cumprir com alguns dos quesitos da Química Limpa, certifica-se que este é o melhor caminho para uma utilização mais consciente dos recursos naturais e para a manutenção da vida no planeta.

### ***2.7. Eficiência da remoção de triclosan durante tratamento de água potável***

A água doce proveniente de rios, lagos ou poços artesianos, antes que possa ser consumida pelos seres humanos, necessita passar por um tratamento prévio para que se torne potável, visto que isso, muitas vezes, não é garantido a partir de sua fonte natural. Logo, para promover o abastecimento de água, faz-se necessária a potabilização das águas naturais, ou seja, adequá-los aos parâmetros microbiológicos, físicos, químicos e radioativos para que atendam ao padrão de potabilidade para não ofereçam riscos à saúde. Este processo de potabilização da água bruta é estabelecido pela Portaria MS Nº 2914 DE 12/12/2011 (Federal) [71] e trata-se de um conjunto de procedimentos físicos e químicos aplicados à água para torná-la potável, evitando a transmissão de doenças. Esse tratamento é normalmente realizado nas chamadas Estações de Tratamento de Água (ETA).

Maringá conta com uma ETA que foi inaugurada em março de 1964, sendo a Estação de Tratamento de Água considerada do tipo convencional, tem vazão nominal de  $1.440 \text{ L s}^{-1}$  e atualmente opera com uma vazão média de  $1.000 \text{ L s}^{-1}$  [72]. A ETA opera realizando os seguintes tipos de tratamento:

**Captação** - a água é captada na sua forma natural (bruta) em mananciais (nascentes de rios) ou poços subterrâneos, e direcionada, por meio de tubulações, para

as estações de tratamento de água [73]. Maringá faz uso da captação da água do rio Pirapó, com uma vazão atual captada de  $1\ 000\ \text{L s}^{-1}$ ,  $3600\ \text{m}^3\ \text{h}^{-1}$  para o abastecimento da cidade [72].

**Coagulação** - a ETA é composta por vários tanques. No primeiro deles, a água recebe uma determinada quantidade de sulfato de alumínio ou depolicloreto de alumínio (PAC). Atualmente, a Sanepar tem optado por utilizar o PAC para a coagulação. Estas substâncias têm a função de aglomerar as partículas sólidas que se encontram na água como, por exemplo, a argila, facilitando assim, a limpeza da água.

**Floculação** – após a coagulação, a água é encaminhada para outro compartimento onde é mantida em constante agitação. Com isso, as partículas sólidas se aglutinam em flocos maiores.

**Decantação** – a seguir, a água é distribuída em outros tanques, onde repousa por determinado tempo. Pela ação da gravidade, os flocos com as impurezas e partículas depositam no fundo dos tanques, clarificando a água. O principal objetivo nesta etapa da limpeza é produzir um efluente clarificado e um lodo adensado que pode ser facilmente manuseado e tratado.

**Filtração** – já decantada, a água passa por filtros formados por carvão, areia e pedras. Nessa etapa, impurezas minúsculas ficam retidas nos filtros, concluindo a limpeza física da água [73].

**Desinfecção** – a adição de elementos químicos é necessária para desinfetar a água que está, até então, fisicamente limpa. Nessa etapa, aplica-se cloro ou ozônio para eliminar microorganismos causadores de doenças [73]. A Sanepar utiliza para a desinfecção hipoclorito de sódio [72].

**Fluoretação** – de acordo com padrões da Organização Mundial da Saúde (OMS) é acrescentado flúor à água já desinfetada; o flúor tem eficiência comprovada na prevenção da formação de cárie dentária em crianças [73].



**Correção do pH** – finalmente é aplicada à água uma certa quantidade de cal hidratada ou carbonato de sódio. Esse procedimento serve para corrigir a alcalinidade da água (pH), preservando a rede de encanamento de futuras corrosões [73].

Portanto para ser considerada potável a água encaminhada a população deve passar por estes procedimentos atendendo ao padrão de potabilidade estabelecido pela portaria N° 2914 não oferecendo riscos à saúde humana. Devem ser realizadas análises periódicas para observar se os parâmetros como Turbidez, pH, gosto e odor, Cianotoxinas, Cloro residual estão de acordo com as exigências. Existem limites máximos para alguns contaminantes, como para os testes para níveis de coliformes e alguns agentes químicos [71] (Tab. 1 e 2):

**Tabela 1. Padrão microbiológico de potabilidade da água para consumo humano [71].**

PARÂMETRO	VMP <sup>[1]</sup>
Água para consumo humano <sup>[2]</sup>	
Escherichia coli <sup>[3]</sup>	Ausência em 100 mL
Água na saída do tratamento	
Coliformes totais	Ausência em 100 mL
Água tratada no sistema de distribuição [reservatórios e rede]	
Escherichia coli <sup>[3]</sup>	Ausência em 100 mL
Coliformes totais	Sistemas que analisam 40 ou mais amostras por mês: Ausência em 100 mL em 95% das amostras examinadas no mês; Sistemas que analisam menos de 40 amostras por mês: Apenas uma amostra poderá apresentar mensalmente resultado positivo em 100 mL

NOTAS:[1] Valor Máximo Permitido.[2] água para consumo humano em toda e qualquer situação, incluindo fontes individuais como poços, minas, nascentes, dentre outras.[3] a detecção de *Escherichia coli* deve ser preferencialmente adotada.

Esta é só uma parte da tabela com os valores máximos permitidos de compostos químicos existentes na água. As rotinas de análises variam conforme o tipo de contaminante: para a classe dos orgânicos e inorgânicos são feitos testes semestrais, para as cianobactérias as análises são realizadas semanalmente quando o número de cianobactérias for maior ou igual a 20.000 células/mL. Para os agrotóxicos as análises são também semestrais, porém para esta classe de contaminantes deverá ser considerada a avaliação dos seus usos na bacia hidrográfica do manancial de contribuição, bem como a sazonalidade das culturas [71].

**Tabela 2. Padrão de potabilidade para substâncias químicas que representam risco à saúde [71].**

PARÂMETRO	UNIDADE	VMP <sup>[1]</sup>
Triclorobenzenos	$\mu\text{gL}^{-1}$	20
Tricloroeteno	$\mu\text{gL}^{-1}$	20
2,4 D + 2,4,5 T	$\mu\text{gL}^{-1}$	30
Alaclor	$\mu\text{gL}^{-1}$	20,0
Aldicarbe +	$\mu\text{gL}^{-1}$	10
Aldicarbesulfona +		
Aldicarbesulfóxido		
Aldrin e Dieldrin	$\mu\text{gL}^{-1}$	0,03
Atrazina	$\mu\text{gL}^{-1}$	2
Carbendazim +	$\mu\text{gL}^{-1}$	120
Benomil		
Carbofurano	$\mu\text{gL}^{-1}$	7
Bentazona	$\mu\text{gL}^{-1}$	300
Clordano	$\mu\text{gL}^{-1}$	0,2
Clorpirifós	$\mu\text{gL}^{-1}$	30
+clorpirifós-oxon		
DDT+DDD+DDE	$\mu\text{gL}^{-1}$	1
Diuron	$\mu\text{gL}^{-1}$	90
Endossulfan [ $\alpha$ , $\beta$ e sais] <sup>[2]</sup>	$\mu\text{gL}^{-1}$	20
Endrin	$\mu\text{gL}^{-1}$	0,6
Glifosato + AMPA	$\mu\text{gL}^{-1}$	500
Lindano [g-BHC] <sup>[3]</sup>	$\mu\text{gL}^{-1}$	2
Mancozebe	$\mu\text{gL}^{-1}$	180
Metamidofós	$\mu\text{gL}^{-1}$	12
Metolacloro	$\mu\text{gL}^{-1}$	10
Molinato	$\mu\text{gL}^{-1}$	6
Parationa Metflica	$\mu\text{gL}^{-1}$	9
Pendimentalina	$\mu\text{gL}^{-1}$	20
Permetrina	$\mu\text{gL}^{-1}$	20
Profenofós	$\mu\text{gL}^{-1}$	60

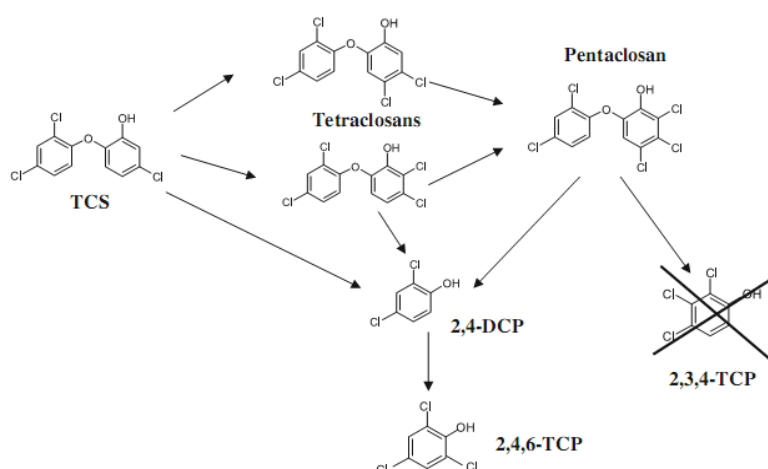
Simazina	$\mu\text{gL}^{-1}$	2
Tebuconazol	$\mu\text{gL}^{-1}$	180
Terbufós	$\mu\text{gL}^{-1}$	1,2
Trifluralina	$\mu\text{gL}^{-1}$	20
Microcistinas	$\mu\text{gL}^{-1}$	1,0
Desinfetantes e produtos secundários da desinfecção		
Ácidos haloacéticos totais	$\text{mgL}^{-1}$	0,08
Bromato	$\text{mgL}^{-1}$	0,01
Clorito	$\text{mgL}^{-1}$	1
Cloro residual livre <sup>[4]</sup>	$\text{mgL}^{-1}$	5
Cloraminas total	$\text{mgL}^{-1}$	4
2,4,6 Triclorofenol	$\text{mgL}^{-1}$	0,2
Trihalometanos Total	$\text{mgL}^{-1}$	0,1

Notas: [1] Valor Máximo Permitido, [2] Somatório dos isômeros alfa, beta e os sais de endossulfan, como exemplo o sulfato de endossulfan, [3] Esse parâmetro é usualmente e equivocadamente conhecido como BHC.

Recentemente houve a revogação da Portaria 518, estando vigente agora para os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade a portaria 2914 de 14/12/2011. Os parâmetros de potabilidade foram revistos, e alguns novos compostos foram adicionados às listas de contaminantes químicos; porém é necessário que esta lista de compostos passe por mais transformações para que outros poluentes sejam incluídos nas análises. Nesse contexto fica evidente a importância de métodos analíticos sensíveis para a quantificação, tendo em vista que para um composto ser candidato a se tornar legislado é necessário ser legislado é necessário ter método analítico, conhecer os estoques destes compostos nos compartimentos ambientais e os efeitos tóxicos.

Atualmente existem dúvidas se o tratamento convencional de água para abastecimento público é adequado para a total retirada dos contaminantes químicos listados e dos contaminantes emergentes não listados, como os resíduos de produtos farmacêuticos, hormonais esteróides, produtos de higiene pessoal, surfactantes e metabolitos, retardantes de chama, aditivos industriais, aditivos da gasolina, produtos cosméticos, pesticidas entre muitos outros que são descartados de forma direta e indireta diariamente nos leitos dos rios [74].

Estudos confirmaram que a degradação de TCS na presença de pequenas concentrações de cloro livre e em valores de pH neutro é cineticamente favorável e requer quantidades mínimas de cloro livre para acontecer. Os dados confirmam que dois dos produtos de degradação gerados são compostos de elevada estabilidade e toxicidades conhecidas, pois causam distúrbios endócrinos, como o 2,4 diclorofenol ou 2,4-DCP e triclorofenol ou 2,4,6-TCP (Fig. 9)[75]. Ou seja, quando acontece a oxidação do TCS e conseqüente degradação, há a formação de compostos com características de interferentes endócrinos e compostos com estabilidade maior que a do TCS.



**Figura 9. Proposta do caminho da degradação de TCS na presença de cloro livre. Fonte: Canosaet al. [75].**

Estudos realizados da quantificação desses compostos em água potável na cidade de Campinas, São Paulo, mostraram que o sistema de tratamento de água utilizado naquela região não é capaz de remover interferentes endócrinos na água analisada. A cafeína apresentou uma concentração média de  $3,3 \mu\text{gL}^{-1}$ , colesterol na concentração de  $2,4 \mu\text{g L}^{-1}$  e outros compostos como hormônios sexuais como o estradiol, a progesterona e o etinilestradiol com valores de concentração próximos ao limite de detecção dos métodos utilizados [76].

Neste sentido, o presente trabalho tem como um dos seus objetivos utilizar os métodos desenvolvidos para verificar se tratamento convencional de água potável são eficientes para a remoção do composto TCS da água tratada.

### **3. Objetivo geral**

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver método de preparo de amostra seguido da determinação analítica de triclosan e etilhexilmetoxicinamato em amostras de águas levando em consideração os princípios da química limpa.

#### ***3.1 Objetivos específicos***

Desenvolver metodologia para preparo de amostras aquosas para a extração do bactericida triclosan e do filtro solar etilhexilmetoxicinamato, utilizando a extração em fase sólida;

Desenvolver metodologia de separação e identificação para o bactericida Triclosan e o filtro solar etilhexilmetoxicinamato utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência;

As metodologias desenvolvidas devem levar em consideração os princípios da química limpa;

Utilizar os métodos desenvolvidos para verificar se o sistema de tratamento de água convencional é capaz de remover o composto TCS.

### **4.0. Parte experimental**

#### ***4.1 Padrões e solventes***

Água ultrapurificada por sistema Milli-Q<sup>®</sup>(Millipore Corporation) e filtrada em membrana 0,45 µm HA em ésteres de celulose (Millipore) foi utilizada em todos os experimentos. Solventes etanol, metanol e butanol da J.T.Baker(Stehelin AG, Basel,

Switzerland) grau HPLC foram filtrados em membrana 0,45  $\mu\text{m}$  PTFE (SartoriusStedim).

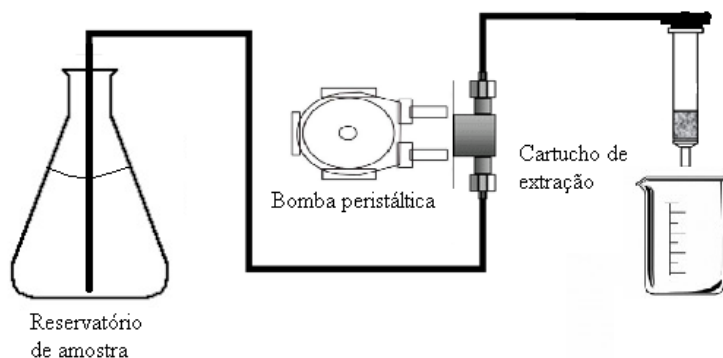
TCS foi obtido da Fluka( $\geq 97,0\%$ ) e EHMC obtido da White SeaandBalticCompany( $\geq 98,0\%$ ). Soluções estoque de TCS e EHMC ( $100,0\text{ mg L}^{-1}$ ) foram preparadas em etanol e reservadas em refrigerador ao abrigo da luz. As soluções trabalho foram preparadas diariamente em água ultrapura na concentração de  $0,025\text{ mg L}^{-1}$  de TCS e  $0,025\text{ mg L}^{-1}$  de EHMC tendo seu pH ajustado para 3,0 com ácido fosfórico.

Soluções de carbonato de sódio  $20,0\text{ g L}^{-1}$  e hipoclorito de sódio  $20,0\text{ g L}^{-1}$  foram fornecidas pela fábrica de sabão e detergente da Universidade Estadual de Maringá. Policloreto de alumínio  $20,0\text{ g L}^{-1}$  foi obtido da Brasinter Produtos Químicos Ltda (São Paulo, Brasil)

## 4.2. Equipamentos e acessórios

### 4.2.1. Sistema de extração

Para as extrações foram utilizados cartuchos Octadecil C18/18% (AppliedSeparations) de  $50,0\text{ mg}$  com capacidade de  $1,0\text{ mL}$ ; a eluição das amostras pelo cartucho de extração foi auxiliada por uma bomba peristáltica MILAN (Colombo, Brasil) (Fig. 10).



**Figura 10. Ilustração do sistema de extração em fase sólida.** Aparatos:reservatório de amostra, bomba peristáltica para eluição da amostra e o cartucho de extração.

#### **4.2.2. Espectrofotômetro**

Para a obtenção dos espectros de absorção molecular na região do UV-Vis dos diferentes compostos químicos foi utilizado um espectrofotômetro de varredura marca Varian modelo Cary-50, utilizando uma cubeta de quartzo com caminho ótico de 1,0 cm.

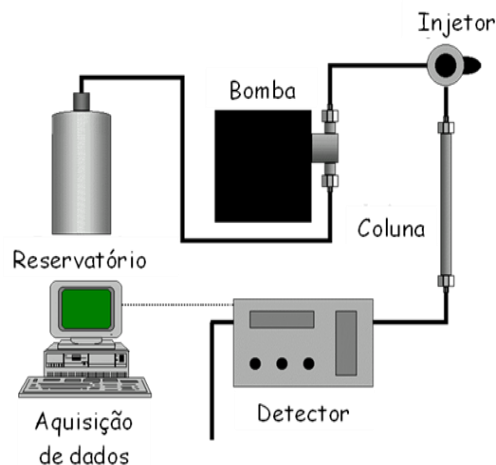
#### **4.2.3. Cromatógrafo**

Para a obtenção dos cromatogramas foi utilizado uma Estação de Trabalho Cromatográfica Star (Fig. 11) com programa para gerenciamento VarianIntruments contendo:

- Bomba de pistão recíprocante com 4 vias, modelo 240;
- Injetor manual Rheodyne modelo 8096 com alça de amostragem de 20  $\mu\text{L}$ ;
- Coluna cromatográfica C18(microsorb250 x 4,6 mm, partículas de 5 $\mu\text{m}$ );
- Pré-coluna C18 (microsorb100 x 4,6 mm, partículas de 5  $\mu\text{m}$ );
- Detector espectrofotométrico com arranjo de fotodiodos modelo ProStar 350

com programa de gerenciamento PolYview.

Os sinais dos compostos eluídos da coluna cromatográfica foram monitorados em dois comprimentos de onda: 282 e 309 nm.



**Figura 11.** Esquema ilustrativo de um cromatógrafo líquido de alta eficiência. **Aparatos:** reservatório da fase móvel, bomba de alta pressão, válvula de injeção, coluna cromatográfica, detector e microcomputador para aquisição dos dados.

### ***4.3. Procedimentos***

#### ***4.3.1. Determinação Cromatográfica***

Diversas soluções contendo reagentes como: água, álcool etílico em diferentes concentrações e composições foram testadas como fase móvel objetivando verificar aquelas que poderiam apresentar maior eficiência na separação dos compostos em estudo. Deve ser ressaltado que nesta fase experimental foram avaliados parâmetros tais como: pH, vazão e composição da fase móvel.

#### ***4.3.2. Extração em Fase Sólida***

##### ***Escolha do cartucho***

Foram realizados testes para verificar qual seria a fase sólida adequada para ser utilizada no processo de extração. Foram testados os sorventes C18, C8 e florisil.



### ***Determinação da saturação da fase sólida e volume de amostra***

Para a determinação da saturação da fase sólida, foi preparada uma solução contendo 0,50 mg L<sup>-1</sup> de TCS e 0,50 mg L<sup>-1</sup> de EHMC. Foram coletadas frações de 1,0 mL a cada 10,0 mL de amostra eluída através do cartucho, e levadas para análise cromatográfica objetivando determinar o ponto de saturação da fase sólida. Com os resultados da saturação do cartucho de extração, determinou-se o volume adequado de amostra a ser utilizado em função da concentração do analito.

### ***Seleção do eluente no processo de extração***

Foram feitos testes para verificar qual o melhor solvente para a eluição dos analitos do cartucho de extração. Também foram realizados testes para se verificar qual o melhor volume, qual a melhor vazão de eluição dos compostos retidos, tempo de secagem do cartucho e massa de fase sólida a ser utilizada.

#### ***4.3.3. Método comparativo***

Como método comparativo, foi utilizado a cromatografia líquida de alta eficiência. Foi realizada busca em base de dados, utilizando as palavras chaves, determinação, triclosan e etilhexilmetoxicinamato, e não foram encontrados trabalhos relacionados, ou seja, determinação e extração para os dois compostos estudados simultaneamente, portanto foi realizada adaptação de um método da literatura que se mostrou adequado para os dois compostos. Foi relatado na literatura um método para a determinação de TCS utilizando coluna C18 sendo a fase móvel constituída de acetonitrila:água (80:20, v/v) [32], e outro método para EHMC que utilizava metanol:acetonitrila:tetrahidrofurano:água para a separação e identificação do analito [37]. Foi realizado teste utilizando apenas acetonitrila e solução ácido acético 0,50%, sendo utilizada a proporção de (75:25, v/v). O modo de eluição foi o isocrático, com vazão de 1,0 mLmin.<sup>-1</sup>.

Os limites de detecção e quantificação foram estimados através da relação de 3x e 10x o ruído da linha de base, respectivamente. A linearidade foi determinada pela

análise de 6 concentrações diferentes de TCS e EHMC (0,10; 0,20; 0,50; 1,00; 2,00 e 3,00 mgL<sup>-1</sup>) e analisadas em triplicatas.

#### **4.3.4. Método comparativo: Extração em fase Sólida**

Para a extração também não foi encontrado método na base de dados literatura para os dois compostos. Assim, foram encontrados dois trabalhos e os eluentes passados sequencialmente. Primeiramente, foi efetuado um condicionamento do cartucho C18 50 mg, passando 7,0 mL de metanol seguido de 6,0 mL de água. Então, foram passados 50,0 mL de amostra, pH ajustado para 3,0 com HCl concentrado, numa vazão de 5,0 mL min<sup>-1</sup>. Após a passagem da amostra, foi feita uma limpeza do cartucho passando-se 1,5 mL de metanol 1% (v/v), o cartucho foi deixado sob efeito de vácuo por 2,0 min, para secagem, e então os analitos foram eluidos com 2 x 4,0 mL de metanol e 2 x 8 mL de acetona para remoção do TCS [5], sendo o EHMC eluido na sequência com 3,0 mL de diclorometano [54]. O solvente foi evaporado e a amostra redissolvida em 1,0 mL de fase móvel.

#### **4.4. Eficiência do tratamento de água potável**

Nesta parte do trabalho, os estudos para se verificar a eficiência do tratamento da estação de tratamento de água convencional, foram realizados apenas para o composto TCS. Para isso, uma amostra de água de rio sofreu tratamento similar aquele utilizado pelas ETAs convencionais. Alguns parâmetros tiveram de ser otimizados para os ensaios de bancada, tais como: filtro utilizado, dosagens de PAC, tempo de agitação para a floculação/coagulação/decantação.

##### **4.4.1. Construção do filtro**

O filtro utilizado pela Sanepar para retirada de impurezas minúsculas e conclusão da limpeza física da água foi construído da seguinte forma: 7,5 cm de seixos de ¾ a 1 ½, 7,5 cm de seixo ½ a ¾, 5,0 cm de seixo ¼ a ½, 5,0 cm de seixos 1/8 a ¼, 5,0 cm de areia mesh 10, 5,0 cm de seixos 1/8 a ¼, 5,0 cm de seixos ½ a ¾, 25,0 cm de areia fina e

45 cm de carvão antracito. Sendo o carvão a camada superior e o fluxo de limpeza descendente. O fluxo de água na Sanepar é de aproximadamente 75000 L/dia, sendo utilizadas dez unidades de filtração rápida, abastecidas por gravidade, de leito misto com areia, seixos e antracito onde são passados cerca de 7000 L de água /dia por filtro [72].

Os filtros possuem uma área filtrante total de 42 m<sup>2</sup>, o fundo é do tipo calhas californianas e a calha de distribuição de água decantada e de coleta de água é de lavagem em concreto [72].

Para os experimentos em bancada, foi construído um filtro, em menores proporções: 1,0 cm de areia mesh 10, 1,0 cm areia fina e 0,80 cm de antracito para pequenos volumes de água (1000 mL), e a passagem da água foi forçada pela utilização de bomba peristáltica numa vazão de 10,0 mLmin.<sup>-1</sup>.

#### **4.4.2. Coagulação e decantação**

Foram realizados testes para verificar qual a melhor concentração do coagulante PAC. Foram testadas as concentrações de 18,0, 60,0, 80,0 100,0 e 120,0 mg L<sup>-1</sup> de policloreto de alumínio (PAC), AlCl<sub>3</sub>. Devido a necessidade de manutenção do pH durante a floculação, a quantidade de carbonato de sódio utilizado para correção do pH teve de ser variada para cada experimento, para que o mesmo permanesse por volta de 6,5 a 7,0 visto que em valores de pH neutro, há a melhor formação dos flocos [77].

Para que ocorresse a coagulação, ao ser adicionado o agente coagulante, devia haver um período de agitação rápida, seguido de agitação lenta com posterior descanso para que as partículas ficassem distribuídas na suspensão, para depois durante a etapa lenta, ocorrer a formação dos coágulos. Devido às cargas nas partículas, elas tendem a se aglomerar aumentando de tamanho, e com isso podem decantar durante o período de descanso. Estes parâmetros influenciam na eficiência global de remoção das impurezas contidas na água bruta, e por isto devem ser estipulados mediante estudos da água a ser tratada em um laboratório ou em uma instalação piloto [78]. Assim, foram otimizados o tempo de agitação rápida, o tempo de agitação lenta, e tempo que o sistema permanecia parado para decantação. Foi utilizado agitador magnético para a agitação.

#### ***4.4.3. Determinação de Triclosan***

Após a otimização dos parâmetros, foram realizados ensaios para se determinar se o tratamento utilizado era adequado para a retirada do poluente emergente TCS da água tratada.

Para tanto, cada etapa do tratamento foi analisada separadamente, começando-se pela etapa de coagulação. Assim, uma amostra de rio, onde não foi encontrado o contaminante TCS, foi fortificada com  $0,025\text{mg L}^{-1}$  de TCS, sendo utilizada nos testes de remoção de TCS. Após a etapa de floculação/coagulação/decantação foi retirada uma alíquota de 50,0 mL e realizado os ensaios de extração em fase sólida, seguido de determinação cromatográfica para se verificar qual a percentagem do composto removido nesta etapa do tratamento da água. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Para a verificação da eficiência da etapa da filtração na remoção do TCS, a amostra de água fortificada sofreu o processo de floculação/coagulação/decantação e então foi filtrada; após a filtração foi retirada uma alíquota de 50,0 mL e realizados os testes de extração e determinação do TCS.

Finalmente foi verificado a presença de TCS após a etapa de cloração, etapa final do processo de tratamento da água potável. Para esta amostra, foram realizados a floculação/coagulação/decantação; após a amostra foi filtrada e então adicionado cloro, na forma de hipoclorito de sódio, para desinfecção da água. Uma alíquota de 50,0 mL foi retirada e levada para análise.

Todas as amostras foram submetidas a extração e pré-concentração pelo método proposto neste trabalho, bem como a identificação e quantificação do analito foram realizadas pelo método cromatográfico desenvolvido.

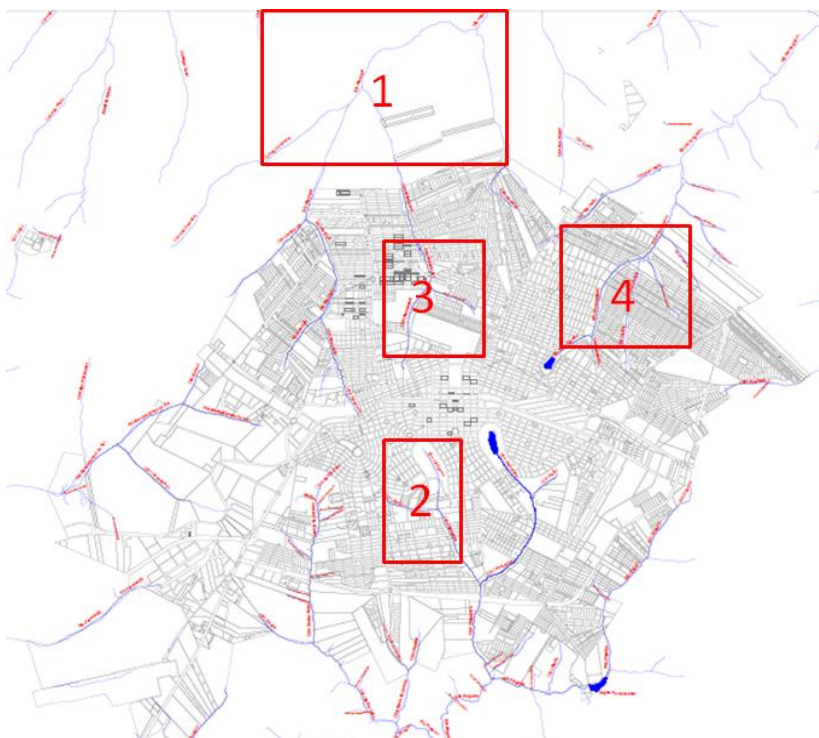
#### ***4.5. Aplicação dos métodos desenvolvidos na análise de amostras reais***

##### ***4.5.1. Amostras Comerciais de creme dental e protetor solar***

Foram pesados  $0,1000 \text{ g} \pm 0,0001\text{g}$  dos produtos comerciais (creme dental e protetor solar) e dissolvidos em 1000 mL de água Milli-Q, sendo o pH ajustado para 3,0 com ácido fosfórico. As soluções foram filtradas através de membranas de  $0,45 \mu\text{m}$  HA em ésteres de celulose (Millipore) e levadas para a extração em fase sólida e pré-concentração, sendo os analitos determinados pelo método proposto.

#### 4.5.2. Amostras de Água

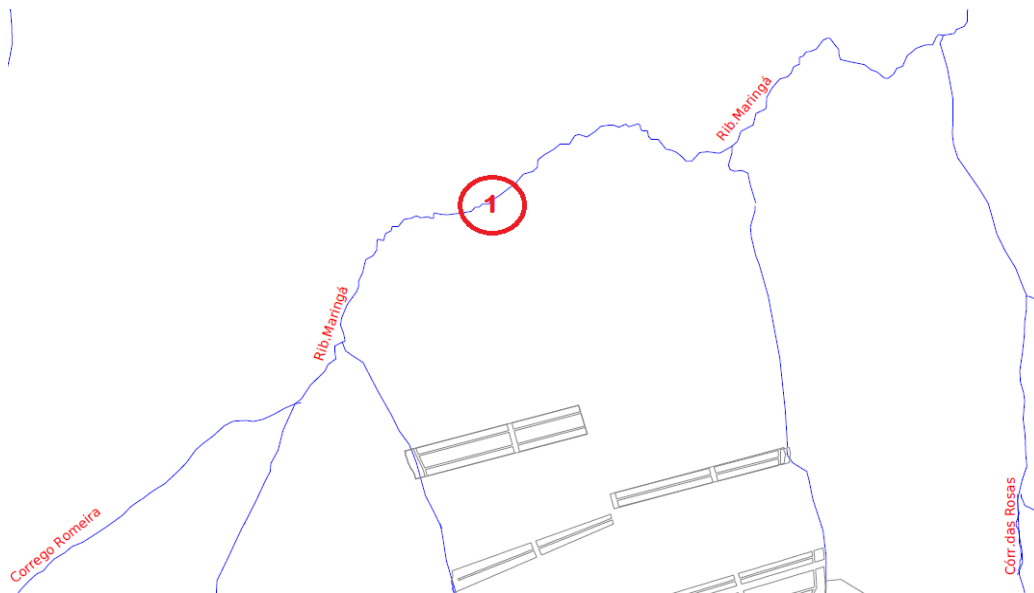
As amostras de águas foram coletadas em corpos de água localizados no perímetro urbano da cidade de Maringá, Paraná: Córrego Mandacaru, Ribeirão Maringá após a estação de tratamento de água, Ribeirão Morangueiro e Córrego Cleópatra (Fig. 12). Os resultados obtidos quando da utilização dos métodos propostos foram comparados com aqueles obtidos quando da utilização do método convencional adaptado para TCS e EHMC.



**Figura 12. Mapa da cidade de Maringá com indicação das regiões dos pontos de coletadas amostras de água.** Os pontos de coleta são marcados por quadros numerados. 1- Ribeirão Maringá, 2-Córrego Cleópatra, 3-Córrego Mandacaru, 4- Ribeirão Morangueiro.

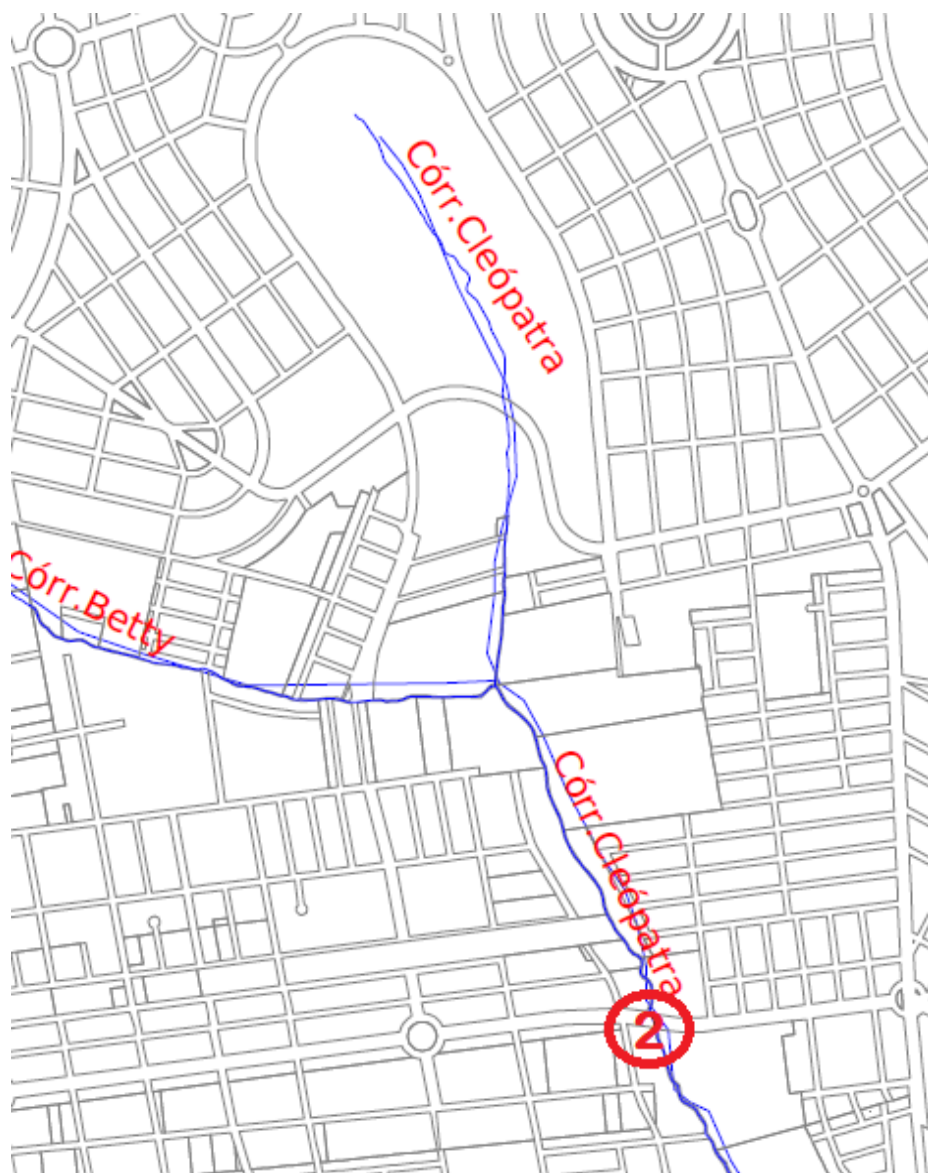
Foram realizadas coletas em dois períodos do ano, 05 maio de 2012, considerado período mais frio e com baixa precipitação pluviométrica, e 05 de setembro de 2012 final do período caracterizado por maior precipitação pluviométrica. A região de Maringá apresenta regime de precipitação pluviométrica que é sazonal, com verão chuvoso e inverno seco, que configura-se em praticamente em duas estações: uma estação chuvosa, que tem o seu início em setembro com breve queda em novembro, crescendo novamente a partir de dezembro. Outra estação seca, apresentando o seu início em maio sendo mais acentuado em agosto [79].

A amostra 1 foi coletada no ribeirão Maringá a aproximadamente 2 quilômetros (Km) a jusante do ponto de descarga de uma estação de tratamento de esgoto da cidade de Maringá (ETE) (Fig. 13).



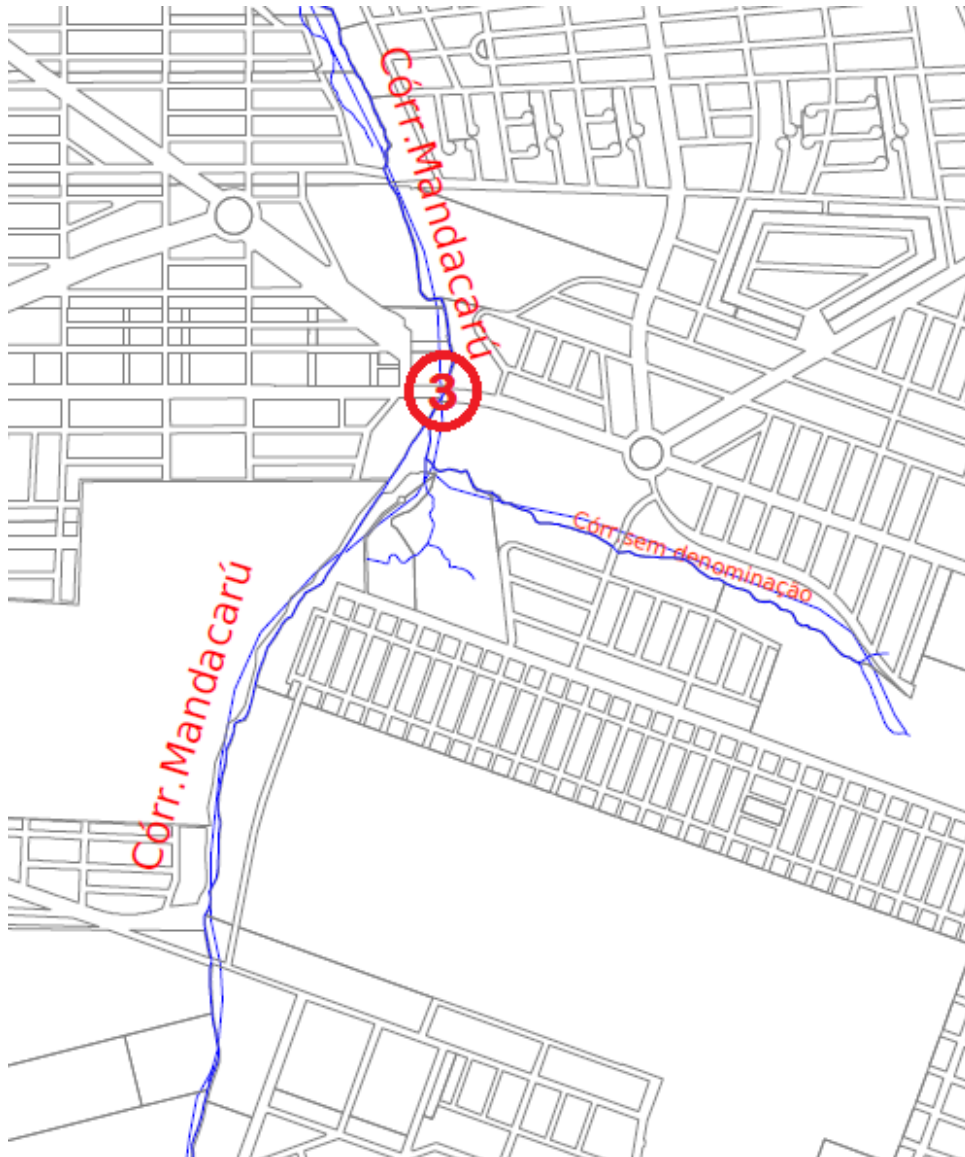
**Figura 13. Mapa com indicação do ponto de coleta de amostra no Ribeirão Maringá.**

A segunda amostra foi coletada no córrego Cleópatra, a aproximadamente 1 km de sua nascente, localizada no interior do Parque Florestal dos Pioneiros, a montante do ponto de coleta o córrego recebe o afluente do Córrego Betty (Fig. 14).



**Figura 14.** Mapa com indicação do ponto de coleta de amostra no Córrego Cleópatra.

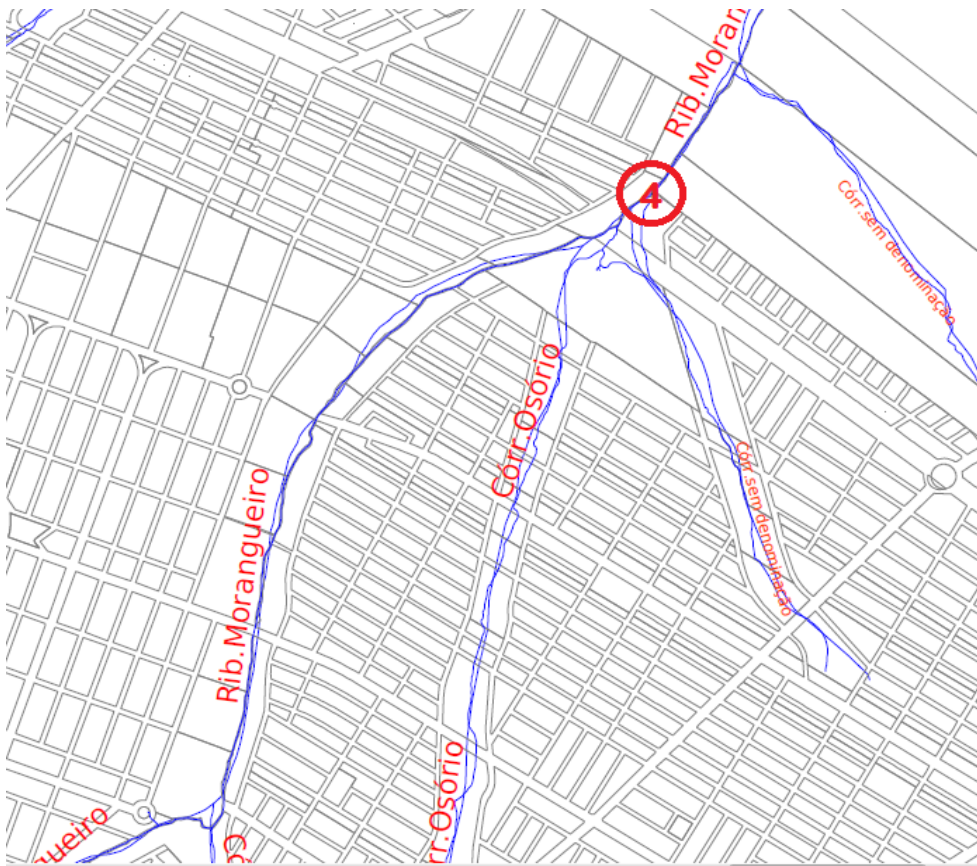
A terceira amostra foi coletada no Córrego Mandacaru a aproximadamente 2 km da nascente, a montante do ponto de coleta o córrego recebe os afluentes de dois córregos sem denominação (Fig.15).



**Figura 15. Mapa com indicação do ponto de coleta de amostra no Córrego Mandacarú.**

A quarta amostra foi coletada no Ribeirão Morangueiro, a 4 km de sua nascente localizada em uma lagoa situada no Parque Alfredo Werner Nyffeler (Buracão), a montante do ponto de coleta o Ribeirão recebe o afluente do córrego Corregozinho, Córrego Osório, e um córrego sem denominação (Fig. 16).





**Figura 16. Mapa com indicação do ponto de coleta no Ribeirão Morangeiro.**

As amostras foram coletadas seguindo os padrões de coleta da COGERH (Companhia de Gestão dos Recursos Hídricos) para águas superficiais [80], de acordo com o que segue:

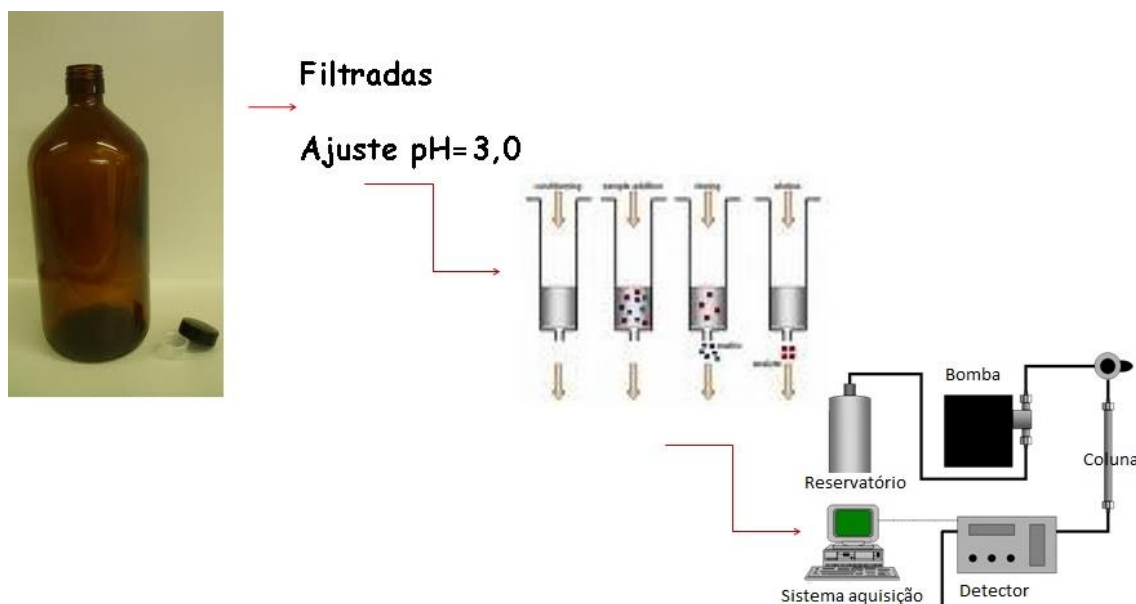
- 1 - Procurar evitar a coleta de amostras em áreas estagnadas ou em locais próximos às margens;
- 2 - Com todos os cuidados de assepsia, remover a tampa do frasco âmbar juntamente com o papel protetor;
- 3 - Com uma das mãos, segurar o frasco pela base, mergulhar rapidamente o frasco com a boca para baixo, de 15 a 30 centímetros abaixo da superfície da água, para evitar a introdução de contaminantes superficiais;
- 4 - Direcionar o frasco de modo que a boca fique em sentido contrário à correnteza;
- 5 - Se o corpo de água for estático, deverá ser criada uma corrente superficial, através da movimentação do frasco na direção horizontal (sempre para frente);

6 - Inclinando o frasco lentamente para cima, a fim de permitir a saída de ar e subsequente enchimento do mesmo;

7 - Retirar o frasco do corpo d'água, desprezar uma pequena porção da amostra, deixando um espaço vazio suficiente que permita a homogeneização da amostra para análise;

8 - Fechar o frasco imediatamente, fixando o papel protetor ao redor do gargalo e trazer ao laboratório sob refrigeração [80].

Após as coletas, as amostras foram levadas para o laboratório, tendo o pH ajustado para 3,0. Após ajuste do pH, as amostras foram filtradas em membranas de 0,45 µm HA em ésteres de celulose (Millipore) e levadas para a extração em fase sólida e posteriormente para a determinação cromatográfica (Fig. 17).



**Figura 17. Ilustrações do sistema de preparo da amostra.**

#### **4.6. Validação do Método**

A validação de uma metodologia desenvolvida para fins analíticos visa garantir, através de estudos experimentais, que o novo método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados [69]. Para a validação

do método desenvolvido foram analisados os parâmetros de exatidão, linearidade, limites de detecção e quantificação, seletividade, precisão e robustez.

### ***Exatidão***

A exatidão do método foi avaliada através de ensaios de recuperação, quando foram adicionadas concentrações conhecidas do analito em matrizes da amostra isenta destes compostos. Neste caso foi utilizada água purificada, uma concentração conhecida do composto que se quer determinar e através dos resultados são calculados os valores de recuperação. Para este devem ser preparadas 3 amostras com 3 níveis diferentes de concentração (baixa, média e alta) e analisados em triplicata [69].

### ***Linearidade, limite de detecção e quantificação***

Os limites de detecção e quantificação foram estimados através das relações de 3x e 10x o ruído da linha de base, respectivamente. A linearidade foi determinada pela análise de 5 concentrações diferentes, analisadas em triplicatas [69].

### ***Seletividade***

A seletividade do método foi avaliada através da sobreposição dos cromatogramas. Foram feitas análises das amostras ambientais e também das amostras comerciais com e sem a adição de padrão. A seletividade do método também pode ser comprovada através da análise do espectro dos compostos obtidos no UV-Vis para os sinais analíticos dos compostos [69].

### ***Precisão intermediária***

A precisão do método desenvolvido foi avaliada através do estudo da precisão intermediária, sendo realizadas análises das amostras do Córrego Mandacaru e do Ribeirão Maringá, onde é descartado o efluente de uma das estações de tratamento de água da cidade de Maringá, bem como no Ribeirão Morangueiro e o Córrego Cleópatra

em três níveis de concentração (baixa, média e alta) em triplicata, e analisadas durante 5 dias consecutivos [69].

### ***Robustez***

Diz-se que um método é robusto quando ele se mostra praticamente insensível a pequenas variações que possam ocorrer quando esse está sendo executado. A robustez de um método cromatográfico pode ser avaliada pela variação de parâmetros como a composição e a vazão da fase móvel em CLAE [69]. Para a avaliação da robustez foram realizados ensaios com variação de  $\pm 2,0^{\circ}\text{C}$  na temperatura e 0,50 na unidade de pH da fase móvel.

## 5. Resultados e discussão

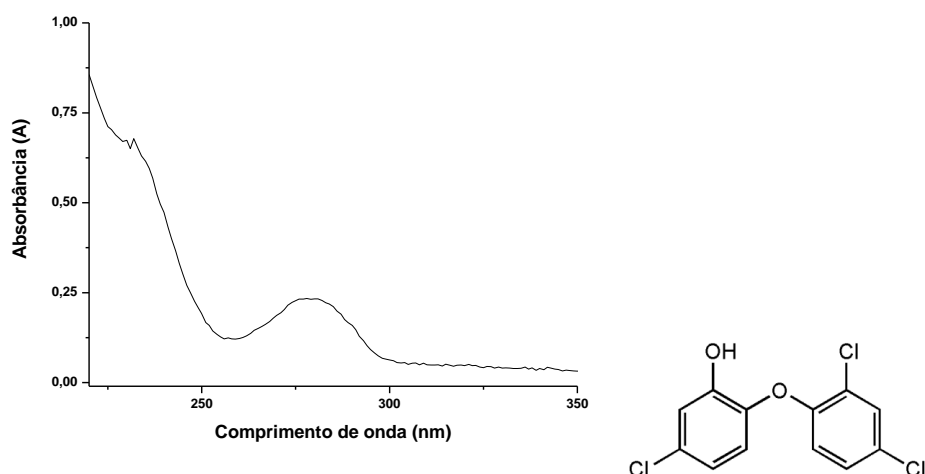
Considerando que o objetivo principal do trabalho foi desenvolver método analítico de extração e determinação para os compostos TCS e EHMC presentes como contaminantes em amostras de água, que pudesse ser considerado limpo e de baixo custo, não foram utilizados solventes orgânicos de alta toxicidade. Para a extração e pré-concentração das amostras o método escolhido é baseado no princípio da extração em fase sólida enquanto que o método de determinação utiliza a cromatografia líquida de alta eficiência.

### 5.1. Otimização das condições cromatográficas

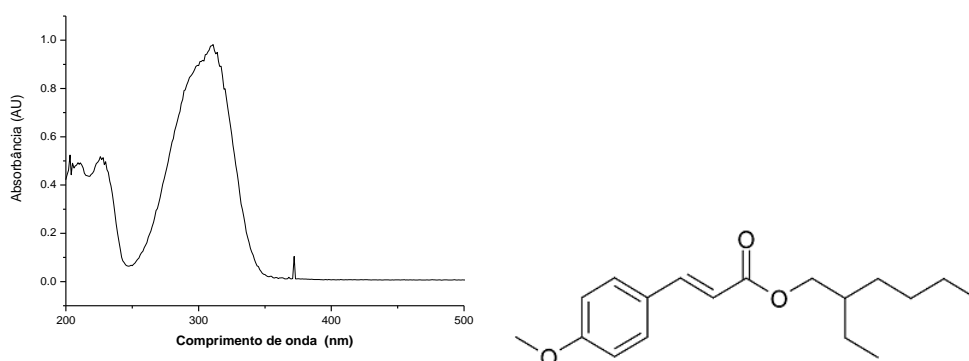
Inicialmente, foram obtidos espectros de absorção no UV-Vis dos compostos em estudo para observar em quais comprimentos de onda seria feito o monitoramento. Através da avaliação dos espectros optou-se por monitorar o TCS em 282 nm e o EHMC em 309 nm (Figs. 18 e 19).

A molécula do TCS apresenta  $pK_a$  de 7.1,  $\log K_{ow}$  de 5.4 e ponto de fusão de 120°C, sendo um composto estável e com características lipofílicas [17,18]. A molécula de EHMC possui um  $\log Kow$  5.7 [48], ponto de fusão de 200°C e também apresenta características lipofílicas, o que levou a optar-se pela utilização de uma coluna C18 para separação e determinação destes compostos.

O TCS é uma molécula que apresenta em sua estrutura um hidrogênio ionizável, sendo necessário ajustar o pH das soluções padrão para que se possa ter o composto em apenas uma das suas formas, caso contrário, pode-se obter um cromatograma com mais de um sinal para o mesmo composto ou a presença de ombros nos picos cromatográficos oriundos da mudança na estrutura da molécula durante a separação.



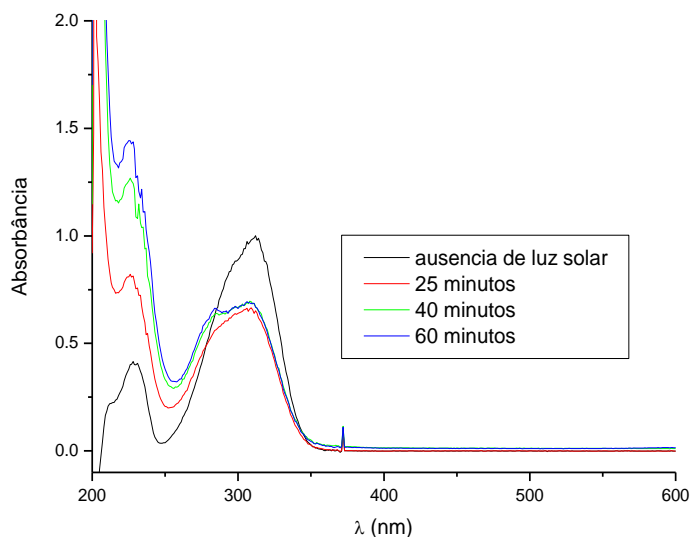
**Figura 18. Espectro de absorção UV-Vis de solução de TCS 5,0 mg L<sup>-1</sup>.** Solução preparada no mesmo solvente da fase móvel etanol:ácido fosfórico 0,01% na proporção de 75:25 (v/v).



**Figura 19. Espectro de absorção UV-Vis para solução de EHMC 10,0 mg L<sup>-1</sup>.** Solução preparada no mesmo solvente da fase móvel etanol:ácido fosfórico 0,01% na proporção de 75:25 (v/v).

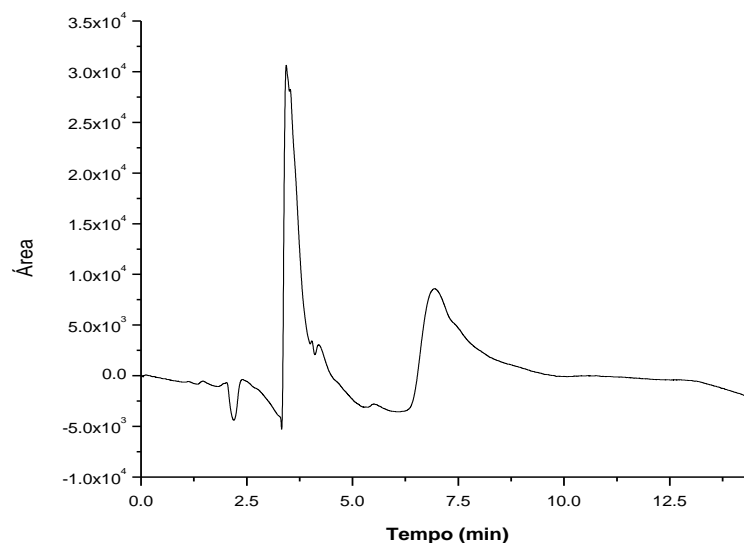
O EHMC quando exposto a luz sofre a isomerização, passando do E-EHMC ( $\lambda=309$  nm,  $\epsilon=24000$  Lmol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> em etanol) para Z-EHMC ( $\lambda=301$  nm,  $\epsilon=11900$  Lmol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> em etanol) (Fig. 2). Estudos mostraram que quando exposto a luz cerca de 54% do E-EHMC isomeriza-se para o Z-EHMC, sendo que a capacidade de absorção do isômero formado significativamente inferior a capacidade de absorção do composto original, ocasionando uma menor proteção aos usuários deste produto [47]. Para os experimentos realizados no laboratório, mesmo estando os padrões e as amostras

protegidos da luz durante o procedimento de extração, foi possível verificar a ocorrência de isomerização do composto, sendo necessário fazer o cálculo dos valores de absorvidade molar e utilizar estes valores de  $\epsilon$  para correção dos cálculos de recuperação, já que para o sinal analítico do EHMC aparecem dois picos (Fig. 20).



**Figura 20. Espectro de absorção UV-Vis para solução de E-EHMC submetido à presença da luz solar por diferentes intervalos tempo.** 0 min (linha preta), 25 min (linha vermelha), 40 min (linha verde) e 60 min (linha azul).

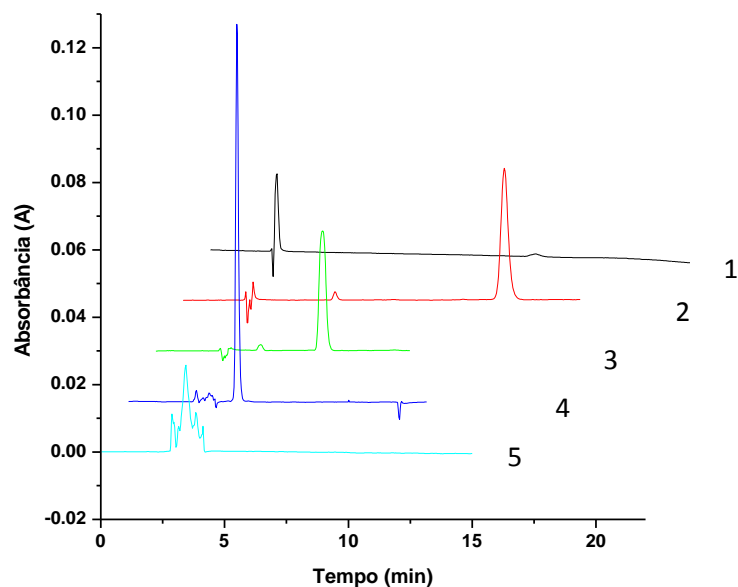
Foram realizados testes preliminares utilizando inicialmente como fase móvel água:etanol (50:50, v/v) numa vazão de  $0,70 \text{ mL min}^{-1}$ . Para este experimento os resultados obtidos não foram adequados, visto que não foi possível observar um pico referente a eluição do EHMC e o sinal referente ao TCS apresentou-se alargado (Fig. 21).



**Figura 21. Cromatograma de uma solução padrão do TCS e EHMC.** Dados obtidos para injeção de 20  $\mu\text{L}$  da solução padrão de TCS e EHMC  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ , vazão  $0,7 \text{ mLmin}^{-1}$ , fase móvel: água:etanol (50:50, v/v).

O fato dos dois compostos terem baixa solubilidade em água provavelmente fez com que ambos os compostos não fossem eluídos de maneira eficaz da coluna C18 que apresenta característica apolar. Na tentativa de melhorar os sinais analíticos, a percentagem de etanol na fase móvel foi aumentada gradativamente objetivando-se diminuir a polaridade do eluente; ainda foi adicionado a água ácido fosfórico para ajuste do pH da fase móvel. Testes utilizando 60, 70, 80, 90 e 100% (v/v) de álcool etílico mostraram que os melhores resultados eram obtidos para a proporção (70:30, v/v) de álcool etílico:ácido fosfórico 0,01% (Fig. 22).



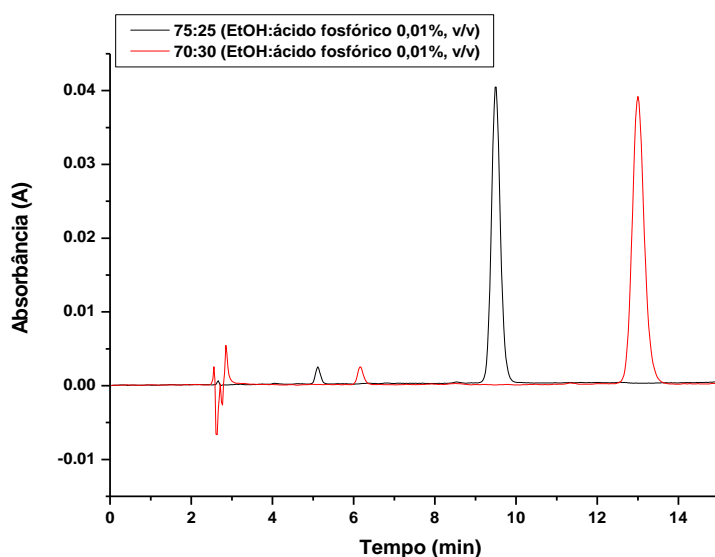


**Figura 22. Cromatograma obtido para solução contendo TCS e EHMC.** Injeção de 20  $\mu\text{L}$  da solução padrão de  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de TCS e EHMC, vazão  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ . Condições: (1) (60:40, v/v) etanol: ácido fosfórico 0,01%; (2) (70:30, v/v) etanol: ácido fosfórico 0,01%; (3) (80:20, v/v) etanol: ácido fosfórico 0,01%; (4) (90:10, v/v) etanol: ácido fosfórico 0,01% e (5) 100% etanol, monitoramento em 282 nm.

Como pode ser observado (Fig. 22), a alteração na concentração de etanol na fase móvel para 60% não permitiu a eluição do EHMC, provavelmente o composto ficou retido na coluna cromatográfica devido à sua baixa solubilidade na fase móvel e alta afinidade pela coluna apolar, o sinal referente ao TCS apresentou um elevado tempo de retenção (15 min). A alteração da vazão de  $0,70 \text{ mL min}^{-1}$  para  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$  auxiliou na redução do alargamento dos sinais analíticos do TCS e reduziu o tempo de retenção do composto EHMC na coluna que para esta mistura de solvente com concentração de etanol menor que 60% ficava totalmente retido na coluna.

Quando a quantidade de etanol na fase móvel foi superior a 80% o TCS foi eluído rapidamente da coluna, indicando o aumento da afinidade do analito pela fase móvel, o que não é desejável, visto que quando se trabalha com amostras ambientais, há compostos interferentes que não apresentam afinidade pela coluna e são eluídos rapidamente, o que pode interferir consideravelmente na análise. Assim, optou-se por variar a concentração de etanol na faixa de 70% de etanol e 30% de solução ácido

fosfórico 0,01% porque o TCS apresentou tempo de retenção intermediário, o que indica que este composto poderia ser diferenciado de eventuais interferentes presentes nas amostras (Fig. 22). Assim, na tentativa de se encontrar uma fase móvel que pudesse eluir os dois analitos com resolução cromatográfica adequada para fins analíticos novos testes foram realizados utilizando-se 75, 70 e 65 % de etanol na fase móvel (Fig. 23).

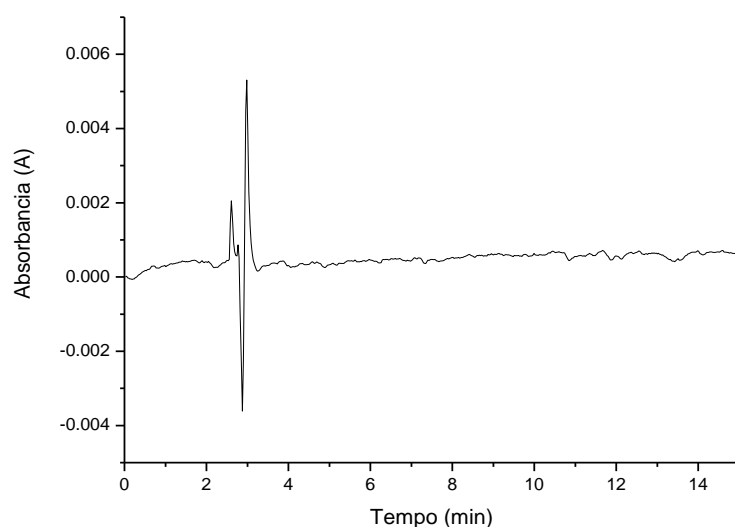


**Figura 23. Cromatograma obtido para solução TCS e EHMC em diferentes concentração de etanol na fase móvel.**Injeção de 20  $\mu\text{L}$  da solução padrão de 1,0  $\text{mg L}^{-1}$  de TCS e EHMC, vazão 1,0  $\text{mL min}^{-1}$ .Condições: (linha preta)(75:25, v/v) etanol:ácido fosfórico 0,01%; (linha vermelha)(70:30, v/v) etanol: ácido fosfórico 0,01 %, 282 nm.

Para a condição de 65% de etanol na fase móvel não foi observado sinal referente ao EHMC no cromatograma; porém para concentrações mais elevadas o analito foi eluido da coluna (Fig. 23). Observa-se que a condição contendo 75% de etanol e 25% da solução de ácido fosfórico 0,01% na fase móvel conduziu aos melhores resultados, visto que com esta fase móvel obteve-se um menor tempo de retenção e uma completa separação para os compostos em estudo (TCS 5,30 min e EHMC 9,80 min). Para a fase contendo de 70% de etanol e 30% da solução de ácido fosfórico 0,01% o tempo de retenção do EHMC foi de 13,5 min, o que elevou o tempo de análise e, conseqüentemente, o consumo de solvente e custo da análise.

Quando o pH da fase móvel não foi ajustado a área do pico referente ao TCS estava próxima aquela obtida quando da utilização de fase móvel com o pH ajustado para 5,0, porém sem ajuste de pH há uma diminuição da intensidade do sinal com conseqüente alargamento do pico. Este fato era esperado, visto que em valores de pH de 5,9 cerca de 99% do TCS está na forma molecular e 1% na forma ionizada, para valores de pH mais altos há um aumento da concentração da forma iônica da molécula, que pode chegar a 48% quando o pH for 8,0 [10]. Portanto, para assegurar que na amostra tenha apenas TCS na forma molecular e evitar o alargamento do pico optou-se por preparar a fase móvel ajustando-se pH para valores menores que 5,0, ou seja empregando-se uma condição que garanta a presença apenas da forma não ionizada do TCS que, resulta em uma melhor resolução do sinal analítico e apresenta um único sinal para o composto.

Com relação aos parâmetros cromatográficos, para o fator de retenção,  $k$ , foi utilizado como tempo morto  $T_M$ , um sinal referente ao *efeito Schlieren* (Fig. 24). Esse sinal ocorre devido a eluição do solvente da amostra que não é retido pela coluna e apresenta composição diferente da fase móvel, o que provoca espalhamento de luz no detector devido à diferença no índice de refração dos solventes, provocando um sinal negativo no cromatograma. Os valores encontrados para  $k$  foram satisfatórios, visto que estão entre 1 e 10, valores desejáveis. Os valores de alargamento de pico calculados a 5% ( $T_F$ ) da base do pico e a assimetria calculado a 10% ( $A_S$ ) também se mostraram adequados, haja visto que valores 1,5 e 0,9 podem ser considerados bons (Tab. 3).



**Figura 24. Cromatograma obtido para o branco.** Injeção de 20  $\mu$ L da solução (90:10, v/v) etanol:metanol, 282 nm.

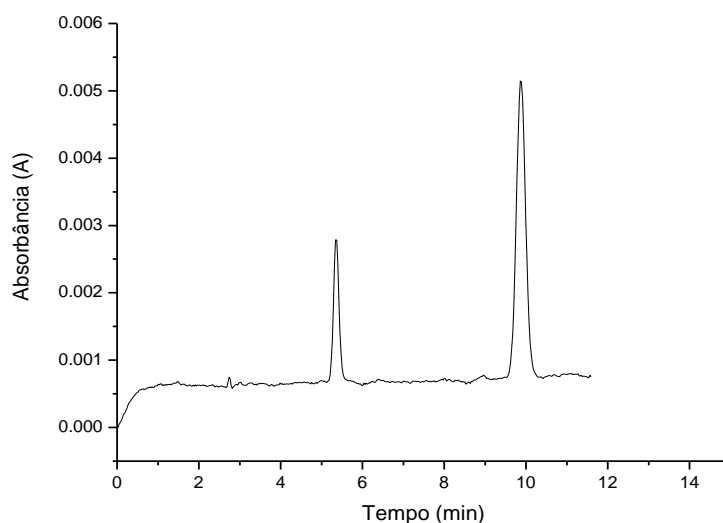
Com relação ao número de pratos teóricos, os valores encontrados foram elevados para todos os compostos, o que demonstra a boa eficiência da coluna. Os coeficientes de absorvidade molar ( $\epsilon$ ) do TCS, Z-EHMC e E-EHMC foram calculados no meio de etanol:ácido fosfórico 0,01% 75:25 (v/v) (Tab. 3) e foram utilizados para os cálculos das taxas de recuperação do EHMC, sendo a soma das áreas multiplicada pelos respectivos valores de  $\epsilon$ .

**Tabela 3. Parâmetros cromatográficos obtidos para os compostos TCS, Z-EHMC e E-EHMC em uma coluna recheada com C18.**

Parâmetros cromatográficos	$T_F^a$	$A_s^b$	$K^c$	N	$\epsilon$
TCS	1,16	1,2	0,92	$3,40 \times 10^3$	$727^d$
Z-EHMC	1,10	1,07	2,19	$5,78 \times 10^3$	$8982,5^e$
E-EHMC	1,06	1,15	2,58	$2,02 \times 10^3$	$21598,8^e$

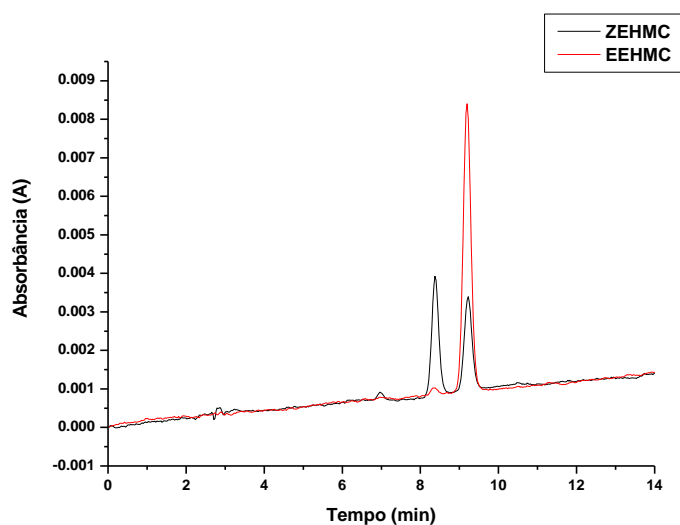
a- fator de alargamento do pico a 5% de altura; b- fator de assimetria do pico a 10% de altura; c-  $T_M$  medido com o *schlieren*; d- valor calculado em fase móvel para  $1,0 \text{ mgL}^{-1}$  em 282 nm; e- valor calculado em fase móvel para  $1,0 \text{ mgL}^{-1}$  em 309 nm.

Considerando os bons resultados obtidos, optou-se por utilizar coluna C18, modo de eluição isocrático com fase móvel constituída de 75% de álcool etílico e 25% de solução ácido fosfórico 0,01%, vazão de eluição de  $1,0 \text{ mLmin}^{-1}$ . Sob estas condições o tempo de retenção para o TCS foi de 5,30 min. e para o EHMC foi de 9,80 min.; sendo o método obtido considerado de baixo custo, simples, rápido e apresentando bons valores de resolução, 12,33 entre TCS/EHMC e 14,66 para Z-EHMC/E-EHMC (Fig. 25).



**Figura 25. Cromatograma obtido para solução TCS e EHMC.** Concentração  $1,0 \text{ mgL}^{-1}$  de TCS e  $0,10 \text{ mgL}^{-1}$  de EHMC. Volume injetado de  $20 \mu\text{L}$ , vazão de  $1,0 \text{ mLmin}^{-1}$ , monitoramento em  $282 \text{ nm}$  e fase móvel constituída de etanol: ácido fosfórico 0,01% 75:25 (v/v). Tempo de retenção para o TCS de 5,30 e para o EHMC de 9,80 min.

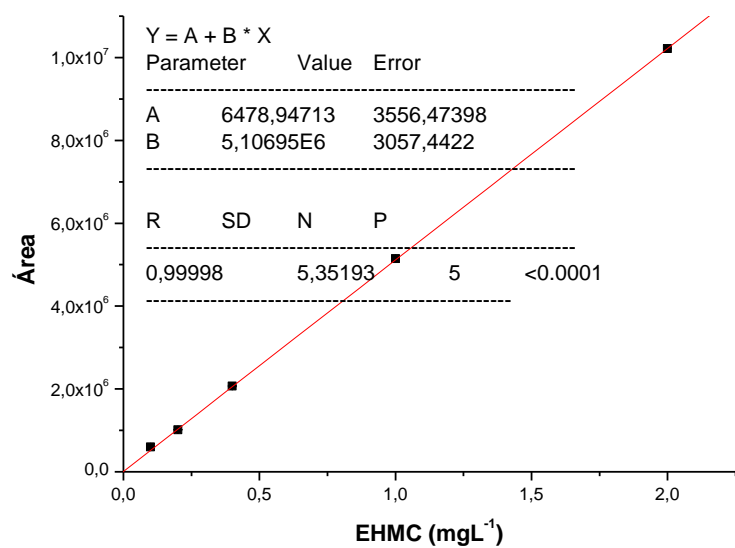
Experimento foi realizado para verificar a formação do isômero Z-EHMC quando EHMC era exposto ao sol adicionando-se a fase móvel  $1,0 \text{ mgL}^{-1}$  de EHMC e dividindo a solução em duas alíquotas, uma protegida da luz e a outra foi colocada em contato com a luz solar por 45 min. Após esse tempo de exposição à luz solar, foi retirada uma amostra de cada solução e foram levadas à análise cromatográfica. Observou-se a formação do isômero Z-EHMC e uma diminuição significativa do sinal analítico do E-EHMC para a solução que permaneceu sob o efeito da luz solar, indicando que há uma significativa isomerização do composto quando na presença da luz solar (Fig. 26).



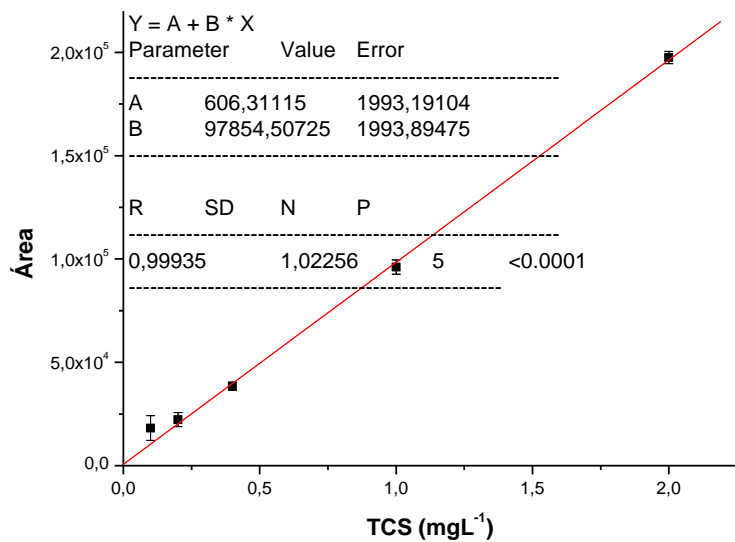
**Figura 26. Efeito da luz no cromatograma da solução EHMC 1,0 mg L<sup>-1</sup>.** Dados obtidos para injeção de 20 µL das soluções de EHMC na ausência de luz (linha vermelha) e após 45 min de exposição à luz solar (linha preta). Vazão 1,0 mL min.<sup>-1</sup>, fase móvel constituída de 75:25(v/v)etanol:água ácido fosfórico 0,01 %, monitoramento em 309 nm.

## 5.2. Figuras de Mérito para o método proposto

As curvas analíticas foram construídas para os dois compostos em uma faixa de concentração de 0,10 a 2,0 mgL<sup>-1</sup>. Cada padrão foi analisado em triplicata e a linearidade do método foi avaliada (Fig. 19). As figuras de mérito (Tab. 4, Fig. 27 e 28) indicaram que os limites de detecção e quantificação apresentaram-se adequados para as análises de amostras reais, demonstrando boa detectabilidade do método cromatográfico desenvolvido; se necessário, estes valores podem ser melhorados aumentando-se o volume de amostra injetado ou através de procedimentos de pré-concentração. O valor de R<sup>2</sup> apresentou-se melhor que 0,999 para os dois compostos em estudo, demonstrando o bom ajuste da curva analítica.



**Figura 27. Curva analítica para EHMC pelo método proposto. Concentrações de 0,10; 0,20; 0,40; 1,0 e 2,0 mg L<sup>-1</sup>.**



**Figura 28. Curva analítica para TCS pelo método proposto. Concentrações de 0,10; 0,20; 0,40; 1,0 e 2,0 mg L<sup>-1</sup>.**

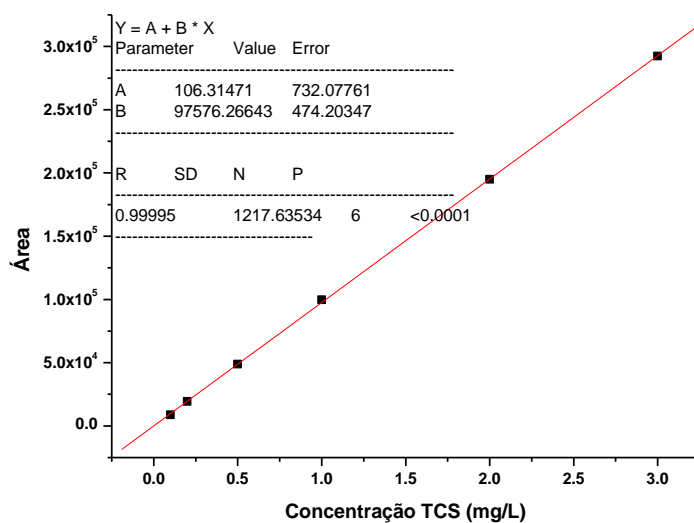
**Tabela 4. Características do método cromatográfico para a determinação do TCS (282 nm) e EHMC (309 nm).**

	TCS 282 nm	EHMC 309 nm
Equação da reta	$Y = 606,31 + 97854,51X$	$Y = 6478,94 + 5,10 \cdot 10^6 X$
	R = 0,99935	R = 0,99998
Limite de detecção (mgL <sup>-1</sup> )	0,021	0,0011
Limite de quantificação (mgL <sup>-1</sup> )	0,091	0,0066

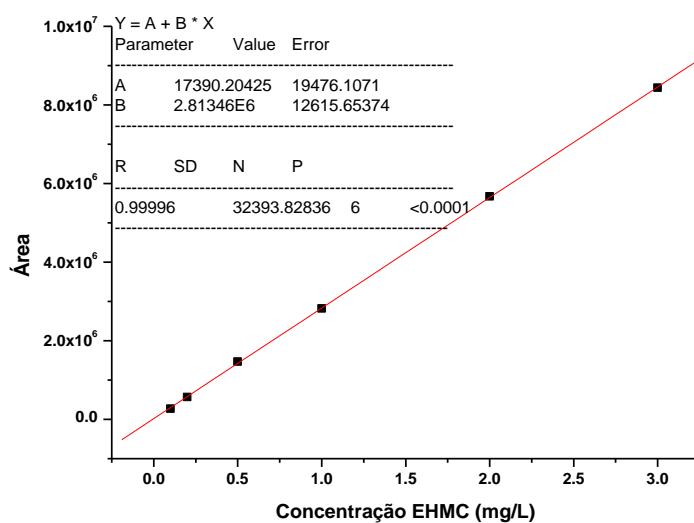
### ***5.3. Figuras de Mérito para o método Convencional***

As curvas analíticas obtidas para o método convencional (Figs. 29 e 30) bem como os limites de detecção e quantificação (Tab. 5) indicam semelhanças nas características analíticas dos dois métodos analíticos, sendo a substituição dos solventes orgânicos tóxicos a principal diferença entre ambos. A exemplo do método proposto, no método convencional as curvas analíticas puderam ser realizadas para as mesmas faixas de concentração (0,10 a 3,0 mgL<sup>-1</sup>).





**Figura 29. Curva analítica para TCS pelo método convencional.** Concentrações de 0,10; 0,20; 0,50; 1,0; 2,0 e 3,0 mg L<sup>-1</sup>.



**Figura 30. Curva analítica para EHMC pelo método convencional.** Concentrações de 0,10; 0,20; 0,50; 1,0; 2,0 e 3,0 mgL<sup>-1</sup>.

**Tabela 5. Figuras de mérito do método cromatográfico convencional para a determinação de TCS e EHMC.**

	TCS 282 nm	EHMC 309 nm
Equação da reta	$Y=106,31+ 97576,26X$	$Y=17390,20 + 2,81 \times 10^6X$
	R= 0,99995	R= 0,99996
Limite de detecção (mgL <sup>-1</sup> )	0,0090	$2,3 \times 10^{-4}$
Limite de quantificação (mgL <sup>-1</sup> )	0,030	0,015

#### 5.4. Otimização da Etapa de Extração

Extração em fase sólida comumente utilizada no preparo de amostras aquosas e na em procedimento de pré-concentração foi escolhida por ser uma técnica muito difundida e de fácil manipulação. Sabe-se, portanto, que neste método há a necessidade de utilização de solventes orgânicos na etapa de eluição dos analitos do cartucho [55]. Assim, na tentativa de se desenvolver uma metodologia que não seja considerada tóxica, os solventes orgânicos, normalmente utilizados na etapa de eluição, foram substituídos.

A ativação e limpeza do cartucho foi realizada antes do início de cada procedimento de extração, passando-se 7,0 mL de metanol pelo cartucho e 5,0 mL de água. Na sequência a amostra era passada pelo cartucho na vazão de 5,0 mL min<sup>-1</sup>[5], sendo o cartucho seco com auxílio de bomba de vácuo, e após realizada a eluição dos analitos do cartucho de extração.

Foram realizados testes para verificar qual a melhor fase sólida, avaliando qual a concentração de saturação, melhor solvente de eluição, volume e a vazão ideais. Também foi investigado o tempo que o cartucho permanecia sob o efeito do vácuo para secagem. Para se avaliar os dados obtidos, estes foram submetidos ao teste t de student de confiança 95% que, pode ser aplicado para as amostras independentes como as amostras emparelhadas, para tanto foi utilizado o programa ASSISTAT 7.6 beta-Assistência Estatística. Os resultados destes testes estatísticos são apresentados nas

figuras, onde as letras maiúsculas e minúsculas referem-se respectivamente aos testes realizados para TCS e para EHMC [81].

### ***Melhor sorvente***

Foram realizados testes com três cartuchos contendo diferentes sorventes, todos com a mesma massa (50,0 mg): florizil, que se trata de uma fase normal, C8 que é moderadamente apolar e C18 que é apolar [55]. Para estas análises foram passados 50,0 mL da amostra, numa vazão de 5,0 mLmin<sup>-1</sup> fortificada com 0,025 mgL<sup>-1</sup> de TCS e 0,025 mgL<sup>-1</sup> de EHMC. O solvente de eluição foi 2 x 4,0 mL de metanol seguido de 2 x 8,0 mL de acetona e 3,0 mL de diclorometano [5,54], sendo o solvente evaporado em evaporador rotatório e diluído em 1,0 mL da fase móvel.

Devido às características apolares dos compostos em estudo, os cartuchos contendo os sorventes com características mais apolares apresentaram melhores percentagens de recuperação quando comparadas ao florizil. Comparando-se os dados obtidos para as fases C8 e a C18, verificou-se que a fase sólida mais apolar permitiu obter melhor percentagem de recuperação do analito (80,0 e 88,0% de recuperação para TCS e EHMC, respectivamente), enquanto que fase C8 (47,0 e 45,5% de recuperação para TCS e EHMC, respectivamente), e florizil (23,5 e 20,0 % de recuperação para TCS e EHMC respectivamente), levaram a resultados bem inferiores. Assim, a fase estacionária C18 foi selecionada. Portanto, considerando os resultados de recuperação obtidos para as diferentes fases sólidas testadas, selecionou-se a fase estacionária C18 para a realização dos estudos de extração.

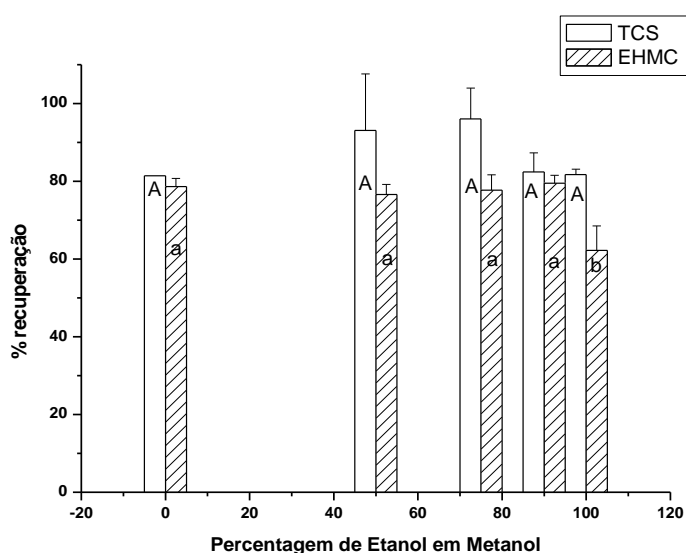
### ***Saturação da fase sólida***

Para verificar a saturação da fase sólida, foram passados pelo cartucho C18 com 50,0 mg de sorvente, 100,0 mL de uma solução contendo 0,50 mgL<sup>-1</sup> de TCS e EHMC, sendo que a cada 10,0 mL da amostra, foi coletada uma alíquota de 1,0 mL e levado diretamente para análise cromatográfica. Nos cromatogramas de todas as alíquotas amostradas até o volume de 100 mL não foi verificada a presença dos sinais relativos aos analitos, indicando que para uma solução contendo 0,50 mg L<sup>-1</sup> não há a

saturação do cartucho de extração até este volume; o volume pré-concentrado utilizado para as amostras foi de 50,0 mL.

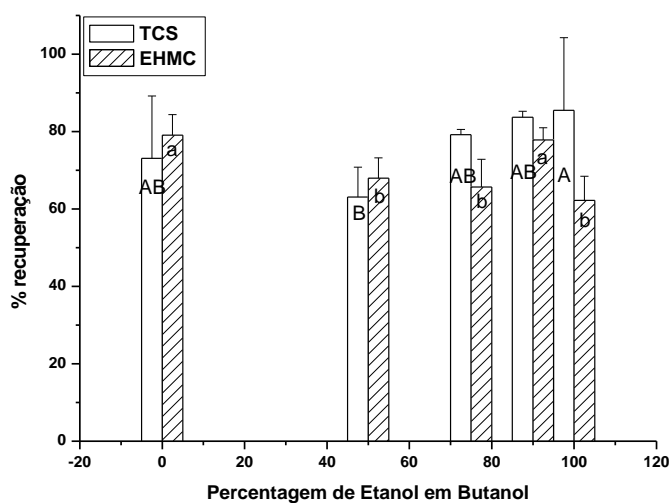
### ***Escolha do eluente.***

Testes preliminares foram realizados com a própria fase móvel utilizada na determinação por CLAE, 25% de solução ácido fosfórico 0,01% e 75% de etanol. Observou-se que para o TCS as percentagens de recuperação se mostraram adequadas, enquanto que para EHMC estas foram baixas, indicando a necessidade de mudanças no solvente de eluição. Assim, foram realizados novos testes com diferentes percentagens de etanol em metanol (0, 50, 75, 90 e 100 %, v/v) (Fig. 31), em butanol (Fig. 32) e em água (Fig.33).



**Figura 31. Percentagem de recuperação para TCS e EHMC com a utilização de diferentes misturas de solventes como eluentes no procedimento de extração em fase sólida.** Condições: etanol:metanol v/v (0:100), (50:50), (75:25), (90:10) e (100:0). Etapa de limpeza e ativação do cartucho realizada com 7,0 mL de metanol e 6,0 mL de água sendo a eluição com os diferentes eluatos num volume de 3,0 mL. Foi aplicado o Teste t ao nível de 5% de probabilidade. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si (sendo as letras minúsculas para EHMC e letras maiúsculas para TCS).

Para a mistura etanol:metanol (Fig. 31), estatisticamente não houve diferenças significativas entre os experimentos. Para 100% de metanol as percentagens de recuperação para ambos os compostos foram de aproximadamente 80%, com o aumento da concentração de etanol as percentagens de recuperação para o EHMC apresentaram um leve aumento, enquanto que para o TCS chegou a 93% para a mistura 80% etanol 20% metanol. Porém, para minimizar o uso de solventes orgânicos tóxicos indicou-se como melhor resultado para a mistura de solventes de relação 90:10.

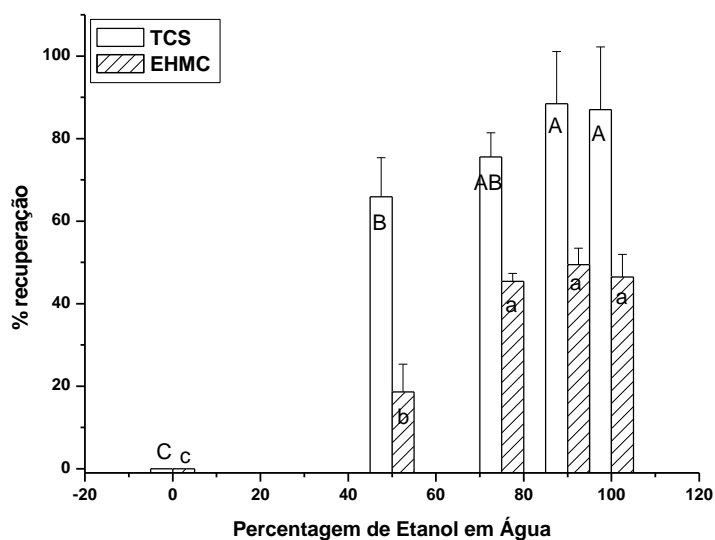


**Figura 32. Percentagem de recuperação para TCS e EHMC com a utilização de diferentes misturas de solventes como eluentes no procedimento de extração em fase sólida.** Condições: etanol:butanol v/v (0:100), (50:50), (75:25), (90:10) e (100:0). Etapa de limpeza e ativação do cartucho realizada com 7,0 mL de metanol e 6,0 mL de água sendo a eluição com os diferentes eluatos num volume de 3,0 mL. Foi aplicado o Teste t ao nível de 5% de probabilidade. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si (sendo as letras minúsculas para EHMC e letras maiúsculas para TCS).

Para a mistura etanol:butanol (Fig. 32) existe uma diferença estatística entre as misturas de solvente, sendo as melhores respostas obtidas para os experimentos contendo 90 e 100% de etanol; e os melhores resultados obtidos para eluição de ambos compostos foi para a solução contendo 90% de etanol 10% de butanol.

Para os experimentos utilizando mistura de etanol:água (Fig. 33) observou-se que para valores inferiores a 50% de etanol na solução extratora, as taxas de recuperação foram baixas, o que já era esperado devido a polaridade dos analitos; porém, mesmo

com o aumento da concentração de etanol, as percentagens de recuperação para EHMC não melhoraram; indicando que esta solução pode ser utilizada para a eluição apenas do TCS com percentagens de recuperação maiores que 85%.

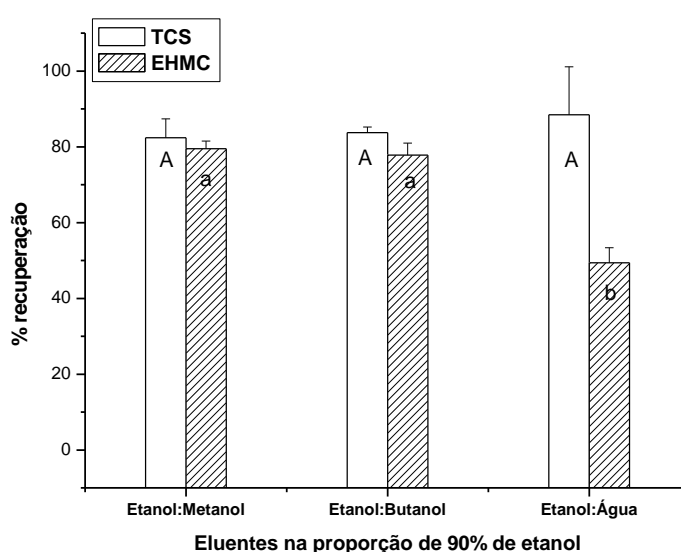


**Figura 33. Percentagem de recuperação para TCS e EHMC com a utilização de diferentes misturas de solventes como eluentes no procedimento de extração em fase sólida.** Condições: etanol:água v/v (0:100), (50:50), (75:25), (90:10) e (100:0). Etapa de limpeza e ativação do cartucho realizada com 7,0 mL de metanol e 6,0 mL de água sendo a eluição com os diferentes eluatos num volume de 3,0 mL. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si (sendo as letras minúsculas para EHMC e letras maiúsculas para TCS). Foi aplicado o Teste t ao nível de 5% de probabilidade.

Observou-se que dentre as três misturas de solventes utilizadas para a eluição do TCS e EHMC os melhores resultados foram obtidos quando a porcentagem de etanol foi superior a 75%, devido ao fato de que os compostos analisados têm grande solubilidade em etanol; contudo, quando utilizado 100% de etanol como eluente não se obteve os melhores resultados, demonstrando que a utilização de um solvente com diferente polaridade e estrutura ajudaria na retirada dos compostos do cartucho de extração. Dentre os testes realizados as proporções que apresentaram melhores resultados foram etanol:butanol 90:10 (v/v) e etanol:metanol 90:10 (v/v) (Fig.34). Foi selecionado a solução de etanol:metanol 90:10 (v/v) como solução eluente porque nesta condição

obteve-se as maiores percentagens de recuperação e baixo erro associado as triplicatas, além da fase ser compatível com o método cromatográfico anteriormente desenvolvido.

Deve ser considerado que apesar do solvente butanol ser menos tóxico que o metanol, este apresenta menor solubilidade em meio aquoso [82], o que provocava problemas durante a realização da determinação cromatográfica, pois a fase móvel apresentava 25% de água. Uma opção para a utilização de butanol seria a evaporação e solubilização dos analitos em fase móvel, mas isso acarretaria em mais uma etapa no método com aumento dos erros experimentais.

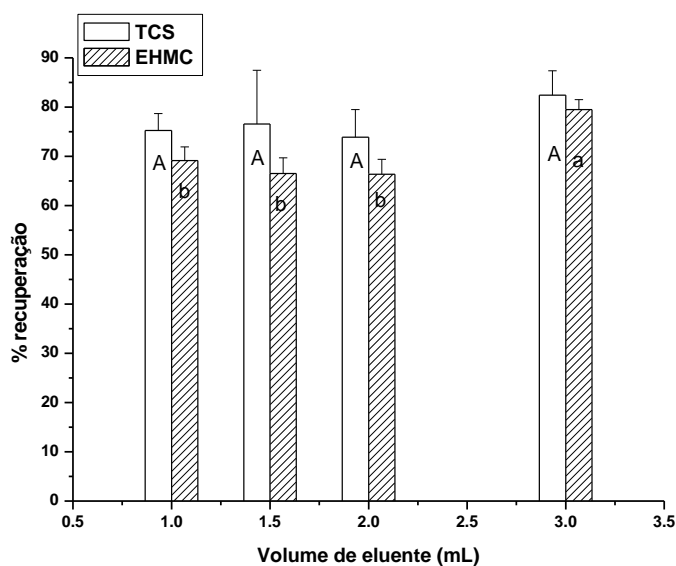


**Figura 34. Percentagem de recuperação para TCS e EHMC com a utilização de diferentes misturas de solventes como eluentes no procedimento de extração em fase sólida.** Condições: etanol:metanol(90:10, v/v); etanol:butanol(90:10, v/v); e etanol:água(90:10, v/v). Etapa de limpeza e ativação do cartucho realizada com 7,0 mL de metanol e 6,0 mL de água sendo a eluição com os diferentes eluatos num volume de 3,0 mL. . Médias As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si (sendo as letras minúsculas para EHMC e letras maiúsculas para TCS). Foi aplicado o Teste t ao nível de 5% de probabilidade.

#### *Volume do solvente de eluição*

Foram testados diferentes volumes do eluente, 1,0, 1,5, 2,0 e 3,0 mL e aplicado teste t com 95% de confiança. Para o TCS não houve diferença significativa entre as

médias dos resultados para diferentes volumes, porém para EHMC o volume de 3,0 mL foi significativamente superior aos demais volumes utilizados (Fig. 35).

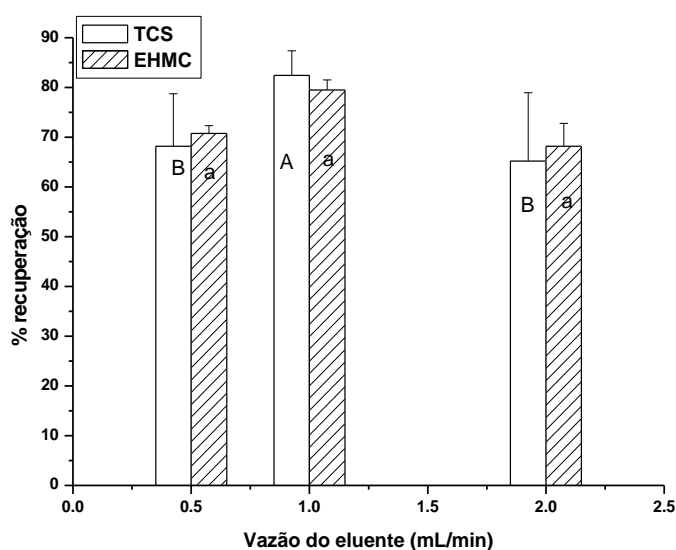


**Figura 35. Percentagem de recuperação para TCS e EHMC com a utilização de diferentes volumes do eluente no procedimento de extração em fase sólida.** Condições: etanol:metanol(90:10, v/v) nos volumes de 1,0, 1,5, 2,0 e 3,0 mL. Etapa de limpeza e ativação do cartucho realizada com 7,0 mL de metanol e 6,0 mL de água. Foi aplicado o Teste t ao nível de 5% de probabilidade. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si (sendo as letras minúsculas para EHMC e letras maiúsculas para TCS).

### *Vazão do eluente*

Foram realizados testes para verificar qual a melhor vazão para a eluição dos analitos do cartucho de extração. Observou-se que a vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup> foi a que apresentou os melhores resultados (Fig. 36). Para o EHMC não houve diferença entre os diferentes valores de vazão de eluição.

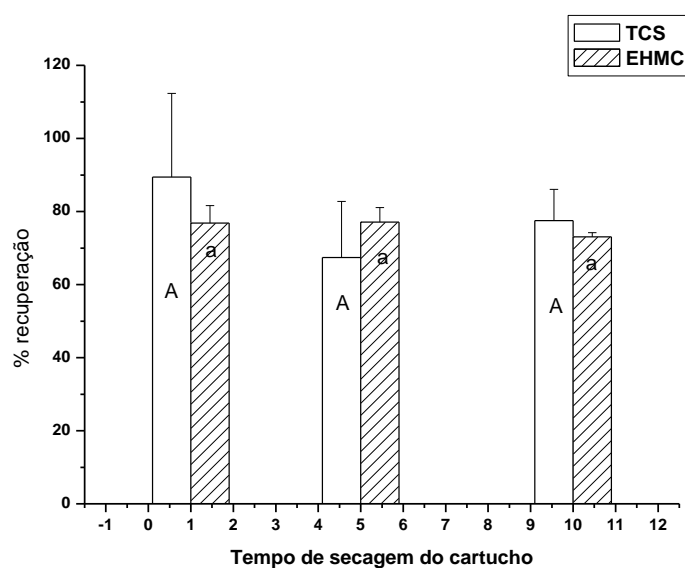




**Figura 36. Percentagem de recuperação para TCS e EPMC com a utilização de diferentes vazões do eluente no procedimento de extração em fase sólida.** Condições: 3,0 mL do eluente etanol:metanol(90:10, v/v) nas vazões de 0,5, 1,0, 2,0 mL min.<sup>-1</sup> Etapa de limpeza e ativação do cartucho realizada com 7,0 mL de metanol e 6,0 mL de água. Foi aplicado o Teste t ao nível de 5% de probabilidade. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si (sendo as letras minúsculas para EPMC e letras maiúsculas para TCS).

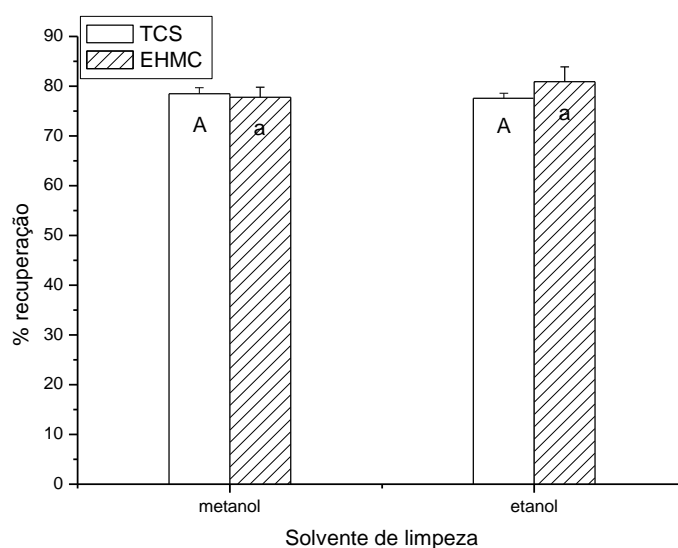
### *Tempo de secagem do cartucho*

Outro parâmetro analisado foi o tempo que o cartucho permaneceu sob efeito do vácuo para a secagem após a passagem da amostra. Foram testados os tempos de 1,0; 5,0 e 10,0 min. Observou-se que quando o cartucho permanece por 1,0 min sob o efeito do vácuo consegue-se a melhor recuperação (Fig. 37), porém o erro associado a esta resposta é o maior. Isso decorre do fato de que ainda pode haver amostra na forma líquida no cartucho para este tempo de secagem, levando a erros maiores. Não houve diferença significativa entre as respostas, porém para garantir a total secagem do cartucho antes da eluição dos analitos, optou-se por utilizar o tempo de 10,0 min.



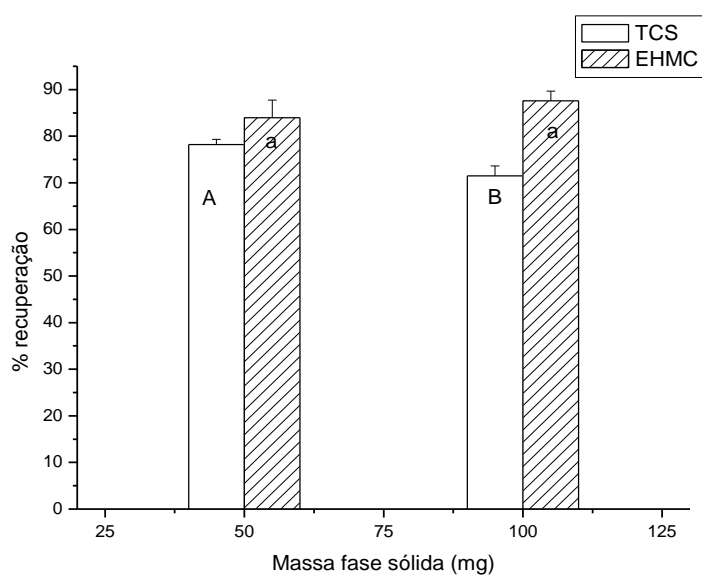
**Figura 37. Percentagem de recuperação para TCS e EHMC para diferentes tempos de secagem do cartucho de extração.** Testes realizados para tempos de 2,0, 5,0 e 10,0 min. Condições: 3,0 mL do eluente etanol:metanol(90:10, v/v) na vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup>. Etapa de limpeza e ativação do cartucho realizada com 7,0 mL de metanol e 6,0 mL de água. Foi aplicado o Teste t ao nível de 5% de probabilidade. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si (sendo as letras minúsculas para EHMC e letras maiúsculas para TCS).

Para adequar o método aos princípios da química limpa, a etapa de limpeza também passou por modificação. Nos testes iniciais era passando 7,0 mL de metanol, sendo alterado para 7,0 mL de etanol, que é um solvente menos tóxico, assegurando o descarte de substância não agressiva ao ambiente e evitando que analistas fiquem expostos a substâncias tóxicas [82]. Deve-se ressaltar que não houve diferença significativa no sinal analítico ao mudar o solvente da etapa de limpeza (Fig.38).



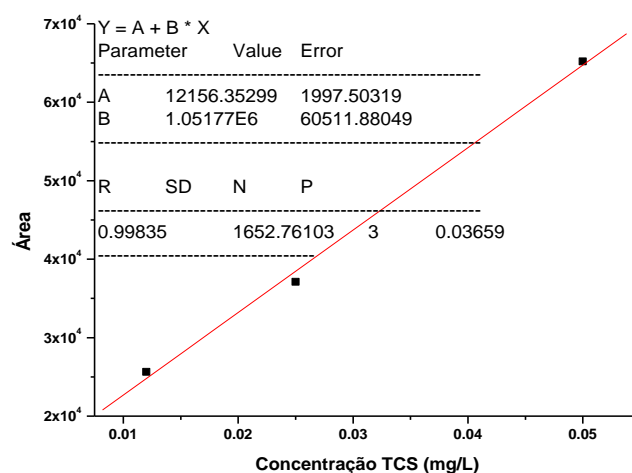
**Figura 38. Percentagem de recuperação para TCS e EHMC quando da utilização de etanol e metanol para limpeza do cartucho.** Condições de análise: 3,0 mL do eluente etanol:metanol(90:10, v/v) na vazão de 1,0 mL min.<sup>-1</sup>Foi aplicado o Teste t ao nível de 5% de probabilidade. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si (sendo as letras minúsculas para EHMC e letras maiúsculas para TCS).

Testes realizados para verificar se uma maior massa de fase sólida contida no cartucho poderia influenciar nos resultados (cartuchos contendo 50,0 e 100,0 mg de fase sólida) mostraram não haver diferença significativa, permanecendo-se, então, com o uso de menor quantidade de fase sólida (Fig. 39).

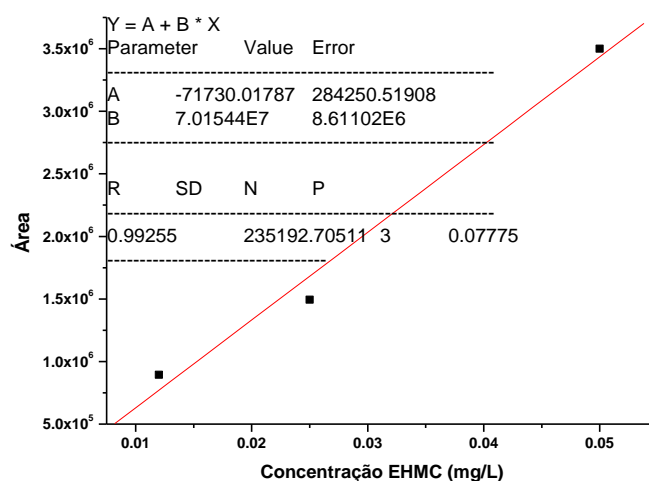


**Figura 39. Percentagem de recuperação para TCS e EHMC para diferentes massas de sorbente.** Testes realizados para 50,0 e 100,0 mg de sorbente C18. Condições: 3,0 mL do eluente etanol:metanol(90:10, v/v) na vazão de 1,0 mL min.<sup>-1</sup>. Etapa de limpeza e ativação do cartucho realizada com 7,0 mL de etanol e 6,0 mL de água. Foi aplicado o Teste t ao nível de 5% de probabilidade. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si (sendo as letras minúsculas para EHMC e letras maiúsculas para TCS).

Para se certificar que o método de extração apresentava resposta linear em função da concentração da amostra foram preparados padrões em 3 concentrações diferentes (baixa, média e alta), o método de extração tem resposta linear para as 3 concentrações avaliadas (0,012, 0,025 e 0,050 mg L<sup>-1</sup> para TCS e EHMC), obtendo-se percentagens de recuperação de 85, 77 e 78 % para baixa, média e alta concentração de TCS e 85, 81 e 84 % para baixa, média e alta concentração de EHMC (Figs. 40 e 41).



**Figura 40. Curva de extração para TCS nas concentrações de 0,012, 0,025 e 0,05 mgL<sup>-1</sup>. Eluição com 3,0 mL Etanol:Metanol(90:10, v/v) na vazão de 1,0 mL min.<sup>-1</sup>.**

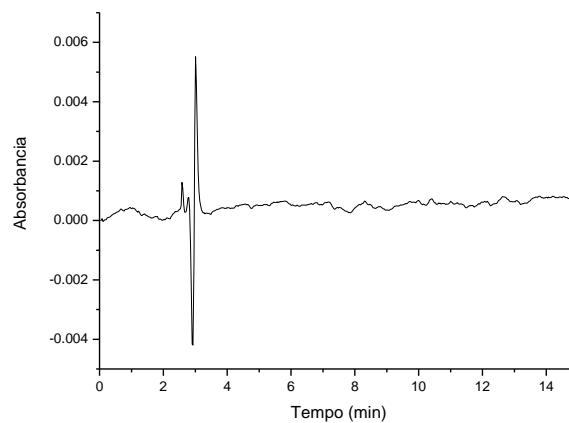


**Figura 41. Curva de extração para TCS e EHMC nas concentrações de 0,012, 0,025 e 0,050 mgL<sup>-1</sup>. Eluição com 3,0 mL Etanol:Metanol(90:10, v/v) na vazão de 1,0 mL min.<sup>-1</sup>.**

Após todos estes testes, verificou-se que é possível extrair TCS e EHMC das amostras nas seguintes condições: cartucho de extração em fase sólida contendo 50,0 mg com fase C18; etapa de ativação do cartucho utilizando 7,0 mL de etanol seguido de 6,0 mL de água. A eluição da amostra realizada em uma vazão de 5,0 mL min<sup>-1</sup>, secagem do cartucho por 10,0 min sob vácuo; eluição dos analitos com 3,0 mL de Etanol:Metanol 90:10 (v/v) a uma vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup>. Sob estas condições o fator de

pré-concentração foi de 16,7, podendo ser melhorado com a evaporação e redissolução do eluato em menor volume, ou mesmo aumentando o volume da amostra, visto que o cartucho suporta concentrações maiores.

Extrações de soluções em branco também foram realizadas para verificar se havia a contaminação dos equipamentos utilizados para extração, o que poderia resultar em resultados falsos positivos para as amostras reais. Como pôde-se verificar, não houve contaminação no sistema (Fig. 42).



**Figura 42. Cromatograma obtido para o branco após procedimento de extração.** Injeção de 20 $\mu$ L da solução obtida após extração em fase sólida de amostra branco. Fase móvel constituída de etanol: ácido fosfórico 0,01% (75:25, v/v), monitoramento em 282 nm.

## 6. Avaliação do sistema de tratamento de água potável

Foram realizados testes de bancada para verificar a eficiência do sistema de tratamento de água de abastecimento público. Para isto, uma amostra de água de rio que não apresentava contaminação por TCS foi fortificada com 0,025 mg L<sup>-1</sup> do analito, sendo submetida ao tratamento semelhante ao utilizado pela SANEPAR para tratamento da água de abastecimento público da cidade de Maringá.

### 6.1. Coagulação e decantação

A coagulação e a decantação são importantes no tratamento de água e as concentrações dos agentes coagulantes devem ser otimizadas para diferentes amostras [78]. Assim, foram realizados testes com diferentes concentrações do coagulante PAC para diferentes condições de agitação para a fase rápida, lenta e tempo de repouso.

Foram testadas soluções contendo 16,0, 60,0, 80,0, 100,0 e 120,0 mg L<sup>-1</sup> de policloreto de alumínio como coagulantes. Para os valores de concentração menores que 60,0 mg L<sup>-1</sup> não houve a formação dos flocos, não sendo possível a utilização dessas concentrações de PAC. Para 80,0 mg L<sup>-1</sup> houve a formação dos flocos, porém o processo de decantação não ocorreu. Para as concentrações de 120,0 e 100,0 mg L<sup>-1</sup> houve uma boa formação dos flocos; sendo que para a concentração de 100,0 mg L<sup>-1</sup> a decantação foi mais eficiente, mais rápida e deixou a água com aspecto mais límpido, além de utilizar menor quantidade de PAC, o que diminui os custos da análise, sendo esta a concentração de PAC escolhida.

Os testes para a concentração do coagulante foram feitos utilizando os tempos de velocidade rápida, velocidade lenta e de decantação citados por MaceloJulio *et al.*, sendo utilizados 30 s para a agitação rápida, 10 min a uma velocidade lenta e 30 min para a decantação [78].

Para a otimização dos parâmetros para a amostra utilizada foram testados os tempos de 0,50 e 1,0 min de mistura rápida, sendo o tempo de 1,0 min melhor que o 0,5 min. Como o sistema de agitação utilizado nos experimentos foi do tipo agitação com barra magnética, que não apresenta a mesma eficiência que os Jar-test, é justificada a diferença na eficiência quando utilizado um tempo maior de agitação, visto que há a necessidade de um maior tempo para a total homogeneização da amostra.

Foi estudado o tempo que a amostra permanecia com velocidade lenta para a formação dos flocos, sendo testados os tempos de 10,0, 20,0 e 30,0 min. O tempo de 10,0 min mostrou-se ineficiente para a completa formação dos flocos, enquanto que para 20,0 e 30,0 min não houve diferença significativa, sendo escolhido o tempo de 20,0 min como tempo de velocidade lenta.

Para a decantação foram testados 20,0, 30,0 e 40,0 min, sendo o menor tempo ineficiente para a clarificação da água tratada. Para os tempos de 30,0 e 40,0 min não houve diferenças significativas, sendo então escolhido o tempo de 30,0 min. (Fig. 43).



**Figura 43. Amostra após procedimentos de floculação/sedimentação de amostra de água de rio.**

O filtro para a purificação final da água foi construído seguindo-se a mesma proporção dos materiais utilizados na estação de tratamento de água potável do município de Maringá. Devido ao pequeno volume de água utilizado nos testes, o filtro teve seu tamanho diminuído substancialmente. Assim, apenas areia mesh10, areia fina e carvão antracito foram utilizados para a construção do mesmo (Fig. 44).





**Figura 44. Filtro utilizado na etapa de filtração para limpeza física da água.** Contendo: 1,10cm de carvão antracito, 0,85 cm de areia grossa e 0,85 cm de areia fina.

Otimizados os parâmetros para o tratamento da água, passou-se aos testes com amostras com adição padrão, sendo coletadas alíquotas da amostra de água após as diferentes etapas do tratamento: floculação/coagulação/decantação, filtração e adição de hipoclorito de sódio.

### ***6.2. Determinação de Triclosan na água tratada***

A amostra de água de rio foi fortificada com  $0,025 \text{ mgL}^{-1}$  de TCS e tratada com 5,0 mL de uma solução sulfato de alumínio  $20,0 \text{ gL}^{-1}$  e 4,0 mL de carbonato de sódio  $20,0 \text{ gL}^{-1}$  para correção do pH; sendo deixada sob agitação rápida por 1,0 min. Após

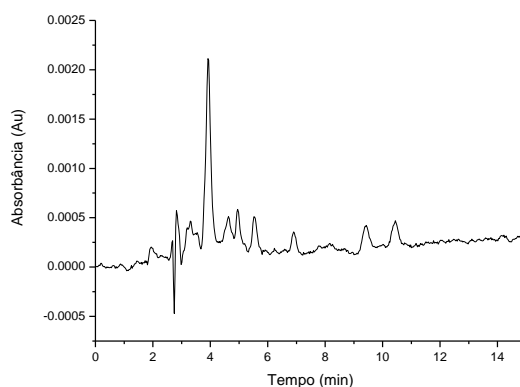
esse tempo, a velocidade de agitação foi diminuída e o sistema permaneceu sob agitação lenta por 20,0 min. Após, a agitação foi cessada e a amostra sofreu processo de decantação por 30,0 min. Foi retirada uma alíquota de 50 mL da amostra tratada e levada para a extração em fase sólida, sendo que todas as extrações foram realizadas em triplicata e os extratos levados para a determinação de TCS por CLAE. Nesta etapa foi verificado que houve uma redução de 85,44% da massa de triclosan adicionada, ou seja, permaneceu na água cerca de  $14,56 \pm 2,60$  % do TCS adicionado. Devido ao alto valor de  $K_{ow}$  do TCS, ele apresenta grande afinidade por partículas dispersas, tendendo a adsorção [11].

HEIDLER *et al.* observou em seu estudo para verificar se o tratamento de água de esgoto era adequado para remoção total do TCS da água que, o particionamento e persistência em lamas ou sedimentos, foram os principais mecanismos de remoção do TCS de águas residuais, sendo relativamente mais importante do que a destruição biológica ou outros processos de transformação, que potencialmente podem ocorrer durante o tratamento de águas residuais [11]. Isto demonstra uma grande afinidade do TCS pelo particulado, sendo comprovado, pela percentagem de recuperação encontrada após o processo de decantação que, essas partículas dispersas na água se aglomeram e decantam arrastando consigo uma grande quantidade dos compostos dissolvidos na água, principalmente os de baixa solubilidade como o TCS.

Para o teste da filtração, repetiu-se a etapa de floculação/coagulação/decantação e após a clarificação, a amostra foi passada através do filtro contendo carvão antracito e areia. Após a passagem da amostra pelo filtro, foram coletadas as alíquotas e levadas para a extração e posterior determinação cromatográfica. Análise dos cromatogramas demonstraram que com mais essa etapa do tratamento há uma retirada de 94,32 % do total do TCS adicionado, indicando que esta etapa é responsável pela retirada de cerca de 6% do TCS e que o carvão que deveria reter o bactericida devido as suas características apolares [17] não consegue eliminá-lo totalmente, permanecendo na água tratada ainda  $5,68 \pm 1,53$ % de TCS.

Após as etapas de floculação/coagulação/decantação seguida de filtração, a água passou por um processo de desinfecção através da adição do agente oxidante hipoclorito de sódio NaClO, substância capaz de oxidar compostos causadores de gosto e odor na água. A análise do cromatograma feito para uma alíquota da amostra de água após 25

min da adição de hipoclorito não indicou a presença do bactericida TCS, porém houve surgimento de vários outros sinais analíticos que não puderam ser identificados (Fig. 45).

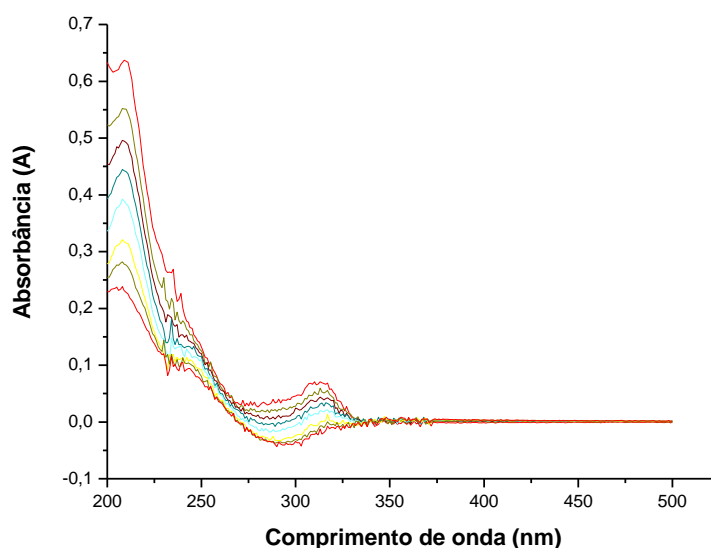


**Figura 45** Cromatograma de uma alíquota da amostra de água tratada após adição de hipoclorito de sódio. Condições de extração: condicionamento da fase sólida 7,0 mL etanol, seguido de 6,0 mL de água, passagem de 50,0 mL de amostra. Eluição dos analitos com 3,0 mL de solução etanol:metanol(90:10). Condições cromatográficas: Fase móvel constituída de (75:25, v/v) etanol:0,01 % ácido fosfórico, vazão de 1,0 mL min.<sup>-1</sup>; tempo de retenção TCS 5,20 min., monitoramento em 282 nm.

Existem cinco produtos de degradação formados quando TCS entra em contato com cloro livre, são eles, dois iômeros Tetraclosan, o Pentaclosan e 2,4-diclorofenol, 2,4-DCF e 2,4,6 triclorofenol, 2,4,6-TCF [75]. Pentaclosan e Tetraclosan são muito instáveis, permanecendo muito pouco tempo na presença de cloro, porém o 2,4-DCF e o 2,4,6-TCF são conhecidos interferentes endócrinos, lipofílicos e persistentes no meio [75]. O tratamento de água, quando permite que compostos orgânicos do tipo TCS permaneçam na água após a última etapa do tratamento (filtração) dá condições para que na fase de cloração forme produtos de degradação tóxicos, que irão para os consumidores, não na forma de TCS, mas muitas vezes, na forma de substâncias que são ainda mais tóxicos que o próprio TCS (Fig. 9).

Neste estudo foi demonstrado que as etapas de tratamento da água não conseguem eliminar 100% do TCS presente na amostra, permanecendo cerca 5,0% do composto na etapa de cloração, que pode formar produtos derivados do TCS mais tóxicos e que irão para o consumo humano através das redes de abastecimento público.

Foi preparada uma solução contendo TCS e solução de hipoclorito de sódio, e monitorado continuamente durante 3,0 h (Fig. 46) para se verificar o tempo necessário para a total degradação do TCS quando na presença de hipoclorito de sódio. A experiência mostrou que são necessários em torno de 30 min para que a concentração de TCS caia a metade da inicial, sendo que aos 70 min praticamente todo o TCS já está degradado. Houve um pequeno deslocamento da banda de absorção do TCS, bandas de absorção em 282 nm e 230 nm, devido à presença de hipoclorito no meio, provavelmente devido ao aumento do valor do pH e desprotonação do TCS, o que facilita a degradação do composto visto que a forma básica do TCS é mais suscetível a ataques de degradação[11,16,75].



**Figura 46. Monitoramento da degradação do TCS  $1,0 \text{ mgL}^{-1}$  pelo hipoclorito de sódio.** Foram misturados uma solução contendo  $1,0 \text{ mgL}^{-1}$  de TCS e solução contendo hipoclorito de sódio 1,0% e deixados reagir em cubeta de quartzo, sendo monitorado constantemente por espectrofotômetro na faixa de 200 a 500 nm.

CANOSA *et al.* analisaram uma água de rio e verificaram a presença de TCS, 2,4-DCF e 2,4,6-TCF, e concluíram que TCS auxilia no aparecimento destes compostos na água, porém não é o único a contribuir para a introdução de ambos poluentes no ambiente aquático[75].

## 7. Aplicação dos métodos análise de amostras ambientais

Foram coletadas amostras em corpos de água localizados no perímetro urbano cidade de Maringá-Paraná. A primeira coleta foi realizada no dia 08 de maio de 2012 e a segunda no dia 05 de setembro de 2012 nos seguintes locais: 1- Córrego Mandacaru; 2-Ribeirão Maringá, após a descarga de uma das estações de tratamento de esgoto (ETE) de Maringá; 3-Córrego Cleópatra; 4- Ribeirão Morangueiro e 5- água de torneira do campus da UEM. As amostras foram analisadas no mesmo dia da coleta, passando por processo de filtração e tendo seu pH ajustado com ácido fosfórico assim que chegaram ao laboratório.

Para verificar a eficiência de extração do método, foram adicionadas às amostras de água de rio quantidades conhecidas dos compostos em dois níveis de concentração ( $0,025 \text{ mg L}^{-1}$  e  $0,050 \text{ mg L}^{-1}$ ); sendo estas submetidas aos procedimentos de extração e determinação (Tab. 6). As percentagens de recuperação variaram de 32 a 93%, sendo que para a amostra do Córrego Cleópatra as percentagens de recuperação foram baixas para o EHMC (45,12 e 32,73% para adições de  $0,025$  e  $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente).

Análises da demanda química de oxigênio (DQO) das amostras de rio, parâmetro global utilizado como indicador do conteúdo orgânico de águas residuárias e superficiais, por indicar o potencial poluidor de efluentes domésticos de industriais [82].

Os valores de DQO para o Córrego Cleópatra e para o Ribeirão Maringá foram elevados, chegando a  $24,50 \text{ mg L}^{-1} \text{ O}_2$  para Córrego Cleópatra e  $24,00 \text{ mg L}^{-1} \text{ O}_2$  para o Ribeirão Maringá. Estas amostras foram filtradas em laboratório e apresentaram grande quantidade de matéria orgânica retida na etapa de filtração que, pode ter sido responsável pela adsorção de grande parte dos analitos; fato evidenciado pela menor percentagem de recuperação que, indicando que a presença de matéria orgânica influencia nas percentagens de extração. Para as amostras coletadas no Córrego Mandacaru e no Ribeirão Morangueiro os valores de DQO foram de 3,14 e  $2,27 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{O}_2$ , respectivamente.

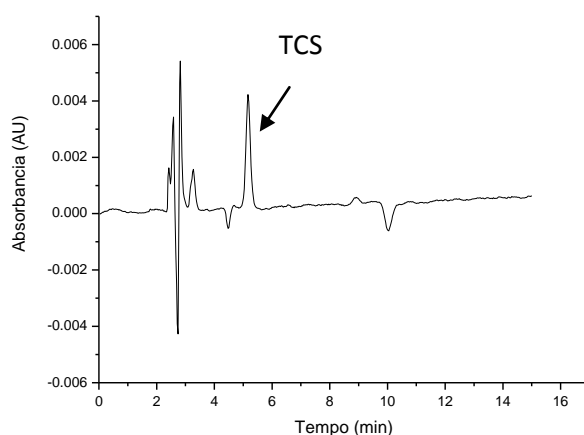
Um fator ambiental que deve ser observado é que o Córrego Mandacaru, após receber a descarga da ETE Mandacaru recebe o nome de Ribeirão Maringá e passa de uma DQO de  $3,14 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{O}_2$  a montante da descarga para  $24,50 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{O}_2$ . Estes resultados mostram que a um aumento significativo no teor de matéria orgânica na água.

Segundo dados da literatura, para 8 amostras coletadas no efluente da ETE Mandacaru no ano de 2010, todas apresentaram valores de DQO acima dos permitidos pela Resolução Sema n° 021/09 que aprova que os efluentes das ETEs somente poderão ser lançados, direta ou indiretamente, nos corpos de água desde que obedecem as condições e padrões estabelecidos, para a DQO: até 225 mgL<sup>-1</sup> O<sub>2</sub> [84, 72].

**Tabela 6. Eficiência de extração (%) dos compostos para diferentes amostras de rio em duas concentrações (0,025 e 0,050 mg L<sup>-1</sup>)**

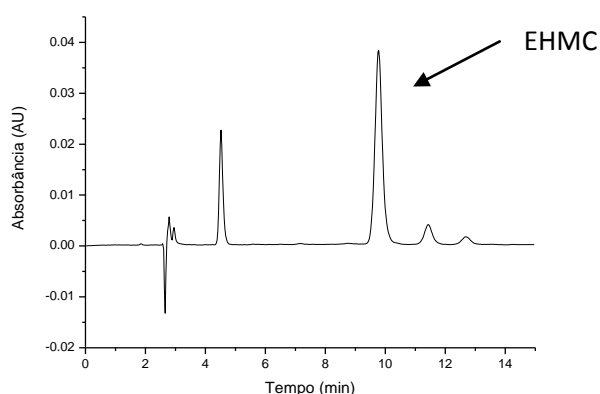
Amostras	Método Proposto	
	TCS % rec	EHMC % rec.
Mandacarú	80,20 ± 0,30	72,63 ± 3,34
	99,90 ± 5,96	76,06 ± 8,36
Maringá	87,80 ± 4,60	69,61 ± 3,02
	86,50 ± 1,50	62,28 ± 4,86
Cleópatra	83,07 ± 3,55	45,12 ± 5,95
	76,54 ± 8,51	32,73 ± 1,65
Morangueio	75,48 ± 4,08	60,60 ± 1,67
	90,39 ± 1,37	78,47 ± 1,80
Torneira	74,71 ± 1,93	89,90 ± 2,01
	83,05 ± 3,46	88,56 ± 1,81

Foram analisadas duas amostras comerciais, uma de creme dental contendo o composto TCS e um creme protetor solar, contendo o composto EHMC. Para a amostra comercial de creme dental a indicação do rótulo era de 0,30% do composto ativo TCS, ou seja, 3,0 mg para cada 1,0 g de creme dental e após as análises foram encontrados 2,8 mg g<sup>-1</sup>, valor próximo ao esperado (Fig. 47).



**Figura 47. Cromatograma de amostra de creme dental ( $0,10 \text{ gL}^{-1}$ ) monitorado no comprimento de onda de  $282 \text{ nm}$ .** Condições de extração: condicionamento da fase sólida  $7,0 \text{ mL}$  etanol, seguido de  $6,0 \text{ mL}$  de água, passagem de  $50,0 \text{ mL}$  de amostra. Eluição dos analitos com  $3,0 \text{ mL}$  de solução etanol:metanol(90:10). Condições cromatográficas: Fase móvel constituída de (75:25, v/v) etanol:0,01 % ácido fosfórico, vazão de  $1,0 \text{ mLmin}^{-1}$ . Tempo de retenção TCS  $5,20 \text{ min}$ .

Para a amostra de protetor solar que não apresentava em seu rótulo a percentagem de EHMC utilizado na formulação e que a ANVISA permite até 10% do composto ativo em filtro solares, ou seja,  $100 \text{ mg}$  para cada  $1,0$  de creme protetor solar, encontrou-se uma concentração de  $6,9 \text{ mg g}^{-1}$  do composto EHMC que equivale a  $0,69\%$  da composição, uma quantidade abaixo dos 10% limitado pela ANVISA. Este valor baixo encontrado pode ser explicado pela presença de pelo menos outros 3 compostos com a finalidade de proteção contra raios solares (Benzofenona-3, Homosalato e Octilsalicilato), fato evidenciado no cromatograma da amostra da solução com filtro solar, onde podem ser vistos outros sinais analíticos com áreas consideravelmente elevadas e com espectros eletromagnéticos característicos de cada um dos filtros solares presentes na amostra (Fig. 48).



**Figura 48. Cromatograma de uma amostra de creme protetor solar ( $0,10 \text{ gL}^{-1}$ ) obtido no comprimento de onda de  $309 \text{ nm}$ .** Condições de extração: condicionamento da fase sólida  $7,0 \text{ mL}$  etanol, seguido de  $6,0 \text{ mL}$  de água, passagem de  $50,0 \text{ mL}$  de amostra. Eluição dos analitos com  $3,0 \text{ mL}$  de solução etanol:metanol(90:10). Condições cromatográficas: Fase móvel constituída de (75:25, v/v) etanol:0,01 % ácido fosfórico, vazão de  $1,0 \text{ mLmin}^{-1}$ . Tempo de retenção TCS  $9,80 \text{ min}$ .

As amostras coletadas no dia 05 de setembro de 2012 tiveram seus resultados comparados com aqueles fornecidos pelo método convencional (Tab. 7) [5]. O método proposto forneceu percentagens de recuperação que variaram entre 70,45 e 87,31% enquanto que o método convencional forneceu percentagens de recuperação na faixa de 74,32 a 100,12 %; porém com utilização de elevada quantidade de solventes orgânicos ( $8,0 \text{ mL}$  de metanol,  $16,0 \text{ mL}$  de acetona e  $3,0 \text{ mL}$  de diclorometano), além de necessitar de uma etapa adicional de evaporação que pode levar a erros e maior custo da análise devido ao maior tempo de preparo da amostra.



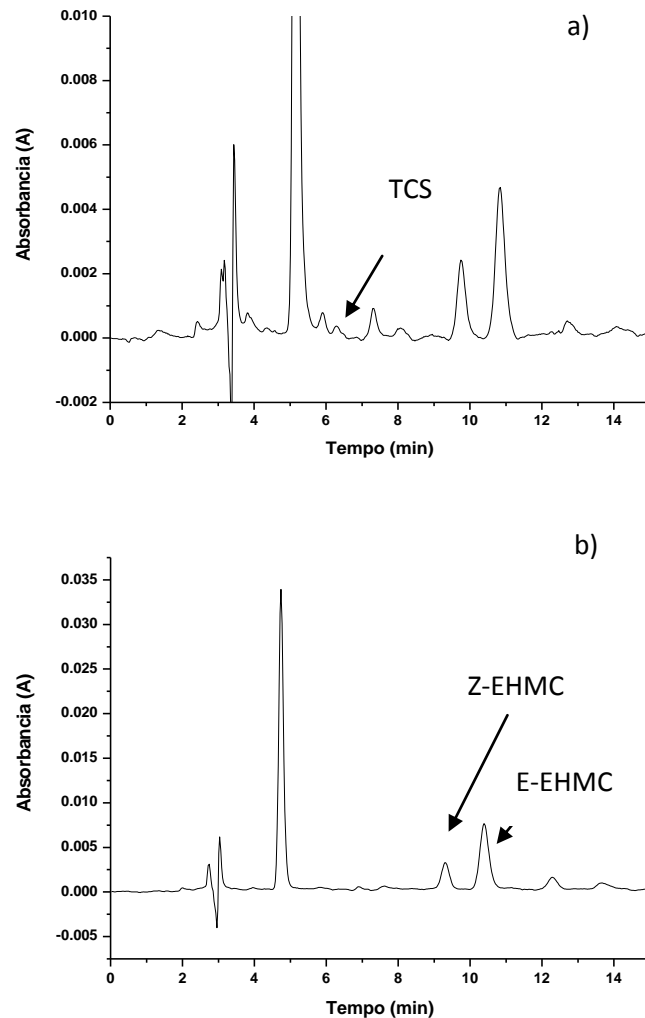
**Tabela 7. Eficiência de extração (%) dos compostos TCS e EHMC para diferentes matrizes para o método proposto e o método convencional após a adição de padrão 0,05 mg L<sup>-1</sup> (média ± desvio padrão; n=3).**

Matrizes	Método Proposto		Método convencional	
	TCS % rec	EHMC % rec.	TCS % rec	EHMC % rec.
Mandacaru	81,40 ± 4,12	83,14 ± 1,62	100,12 ± 13,70	98,90 ± 17,72
Maringá	87,31 ± 2,50	82,15 ± 4,12	90,25 ± 2,50	89,70 ± 6,30
Cleópatra	70,45 ± 1,38	80,10 ± 3,88	89,45 ± 5,14	74,32 ± 2,40
Morangueiro	83,66 ± 4,50	80,90 ± 3,22	95,03 ± 5,20	84,70 ± 3,50
Torneira	80,05 ± 2,46	85,56 ± 4,81	96,80 ± 4,0	92,50 ± 3,90

Para a maioria das amostras de água, foram encontradas quantidades consideráveis dos compostos em estudo, principalmente do composto proveniente do protetor solar EHMC. Somente para as amostras de água de torneira e em uma das amostras de rio (Ribeirão Morangueiro) o sinal analítico referente ao TCS apresentou-se menor que o da concentração referente ao limite de detecção; tanto para o método proposto quanto para o método convencional. São apresentados abaixo os cromatogramas para uma das amostras, o rio Mandacaru, (Fig. 49 e Tab. 8).

O EHMC foi determinado em praticamente todas as amostras, enquanto o TCS não foi encontrado nas amostras de água potável e do Ribeirão Morangueiro, isto para ambos os métodos utilizados. Houve uma diferença de concentração entre os valores fornecidos pelos dois métodos (proposto e convencional), principalmente para a amostra do Ribeirão Maringá.

Os valores obtidos para a concentração de TCS são similares aos valores relatados na literatura que indicam valores entre 3,08 e 0,14 µg L<sup>-1</sup> de TCS [36]; exceto para os valores encontrados para a amostra Ribeirão Maringá que, recebe a descarga da estação de tratamento de esgoto da cidade de Maringá, e apresentou maiores concentrações do bactericida.



**Figura 49. Cromatograma da amostra do Rio Mandacaru. a) Monitorado em 282 nm, b) monitorado em 309 nm.** Condições de extração: condicionamento da fase sólida 7,0 mL etanol, seguido de 6,0 mL de água, passagem de 50,0 mL de amostra. Eluição dos analitos com 3,0 mL de solução etanol:metanol(90:10). Condições cromatográficas: Fase móvel constituída de (75:25, v/v) etanol:0,01 % ácido fosfórico, vazão de 1,0 mLmin<sup>-1</sup>. Tempo de retenção TCS 9,80 min.

**Tabela 8. Concentração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) de TCS e EHMC encontrados nas amostras de água.**

Amostra	Método Proposto		Método Convencional	
	TCS ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	EHMC( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	TCS ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	EHMC ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
Mandacaru	$3,7 \pm 0,59$	$17,0 \pm 1,8$	$1,9 \pm 0,43$	$12,0 \pm 8,0$
Maringá	$23,0 \pm 1,2$	$27,0 \pm 1,2$	$6,0 \pm 2,1$	$70,0 \pm 3,7$
Cleópatra	$3,4 \pm 0,25$	$20,0 \pm 2,3$	$1,7 \pm 0,53$	$26,0 \pm 9,3$
Morangueiro	$\leq \text{LQ}$	$40,0 \pm 9,2$	$\leq \text{LQ}$	$25,0 \pm 8,3$
Torneira	$\leq \text{LQ}$	$1,7 \pm 0,1$	$\leq \text{LQ}$	$1,8 \pm 0,3$

Estudo realizado nos EUA mostrou que, o sistema de tratamento nem sempre consegue degradar a molécula de TCS, sendo o composto sequestrado em sua maioria pelo sedimento, pois análises dos lodos de uma estação de tratamento indicaram níveis de TCS na faixa de 20000 a 50000  $\mu\text{g kg}^{-1}$  [11]. Esta fato pode também estar ocorrendo na estação estudada, no entanto, deve ser considerado o fato da eficiência de tratamento da água empregando o método convencional ser menor que a observada no estudo americano que demonstrou que a concentração de TCS na água tratada era de  $0,07 \mu\text{g L}^{-1}$  [11].

Quando foram comparados os resultados para períodos diferentes de coleta, observou-se variações nas concentrações encontradas que podem ser explicadas pelas diferentes condições climáticas dos períodos de coleta [84]. Estudos nas estações de tratamento de água nos EUA indicaram que os resultados das análises podem variar no mesmo dia para horários diferentes de coleta com valores de TCS fluando entre  $0,80$ - $10,8 \mu\text{g L}^{-1}$  [11].

Era esperado que para os meses com pouca chuva, devido a diminuição do volume de água, haveria uma maior concentração dos contaminantes, porém existem outros fatores que podem influenciar o meio tais como: degradação pelo sol que é facilitada pela dissociação do TCS [10, 85], a fototransformação que pode ser afetada pelo fluxo, a taxa de turbulência, o perfil em corte transversal, o horário da coleta e etc que devem ser considerados [10]. Variáveis como a presença de substâncias húmicas podem diminuir a retenção dos compostos no cartucho de extração e influenciar nos resultados

finais. Para o Córrego Mandacaru e o Ribeirão Morangueiro as amostras coletadas no mês de maio apresentaram maiores valores de concentração para TCS, enquanto que para as demais amostras, o período de seca apresentou maiores concentrações de TCS.

Para o EHMC as amostras coletadas no mês de setembro apresentaram resultados superiores aos valores encontrados para as amostras coletadas em maio, porém para ambos os analitos estas diferenças não foram significativas (Tab. 9).

**Tabela 9. Concentrações de TCS e EHMC encontradas em amostras de água.**

Amostra	Setembro		Maio	
	TCS ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	EHMC ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	TCS ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	EHMC ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
Mandacaru	3,70 $\pm$ 0,59	17,0 $\pm$ 1,8	13,0 $\pm$ 3,7	13,0 $\pm$ 1,6
Maringá	23,0 $\pm$ 1,2	27,0 $\pm$ 1,2	8,0 $\pm$ 0,72	86,0 $\pm$ 3,7
Cleópatra	3,40 $\pm$ 0,25	20,0 $\pm$ 2,3	nd	nd
Morangueiro	$\leq$ LQ	40,0 $\pm$ 9,2	6,0 $\pm$ 0,75	1,2 $\pm$ 8,3

### **7.1. Validação da Metodologia**

Para a validação da metodologia desenvolvida foram analisados os parâmetros de exatidão, precisão intermediária, linearidade, limites de detecção e quantificação, sensibilidade e robustez.

#### **Exatidão**

A exatidão do método foi obtida através de ensaios de recuperação em matrizes isentas do analito; sendo que o método demonstrou boas percentagens de recuperação para as faixas de concentrações avaliadas (Tab. 10).

**Tabela 10. Amostras de água adicionadas de 3 concentrações diferentes dos analitos(0,0125, 0,025 e 0,050 mg L<sup>-1</sup>).**

Concentração (mg L <sup>-1</sup> )	TCS (% rec.)	EHMC (% rec.)
0,012	85,2 ± 1,98	85,14 ± 4,26
0,025	77,71 ± 1,93	81,79 ± 0,93
0,050	78,05 ± 3,46	84,80 ± 1,81

### ***Linearidade e limite de detecção e quantificação***

Foram construídas as curvas analíticas a partir das soluções de TCS e EHMC sendo bons valores para os coeficientes de correlação (r) e limites de detecção (Tab. 4). Todos os valores de coeficiente de correlação foram superiores a 0,99; confirmando a linearidade das curvas analíticas, estando de acordo com as normas da ANVISA [69]. Os limites de detecção e quantificação são bons (0,021 e 0,091 para TCS e 0,011 e 0,0066 para HEMC respectivamente) e qualificam os métodos desenvolvidos para serem utilizados na análise de TCS em amostras reais.

### ***Seletividade***

O método de determinação desenvolvido e que utilizou o detector CLAE-DAD é seletivo visto que após a separação não ocorreu sobreposição de picos ou a co-eluição de interferentes com os compostos de interesse.

Análises das amostras de água de rios e amostras de produtos comerciais após a adição de padrão indicaram que o método é seletivo para a determinação de TCS e EHMC, visto que não houve sobreposição dos interferentes em nenhum dos sinais analíticos dos compostos monitorados.

Outra maneira de comprovar a seletividade do método é através de comparação do espectro na região do UV dos padrões com aqueles obtidos no para as amostras no início, no meio e no final de cada pico cromatográfico do TCS e EHMC que indicaram que não havia co-eluição de interferentes.

## ***Precisão***

A precisão do método desenvolvido foi avaliada através do estudo da precisão intermediária em três níveis de concentração (baixa, média e alta) em triplicata sendo realizado a análise para as amostras dos rios Córrego Mandacaru, Ribeirão Maringá, Ribeirão Morangueiro e o Córrego Cleópatra resultando num total de nove determinações para cada amostra, conforme sugerido pela ANVISA [69].

A precisão foi avaliada em termos de repetitividade e precisão intermediária, em três níveis de fortificação e em triplicatas. A precisão intermediária foi avaliada realizando-se ensaios em 5 dias consecutivos para verificar se o método desenvolvido apresentava o mesmo comportamento quando mudavam algumas variáveis como temperatura, umidade, fase móvel, entre outras (Tab. 6). Os valores de desvio padrão relativo foram calculados a partir da concentração média determinada e do desvio padrão das medidas [69].

Para testes de precisão intermediária não são admitidos valores de DPR superiores a 15%, exceto para concentrações próximas aos do limite de quantificação, para as quais se admite valores menores ou iguais a 20% [69]. Tanto para a repetitividade quanto para a precisão intermediária, determinada em 5 dias consecutivos, foram obtidos coeficientes de variação inferiores a 15% (Tab. 11), comprovando que o método é repetitivo não só quando os ensaios são realizados no mesmo dia, mas que permanece constante mesmo após a mudança de algumas variáveis. Porém observa-se na Tabela 6 que para as amostras contendo as menores concentrações do composto TCS ( $0,0125 \text{ mg L}^{-1}$ ) os valores do desvio padrão relativo foram mais elevados que para as concentrações maiores ( $0,025$  e  $0,05 \text{ mgL}^{-1}$ ), sendo que para uma das amostras o valor de DPR ultrapassou 20%, estes resultados podem ser justificados pelo fato de estas amostras apresentam um valor de concentração muito próximos aos valores de concentração dos limites de quantificação do TCS que é  $0,091 \text{ mgL}^{-1}$ , sendo esta uma das justificativas para os altos valores do DPR, outro fator muito importante que interfere nas análises, foi o teor de matéria orgânica encontrada para estas amostras de água,  $24,50 \text{ mg L}^{-1} \text{ O}_2$  para Córrego Cleópatra e  $24,00 \text{ mg L}^{-1} \text{ O}_2$  para o Ribeirão Maringá, que claramente influência nas percentagens de recuperação destas amostras e também nos valores de desvio entre as análises [57].

**Tabela 11. Ensaio de repetibilidade para três concentrações diferentes (0,012, 0,025 e 0,050 mg L<sup>-1</sup>) durante 5 dias consecutivos.**

	TCS	EHMC
	% rec. media ± DRP	% rec. média ± DPR
Mandacará		
0,012 mg L <sup>-1</sup>	57,67 ± 13,10	65,14 ± 4,02
0,025 mg L <sup>-1</sup>	87,69 ± 14,47	71,42 ± 1,45
0,050 mg L <sup>-1</sup>	87,95 ± 6,78	77,30 ± 1,03
Maringá		
0,012 mg L <sup>-1</sup>	71,91 ± 17,82	75,32 ± 7,12
0,025 mg L <sup>-1</sup>	83,28 ± 10,41	68,06 ± 2,14
0,050 mg L <sup>-1</sup>	83,36 ± 7,33	63,06 ± 1,08
Cleópatra		
0,012 mg L <sup>-1</sup>	87,78 ± 11,47	54,73 ± 5,77
0,025 mg L <sup>-1</sup>	87,13 ± 3,46	43,50 ± 3,35
0,050 mg L <sup>-1</sup>	73,30 ± 6,80	33,08 ± 2,76
Morangueiro		
0,012 mg L <sup>-1</sup>	111,04 ± 22,34	75,01 ± 2,50
0,025 mg L <sup>-1</sup>	76,58 ± 8,01	60,28 ± 0,75
0,050 mg L <sup>-1</sup>	85,49 ± 10,51	77,77 ± 0,98

### ***Robustez***

O método desenvolvido utilizando-se CLAE-DAD pode ser considerado robusto por não ter sido afetado quando pequenas mudanças, como variações no pH da fase móvel em ±0,50.

## **8. Conclusões**

Este trabalho priorizou as novas tendências analíticas de métodos limpos, mostrando que através da extração em fase sólida foi possível o desenvolvimento de uma metodologia de preparo de amostra eficaz, rápida e reprodutível priorizando minimizar a utilização de solventes orgânicos tóxicos.

Foi utilizado como solvente para a extração em fase sólida 3,0 mL solução composta de 10% de metanol e 90% de etanol.

Com os resultados obtidos pôde-se observar a possibilidade de desenvolvimento de método analítico de determinação por cromatográfica a líquido para TCS e EHMC reduzindo o uso de solventes orgânicos tóxicos. O método cromatográfico desenvolvido é rápido (15 min); de baixo custo e apresentou limites de detecção e de quantificação para o TCS de 0,021 e 0,091 mgL<sup>-1</sup>, EHMC de 0,0011 e 0,0066 mgL<sup>-1</sup> respectivamente; que podem ser considerados adequados para a análise de amostras reais.

O método CLAE utilizou fase móvel constituída de 75% de etanol e 25% de solução ácido fosfórico 0,01%, fase estacionária C18 e detector de arranjo de diodos, sendo TCS e EHMC monitorados em 282 e 310 nm, respectivamente. O método se mostrou robusto, sensível e de baixo custo e mais preciso que o método convencional utilizado.

Pôde-se verificar por meio dos resultados que o método convencional de tratamento de água, empregado na estação de tratamento estudada, foi capaz de remover cerca de 95% do triclosan presente na amostra.

## 9. Referências

- 1 SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R.. **Fundamentos de Química Analítica**. São Paulo: Cengage Learning, 2012.
- 2 PRADO, A. G. S. Química verde, os desafios da química do novo milênio. **Química Nova**, v. 26, p. 783, 2003.



3 BOAS, M.; FELDT-RASMUSSEN, U.; MAIN, K. M. Thyroid effects of endocrine disrupting chemicals. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 355, p. 240-248, 2012.

4 SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis understanding the differences and similarities between validation requirements of the US food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Confer. **Journal of Chromatography A**, v. 987, p. 57-66, 2003.

5 AGUERA, A.; FERNÁNDEZ-ALBA, A.R.; PIEDRA, L.; MÉZCUA, M.; GÓMEZ, M. J. Evaluation of triclosan and biphenylol in marine sediments and urban wastewaters by pressurized liquid extraction and solid phase extraction followed by gas chromatography mass spectrometry and liquid chromatography mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 480, p. 193-205, 2003.

6 ANVISA. RESOLUÇÃO - RDC Nº 211, DE 14 DE JULHO DE 2005. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, 2005. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/>>. Acesso em: 12 março 2012.

7 ANVISA. NOTA TÉCNICA INCI. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/d0c784004d72e57887e9e7c116238c3b/PDF+INCI+Nota+t%C3%A9cnica.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 20 março 2012.

8 MANDIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P.. **Microbiologia de Brock**. 12. ed. New Jersey: Prentice-Hall International, 1994.

9 ALBINI, C. Bactérias, essas velhas, perigosas e benéficas conhecidas. **Pharmacia Brasileira**, v. 83, p. 17-21, 2011.

10 TIXIER, C.; SINGER, H.P.; CANONICA, S.; MULLER, S.. Phototransformation of Triclosan in Surface Waters: A Relevant Elimination

Process for This Widely Used Biocide sLaboratory Studies, Field Measurements, and Modeling. **Environmental Science & Technology**, v. 36, p. 3482-3489, 2002.

11 HEIDLER, J.; HALDEN, R. U. Mass balance assessment of triclosan removal during conventional sewage treatment. **Chemosphere**, v. 66, p. 362–369, 2007.

12 AQUINO, D. R.; CORTELLI, J. R.; FARIA, I. S.; SIQUEIRA, A. F.; CORTELLI, S. Ação antimicrobiana do triclosan sobre microbiota cariogênica. **Revista Biociência**, v. 10, p. 79-86, 2004.

13 GLASER, A. The Ubiquitous Triclosan. A common antibacterial agent exposed. **Beyond Pesticides/National Coalition Against the Misuse of Pesticides**, v. 24, p. 12-17, 2004.

14 CANOSA, P.; RODRÍGUEZ, I.; RUBÍ, E.; CELA, R.. Optimization of solid-phase microextraction conditions for the determination of triclosan and possible related compounds in water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1072, p. 107–115, 2005.

15 CROFTON, K. M.; PAUL, K B.; DEVITO, M. J.; HEDGE, J. M.. Short-term in vivo exposure to the water contaminant triclosan: Evidence for disruption of thyroxine. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 24, p. 194-197, 2007.

16 MESCUA, M.; GÓMEZ, M. J.; FERRER, I.; AGUERA, A.; HERNANDO, M. D.; FERNÁNDEZ-ALBA, A.R.. Evidence of 2,7/2,8-dibenzodichloro- p-dioxin as a photodegradation product of triclosan in water and wastewater samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 524, p. 241–247, 2004.

17 HUA, W.; BENNETT, E. R.; LETCHER, R. J. Triclosan in waste and surface waters from the upper Detroit River by liquid chromatography-electrospray-tandem quadrupole mass spectrometry. **Environment International**, v. 31, p. 621 – 630, 2005.

18 PICCOLI, A.; FIORI, J.; ANDRISANO, V.; ORIOLI, M.. Determination of triclosan in personal health care products by liquid chromatography (HPLC). **II Farmaco**, v. 57, p. 369 – 372, 2002.

19 U. S. EPA. Pesticides: Reregistration - Triclosan Facts. **U. S. Environmental Protection Agency**, 2012. Disponível em: <[http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/factsheets/triclosan\\_fs.htm](http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/factsheets/triclosan_fs.htm)>. Acesso em: 12 Agosto 2012.

20 ANVISA. Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003. **Agencia Nacional de Vigilância Sanitária**, 2012. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899\\_03re.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm)>. Acesso em: 19 abril 2012.

21 PERENCEVICH, E. N.; WONG, M. T.; HARRIS, A. D. National and regional assessment of the antibacterial soap market: A step toward determining the impact of prevalent antibacterial soaps. **American Journal of Infection Control**, v. 29, p. 281–283, 2001.

22 LATCH, D. E.; PARCKER, J. L.; ARNOLD, W. A.; MECNEILL, K.. Photochemical conversion of triclosan to 2,8-dichlorodibenzo-p-dioxin in aqueous solution. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 158, p. 63–66, 2003.

23 MONTES, R.; TODRÍGUEZ, I.; RUBÍ, E.; CELA, R.. Dispersive liquid–liquid microextraction applied to the simultaneous derivatization and concentration of triclosan and methyltriclosan in water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 205-210, 2009.

24 KAWAGUCHI, M.; ITO, R.; HONDA, H.; ENDO, N.; OKANOUCI, N.; SAITO, K.; SETO, Y.; NAKAZAWA, H.. Stir bar sorptive extraction and thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry for trace analysis of triclosan in water sample. **Journal of Chromatography A**, v. 1206, p. 196–199, 2008.

25 WU, J.; LAM, N. P.; MARTENS, D.; KETTRUP, A.; CAI, Z.. Triclosan determination in water related to wastewater treatment. **Talanta**, v. 72, p. 1650–1654, 2007.

26 OKUMURA, T.; NISHIKAWA, Y. Gas chromatography-mass spectrometry determination of triclosans in water, sediment and fish samples via methylation with diazomethane. **Analytica Chimica Acta**, v. 325, p. 175-184, 1996.

27 LAMEIRA, V. **Tese Doutorado –Estudos dos efeitos letais e subletais (reprodução e teratogênese) do fármaco Triclosan para *Daphnia similis*, *Ceriodaphnia dubia*, *Ceriodaphnia silvestrii* (Cladocera, Crustacea)**. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. São Paulo, 2008.

28 CHEREDNICHENKO, G.; ZHANG, R.; BANNISTER, R. A.; TIMOFEYVE, V.. Triclosan impairs excitation–contraction coupling and  $Ca^{2+}$  dynamics in striated muscle. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 1, p. 1-6, 2012.

29 NASSEFA, M.; MATSUMOTOA, S.; SEKIB, M.; KHALILA, F.; J., KANGO. I. K.; SHIMASAKIA, Y.; OSHIMAA, Y.; HONJOA, T.. Acute effects of triclosan, diclofenac and carbamazepine on feeding performance of Japanese medaka fish (*Oryzias latipes*). **Chemosphere**, v. 80, p. 1095–1100, 2012.

30 LIANG, X.; NIE, X.; YING, G.; AN, T.; LI, K.. Assessment of toxic effects of triclosan on the swordtail fish (*Xiphophorus helleri*) by a multi-biomarker approach. **Chemosphere**, v. 90, p. 1281–1288, 2013.

31 ANVISA. Resolução RDC nº 161 de 11 de setembro de 2001. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, 2001. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/161\\_01rdc.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/161_01rdc.htm)>. Acesso em: 28 Setembro 2011.

32 SILVA, A. R. M.; NOGUEIRA, J. M. F. New approach on trace analysis of triclosan in personal care products, biological and environmental matrices. **Talanta**, v. 74, p. 1498–1504, 2008.

33 GUIMARÃES, J. R. P. F.. Disruptores endócrinos no meio ambiente: um problema de saúde pública e ocupacional. **Associação de combate aos Poluentes**. Disponível em: <[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/trabalhador/pdf/texto\\_disruptores.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/trabalhador/pdf/texto_disruptores.pdf)>. Acesso em: 10 Julho 2012.

34 YE, X.; BISHOP, A.M.; NEEDHAM, L. L.; CALAFAT, A. M.. Automated on-line column-switching HPLC-MS/MS method with peak focusing for measuring parabens, triclosan, and other environmental phenols in human milk. **Analytica Chimica Acta**, v. 622, p. 150–156, 2008.

35 MEADE, M. J.; WADDELL, R. L.; CALLAHAN, T. M. Soil bacteria *Pseudomonas putida* and *Alcaligenes xylosoxidans* subsp. *denitrificans* inactivate triclosan in liquid and solid substrates. **FEMS Microbiology Letters**, v. 204, p. 45-48, 2001.

36 LEE, H.; PEAT, 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, p. 122–129, 2005.

37 SIMEONI, S.; TURSILLI, R.; BIANCHI, A.; SCALIA, S.. Assay of common sunscreen agents in suncare products by high-performance liquid chromatography on a cyanopropyl-bonded silica column. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 38, p. 250-255, 2005.

38 FLOR, J.; DAVOLOS, M. R.; CORREA, M. A. Protetores Solares. **Quimica Nova**, v. 30, p. 153-158, 2007.

39 POIGER, T.; BUSER, H.; BALMER, M. E.; BERGQVIST, P.; MULLER, M. D.. Occurrence of UV filter compounds from sunscreens in surface

waters: regional mass balance in two Swiss lakes. **Chemosphere**, v. 55, p. 951-963, 2004.

40 LI, W.; MA, Y.; GUO, C.; HU, W.; LIU, K.; WANG, Y.; ZHU, T.. Occurrence and behavior of four of the most used sunscreen UV filters in a wastewater reclamation plant. **Water Research**, v. 41, p. 3506-3512, 2007.

41 STRAUB, J. O. Concentrations of the UV filter ethylhexyl methoxycinnamate in the aquatic compartment: a comparison of modelled concentrations for Swiss surface waters with empirical monitoring data. **Toxicology Letters**, v. 131, p. 29-37, 2002.

42 AXELSTAD, M.; BOBERG, J.; HOUGAARD, K. S.; CHRISTIANSEN, S.; JACOBSEN, P. R.; MANDRUP, K. R.; NELLEMAN, C.. Effects of pre- and postnatal exposure to the UV- filter Octyl Methoxycinnamate (OMC) on the reproductive, auditory and neurological development of rat offspring. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 250, p. 278-290, 2011.

43 SILVA, A. P.; TRINDADE, M. A. G.; FERREIRA, V. S. Polarographic determination of sunscreen agents in cosmetic products in micellar media. **Talanta**, v. 68, p. 679-685, 2006.

44 PATTANAARGSON, S.; LIMPHONG, P.. Stability of octyl methoxycinnamate and identification of its photodegradation product. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 23, p. 153-160, 2001.

45 HUONG, S. P.; ANDRIEU, V.; REYNIER, J. P.; ROCHER, E.; FOURNERON, J. D.. The photoisomerization of the sunscreen ethylhexyl p-methoxy cinnamate and its influence on the sun protection factor. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 186, p. 65-70, 2007.

46 KLAMMER, H.; SCHLECHT, C.; WUTTKE, W.; SCHMUTZLER, C.; GOTTHARDT, I.; KOHRLE, J.; JARRY, H.. Effects of a 5-day treatment with the UV-filter octyl-methoxycinnamate (OMC) on the function of the

hypothalamo-pituitary–thyroid function in rats. **Toxicology**, v. 238, p. 192–199, 2007.

47 PATTANAARGSON, S.; MUNHAPOL, T.; HIRUNSUPACHOT, P.; LUANGTHONGARAM, P.. Photoisomerization of octyl methoxycinnamate. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 161, p. 269-274, 2004.

48 KAISER, D.; SIERATOWICZ, A.; ZIELKE, H.; OETKEN, M.; HOLLERT, H.; OEHLMANN, J.. Ecotoxicological effect characterisation of widely used organic UV filters. **Environmental Pollution**, v. 163, p. 84-90, 2012.

49 CHISVERT, A.; PACUAL-MARTI, M. C.; SALVADOR, A. Determination of the UV filters worldwide authorised in sunscreens by high-performance liquid chromatography Use of cyclodextrins as mobile phase modifier. **Journal of Chromatography A**, v. 921, p. 207-215, 2001.

50 FENT, K.; ZENKER, A.; RAPP, M. Widespread occurrence of estrogenic UV-filters in aquatic ecosystems in Switzerland. **Environmental Pollution**, v. 158, p. 1817-1824, 2010.

51 RODIL, R.; QUINTANA, J. B.; CONCHA-GRAÑA, E.; LÓPEZ-MAHÍA, P.; MUNIATEGUI-LORENZO, S.; PRADA-RODRÍGUEZ, D.. Emerging pollutants in sewage, surface and drinking water in Galicia (NW Spain). **Chemosphere**, v. 86, p. 1040-1049, 2012.

52 SCHLUMPF, M.; KYPKE, K.; WITTASSEK, M.; ANGERER, J.; MASCHER, H.; MASCHER, D.; VOKT, C.; BIRCHLER, M.; LICHTENSTEIGER, W.. Exposure patterns of UV filters, fragrances, parabens, phthalates, organochlor pesticides, PBDEs, and PCBs in human milk: Correlation of UV filters with use of cosmetics. **Chemosphere**, v. 81, p. 1171-1183, 2010.

53 JIANG, R.; HAYDEN, C.G.J.; PRANKERD, R.J.; ROBERTS, M.S.; BENSON, H.A.E.. High-performance liquid chromatographic assay for common

sunscreening agents in cosmetic products, bovine serum albumin solution and human plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 682, p. 137-145, 1996.

54 VOSOUGH, M.; MOJDEHI, N. R. Fast liquid chromatography-diode array detection assisted by chemometrics for quantification of seven ultraviolet filters in effluent wastewater. **Talanta**, v. 85, p. 2175-2181, 2011.

55 ZWIR-FERENC, A.; BIZIUK, M. Solid Phase Extraction Technique – Trends, Opportunities and Applications. **Polish Journal of Environment Study**, v. 15, p. 677-690, 2006.

56 POOLE, C. F.; GUNATILLEKA, A. D.; SETHURAMAN, R. Contributions of theory to method development in solid-phase extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 885, p. 17-39, 2000.

57 FONTANALS, N.; CORMACK, P. A. G.; SHERRINGTON, D. C.; MARCÉ, R. M.; BORRULL, F.. Weak anion-exchange hypercrosslinked sorbent in on-line solid-phase extraction–liquid chromatography coupling to achieve automated determination with an effective clean-up. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 2855-2861, 2010.

58 QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, v. 24, p. 68-76, 2001.

59 OLIVEIRA, E. C. **Dissertação Mestrado- Aplicação da extração em fase sólida na pré-concentração de compostos fenólicos clorados em efluentes de branqueamento de celulose**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. p. 95. 1999.

60 BACALUM, E.; TANASE, A.; DAVID, V.. Retention mechanisms applied in solid phase extraction for some polar compounds. **Analele Universităţii din Bucureşti – Chimie**, v. 19, p. 61-68, 2010.



61 COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a Métodos Cromatográficos**. 5. ed. Campinas - SP: Editora da Unicamp, 1993.

62 SCOTT, R. P. W. **Techniques and Practise of Chromatography**. Marcel Dekker, Nova Yorque - USA: v. 70, 1995.

63 CIOLA, R. **Fundamentos da Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho HPLC**. 1. ed. São Paulo: Edgard Blücher, 1998.

64 DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia: um breve ensaio. **Química Nova**, v. 7, p. 21-25, 1998.

65 RAIMUNDO, I. M.; PASQUINI, C. Espectrofotometria multicanal e arranjos de fotodiodos. **Química Nova**, v. 20, p. 83-88, 1997.

66 RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C.. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

67 PEREIRA, A.; SCHESHOWITSCH, K.; CRUZ, A.; SILVA, M. A. S.; STULZER, H. K.. Validação de metodologia analítica para quantificação de piroxicam em cápsulas de gelatina por espectrometria ultravioleta (UV). **Visão Acadêmica, Curitiba**, v. 8, p. 29-37, 2007.

68 GUIMARÃES, E. C. B. T.; PEREIRA, A. C.; ÁVILA, A. K. Orientação sobre validação de métodos analíticos. **INMETRO**. 2010.

69 ANVISA. Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003 - Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, 2003. Disponível em: <[http://redsang.ial.sp.gov.br/site/docs\\_leis/vm/vm1.pdf](http://redsang.ial.sp.gov.br/site/docs_leis/vm/vm1.pdf)>. Acesso em: 21 março 2012.

70 SILVA, F. M.; LACERDA, P. S. B.; JONES, J. J. Desenvolvimento sustentável e Química Verde. **Química Nova**, v. 28, p. 103-104, 2005.

71 MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria MS Nº 2914 DE 12/12/2011 [Federal]. **Governo Federal**, 2011. Disponível em: <[http://www.comitepcj.sp.gov.br/download/Portaria\\_MS\\_2914-11.pdf](http://www.comitepcj.sp.gov.br/download/Portaria_MS_2914-11.pdf)>. Acesso em: 15 Janeiro 2013.

72 AMPLA- CONSULTORIA E PLANEJAMENTO. Levantamento e diagnóstico da situação atual do sistema de abastecimento de água – SAA. **Ampla- Consultoria e planejamento**.2010.

73 SANEPAR. Companhia de Saneamento do Paraná. **Sanepar**, 2012. Disponível em: <<http://site.sanepar.com.br/a-sanepar>>. Acesso em: 14 Outubro 2012.

74 STACKELBER, P. E.; FURLONG, E. T.; MEYER, M. T.; ZAUGG, S. D.; HENDERSON, A. K.; REISSMAN, D. B.. Persistence of pharmaceutical compounds and other organic wastewater contaminants in a conventional drinking-water-treatment plant. **Science of the Total Environment**, v. 329, p. 99-113, 2004.

75 CANOSA, P.; MORALES, S.; RODRÍGUEZ, I.; RUBÍ, E.; CELA, R.; GOMÉZ, M.. Aquatic degradation of triclosan and formation of toxic chlorophenols in presence of low concentrations of free chlorine. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 383, p. 1119-1126, 2005.

76 GHISELLI, G. **Tese Doutorado- Avaliação da qualidade das águas destinadas ao abastecimento público na região de Campinas: Ocorrência e destinação dos interferentes endócrinos (IE) e produtos farmacêuticos e de higiene pessoal [PFHP]**. Instituto de Química- Universidade Estadual de Campinas. Campinas. 2006.

77 FERNANDES, N. M. G.; GINORIS, Y. P.; RIOS, R. H. T.; BRANDÃO, C. C. S.. Influência do pH de coagulação e da dose de sulfato de alumínio na remoção de oocistos de *Cryptosporidium* por filtração direta descendente. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 15, p. 375-384, 2010.

78 DE JULIO, M.; FIORAVANTE, D. A.; SELHORST, O. F.; DE JULIO, T. S.; OROSKI, F. I. Influência dos parâmetros de mistura rápida, floculação e decantação no tratamento da água afluyente à ETA de Ponta Grossa/PR. **Engenharia Ambiental - Espírito Santo do Pinhal**, v. 6, p. 38-54, 2009.

79 ANJOS, I. B.; MARTINS, M. L. O. F.; NERY, J. T.. Estudo da precipitação pluviométrica e balanço hídrico em Maringá. **Boletim de Geografia**, v. 19, p. 115-128.

80 MANUAL Técnico para Coleta de Amostras de Água. **Ministério Público de Santa Catarina**, Florianópolis, 2009. Disponível em: <[http://portal.mp.sc.gov.br/portal/conteudo/cao/cme/atividades/recursos\\_hidricos/manual\\_coleta\\_%C3%A1gua.pdf](http://portal.mp.sc.gov.br/portal/conteudo/cao/cme/atividades/recursos_hidricos/manual_coleta_%C3%A1gua.pdf)>. Acesso em: 16 março 2012.

81 SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 4, p. 71-78 , 2002.

82 CETESB. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. **Manual de Produtos Químicos e Segurança de laboratório**. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/gerenciamento-de-riscos/emergencias-quimicas/258-manual-de-produtos-quimicos>>. Acesso em: 10 janeiro 2011.

83 ZUCCARI, M. L.; GRANER, C. A. F.; LEOPOLDO, P. R. Determinação da demanda química de oxigênio (DQO) em águas e efluentes por método colorimétrico alternativo. **Engenharia na Agricultura**, v. 20, p. 69-82, 2005.

84 SEMA. RESOLUÇÃO Nº 021/09. **Secretaria de Meio Ambiente**, 2009. Disponível em: <[http://www.iap.pr.gov.br/arquivos/File/Legislacao\\_ambiental/Legislacao\\_estadual/RESOLUCOES/RESOLUCAO\\_SEMA\\_21\\_2009\\_LICENCIAMENTO\\_PADROES\\_AMBIENTAIS\\_SANEAMENTO.pdf](http://www.iap.pr.gov.br/arquivos/File/Legislacao_ambiental/Legislacao_estadual/RESOLUCOES/RESOLUCAO_SEMA_21_2009_LICENCIAMENTO_PADROES_AMBIENTAIS_SANEAMENTO.pdf)>. Acesso em: 20 janeiro 2013.