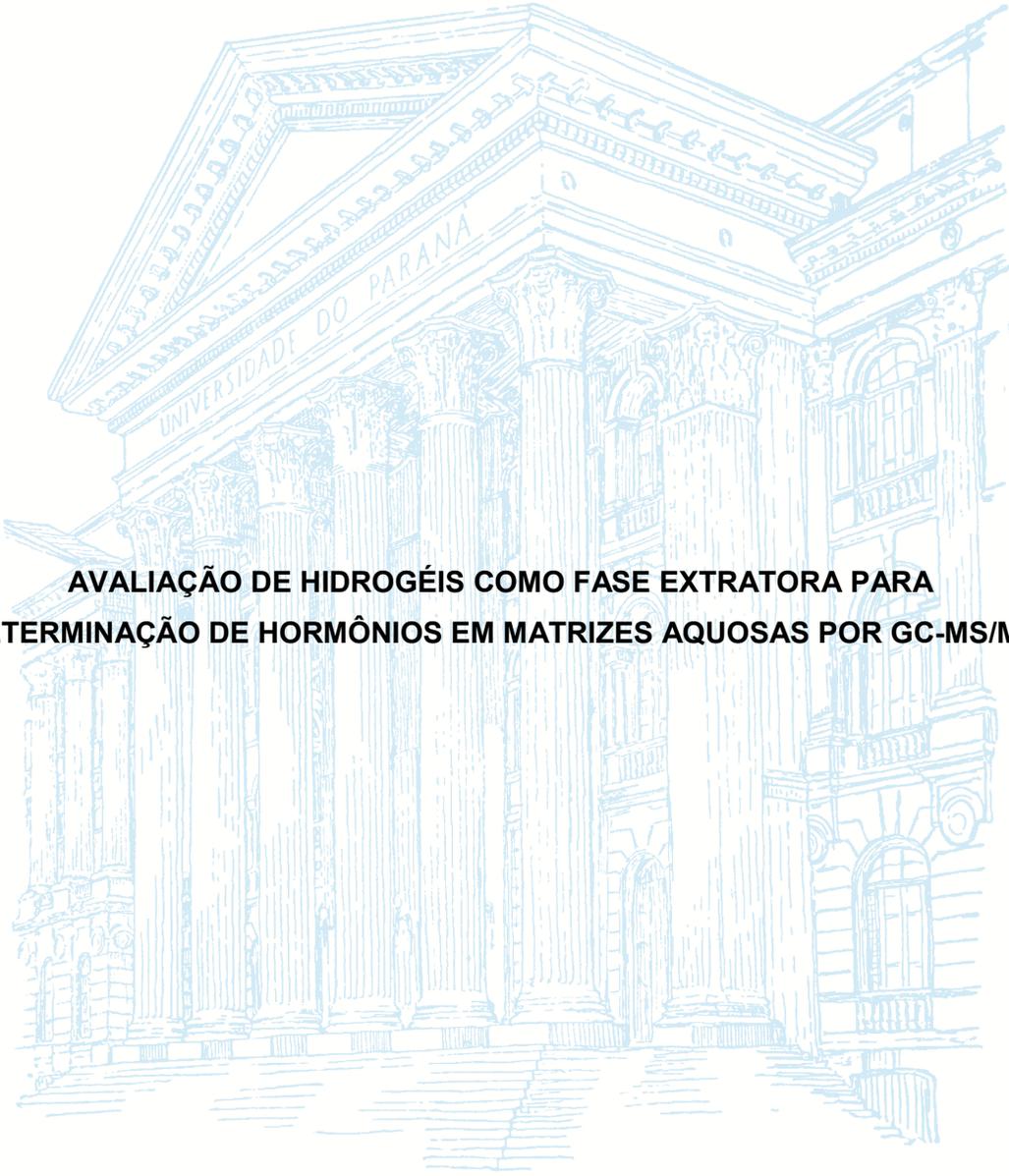


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

NAIARA MARIANA FIORI MONTEIRO SAMPAIO



**AValiação de Hidrogéis como Fase Extratora para
Determinação de Hormônios em Matrizes Aquosas por GC-MS/MS**

CURITIBA

2017

NAIARA MARIANA FIORI MONTEIRO SAMPAIO

**AVALIAÇÃO DE HIDROGÉIS COMO FASE EXTRATORA PARA
DETERMINAÇÃO DE HORMÔNIOS EM MATRIZES AQUOSAS POR GC-MS/MS**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Química Analítica, no Curso de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Bruno José Gonçalves da Silva

CURITIBA

2017

SA192a Sampaio, Naiara Mariana Fiori Monteiro
Avaliação de hidrogéis como fase extratora para determinação de
hormônios em matrizes aquosas por GC-MS/MS / Naiara Mariana Fiori
Monteiro Sampaio. – Curitiba, 2017.
113 f. : il. color. ; 30 cm.

Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas,
Programa de Pós-Graduação em Química, 2017.

Orientador: Bruno José Gonçalves da Silva.

1. Química analítica. 2. Hidrogel. 3. Hormônios. 4. Contaminantes
emergentes. I. Universidade Federal do Paraná. II. Silva, Bruno José
Gonçalves da. III. Título.

CDD: 543

TERMO DE APROVAÇÃO

**AVALIAÇÃO DE HIDROGÉIS COMO FASE EXTRATORA PARA
DETERMINAÇÃO DE HORMÔNIOS EM MATRIZES AQUOSAS POR
GC-MS/MS**

por

NAIARA MARIANA FIORI MONTEIRO SAMPAIO

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química,
pela Comissão Examinadora composta por:

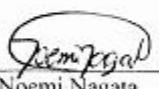
Orientador:



Prof. Dr. Bruno José Gonçalves da Silva
Dep. de Química - UFPR



Prof. Dr. Andréa Rodrigues Chaves
Dep. de Química - UFG



Prof. Dr. Noemi Nagata
Dep. de Química - UFPR

Curitiba, 24 de março de 2017.

Aos meus pais Maria Zilda e José Altair
por todo o amor, carinho e apoio dedicados nos
momentos de minha vida.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Maria Zilda e José Altair por todo o apoio e compreensão recebidos durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao prof. Dr. Bruno José Gonçalves da Silva agradeço à oportunidade de aprendizagem, que foi movida por sua excelente orientação, regada de dedicação, apoio, incentivo e confiança.

À profa. Dra. Izabel Riegel-Vidotti pelas incontáveis contribuições com este trabalho e importantes considerações feitas no exame de qualificação.

Ao prof. Dr. Marco Tadeu Grassi por gentilmente disponibilizar a sua estrutura laboratorial contribuindo com a realização deste trabalho.

À profa. Dra. Noemi Nagata pela dedicação na correção do projeto de mestrado e do relatório anual, bem como às suas valiosas contribuições no exame de qualificação. Agradeço também por aceitar participar da Banca de Defesa e pelas importantes contribuições para este trabalho.

À profa. Dra. Andréa Chaves por aceitar participar da Banca de Defesa e pelas valiosas contribuições.

Aos amigos e colegas dos grupos de pesquisa CroMe, GQA, TECNOTRATER e GAQQ, pela ajuda, companhia, carinho e aos momentos de descontração que facilitaram essa jornada. Em especial a Rayta, Natara, Amanda, Sheisa, Tiago e Bianca.

Ao CNPq pelo apoio financeiro concedido durante o período de realização deste Mestrado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ) da Universidade Federal do Paraná.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta dissertação e para a minha formação acadêmica.

Vem, vamos embora,
Que esperar não é saber,
Quem sabe faz a hora,
Não espera acontecer

Geraldo Vandré

RESUMO

A procura contínua por métodos analíticos sensíveis e seletivos capazes de identificar e quantificar compostos orgânicos em concentrações a nível traço ($\mu\text{g L}^{-1}$ a ng L^{-1}), tem estimulado o desenvolvimento de pesquisas na área de preparo de amostra a fim de se obter métodos que consumam menores quantidades de solventes, sejam seletivos, rápidos, de baixo custo e que tenham alto nível de automação. Nesse sentido, a extração em fase sólida (SPE) tem sido uma técnica amplamente utilizada na pré-concentração de analitos e remoção de interferentes. No entanto, as fases comerciais de SPE, como o C18, têm como desvantagem a falta de seletividade que conduz à co-extração de interferentes, além da dificuldade em extrair compostos polares de matrizes aquosas. Comercialmente, existem disponíveis fases extratoras com caráter misto (ex. Oasis® HLB - Waters® e Strata™-X - Phenomenex®) que permitem a extração de compostos em uma faixa mais ampla de polaridade, todavia esses cartuchos apresentam custo elevado e são descartáveis sendo, na maioria das vezes, utilizados uma única vez.

Então, recentemente, muitos esforços têm sido realizados no sentido de desenvolver novos materiais sorventes mais seletivos, com alta capacidade de sorção, estáveis (maior vida útil) e de baixo custo. Diante disto, o hidrogel, que é um material formado por redes poliméricas hidrofílicas química ou fisicamente reticuladas, tem se mostrado promissor para aplicação como fase extratora. Devido à presença de diversos sítios hidrofílicos em sua estrutura polimérica, como -OH, -COOH, -SO₃H e -NH₂, esse material possibilita a extração de compostos polares de matrizes aquosas, o que tem sido um grande obstáculo para as técnicas de extração em geral.

Então, neste trabalho foi desenvolvida e proposta uma nova técnica de extração, denominada aqui por extração em fase gel (**GPE – “Gel Phase Extraction”**). Esta técnica emprega um hidrogel, material inovador para fins de extração, como fase sorvente para a extração de seis hormônios esteroidais (estriol, estrona, 17 β -estradiol, 17 α -etinilestradiol, progesterona e testosterona) de amostras aquosas, seguida pela determinação por GC-MS/MS. Desenvolveu-se um hidrogel de álcool polivinílico (PVA) e pectina reticulado com ácido cítrico, o qual possibilitou a extração dos hormônios estudados. O método utilizando a técnica de GPE apresentou limites de quantificação iguais a 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$, para E1 e E2, e a 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ para TES, EE2, PRO e E3. Os valores de exatidão ficaram entre o intervalo de 80% a 110%, enquanto que a precisão interensaio variou de 0,23% a 22,2% e a intraensaio de 0,55% a 12,3%.

Como principais destaques da técnica e da fase extratora proposta, pode-se citar o baixo custo (inferior a 15 centavos de real - R\$ 0,15) e a possibilidade de reutilização dos discos de extração. Portanto, o uso do hidrogel como fase extratora mostrou-se muito promissor para extração de compostos de média e alta polaridade, sendo possível, neste trabalho, obter uma fase sorvente de caráter anfifílico, reproduzível, livre de efeito de memória e de baixo custo.

Palavras-chave: Hidrogel. GPE. Hormônios. GC-MS/MS. Contaminantes emergentes.

ABSTRACT

The continuous search for sensitive and selective analytical methods capable of identifying and quantifying organic compounds in trace levels ($\mu\text{g L}^{-1}$ a ng L^{-1}) has stimulated the development of research in the sample preparation field in order to obtain methods with less solvent consumption, high selectivity, fast and with high level of automation and low cost. In this regard, the solid phase extraction (SPE) has been widely used for the pre-concentration of analytes and removal of interferents. However, commercial SPE phases, such as C18, have the disadvantage of poor selectivity that leads to co-extraction of interferents, besides the difficulty in extracting polar compounds from aqueous matrices. Commercially there are available extractive phases (eg Oasis® HLB - Waters® and Strata™-X - Phenomenex®) that allow the extraction of compounds over a wider range of polarity, however these cartridges are expensive, and also these devices are disposable and usually used only once.

Much effort has recently been made to develop new materials with high sorption capacity, more selective, stable (longer lifetime) and low cost. In this view, the hydrogel, a material formed by chemically or physically crosslinked hydrophilic polymer networks, has shown a potential for application as an extractive phase. Due to the presence of diverse hydrophilic sites in the polymeric structure such as -OH, -COOH, -SO₃H and -NH₂, this material makes possible the extraction of polar compounds from aqueous matrices, which has been a challenge for the extraction techniques in general.

Therefore, a new technique of extraction, denominated here by gel phase extraction (**GPE - "Gel Phase Extraction"**), was developed and proposed. This technique employs a hydrogel, an innovative material for extraction purposes, as a sorbent phase for the extraction and determination of six steroidal hormones (estriol, estrone, 17 β -estradiol, 17 α -ethinylestradiol, progesterone and testosterone) in aqueous samples by gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC-MS/MS). A hydrogel of polyvinyl alcohol (PVA) and pectin cross-linked with citric acid was developed and it allowed the extraction of the target hormones. The method using the GPE technique showed quantification limits equal to 0.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ for E1 and E2, and 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ for TES, EE2, PRO and E3. Accuracy values ranged from 80% to 110%, while the interassay precision ranged from 0.23% to 22.2% and the intraassay from 0.55% to 12.3%.

As the main highlights of the technique and extraction phase proposed, it can be mentioned the low cost (less than 15 cents of real per disc - R\$ 0.15) and the possibility of reuse of the extraction discs. As a result, the use of the hydrogel as extraction phase was very promising for the extraction of medium to high polarity compounds, being possible to obtain an amphiphilic, reproducible and free of memory effect phase with low cost.

Key-words: Hydrogel. GPE. Hormones. GC-MS/MS. Emerging contaminants.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Representação do funcionamento de um analisador de massas do tipo triplo quadrupolo no modo MRM.	20
FIGURA 2: Esquema de reação de alquilação.	22
FIGURA 3: Esquema de reação de acilação.	23
FIGURA 4: Esquema de reação de sililação.....	24
FIGURA 5: Etapas envolvidas na SPE: condicionamento da fase sorvente, percolação da amostra, remoção dos interferentes e eluição dos analitos.	27
FIGURA 6: Representação esquemática da interação de um hidrogel com moléculas de água.....	30
FIGURA 7: Estrutura possível dos polímeros PVA altamente hidrolisado (a), alginato (b) e pectina (c) empregados na síntese dos hidrogéis estudados.	32
FIGURA 8: Representação do funcionamento de um analisador de massas do tipo triplo quadrupolo no modo <i>Product Ion Scan</i>	41
FIGURA 9: Hidrogel P5PC1 após ser retirado do molde (a) e cortado (b).....	42
FIGURA 10: Dispositivo de extração fechado (a) e aberto (b) e sistema <i>manifold</i> (c).	44
FIGURA 11: Pontos de amostragem na Bacia Hidrográfica do Rio Belém.....	50
FIGURA 12: Áreas médias dos picos cromatográficos dos hormônios de acordo com o agente de sililação empregado.....	55
Figura 13: Gráficos de Pareto para os efeitos obtidos no primeiro planejamento fatorial 2 ³	58
FIGURA 14: Variação das respostas com os níveis dos três fatores do primeiro planejamento fatorial 2 ³ para a estrona.....	59
Figura 15: Gráficos de Pareto para os efeitos obtidos no segundo planejamento fatorial 2 ³	61
FIGURA 16: Variação das respostas com os níveis dos fatores temperatura e volume do segundo planejamento fatorial 2 ³ para a estrona.....	62
Figura 17: Áreas médias dos picos cromatográficos para cada hormônio de acordo com o processo de secagem empregado.	63
FIGURA 18: Potenciais produtos da sililação com TMS do EE2.	64
FIGURA 19: Cromatogramas obtidos para o produto de sililação do EE2.....	65

FIGURA 20: Cromatogramas da determinação dos hormônios nas suas formas não derivatizada (a) e derivatizada com MSTFA:1%TMSI (b).	66
FIGURA 21: Áreas médias dos picos cromatográficos dos hormônios na sua forma derivatizada e não derivatizada.....	67
FIGURA 22: Resposta para cada transição MRM em função da energia de colisão empregada para cada hormônio.	69
FIGURA 23: Cromatogramas da determinação do bisfenol A - d ₁₆ (100 µg L ⁻¹) e dos hormônios (500 µg L ⁻¹) no modo MRM.....	70
FIGURA 24: Fotos do discos de extração seco (a) e intumescido (b).	72
FIGURA 25: Cromatogramas da determinação dos hormônios (1 mg L ⁻¹) extraídos com discos de hidrogel de diferentes composições.	73
FIGURA 26: Áreas médias dos picos cromatográficos (n =2) dos hormônios de acordo com a composição do hidrogel empregado na extração.	74
FIGURA 27: Discos de extração P5PC1, P10PC2, P15PC3 e P20PC4.....	75
FIGURA 28: Áreas médias dos picos cromatográficos (n =2) dos hormônios de acordo com a composição do hidrogel empregado na extração.	76
FIGURA 29: Grau de intumescimento (% m/m) dos hidrogéis a temperatura de 25°C.	77
FIGURA 30: Perda de água (% m/m) dos hidrogéis sob as temperaturas de 4°C e 25°C.	78
FIGURA 31: Espectro de FTIR-ATR para os hidrogéis P5PC1, P10PC2, P15PC3, P20PC4, P15PC2 e PVA.....	79
FIGURA 32: Imagens de microscopia eletrônica de varredura dos discos de extração (a) PVA ampliado 250x, (b) P5PC1 ampliado 650x, (c) P10PC2 ampliado 150x, (d) P15PC3 ampliado 400x, (e) P20PC4 ampliado 400x e (f) P15PC2 ampliado 750x. .	81
FIGURA 33: Áreas dos picos cromatográficos dos hormônios extraídos com o disco de hidrogel P15PC2 e eluídos em quatro etapas com 1 e 2 mL de metanol.....	82
FIGURA 34: Gráficos de Pareto para os efeitos obtidos no planejamento composto central (CCD).	86
FIGURA 35: Variações das respostas com os níveis dos fatores para a estrona (pH x Vol e Vol x Vaz) e para o 17α-etinilestradiol (Vol x Vaz).	87
FIGURA 36: Variações das respostas com os níveis dos três fatores para o 17β-estradiol (E2) e o estriol (E3).....	89

FIGURA 37: Razões AA/API das 10 extrações consecutivas (n=3) para cada hormônio.	91
FIGURA 38: Curvas analíticas extraídas obtidas para os 6 hormônios: E1, E2, TES, EE2, PRO E E3.	93
FIGURA 39: Comparação entre as fases extratoras C18, Strata-X, Oasis HLB e hidrogel P15PC2, para a extração de hormônios ($50 \mu\text{g L}^{-1}$) de matriz aquosa.	97

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Estrutura química, massa molar e log Kow dos hormônios em estudo.	17
TABELA 2: Condições utilizadas na derivatização de hormônios encontradas na literatura.	25
TABELA 3: Condições de análise do sistema GC-MS/MS.	36
TABELA 4: Condições avaliadas no primeiro planejamento fatorial 2^3 com ponto central.	37
TABELA 5: Condições avaliadas no segundo planejamento fatorial 2^3 com ponto central.	38
TABELA 6: Relação das condições de volumes para os reagentes de sililação e solventes empregados na sililação do EE2.	39
TABELA 7: Composição dos discos de hidrogel estudados.	43
TABELA 8: Condições avaliadas no planejamento composto central.	47
TABELA 9: Localização geográfica dos pontos de coleta na Bacia Hidrográfica do Rio Belém.	51
TABELA 10: Resultados obtidos para cada um dos hormônios empregando-se os agentes de sililação: BSTFA:1%TMCS, MSTFA E MSTFA:0,1%TMSI.	54
TABELA 11: Massas molares, tempos de retenção e principais íons do espectro de massas dos analitos sililados.	56
TABELA 12: Resultados do primeiro planejamento fatorial 2^3 para os fatores de temperatura, tempo de reação e volume de agente derivatizante.	57
TABELA 14: Resultados do segundo planejamento fatorial 2^3 para os fatores de temperatura, tempo de reação e volume de agente derivatizantes.	60
TABELA 16: Parâmetros do MRM otimizados para cada analito.	71
TABELA 17: Áreas de pico percentuais para cada eluição.	83
TABELA 18: Matriz do planejamento fatorial 2^3 com pontos em estrela e quadruplicata do ponto central.	84
TABELA 19: Resultados obtidos para o planejamento composto central (CCD) avaliando os fatores de pH, volume de amostra e vazão.	85
TABELA 20: Regressão linear e limite de quantificação (LQ).	92
TABELA 21: Resultados dos ensaios de precisão e exatidão.	94
TABELA 22: Concentrações dos hormônios nos pontos amostrados do rio Belém.	95

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ATR - Reflectância Total Atenuada (*Attenuated Total Reflectance*)
- BPA-d₁₆ - Bisfenol A d₁₆
- BSA - N,O-Bis(trimetilsilil) acetamida (*N,O-Bis(trimethylsilyl) acetamide*)
- BSTFA - N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (*N,O-Bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide*)
- CCD - Planejamento Composto Central (*Central Composite Design*)
- CID - Dissociação Induzida por Colisão (*Collision-induced Dissociation*)
- DAD - Detector de Arranjo de Diodos (*Diode Array Detector*)
- DTE - Ditioeritrol (*Dithioerytrol*)
- E1 - Estrona
- E2 - 17 β -estradiol
- EE2 - 17 α -etinilestradiol
- E3 - Estriol
- ECD - Detector de Captura de Elétrons (*Electron Capture Detector*)
- ETE - Estação de Tratamento de Esgoto
- FTIR - Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*)
- GC - Cromatografia em Fase Gasosa (*Gas Chromatography*)
- GC-MS - Cromatografia em Fase Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (*Gas Chromatography Mass Spectrometry*)
- GC-MS/MS - Cromatografia em Fase Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas Sequencial (*Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*)
- GM - Grau de Metoxilação
- GPE - Extração em Fase Gel (*Gel Phase Extraction*)
- HPLC - Cromatografia em Fase Líquida de Alta Eficiência (*High Performance Liquid Chromatography*)
- IUPAC - União Internacional de Química Pura e Aplicada (*International Union of Pure and Applied Chemistry*)
- LC-MS/MS - Cromatografia em Fase Líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (*Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*)
- LLE - Extração Líquido-Líquido (*Liquid-Liquid Extraction*)
- LPME - Microextração em Fase Líquida (*Liquid Phase Microextraction*)

LQ - Limite de Quantificação

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

MIP - Polímero Molecularmente Impresso (*Molecularly Imprinted Polymer*)

MRM - Monitoramento de Reações Múltiplas (*Multiple Reaction Monitoring*)

MM - Massa Molar

MS - Espectrometria de Massas (*Mass Spectrometry*)

MSTFA - N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (*N-methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide*)

MTBSTFA - N-terc-butildimetilsilil-metiltrifluoroacetamida (*N-tert-butyl dimethylsilyl-methyltrifluoroacetamide*)

MWCO - *Molecular Weight Cut-off*

m/z - Razão massa/carga

PFPA - Anidrido Pentafluoropropionico (*Pentafluoropropionic Anhydride*)

PFPOH - 2,2,3,3,3-pentafluoro-1-propanol (*2,2,3,3,3-pentafluoro-1-propanol*)

PMMA - Polimetilmetacrilato (*Polymethylmethacrylate*)

PRO - Progesterona

PS-DVB - Poliestireno Divinilbenzeno (*Polystyrene Divinylbenzene*)

PVA - Álcool Polivinílico (*Polyvinyl alcohol*)

PTFE - Politetrafluoretileno (*Polytetrafluorethylene*)

QqQ - Triplo Quadrupolo

RAM - Material de Acesso Restrito (*Restricted Access Material*)

RSD - Desvio Padrão Relativo (*Relative Standard Deviation*)

SBSE - Extração Sortiva em Barra de Agitação (*Stir Bar Sorptive extraction*)

SDME - Microextração em Gota Única (*Single Drop Microextraction*)

SIM - Monitoramento de Íon Seletivo (*Single Ion Monitoring*)

SPE - Extração em Fase Sólida (*Solid Phase Extraction*)

SPME - Microextração em Fase Sólida (*Solid Phase Microextraction*)

TBS - Terc-butildimetilsilil (*Tert-butyl dimethylsilyl*)

TES - Testosterona

TMCS - Trimetilclorosilano (*Trimethylchlorosilane*)

TMIS - Trimetiliodosilano (*Trimethyliodosilane*)

TMS - Trimetilsilil (*Trimethylsilyl*)

TMSI - Trimetilsililimidazol (*Trimethylsilylimidazole*)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1	HORMÔNIOS ESTEROIDAIIS	16
2.2	MÉTODOS ANALÍTICOS	19
2.3	DERIVATIZAÇÃO.....	21
2.3.1	Alquilação	22
2.3.2	Acilação	22
2.3.3	Sililação	23
2.3.4	Derivatização dos hormônios esteroidais	24
2.4	PREPARO DE AMOSTRA	25
2.5	EXTRAÇÃO EM FASE GEL (GPE)	28
3	OBJETIVOS	33
3.1	OBJETIVO GERAL.....	33
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4	MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1	MATERIAIS E REAGENTES.....	34
4.2	EQUIPAMENTOS.....	34
4.3	METODOLOGIA	35
4.3.1	Preparo das soluções de padrões	35
4.3.2	Sistema analítico – GC-MS/MS	35
4.3.3	Seleção do agente derivatizante.....	36
4.3.4	Otimização da reação de derivatização	37
4.3.5	Avaliação da etapa de secagem da amostra	38
4.3.6	Derivatização do 17 α -etinilestradiol.....	39
4.3.7	Desempenho cromatográfico dos hormônios derivatizados e não derivatizados	39
4.3.8	Otimização do método MRM	40
4.3.9	Preparo dos discos de extração	41
4.3.10	Extração dos hormônios	43
4.3.11	Caracterização físico-química dos hidrogéis de PVA/pectina.....	44
4.3.12	Otimização da extração em fase gel (GPE).....	46
4.3.13	Reutilização dos discos de extração.....	47

4.3.14	Análise dos parâmetros de mérito	48
4.3.15	Aplicação	49
4.3.16	GPE x SPE	52
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.1	SELEÇÃO DO AGENTE DERIVATIZANTE	53
5.1.1	Acilação	53
5.1.2	Sililação	53
5.2	OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE DERIVATIZAÇÃO	55
5.2.1	Planejamento fatorial para a determinação das condições de compromisso	56
5.2.2	Avaliação da etapa de secagem da amostra	63
5.2.3	Derivatização do 17 α -etinilestradiol	64
5.3	COMPARAÇÃO DO DESEMPENHO CROMATOGRÁFICO DOS HORMÔNIOS NA SUA FORMA DERIVATIZADA E NÃO DERIVATIZADA	66
5.4	OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO MRM	67
5.5	AVALIAÇÃO DOS HIDROGÉIS COMO FASES EXTRATORAS	71
5.5.1	Discos de extração	71
5.5.2	Alginato x Pectina	72
5.5.3	Influência da massa de polímero	73
5.6	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS HIDROGÉIS	77
5.6.1	Grau de intumescimento	77
5.6.2	Perda de Água	78
5.6.3	Espectroscopia de infravermelho	79
5.6.4	Microscopia eletrônica de varredura	80
5.7	OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO EM FASE GEL (GPE)	82
5.7.1	Otimização da eluição dos analitos	82
5.7.2	Planejamento fatorial	84
5.8	REUTILIZAÇÃO DO DISCO DE EXTRAÇÃO	90
5.9	ANÁLISE DOS PARÂMETROS DE MÉRITO	92
5.10	APLICAÇÃO	95
5.11	SPE X GPE	96
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	100
	REFERÊNCIAS	102

1 INTRODUÇÃO

Atividades humanas como irrigação agrícola, abastecimento público e industrial utilizam diariamente a água, que é um recurso natural de grande importância, gerando efluentes com uma grande diversidade de compostos químicos. Os chamados contaminantes emergentes têm atraído, nas últimas décadas, a atenção de diversos pesquisadores (ZAPF; HEYER; STAN, 1995; PEDROUZO *et al.*, 2009; LOPEZ *et al.*, 2015), uma vez que são compostos químicos novos ou que não possuem regulamentação e que se suspeita causarem efeitos adversos à biota e à saúde humana mesmo presentes no ambiente em baixas concentrações, na faixa de $\mu\text{g L}^{-1}$ a ng L^{-1} (FARRÉ, *et al.*, 2008; DEBLONDE; COSSU-LEGUILLE; HARTEMANN, 2011; JIANG; ZHOU; SHARMA, 2013).

Dentre esses contaminantes, um grupo que merece destaque é o dos interferentes endócrinos, devido à sua capacidade de interferir no funcionamento natural do sistema endócrino de humanos e animais. Esse grupo é formado, principalmente, por hormônios esteroidais naturais e sintéticos, seus respectivos metabólitos, e por diversos outros compostos não esteroidais, como plastificantes, retardantes de chama, surfactantes e pesticidas (MIÈGE *et al.*, 2009; AUFARTOVÁ *et al.*, 2011).

Entretanto, há uma maior preocupação em relação à classe dos hormônios esteroidais, compostos extremamente ativos e considerados os interferentes endócrinos mais potentes encontrados no meio ambiente (STRECK, 2009; HAMID; ESKICIOGLU, 2012). De modo que a presença dessas substâncias no ambiente aquático, mesmo em concentrações em nível de ng L^{-1} , já tem sido suficiente para provocar a desregulação das funções normais do sistema endócrino (PANTER; THOMPSON; SUMPTER, 1998; IRWIN; GRAY; OBERDÖRSTER, 2001).

Tal característica demonstra a necessidade de métodos analíticos sensíveis e seletivos que possibilitem a identificação e quantificação desses compostos em matrizes complexas, como por exemplo, amostras de águas superficiais e efluentes. A cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS e GC-MS/MS), tem se destacado nesse aspecto, sendo a técnica preferida para a determinação de esteroides sexuais em amostras ambientais, devido ao seu alto poder de resolução e capacidade de atingir baixos limites de detecção.

Neste contexto, pesquisas na área de preparo de amostra têm sido estimuladas, a fim de se desenvolver métodos que apresentem baixo consumo de solvente, alta seletividade, sejam rápidos e tenham um alto nível de automação. A extração em fase sólida (*Solid Phase Extraction* - SPE) é uma técnica amplamente utilizada, desde meados da década de 1970, para a pré-concentração de analitos e remoção de interferentes em amostras complexas, pois apresenta vantagens como facilidade de automação, reprodutibilidade e alta recuperação, além da disponibilidade comercial de diversos dispositivos e fases sorventes (HERNÁNDEZ-BORGES *et al.*, 2007).

No entanto, as fases comerciais, como o octadecilsilano (C18), têm como desvantagem a falta de seletividade que conduz à co-extração de interferentes, além da dificuldade em extrair compostos polares de matrizes aquosas, uma vez que as interações entre essa fase e os analitos são de natureza hidrofóbica. Comercialmente, existem disponíveis fases extratoras com caráter misto (ex. Oasis® HLB - Waters® e Strata™-X - Phenomenex®) que permitem a extração de compostos em uma faixa mais ampla de polaridade. No entanto, o custo dos cartuchos é elevado tanto para as fases mais comuns, como C18, quanto ainda mais, para as fases poliméricas, como as citadas anteriormente. Além disso, esses dispositivos são descartáveis sendo, na maioria das vezes utilizados uma única vez. Então, recentemente, muitos esforços têm sido realizados no sentido de desenvolver novos materiais sorventes mais seletivos, com alta capacidade de sorção, estáveis (maior vida útil) e de baixo custo.

Diante disto, o hidrogel tem se mostrado promissor para aplicação como fase extratora, uma vez que se trata de um material estímulo responsivo, modulável e que apresenta em sua estrutura polimérica diversos sítios hidrofílicos, como grupos –OH, –COOH, –SO₃H e –NH₂. Sendo esta última característica de grande interesse, pois possibilita a extração de compostos polares de matrizes aquosas, o que tem sido um grande obstáculo para as técnicas de extração em geral. A possibilidade de modular esse material permite a obtenção de fases mais seletivas. Além disso, sua característica de responder a estímulos externos pode ser empregada no controle da capacidade de retenção dos analitos por esse material.

Assim, diante das necessidades supramencionadas, este trabalho tem como objetivo a avaliação de fases extratoras baseadas em hidrogéis e determinação por cromatografia em fase gasosa e detecção por espectrometria de massas sequencial

(GC-MS/MS) de seis hormônios esteroidais (estriol, estrona, 17β -estradiol, 17α -etinilestradiol, progesterona e testosterona) em amostras aquosas.

O hidrogel é um material inovador para fins de extração e apresenta características distintas das fases sorventes empregadas em SPE (materiais sólidos), por conseguinte, a técnica de extração proposta neste trabalho receberá o nome de extração em fase gel (**GPE – “Gel Phase Extraction”**), pois emprega um hidrogel como fase sorvente no lugar das partículas sólidas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 HORMÔNIOS ESTEROIDAIIS

Os hormônios esteroidais são compostos biologicamente ativos, sintetizados a partir do colesterol, classificados em esteroides sexuais e corticosteróides, de acordo com sua atividade biológica e efeito farmacológico (NOPPE *et al.*, 2008). Neste trabalho, será abordado apenas o grupo dos esteroides sexuais, que são os hormônios responsáveis pela reprodução, desenvolvimento das características secundárias femininas e masculinas, além do funcionamento de diversos órgãos (YING; KOOKANA; RU, 2002).

Esses esteroides sexuais são motivo de preocupação de diversos pesquisadores ao redor do mundo, devido à sua capacidade de interferir no funcionamento natural do sistema endócrino de animais e dos seres humanos, podendo prejudicar os sistemas reprodutivos e até mesmo promover o desenvolvimento de câncer (GHISELLI; JARDIM; 2007), fato que os caracteriza como interferentes endócrinos. Os efeitos adversos causados por essas substâncias são consequência da mimetização dos hormônios endógenos, através de mecanismos de agonismo ou antagonismo, alterando assim o padrão normal da síntese, do metabolismo e da regulação hormonal (ALMEIDA; NOGUEIRA, 2006; CHEN *et al.*, 2013).

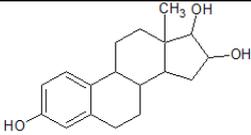
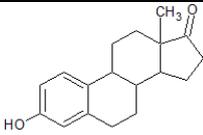
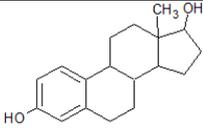
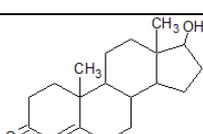
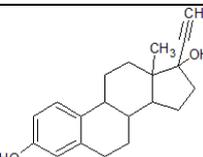
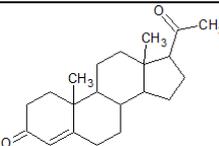
Fazem parte do grupo dos hormônios sexuais tanto esteroides naturais quanto sintéticos, os quais são classificados em estrogênios, responsáveis por estimular e desenvolver o sistema reprodutor feminino junto com as características secundárias, e progestogênios, encarregados da regulação do ciclo menstrual e da manutenção da gravidez. Por último, os andrógenos que estimulam e controlam o desenvolvimento e a manutenção das características secundárias masculinas (NOPPE *et al.*, 2008; COMBALBERT *et al.*, 2010).

A estrona (E1), o 17 β -estradiol (E2) e o estriol (E3) são os principais representantes naturais da família dos estrogênios, os quais juntamente com o 17 α -etinilestradiol (EE2), hormônio sintético amplamente utilizado em pílulas contraceptivas, apresentam atividade estrogênica mais forte do que qualquer outra substância química conhecida, como, por exemplo, alquilfenóis e bifenilas policloradas (HUANG *et al.*, 2010; AUFARTOVÁ *et al.*, 2011). Os progestogênios

também são utilizados em pílulas contraceptivas, geralmente em combinação com o EE2, e no tratamento da menopausa. A saber, a progesterona (PRO) é o único hormônio dessa família de origem natural, cuja excreção é feita pelo corpo lúteo no ovário e pela placenta durante a gravidez. O principal representante dos andrógenos é a testosterona (TES), um esteroide natural, que tem sido usado, juntamente com outros hormônios naturais e sintéticos dessa família, como promotor de crescimento em terapia humana e veterinária (STRECK, 2009).

A **Tabela 1** traz algumas informações físico-químicas a respeito dos principais hormônios estudados (E1, E2, EE2, E3, PRO e TES) e que são os compostos de interesse deste trabalho.

TABELA 1: Estrutura química, massa molar e log Kow dos hormônios em estudo.

Analito	Abreviação	Fórmula estrutural	Massa molar /g mol ⁻¹	log Kow
Estriol	E3		288,38	2,81
Estrona	E1		270,37	3,13
17β-estradiol	E2		272,38	3,30
Testosterona	TES		288,4	3,32
17α-etinilestradiol	EE2		296,4	3,67
Progesterona	PRO		314,47	3,87

FONTE: U. S. Pharmacopeia (2005, 2006, 2010a, 2010b); ALBERO *et al.* (2013).

Esses compostos são excretados através das fezes ou urina, de humanos e animais, na sua forma livre, biologicamente ativa, ou na sua forma conjugada, biologicamente inativa, como sulfatos e glucoronidos. Entretanto, após sua excreção, os conjugados são convertidos a sua forma livre pela ação de microorganismos (FARRÉ *et al.*, 2008; SARAVANABHAVAN; HELLEUR; HELLOU, 2009). A entrada desses hormônios esteroidais no ambiente aquático ocorre, principalmente, pelo despejo de esgoto doméstico (comprimidos não administrados ou excreção da forma livre) e de efluentes de estações de tratamento de esgoto (ETE) nos corpos hídricos, uma vez que as ETE, a princípio, não são projetadas para a remoção desses micropoluentes orgânicos (DEBLONDE; COSSU-LEGUILLE; HARTEMANN, 2011). Outra via de entrada é o escoamento superficial em regiões com atividades de agropecuária, devido ao uso desses hormônios na engorda de animais.

A literatura tem reportado a presença de estrogênios, progestogênios e andrógenos em efluentes e águas superficiais, cujas concentrações, a nível de ng L^{-1} , já são suficientes para causar a desregulação das funções normais do sistema endócrino de humanos (DELBÈS; LEVACHER; HABERT, 2006; MCLACHLAN; SIMPSON; MARTIN, 2006) e animais (PANTER; THOMPSON; SUMPTER, 1998; IRWIN; GRAY; OBERDÖRSTER, 2001; KIDD *et al.*, 2007). Como esses compostos apresentam atividade biológica mesmo em baixas concentrações, $\mu\text{g L}^{-1}$ a ng L^{-1} , há uma preocupação da comunidade científica em desenvolver novos métodos analíticos sensíveis e seletivos para o monitoramento de hormônios sexuais em nível traço em matrizes aquosas (ALMEIDA; NOGUEIRA, 2015).

Diversos trabalhos têm determinado resíduos de hormônios em amostras de esgoto doméstico, águas superficiais e subterrâneas (QUINTANA *et al.*, 2004; PAILLER *et al.*, 2009; SODRÉ *et al.*, 2010; ALMEIDA; NOGUEIRA, 2015), uma vez que esses compostos não são completamente degradados nas estações de tratamento de esgotos e acabam atingindo o ambiente aquático (TOGOLA; BUDZINSKI, 2007). Quintana e colaboradores (2004) encontraram os hormônios E1 e E2 em amostras de efluente, com concentrações de 33 ng L^{-1} e $2,9 \text{ ng L}^{-1}$, respectivamente, utilizando a técnica de GC-MS/MS. Em outro trabalho, Sodré e colaboradores (2010) determinaram quatro estrogênios (E1, E2, EE2 e E3), por LC-MS/MS, em amostras de águas superficiais (rio Atibaia – São Paulo) cujas concentrações variaram de $2,2 \text{ ng L}^{-1}$ a 39 ng L^{-1} .

2.2 MÉTODOS ANALÍTICOS

A presença de microcontaminantes orgânicos no solo e na água passou despercebida por muito tempo devido à falta de métodos analíticos que apresentassem limites de detecção suficientemente baixos (BUCHBERGER, 2011). No entanto, nos últimos anos tem ocorrido um grande progresso no desenvolvimento de técnicas analíticas capazes de determinar multirresíduos, em nível traço, presentes em amostras ambientais. A aplicação de tecnologias avançadas, como a cromatografia em fase líquida ou gasosa acoplada à espectrometria de massas, em análises ambientais tem permitido a determinação de uma ampla gama de compostos e possibilitado uma avaliação mais abrangente dos contaminantes ambientais (FATTA *et al.*, 2007). O aumento da conscientização do público de que contaminantes ambientais são um risco para a saúde e a elevação do padrão e da qualidade de vida da população tem impulsionado o desenvolvimento de metodologias mais sensíveis e confiáveis (CHEN *et al.*, 2008).

Nesse sentido, a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS ou GC-MS/MS) tem se destacado quando o assunto é a determinação de esteroides sexuais em amostras ambientais, devido ao seu alto poder de resolução, capacidade de atingir menores limites de detecção quando comparada aos detectores mais clássicos (ionização em chama e condutividade térmica, por exemplo) e sofrer menor influência do efeito de matriz em relação à cromatografia líquida.

A cromatografia gasosa (GC – *Gas Chromatography*) é uma técnica de separação baseada na distribuição das substâncias presentes na amostra entre a fase estacionária, a qual pode ser sólida ou líquida, e a fase móvel que é um gás. Quando a amostra é introduzida no sistema cromatográfico, os seus componentes são vaporizados no injetor e arrastados através da coluna pelo gás de arraste. Esses compostos irão interagir com a fase estacionária de acordo com as propriedades de cada um, por mecanismos de adsorção, se a fase estacionária for sólida, ou por partição, se esta for líquida (polímero líquido). Como essa interação não é a mesma de substância para substância, o tempo necessário para que cada componente da amostra chegue ao detector será diferente (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Como mencionado anteriormente, a técnica de GC apresenta como vantagens um excelente poder de resolução e capacidade de alcançar baixos limites de detecção, no entanto, esta técnica apresenta como limitação a exigência de que os

analitos sejam voláteis e termicamente estáveis, de forma que o emprego de reações de derivatização, em algumas ocasiões, é necessário.

A espectrometria de massas (MS – *Mass Spectrometry*) é um sistema de detecção amplamente empregado na GC, pois permite identificação confiável dos compostos aliada a uma detecção sensível. O seu funcionamento consiste, de forma resumida, na transformação das moléculas presentes na amostra em íons em fase gasosa, na fonte de ionização, seguida pela separação desses íons de acordo com a sua razão massa/carga (m/z), no analisador de massas. Por fim, os íons são contados pelo detector, e o sinal é registrado e processado pelo sistema de dados, que gera um espectro de massas (PAVIA *et al.*, 2010).

Maiores sensibilidades e seletividades podem ser alcançadas empregando-se a espectrometria de massas sequencial, ou em tandem, (MS/MS), onde mais de um analisador de massas faz a separação dos íons de acordo com a sua razão m/z . Um exemplo desse tipo de sistema é o analisador de massas do tipo triplo quadrupolo (QqQ), sendo o primeiro e o terceiro quadrupolo (Q1 e Q3) filtros de massas e o segundo quadrupolo uma célula de colisão (q2).

A **Figura 1** exemplifica o funcionamento desse tipo de analisador de massas, no modo MRM (Monitoramento de reações múltiplas - “*Multiple Reaction Monitoring*”), no qual é fixado um valor de m/z para Q1 e outro para Q3. O íon precursor, selecionado no primeiro quadrupolo, sofre uma dissociação induzida por colisão com uma molécula neutra de um gás, em q2, formando íons produtos que são selecionados no terceiro quadrupolo. Então, no modo MRM, é feita a medição da transição do íon precursor ao íon produto, garantindo extrema seletividade ao processo de detecção e, na maioria das vezes, gerando cromatogramas com um único pico para cada um dos analitos.

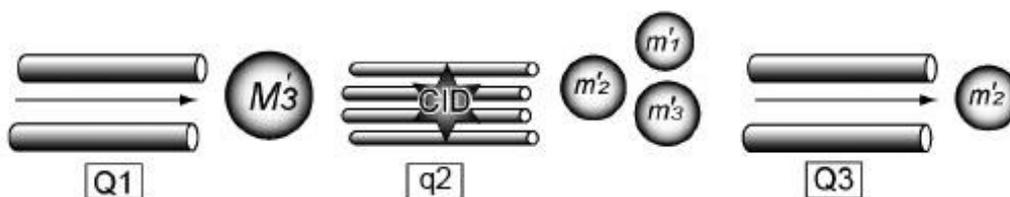


FIGURA 1: Representação do funcionamento de um analisador de massas do tipo triplo quadrupolo no modo MRM.

CID: *Collision-induced dissociation*; M'3: íon precursor; m'1, m'2 e m'3: íons produtos.

FONTE: Adaptado de Shimadzu (2014).

2.3 DERIVATIZAÇÃO

Compostos que contêm em suas estruturas grupos funcionais fortemente polares, como $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$, $-\text{NH}$ e $-\text{SH}$, cuja tendência em formar ligações de hidrogênio os torna pouco voláteis e termolábeis, são de difícil determinação por GC. Uma vez que as temperaturas empregadas na técnica podem causar a decomposição térmica dos analitos, além da possibilidade de haver a sua adsorção na fase estacionária, acarretando em uma menor sensibilidade (TOMŠÍKOVÁ *et al.*, 2012).

Entretanto, essa adversidade pode ser superada se a esses compostos for empregado o processo de derivatização, que consiste na substituição de grupos funcionais, com o intuito de reduzir a polaridade das moléculas e, por consequência, gerar derivados com maior volatilidade e/ou estabilidade térmica (BOWDEN *et al.*, 2009). Além disso, a redução da polaridade pode melhorar as propriedades cromatográficas, isso porque a minimização da adsorção indesejável e não específica do analito na coluna, devido à presença de grupos silanóis residuais na fase estacionária, contribui para a obtenção de picos simétricos e com maior resolução (SEGURA; VENTURA; JURADO, 1998; HALKET; ZAIKIN, 2003; ORATA, 2012).

A eficiência do processo de derivatização é dependente de um certo número de fatores, que incluem as condições reacionais, tais como tempo e temperatura, além da natureza do agente derivatizante e do solvente, quando este é utilizado (SHAREEF; ANGOVE; WELLS, 2006).

Como a estrutura química da substância é modificada pela reação de derivatização, pode haver uma alteração radical no seu padrão de fragmentação na espectrometria de massas, de forma que espectros de massas bem característicos podem ser obtidos, fato relevante para o uso dessa técnica analítica na identificação de compostos. Pode-se também obter íons com maiores razão m/z e abundância, sendo o primeiro de grande interesse uma vez que íons com razão m/z alta são mais específicos e sofrem menor interferência de íons provenientes da fragmentação de contaminantes, quando comparados àqueles que possuem menor razão m/z (SEGURA; VENTURA; JURADO, 1998).

Para a GC, os métodos de derivatização dividem-se em duas categorias: *pre-column* e *on-column*. Enquanto que no modo *pre-column*, a reação de derivatização

ocorre antes da injeção da amostra no sistema GC, sendo que isso pode se dar antes, durante ou depois da etapa de extração (FARAJZADEH; NOURI; KHORRAM, 2014), no modo *on-column*, os analitos e o agente derivatizante são misturados e injetados juntos no sistema GC, de forma que a reação acontece no injetor (SMITH, 2003).

Os principais tipos de reações de derivatização utilizados para análises por GC são alquilação, acetilação e sililação.

2.3.1 Alquilação

Na reação de alquilação ocorre a substituição dos hidrogênios ativos presentes na estrutura de uma molécula por grupos alifáticos ou aromáticos (ORATA, 2012), sendo esta exemplificada na **Figura 2** abaixo:

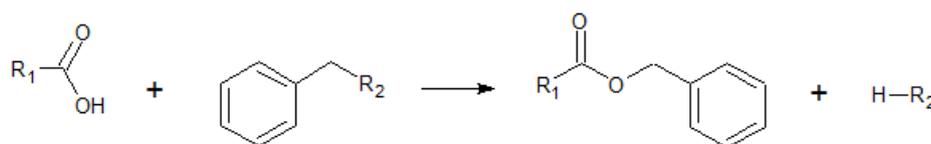


FIGURA 2: Esquema de reação de alquilação.
R1: grupo alquila ou arila; R2: grupo alquila ou halogênio.
FONTE: Orata (2012).

Essa reação pode ser aplicada às seguintes funções orgânicas: ácidos carboxílicos, álcoois, tióis, fenóis, aminas primária e secundária, amidas e sulfonamidas. Entretanto, em cromatografia, seu principal uso é para conversão de ácidos carboxílicos em ésteres, acarretando em um melhor perfil cromatográfico do que aqueles obtidos para esses ácidos. Além disso, a alquilação pode ser utilizada como método de proteção à determinados hidrogênios ativos de uma molécula (ORATA, 2012).

2.3.2 Acilação

A derivatização por acilação é um tipo de reação na qual um grupo acila substitui hidrogênios ativos presentes na estrutura de compostos orgânicos, como: álcoois, fenóis, enóis, tióis, aminas, amidas e sulfamidas (SEGURA; VENTURA; JURADO, 1998).

Essas reações ocorrem, normalmente, em temperatura ambiente pela simples mistura e agitação da amostra com os agentes de acilação, sendo os mais comuns: anidridos ácidos e haletos de acila. A utilização de catalisadores básicos também é necessária para que subprodutos ácidos formados durante a reação sejam removidos (ZAIKIN; HALKET, 2003). A **Figura 3** mostra uma reação de acilação empregando o anidrido acético como agente derivatizante.

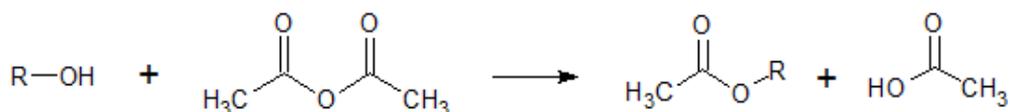


FIGURA 3: Esquema de reação de acilação.

R: grupo alquila ou arila.

FONTE: Farayzadeh et al. (2014).

A acilação é usada como uma alternativa à sililação, sendo em algumas situações o método preferível, como é o caso da derivatização de aminas e amidas cujos produtos de acetilação são muito mais estáveis do que os de sililação (ZAIKIN; HALKET, 2003).

Porém, a obtenção dos produtos dessa reação pode apresentar certa dificuldade, devido à interferência de produtos ácidos formados em reações secundárias, os quais precisam ser removidos antes da injeção no sistema GC, uma vez que esses compostos podem contribuir para a deterioração da coluna (ORATA, 2012).

2.3.3 Sililação

A reação de sililação envolve a substituição de hidrogênios ativos presentes em grupos funcionais, tais como -OH, -COOH, -NH, -NH₂ e -SH, por grupos alquilsilil, como o trimetilsilil (TMS) e o terc-butildimetilsilil (TBS). Sendo a trimetilsililação o procedimento mais empregado, uma vez que os seus derivados são de fácil obtenção, combinam estabilidade térmica e química com alta volatilidade (SEGURA; VENTURA; JURADO, 1998). A **Figura 4** mostra um exemplo de reação de sililação, onde é formado um produto derivado de TMS.



FIGURA 4: Esquema de reação de sililação.

R₁: Grupo alquila ou arila.

FONTE: Farayzadeh *et al.* (2014).

Os agentes de sililação de uso mais comum incluem N,O-Bis(trimetilsilil)acetamida (BSA), N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA), N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (MSTFA) e N-terc-butildimetilsililmetiltrifluoroacetamida (MTBSTFA), os quais podem ser utilizados na sua forma pura ou em conjunto com catalisadores como trimetilclorosilano (TMCS) e trimetilsililimidazol (TMSI) a fim de melhorar a eficiência da reação e/ou permitir a substituição de hidrogênios ativos que estejam impedidos estericamente (SEGURA; VENTURA; JURADO, 1998; HALKET; ZAIKIN, 2003; ORATA, 2012). A reação também pode ocorrer na presença ou ausência de solventes orgânicos, sendo que o acetato de etila, a acetonitrila, a piridina e a dimetil formamida são os solventes habitualmente empregados (SHAREEF; ANGOVE; WELLS, 2006).

A sililação é um método de derivatização simples e versátil, entretanto alguns cuidados devem ser tomados, visto que tanto os reagentes quanto os produtos dessa reação são passíveis de sofrer hidrólise. Por esse motivo, a sililação deve ocorrer em frasco fechado e com excesso de reagente (HALKET; ZAIKIN, 2003).

2.3.4 Derivatização dos hormônios esteroidais

Como os hormônios esteroidais de relevância para esse trabalho, com exceção da progesterona, possuem hidroxilas em suas estruturas (provenientes de grupos fenólicos e álcoois), devem-se submeter esses compostos ao processo de derivatização. Este procedimento torna possível a determinação desses por GC-MS/MS. A sililação é o método mais aplicado aos hormônios esteroidais em trabalhos da literatura, sendo os agentes derivatizantes mais comuns: BSTFA, BSTFA com 1% de TMCS e o MSTFA. As condições de tempo e temperatura comumente utilizadas variam de 15 min a 60 min e de 40°C a 80°C, respectivamente. A **Tabela 2** apresenta uma relação de condições experimentais empregadas pela literatura na derivatização de alguns dos hormônios de interesse.

TABELA 2: Condições utilizadas na derivatização de hormônios encontradas na literatura.

Analitos	Agente derivatizante	Condições reacionais	Solvente	Técnica analítica	Referência
E1, E2 e EE2	MSTFA	50 µL, 60 °C 30 min	-	GC-MS/MS	CARPINTEIRO <i>et al.</i> , 2004
E1, E2 e EE2	MSTFA	50 µL, 60 °C 60 min	Diclorometano	GC-MS	BASHEER <i>et al.</i> , 2005
E1, E2, EE2 e E3	BSTFA: 1% TMCS	50 µL Microondas: 800 w, 1 min	Piridina	GC-MS	ZUO <i>et al.</i> , 2007
E1, E2, EE2, E3 e PRO	MSTFA: 5% Imidazol	100 µL, 55 °C 30 min	Isocetano	GC-MS	DALLEGRAVE, 2012
E1, E2, EE2 e E3	BSTFA: 1% TMCS	50 µL, 60 °C 30 min	Piridina	GC-MS	MIGOWSKA <i>et al.</i> , 2012
E1, E2, EE2 e E3	PFPOH:PFPA	50 µL:200 µL 75 °C, 15 min	-	GC-ECD	MIGOWSKA <i>et al.</i> , 2012
E1, E2, EE2, E3, TES, PRO	BSTFA	25 µL, 70 °C 60 min	Acetonitrila e piridina	GC-MS/MS	ALBERO <i>et al.</i> , 2013
E1, E2, EE2, E3, TES, PRO	MSTFA/TMIS/DTE (1000:2:5, v/v/w)	100 µL, 5 min Temperatura ambiente	-	GC-MS/MS	ALBERO <i>et al.</i> , 2014

BSTFA: N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida; TMCS: Trimetilclorosilano; MSTFA: N-Metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida; TMIS: Trimetiliodosilano; DTE: Ditioeritrol; PFPOH:2,2,3,3,3-pentafluoro-1-propanol; PFPA: Anidrido pentafluoropropionico.

2.4 PREPARO DE AMOSTRA

O preparo de amostra é uma etapa crucial do processo analítico, onde é realizada, normalmente, a extração e pré-concentração dos analitos, bem como, a remoção de interferentes presentes na amostra. Nas últimas décadas, diversas técnicas de preparo de amostras foram desenvolvidas e avaliadas com o intuito de se obter procedimentos que consumissem menores volumes de solvente, tivessem alta seletividade, fossem rápidos e altamente automatizados. Exemplos de algumas das técnicas desenvolvidas são: a microextração em fase líquida (*Liquid Phase Microextraction* – LPME), a microextração em gota única (*Single Drop Microextraction* – SDME), a microextração em fase sólida (*Solid Phase Microextraction* – SPME), a extração sortiva em barra de agitação (*Stir Bar Sorptive Extraction* – SBSE) e a extração em fase sólida (*Solid Phase Extraction* – SPE). Sendo a última mais amplamente empregada na pré-concentração e *clean-up* de analitos presentes em amostras de água e efluentes (FATTA *et al.*, 2007).

A SPE foi introduzida em meados da década de 1970 a fim de suprir as desvantagens apresentadas pela extração líquido-líquido (*Liquid-Liquid Extraction* - LLE) e, devido à sua simplicidade, seletividade e melhores limites de detecção em relação à LLE, tornou-se o método de preparo de amostra mais popular para a

concentração de analitos e remoção de interferentes (HUCK; BONN, 2000; HERNÁNDEZ-BORGES *et al.*, 2007; JARDIM, 2010).

Segundo Hernández-Borges *et al.* (2007) a SPE teve uma vasta aceitação devido as vantagens da técnica, como facilidade de automação, alta recuperação, reprodutibilidade da extração, capacidade de concentrar o analito com certa seletividade e a disponibilidade comercial de diversos dispositivos e materiais sorventes para SPE. Além disso, essa técnica requer um tempo menor e consome pequenos volumes de solventes orgânicos em comparação com a LLE, tendo um vasto campo de aplicação como, por exemplo, em análises ambientais (BIZKARGUENAGA *et al.*, 2012; KUMIRSKA *et al.*, 2015) e de alimentos (SANAGI *et al.*, 2013).

A SPE é usualmente empregada com o propósito de isolar compostos presentes em amostras complexas, sendo que os mecanismos de separação envolvidos, tais como, adsorção, partição (fases normal e reversa), troca iônica e exclusão, são similares aos da cromatografia líquida (JARDIM, 2010). Os dispositivos de SPE estão disponíveis na forma de cartucho ou disco de extração. O formato de cartucho é o mais popular, podendo ser encontrado no mercado com diversos volumes e empacotados com diferentes quantidades e tipos de sorventes, sendo que uma escolha apropriada irá depender das características da amostra e das propriedades físico-químicas dos compostos de interesse (CALDAS *et al.*, 2011).

No formato de disco de extração, partículas ativas são imobilizadas em uma matriz inerte e estável de microfibras de politetrafluoretileno (PTFE) ou vidro, por exemplo. A saber, um disco típico de SPE tem diâmetro interno de 47 mm e espessura de 0,5 mm, apresentando dentre as suas vantagens a existência de um leito mais homogêneo, ausência de caminhos preferenciais, maior velocidade de percolação e o uso de menores volumes de eluente (JARDIM, 2010).

Os procedimentos de extração em fase sólida, em geral, ocorrem em quatro etapas: 1) Condicionamento da fase sorvente com solventes apropriados; 2) Extração dos analitos através da percolação da amostra pelo sorvente; 3) Remoção dos interferentes (*clean-up*), geralmente utilizando-se água; e 4) Eluição dos analitos com solvente orgânico. A **Figura 5** ilustra as etapas envolvidas na extração com cartucho empacotado, as quais são as mesmas quando o dispositivo empregado é o disco de extração.

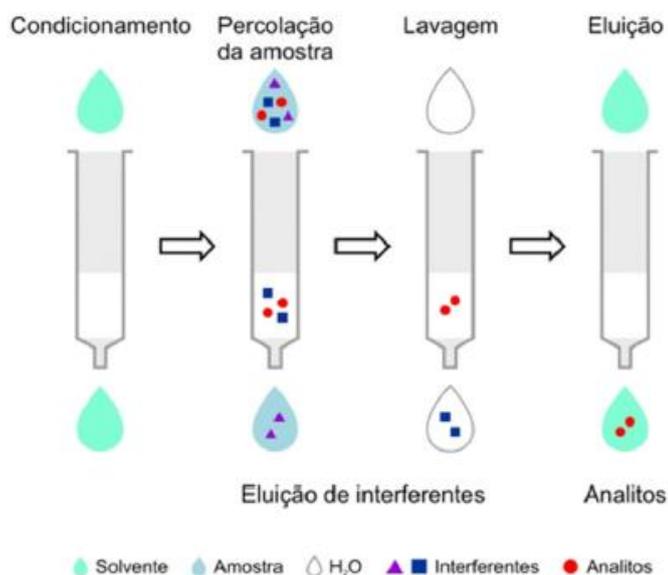


FIGURA 5: Etapas envolvidas na SPE: condicionamento da fase sorvente, percolação da amostra, remoção dos interferentes e eluição dos analitos.
 FONTE: Caldas et al. (2011).

As fases adsorventes convencionais usadas em SPE incluem sílica ligada quimicamente a grupos orgânicos, como C18, C8, C2, carbono grafitizado e polímeros como o copolímero de poliestireno divinilbenzeno (PS-DVB) (FONTANALS; MARCÉ; BORRULL, 2007), as quais têm como grande desvantagem a baixa seletividade que conduz à co-extração de interferentes. Além disso, essas fases apresentam caráter hidrofóbico, o que dificulta a sua utilização para a extração de compostos polares presentes em matrizes aquosas. Isso se deve à baixa afinidade do analito com a fase extratora, que resulta em baixas taxas de recuperações, devido à perda do analito durante a etapa de percolação da amostra e lavagem.

Existem, disponível comercialmente, fases sorventes capazes de atuarem em uma faixa mais ampla de polaridade, como o sorvente Oasis® HLB (Waters®), um copolímero macroporoso, formado por monômeros de divinilbenzeno (caráter hidrofóbico) e N-vinilpirrolidona (caráter hidrofílico), apresentando então, um balanço hidrofílico-hidrofóbico na sua estrutura. Outro exemplo é o sorvente Strata™-X (Phenomenex®), um material polimérico de estireno-divinilbenzeno quimicamente modificado com N-vinilpirrolidona, cujos mecanismos de retenção do analito se dão por meio de interações hidrofóbicas, $\pi - \pi$ e ligações de hidrogênio (FONTANALS;

MARCÉ; BORRULL, 2005). As composições desses materiais permitem então, a extração de compostos polares.

Todavia, os cartuchos de SPE apresentam um custo elevado, principalmente aqueles cuja fase sorvente trata-se de um copolímero com balanço hidrofílico-hidrofóbico. Além disso, esses dispositivos são descartáveis e utilizados, na maioria dos casos, para uma única aplicação, o que acarreta em gastos significativos com consumíveis (SMITH, 2003).

Recentemente, muitos esforços tem sido realizados no desenvolvimento de novos materiais sorventes mais seletivos, com alta capacidade sortiva, estabilidade térmica, química e mecânica, aumentando assim a vida útil do sorvente, e de baixo custo (AUGUSTO *et al.*, 2010). Neste sentido, pode-se citar como exemplos de materiais que estão sendo estudados, os polímeros molecularmente impressos (MIP), os materiais de acesso restrito (RAM), as nanopartículas metálicas, os nanomateriais de carbono e os imunossorventes, que baseiam-se em interações específicas do tipo antígeno e anticorpo (FARRÉ *et al.*, 2012; WEN *et al.*, 2014).

2.5 EXTRAÇÃO EM FASE GEL (GPE)

Como mencionado anteriormente, há um interesse, em especial, no desenvolvimento de fases para extração de compostos polares presentes em matrizes aquosas complexas. Isso porque estes são difíceis de isolar e pré-concentrar, uma vez que sua baixa afinidade com o adsorvente faz com que sejam facilmente perdidos durante a percolação da amostra e lavagem do cartucho. Nesse sentido, o hidrogel, material polimérico de origem natural ou sintética, tem chamado atenção em relação às suas potencialidades de aplicação como fase extratora. O que é devido, principalmente, a sua estrutura formada por redes poliméricas hidrofílicas química ou fisicamente reticuladas, capazes de absorver e reter grandes quantidades de água sem se dissolver (HOFFMAN, 2002; BRITO *et al.*, 2013).

A presença de diversos sítios hidrofílicos, como $-OH$, $-COOH$, $-SO_3H$ e $-NH_2$ ligados à cadeia polimérica do hidrogel, permite a extração de compostos de maior polaridade de matrizes aquosas, o que tem sido um grande obstáculo para as fases extratoras comerciais. Além disso, esse material é modulável, possibilitando a síntese de géis mais seletivos, e estímulo responsável, ou seja, sofre alterações no

seu equilíbrio de intumescimento em resposta à pequenas alterações de parâmetros do meio, como pH, temperatura e força iônica.

Nos últimos 50 anos, os hidrogéis vêm recebendo uma atenção considerável em virtude das suas propriedades como biocompatibilidade e capacidade de resposta sensível a estímulos externos (BAHRAM; KESHVARI; NAJAFI-MOGHADDAM, 2011). Estas características vêm permitindo uma ampla aplicação desses materiais nas áreas médica e farmacêutica, como por exemplo, no desenvolvimento de órgãos artificiais (LEE; KUNG; LEE, 2005), curativos (SIKAREEPAISAN; RUKTANONCHAI; SUPAPHOL, 2011), lentes de contato (CHILDS *et al.*, 2016) e sistemas de liberação controlada de fármacos (TANG *et al.*, 2007; MOREIRA *et al.*, 2014).

Essa habilidade de absorver grandes quantidades de água é devida aos grupos funcionais hidrofílicos presentes na sua estrutura polimérica, enquanto que a resistência à dissolução do material é uma consequência das ligações cruzadas existentes entre as cadeias poliméricas (AHMED, 2015). Com relação ao grau de intumescimento do hidrogel, este é dependente de diversos fatores, como estrutura química, massa molar, composição e grau de reticulação da matriz polimérica (PEPPAS *et al.*, 2000).

Quando o processo de absorção de água pelo hidrogel se inicia, os grupos hidrofílicos são hidratados, levando ao afastamento das cadeias poliméricas e por consequência a formação de poros, nos quais a água adicional absorvida é armazenada, fazendo com que o hidrogel aumente de volume. No entanto, esse processo é regulado por uma força oposta responsável pela manutenção do retículo, de forma que o gel incha até que o equilíbrio de intumescimento seja atingido. Daí então, a quantidade de água absorvida pelo material irá controlar a partição e a difusão de solutos no hidrogel, isso juntamente com fatores externos, como pH, temperatura e força iônica (HOFFMAN, 2002). A **Figura 6** mostra uma representação da interação do hidrogel com as moléculas de água.

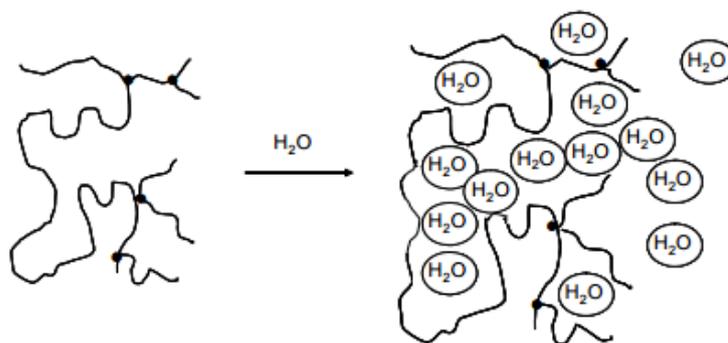


FIGURA 6: Representação esquemática da interação de um hidrogel com moléculas de água.
 FONTE: Moura (2005).

Esses géis são classificados em dois grupos em função da natureza das interações que formam o seu retículo: caso sua estrutura seja mantida devido à ligações covalentes, são chamados de hidrogéis químicos ou permanentes, mas se a rede polimérica é formada por interações físicas, como por exemplo ligações iônicas e ligações de hidrogênio, os hidrogéis são chamados de hidrogéis físicos ou reversíveis (PAL; BANTHIA; MAJUMDAR, 2009).

Os hidrogéis podem ser sintetizados a partir de polímeros de origem sintética ou natural, bem como, pela combinação desses. Ambos apresentam propriedades interessantes, como por exemplo, a biodegradabilidade e atoxicidade dos polímeros naturais, e a resistência mecânica, alta capacidade de absorver água e maior vida útil dos polímeros sintéticos (AHMED, 2015).

Apesar dessas características atrativas do hidrogel, o seu uso no desenvolvimento de novas fases extratoras é algo que teve início apenas na última década e ainda é pouco explorado. Destaca-se o trabalho de Basheer e colaboradores (BASHEER *et al.*, 2005), os quais desenvolveram um método de microextração em fibra oca revestida com hidrogel de polimetilmetacrilato (PMMA) para a determinação de estrona, 17β -estradiol, 17α -etinilestradiol e dietilestilbestrol em amostras de água de torneira e de reservatório por GC-MS. Os autores do trabalho alcançaram limites de detecção de 0,03 a 0,1 ng L⁻¹ e coeficientes de variação de 3 a 7% (BASHEER *et al.*, 2005). Em um trabalho mais recente, Bahram e colaboradores (2013) utilizaram um hidrogel de poli(estireno-co-anidrido maleico), sensível ao pH, como fase extratora de um método de microextração semissólido-líquido dispersiva para pré-concentração e determinação de verde malaquita e violeta cristal por espectrofotometria UV-Vis. Para o corante verde malaquita foi alcançado um limite de detecção de 0,011 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e coeficiente de variação de

4,42%, enquanto que para o violeta cristal o limite de detecção foi de $0,014 \mu\text{mol L}^{-1}$ e o coeficiente de variação foi de apenas 2,72% (BAHRAM; KESHVARI; MOHSENI, 2013).

Com o objetivo de valer-se das vantagens apresentadas pela SPE e das potencialidades dos hidrogéis para serem empregados como fases sorventes, neste trabalho foi desenvolvida e proposta uma nova técnica de extração, denominada aqui por extração em fase gel (**GPE – “Gel Phase Extraction”**). Segundo a IUPAC, um gel é definido como: rede coloidal não fluida ou rede polimérica que se expande ao longo de todo o seu volume por um fluido (ALEMÁN *et al.*, 2007). O hidrogel possui propriedades reológicas intermediárias as de materiais nos estados sólido e líquido, não se comportando igual a um estado ou outro.

Sendo assim, o processo de extração da GPE pode ser compreendido como uma derivação da SPE (condicionamento do cartucho, adição da amostra e eluição), porém, empregando-se hidrogéis como fases extratoras, que é um material inovador para esse tipo de aplicação e possui características distintas das de um sólido, como no caso das partículas de octadecilsilano (C18) que compõe a fase sorvente mais comumente utilizada em SPE.

As fases extratoras desenvolvidas nesse trabalho são baseadas em hidrogéis de PVA/alginato e PVA/pectina. Sendo o álcool polivinílico (PVA) um polímero sintético hidrofílico semicristalino produzido pela hidrólise do acetato de polivinila. Essa reação é incompleta e resulta em polímeros com diferentes graus de hidrólise (MANSUR *et al.*, 2008), de forma que o PVA é disponível comercialmente nas formas altamente hidrolisado (grau de hidrólise acima de 98,5%) e parcialmente hidrolisado (grau de hidrólise de 80 a 98,5%). O PVA contém em sua estrutura diversos grupos hidroxila, sendo, então, um polímero altamente hidrofílico que exhibe propriedades mecânicas excelentes, estabilidade química e capacidade de formar filmes (PARK; PARK; RUCKENSTEIN, 2001).

Já os biopolímeros alginato e pectina são polissacarídeos extraídos de algas e frutos, respectivamente. Sendo o primeiro formado por unidades de ácidos D-manurônico e L-glucurônico ligadas de forma linear por ligações glicosídicas $\alpha(1-4)$ (CAMPESE *et al.*, 2007). Enquanto que a pectina é constituída majoritariamente por unidades de ácido galacturônico ligadas por ligações do tipo $\alpha(1-4)$, contendo quantidades variáveis de substituintes metil-éster (MOREIRA *et al.*, 2014) dependendo do seu grau de metoxilação. A pectina pode ter alto grau de

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliação de hidrogéis baseados em polímeros de origem sintética e natural como fase extratora para a extração em fase gel (GPE) e determinação cromatográfica (GC-MS/MS) de hormônios em matrizes aquosas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos do trabalho são:

- a) Desenvolvimento de um método cromatográfico (GC-MS/MS) para a determinação dos hormônios alvo deste estudo: estrona, 17β -estradiol, 17α -etinilestradiol, estriol, progesterona e testosterona.
- b) Desenvolvimento de discos de extração baseados em hidrogéis de PVA/alginato e PVA/pectina.
- c) Avaliação dos hidrogéis de PVA/alginato e PVA/pectina como fase extratora para extração em fase gel dos analitos.
- d) Otimização das variáveis envolvidas no processo GPE.
- e) Avaliação de parâmetros analíticos de mérito.
- f) Aplicação da metodologia desenvolvida na determinação de hormônios em amostras de águas superficiais.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS E REAGENTES

Os padrões de alta pureza usados foram bisfenol A - d₁₆ (99,9%, *Supelco*®), estrona (99%, *Fluka*®), 17β-estradiol (98%, *Sigma-Aldrich*®), estriol (97%, *Fluka*®); 17α-etinilestradiol, testosterona e progesterona (98%, *Fluka*®).

Os solventes de grau cromatográfico empregados foram diclorometano (*Panreac*®), acetato de etila e metanol (*J. T. Baker*®). Utilizou-se água ultrapura com resistividade controlada em 18,2 μΩ cm⁻¹, purificada pelo sistema Millipore-Simplicity UV (Bedford, MA, USA).

Para a reação de derivatização empregou-se N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida com 1% de trimetilclorosilano (BSTFA:1%TMCS), N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (MSTFA), trimetilsililimidazol (TMSI), anidrido acético (≥ 99%) e carbonato de potássio (≥ 99%) todos fornecidos pela *Sigma-Aldrich*®.

Os polímeros utilizados na síntese dos hidrogéis foram álcool polivinílico (> 99% hidrolisado, MM: 89.000 – 98.000 g mol⁻¹), alginato de sódio, ambos fornecidos pela *Sigma-Aldrich*®, e pectina cítrica adquirida no Mercado Municipal da cidade de Curitiba-PR, a qual foi gentilmente cedida pelo Grupo de Pesquisa em Macromoléculas e Interfaces (GPMIn), coordenado pela professora Izabel C. Riegel-Vidotti. O agente reticulante empregado foi o ácido cítrico anidro fornecido pela *Qhemis*®.

Os cartuchos de SPE utilizados foram SampliQ C18 (Agilent®, 500 mg, 6 mL), Oasis® HLB (Waters®, 500 mg, 6 mL) e Strata™-X (Phenomenex®, 200 mg, 3 mL).

Para a lavagem das vidrarias, estas eram deixadas de molho em água de torneira por um período mínimo de 12 horas, sendo em seguida enxaguadas com álcool etílico comercial, água da torneira, água destilada e água ultrapura. Após a secagem ao ar ou em estufa passava-se acetona de grau analítico PA.

4.2 EQUIPAMENTOS

Para as pesagens utilizou-se uma balança analítica digital Mettler Toledo® XS205DU com precisão de 0,01 mg. O ajuste de pH das amostras foi realizado com a ajuda de um pHmetro Orion 3-star (Thermo Scientific®). Para a concentração dos

extratos empregou-se um concentrador de amostras RVC 2-18CD (CHRIST®). A liofilização da pectina cítrica comercial purificada ocorreu em um liofilizador L101 (Liobras®).

Os espectros de absorvância na região do infravermelho médio (4000 a 600 cm^{-1}) foram adquiridos, a temperatura ambiente, por um espectrômetro com transformada de Fourier modelo Vertex 70 (Bruker®), equipado com acessório de reflectância total atenuada (ATR) e cristal de ZnSe.

As determinações cromatográficas foram realizadas por um cromatógrafo a gás, modelo *GCMS2010 Plus* (Shimadzu®, Japão), hifenado a um espectrômetro de massas em tandem do tipo triplo quadrupolo *TQ8040* e autoamostrador *AC 5000*.

4.3 METODOLOGIA

4.3.1 Preparo das soluções de padrões

As soluções estoque, de cada padrão individual, foram preparadas em metanol nas concentrações de 1000 mg L^{-1} e 400 mg L^{-1} para os hormônios e o padrão interno (bisfenol A - d16), respectivamente. Para isso, pesou-se 10,00 mg de cada hormônio e 4,00 mg de bisfenol A - d16, os quais foram dissolvidos com metanol completando-se o volume de 10 mL da vidraria analítica. O armazenamento dessas soluções foi feito ao abrigo de luz a -18°C . Soluções de trabalho contendo os seis hormônios foram preparadas por diluição das soluções estoque em metanol, a cada 30 dias, período no qual apresentaram estabilidade se armazenadas a -18°C .

4.3.2 Sistema analítico – GC-MS/MS

O sistema GC-MS/MS foi operado nos modos simples (MS), onde o primeiro e o segundo quadrupolo (Q1 e q2) são empregados como focalizadores e o terceiro quadrupolo (Q3) como analisador, e sequencial (MS/MS) que utiliza o primeiro e o terceiro quadrupolo (Q1 e Q3) como analisadores e o segundo quadrupolo (q2) como célula de colisão. A **Tabela 3** apresenta as condições de análise do sistema GC-MS/MS.

As condições da programação de temperatura em GC foram otimizadas, a fim de se obter alta eficiência e resolução na separação cromatográfica. Para isso, analisou-se uma solução de trabalho contendo os seis hormônios (E1, E2, TES,

EE2, PRO e E3) e o padrão interno (BPA-d₁₆) na concentração de 10 mg L⁻¹. Previamente à injeção no sistema GC-MS/MS, os analitos foram derivatizados, empregando-se as condições de compromisso da reação de silição (item 4.3.4).

TABELA 3: Condições de análise do sistema GC-MS/MS.

Injetor	Temperatura do injetor	250 °C
	Volume de injeção	1 µL
	Modo de injeção	<i>Split</i> (1:10 e 1:20)
GC	Coluna	SH-Rtx-5MS (Shimadzu) 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm
	Gás de arraste	He (5.0)
	Fluxo do gás de arraste	1 mL min ⁻¹
	Rampa de aquecimento	Coluna: 220 °C (2 min) Rampa 1: 20 °C min ⁻¹ até 280 °C (1 min) Rampa 2: 2 °C min ⁻¹ até 290 °C Rampa 3: 20 °C min ⁻¹ até 300 °C (1,5 min)
TQMS	Temperatura da linha de transferência	300°C
	Temperatura da fonte de ionização	250 °C
	Analizador de massas	Triplo quadrupolo
	Energia de ionização	70 eV
	Modo de registro dos íons	<i>Full Scan, Product Ion Scan, SIM e MRM</i>

SIM: Monitoramento de íons seletivo (*Single Ion Monitoring*); MRM: Monitoramento de reações múltiplas (*Multiple Reaction Monitoring*).

O argônio (4.8) foi utilizado como gás de colisão, e a otimização dos parâmetros do MS/MS (energia de colisão, estudo de fragmentação e seleção dos íons m/z precursores e produtos) foi realizada e é descrita no item 4.3.8.

4.3.3 Seleção do agente derivatizante

Neste trabalho, foram avaliados quatro reagentes de derivatização: anidrido acético, BSTFA:1% TMCS, MSTFA e MSTFA:0,1% TMSI.

4.3.3.1 Acilação

O procedimento de derivatização, por meio de reação de acilação, teve como base trabalhos descritos na literatura por Rodríguez *et al.* (1996) e Bagheri e Saraji, (2003), o qual consistiu na adição de 50 µL da solução de trabalho dos hormônios (25 mg L⁻¹) em metanol, 100 µL da solução aquosa de K₂CO₃ 5% (m/v) e 100 µL de hexano:anidrido acético (9:1, v/v), em um insert de 350 µL. Essa mistura foi agitada em vórtex durante 1 min e, em seguida, deixada em repouso para que houvesse a separação das fases. Com o auxílio de uma micropipeta, transferiu-se 50 µL do

sobrenadante (fase orgânica) para um insert de 200 µL, dos quais 1 µL foram injetados no sistema GC-MS/MS.

4.3.3.2 Sililação

Para as reações de sililação, tomaram-se como base os trabalhos de Quintana *et al.* (2004), Basheer *et al.* (2005) e Shareef *et al.* (2006). O processo de derivatização consistiu na total evaporação de 100 µL da solução de trabalho dos hormônios (25 mg L⁻¹) sob fluxo de N₂, seguida da adição de 50 µL do agente de sililação (BSTFA:1%TMCS, MSTFA ou MSTFA:0,1%TMSI) e homogeneização em vórtex durante 30 segundos. A reação ocorreu em um banho termostatizado a 60 °C por 30 minutos. Ao término da sililação, as amostras foram secas sob fluxo de N₂, reconstituídas com 100 µL de acetato de etila e injetadas no sistema GC-MS/MS. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.3.4 Otimização da reação de derivatização

4.3.4.1 Planejamento fatorial para a determinação das condições de compromisso

Após a seleção do agente derivatizante mais adequado, realizou-se um estudo de otimização dos parâmetros da reação de derivatização, como temperatura, tempo de reação e volume do agente derivatizante. A fim de se obter uma alta eficiência na reação, optou-se por avaliar esses parâmetros de forma multivariada, e para isso foi empregado um planejamento fatorial completo 2³ com ponto central.

A escolha dos níveis superiores e inferiores para cada um dos fatores foi feita com base em trabalhos descritos na literatura (QUINTANA *et al.*, 2004; BASHEER *et al.*, 2005; SHAREEF; ANGOVE; WELLS, 2006). A **Tabela 4** traz a relação de fatores e níveis empregados no planejamento fatorial. Cada ensaio foi realizado em duplicata.

TABELA 4: Condições avaliadas no primeiro planejamento fatorial 2³ com ponto central.

Variável	Nível (-)	Ponto central	Nível (+)
Temperatura/°C	40	50	60
Tempo de reação/min	30	45	60
Volume de agente derivatizante/µL	30	40	50

Nesta etapa do trabalho, algumas modificações no procedimento experimental da reação sililação, apresentado no item 4.3.3.2, precisaram ser aplicadas com a finalidade de reduzir o número de etapas e o tempo necessário para a obtenção dos hormônios derivados de TMS.

Assim sendo, o novo procedimento experimental, consistiu em evaporar totalmente, sob fluxo N_2 , 100 μL da solução de trabalho (25 mg L^{-1}), adicionar o MSTFA:0,1%TMSI e homogeneizar a amostra com o auxílio de um vórtex por 30 segundos. A reação ocorreu em um forno, com controle preciso de temperatura, nas condições de tempo e temperatura dadas pelo planejamento fatorial. As amostras foram, então, avolumadas para 100 μL com acetato de etila e injetadas no sistema GC-MS/MS.

A partir dos resultados obtidos, um segundo planejamento fatorial completo 2^3 com ponto central foi montado, a fim de se encontrar condições experimentais que acarretassem em respostas ainda melhores que as obtidas no primeiro planejamento. Os níveis selecionados para o segundo planejamento estão apresentados a seguir (**Tabela 5**):

TABELA 5: Condições avaliadas no segundo planejamento fatorial 2^3 com ponto central.

Variável	Nível (-)	Ponto central	Nível (+)
Temperatura/ $^{\circ}C$	60	65	70
Tempo de reação/min	20	25	30
Volume de agente derivatizante/ μL	30	40	50

Os ensaios foram encaminhados em duplicata do mesmo modo que os realizados no primeiro planejamento fatorial, alterando apenas os níveis avaliados.

4.3.5 Avaliação da etapa de secagem da amostra

Com o objetivo de reduzir o tempo da etapa de evaporação da amostra, foram realizados dois ensaios, em duplicata, onde se avaliou a diferença entre o processo de secagem com fluxo de N_2 e em forno, com controle preciso de temperatura, a $80 \text{ }^{\circ}C$. Para tanto, utilizou-se a solução de trabalho dos hormônios na concentração de 10 mg L^{-1} , a qual foi seca por dois processos diferentes, sob fluxo de N_2 e em forno a $80 \text{ }^{\circ}C$. Após a sua evaporação, ambas as amostras foram submetidas à reação de derivatização, descrita no item 4.3.4.1, empregando-se as condições de compromisso para a temperatura ($70 \text{ }^{\circ}C$), o tempo de reação (30 min) e o volume do

MSTFA:0,1%TMSI (30 µL). As amostras foram então, analisadas pelo sistema GC-MS/MS.

4.3.6 Derivatização do 17 α -etinilestradiol

Trabalhos da literatura (SHAREEF *et al.*, 2004; ZHANG; ZUO, 2005; SHAREEF; ANGOVE; WELLS, 2006; MIGOWSKA *et al.*, 2012) tem reportado que quando o hormônio 17 α -etinilestradiol é submetido à reação de sililação, empregando-se diferentes agentes derivatizantes e solventes, este tende a se converter no produto da reação de sililação da estrona, acarretando em um falso negativo para o EE2 e um falso positivo para E1, quando esses compostos são determinados simultaneamente.

Por esse motivo, a derivatização do EE2 foi avaliada empregando-se diferentes reagentes de sililação (BSTFA:1%TMCS, MSTFA, MSTFA:0,1%TMSI e MSTFA:1%TMSI) e também diferentes solventes (acetato de etila e diclorometano). A **Tabela 6** apresenta uma relação das condições utilizadas nesses ensaios.

TABELA 6: Relação das condições de volumes para os reagentes de sililação e solventes empregados na sililação do EE2.

Ensaio	Reagente de sililação	Solvente
1	30 µL de BSTFA;1%TMCS	-
2	30 µL de MSTFA	-
3	30 µL de MSTFA:0,1%TMSI	-
4	30 µL de MSTFA:1%TMSI	-
5	30 µL de MSTFA:1%TMSI	70 µL de acetato de etila
6	30 µL de MSTFA:1%TMSI	70 µL de diclorometano

4.3.7 Desempenho cromatográfico dos hormônios derivatizados e não derivatizados

A fim de comprovar a eficácia do processo de derivatização, realizaram-se dois ensaios, em duplicata, onde foram injetadas no sistema GC-MS/MS amostras dos hormônios submetidas à reação de sililação e também amostras que não passaram por esse processo. Abaixo são descritas as etapas de preparo dessas amostras para sua posterior injeção no sistema cromatográfico.

4.3.7.1 Amostras não submetidas à reação de sililação

Em inserts de 200 μL , foram adicionados 150 μL da solução de trabalho dos hormônios com concentração de 10 mg L^{-1} , os quais foram completamente evaporados em forno a 80°C. As amostras foram em seguida reconstituídas com 150 μL de acetato de etila e homogeneizadas em vórtex durante 30 segundos, por fim 1 μL foi injetado no sistema GC-MS/MS.

4.3.7.2 Amostras submetidas à reação de sililação

Adicionou-se, em inserts de 200 μL , 150 μL da solução de trabalho dos hormônios com concentração de 10 mg L^{-1} , os quais foram completamente evaporados em forno a 80°C. Após as amostras serem resfriadas à temperatura ambiente, foram adicionados 30 μL de MSTFA:1%TMSI (v/v) e sua homogeneização foi realizada em vórtex por 30 segundos. A reação de sililação ocorreu em um forno a 70°C durante 30 minutos. As amostras foram resfriadas a temperatura ambiente e avolumadas para 150 μL com acetato de etila, sendo finalmente injetadas no sistema GC-MS/MS.

4.3.8 Otimização do método MRM

A otimização do método MRM foi realizada para se determinar as energias de colisão e as transições de íon precursor para íon produto que resultariam em uma melhor resposta, ou seja, maior intensidade de pico. Para isso, preparou-se uma amostra, de acordo com o item 4.3.7.2, a qual foi analisada pelo modo *Product Ion Scan*. Nesse modo, fixa-se um valor de m/z em Q1 (íon precursor) enquanto que em Q3 se faz uma varredura, dentro da faixa de m/z estipulada, de todos os íons formados (íons produtos) pela fragmentação do íon precursor na célula de colisão (q2). A **Figura 8** apresenta de forma genérica o funcionamento desse modo.

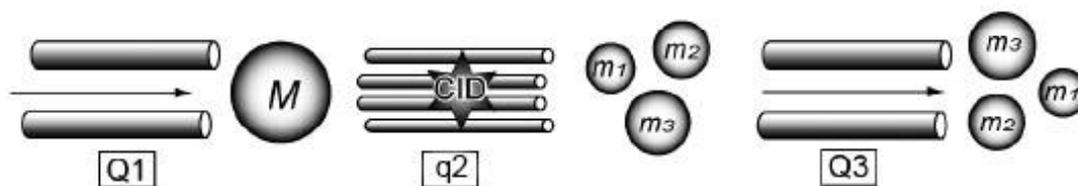


FIGURA 8: Representação do funcionamento de um analisador de massas do tipo triplo quadrupolo no modo *Product Ion Scan*.

CID: *Collision-induced dissociation*; M: íon precursor; m_1 , m_2 e m_3 : íons produtos.

FONTE: Adaptado de Shimadzu (2014).

Os íons precursores selecionados foram aqueles que apresentaram maior intensidade quando determinados pelo modo *Full Scan*. A partir da seleção desse íon, avaliaram-se três transições, sendo uma com a finalidade de quantificação e as outras duas de confirmação. A varredura dos íons produtos foi realizada dentro do intervalo de m/z de 50 ao valor de m/z do íon precursor subtraindo-se 1,5. A diferença de potencial aplicada em q2 foi variada de 3 em 3 V, dentro do intervalo de 1 a 58 V.

4.3.9 Preparo dos discos de extração

4.3.9.1 Purificação da pectina

A pectina cítrica comercial foi purificada por processo de diálise, empregando-se membrana de celulose regenerada com MWCO (*Molecular weight cut off*) de 12 a 14 kDa (Spectra/Por®). Para isso, preparou-se uma solução de pectina com concentração de 10% (m/v), a qual foi acondicionada no interior da membrana e deixada em um banho de água destilada. A diálise ocorreu durante um período de 3 dias, no qual trocou-se a água destilada 4 vezes ao dia. Após esse processo a solução de pectina foi liofilizada.

4.3.9.2 Preparo das soluções dos polímeros

– PVA: as soluções de PVA, nas concentrações de 5%, 10%, 15% e 20% (m/v), foram preparadas pela dissolução do polímero em água ultrapura. Para a solubilização do PVA foi empregado aquecimento ($\sim 85^\circ\text{C}$) e agitação magnética durante 3 horas.

- Alginato e pectina dialisada: as soluções de alginato (1% e 2%, m/v) e pectina dialisada (1%, 2%, 3%, e 4%, m/v) foram preparadas pela dissolução desses polímeros em água ultrapura, sob agitação magnética durante um período de 3 horas.

4.3.9.3 Síntese dos discos de hidrogel

Para a síntese dos discos de hidrogel, foi tomado como base o trabalho de Stone e colaboradores (2013), onde é realizada a síntese de um hidrogel de PVA:alginato na proporção 5:1 (m/m), reticulado com ácido cítrico.

Desta forma, os discos de extração foram obtidos através da reticulação, com ácido cítrico, de misturas de PVA com alginato ou PVA com pectina como é detalhado a seguir. Primeiramente, foi preparada uma dispersão pela mistura, na proporção de 1:1 (m/m), da solução de PVA (5%, 10%, 15% ou 20%, m/v) com a solução de um dos polímeros naturais, alginato (1% ou 2%, m/v) ou pectina (1%, 2%, 3% ou 4%, m/v). Essa dispersão ficou sob agitação magnética durante 30 minutos e, após esse período, adicionou-se uma quantidade de ácido cítrico que correspondia a 10% da massa total dos polímeros. Para a solubilização do ácido cítrico, empregou-se agitação por 10 minutos.

Posteriormente à solubilização do agente reticulante, 1 g da dispersão foi adicionado em béqueres de 10 mL, que neste trabalho, foram utilizados como molde. Esses permaneceram em estufa a 60°C durante 14 horas, para que houvesse a reticulação e secagem dos géis. Os hidrogéis secos foram, então, retirados do molde e cortados com lâmina de aço inox em formato apropriado para acoplamento nos dispositivos de extração (**Figura 9**).

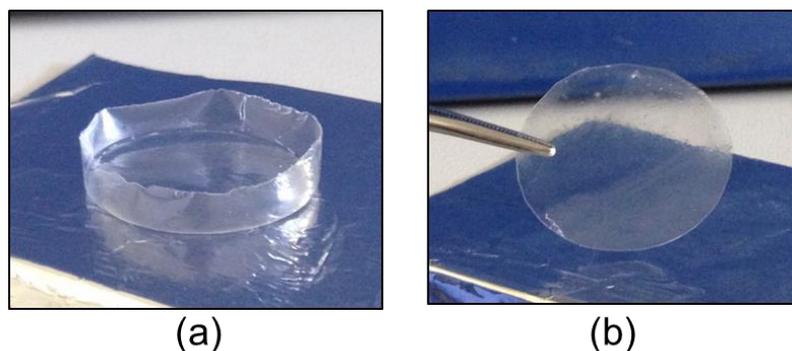


FIGURA 9: Hidrogel P5PC1 após ser retirado do molde (a) e cortado (b). P5PC1: PVA 5% (m/v) e pectina 1% (m/v).

Neste trabalho, avaliou-se hidrogéis com diferentes composições com relação ao polímero natural empregado (alginato ou pectina), à massa do disco de extração e à proporção entre os polímeros. Na **Tabela 7** são discriminadas as soluções empregadas na síntese de cada gel, bem como, a composição do gel seco.

TABELA 7: Composição dos discos de hidrogel estudados.

Disco de extração	Soluções dos polímeros		Composição do hidrogel seco*	
P5AL1	PVA 5% (m/v)	Alginato 1% (m/v)	83,33% PVA	16,67% Alginato
P10AL2	PVA 10% (m/v)	Alginato 2% (m/v)		
P5PC1	PVA 5% (m/v)	Pectina 1% (m/v)	83,33% PVA	16,67% Pectina
P10PC2	PVA 10% (m/v)	Pectina 2% (m/v)		
P15PC3	PVA 15% (m/v)	Pectina 3% (m/v)		
P20PC4	PVA 20% (m/v)	Pectina 4% (m/v)		
P5PC2	PVA 5% (m/v)	Pectina 2% (m/v)	71,43% PVA	28,57% Pectina
P10PC1	PVA 10% (m/v)	Pectina 1% (m/v)	90,91% PVA	9,09% Pectina
P10PC3	PVA 10% (m/v)	Pectina 3% (m/v)	76,92% PVA	23,08% Pectina
P15PC2	PVA 15% (m/v)	Pectina 2% (m/v)	88,24% PVA	11,76% Pectina

*Valores percentuais calculados com relação à massa total dos polímeros, desconsiderando a massa do agente reticulante.

4.3.10 Extração dos hormônios

Os hidrogéis, preparados segundo descrito no item 4.3.9.3, foram avaliados como fase extratora para a determinação dos hormônios estudados (E1, E2, EE2, E3, PRO e TES) em matrizes aquosas. Para os testes iniciais, estudou-se a composição do gel com relação ao polímero natural utilizado (alginato ou pectina), o aumento da massa dos discos de extração e a proporção entre os polímeros, empregando-se amostras de água ultrapura enriquecida com os analitos na concentração de 1 mg L⁻¹.

Como dispositivos de extração utilizou-se suportes reutilizáveis de policarbonato para filtro de membrana para ser acoplado em seringa, com diâmetro de 25 mm, dentro dos quais eram dispostos os discos de extração e uma membrana de celulose regenerada (0,45 µm) sobre cada um destes. Para o processo de extração fez-se o uso de um sistema *manifold* Visiprep (Supelco®), onde os dispositivos de extração foram posicionados e aos quais se acoplou uma seringa de 20 mL sem o embolo para que se pudesse verter a amostra. As extrações foram realizadas a pressão atmosférica. A **Figura 10** traz o dispositivo empregado juntamente com o sistema *manifold*.

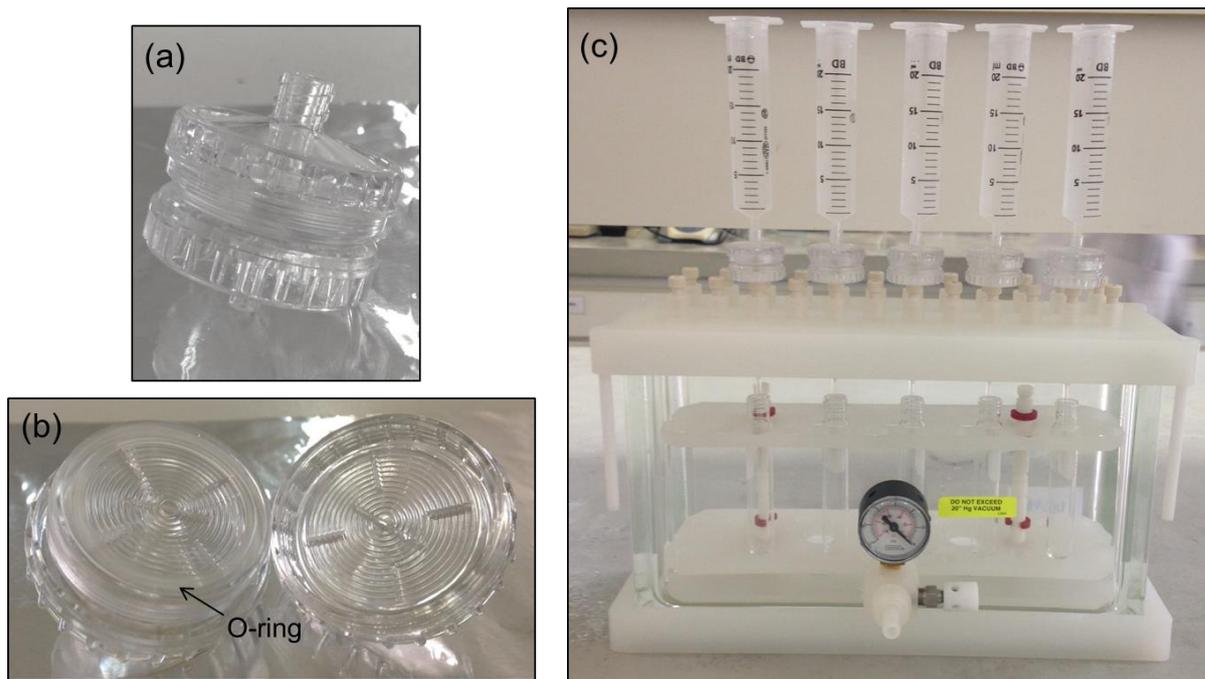


FIGURA 10: Dispositivo de extração fechado (a) e aberto (b) e sistema *manifold* (c).

Previamente ao procedimento de extração, os discos de hidrogel, já dispostos no suporte de filtro seringa juntamente com as membranas, foram hidratados, pela percolação de 10 mL de água ultrapura, e posicionados no sistema *manifold*. A extração consistiu então, na percolação de 100 mL de amostra pelo disco de extração, seguida da secagem do hidrogel no sistema *manifold* com vácuo por 1 hora, empregando-se uma bomba de vácuo (Tecnal® TE-0581). Para a dessorção dos analitos, os discos de extração foram retirados do suporte de filtro seringa e dispostos em vials de 2 mL contendo 1 mL de metanol. A dessorção ocorreu então, em banho ultrassônico durante 20 minutos. Por fim, o extrato foi seco em concentrador e reconstituído com 200 μ L de metanol, dos quais 150 μ L foram transferidos para um insert. Antes da injeção de 1 μ L de amostra no sistema GC-MS/MS esta passou pelo processo de derivatização.

4.3.11 Caracterização físico-química dos hidrogéis de PVA/pectina

Realizou-se a caracterização físico-química (grau de intumescimento, perda de água, espectroscopia de infravermelho e microscopia eletrônica de varredura) dos hidrogéis P5PC1, P10PC2, P15PC3, P20PC4, P15PC2 e PVA. Sendo o último preparado de forma semelhante aos demais (item 4.3.9.3), porém sem a presença de pectina. Assim, em uma solução de PVA 15% (m/v) adicionou-se uma quantidade

de ácido cítrico correspondente a 10 % da massa de PVA. Após a solubilização do agente reticulante, 1 g da solução foi adicionado em béqueres de 10 mL, os quais permanecerem em estufa a 60°C por 14 horas.

4.3.11.1 Grau de intumescimento

Para a determinação do grau de intumescimento (I%), amostras dos hidrogéis secos foram imersas em 30 mL de água ultrapura. Durante 300 minutos, mediram-se as massas dos géis intumescidos, para isso as amostras foram secas superficialmente com papel absorvente para a remoção do excesso de água. Calculou-se o grau de intumescimento de acordo com a equação a seguir.

$$I (\%) = \frac{M_t - M_0}{M_0} 100 \quad (1)$$

Onde, M_t corresponde a massa do hidrogel intumescido em um tempo t e M_0 refere-se a massa do hidrogel seco. O grau de intumescimento de cada gel foi determinado em triplicata.

4.3.11.2 Perda de água

Os ensaios de perda de água foram conduzidos, em triplicata, a temperatura ambiente (25°C) e sob refrigeração (4°C). Primeiramente, os hidrogéis foram hidratados, pela sua imersão em 30 mL de água ultrapura por 90 minutos, e secos com papel absorvente para a remoção do excesso de água. Então, durante 300 minutos, as massas dos géis foram medidas a cada 30 minutos. Calculou-se o percentual de perda de água através da equação abaixo.

$$\text{Perda de água (\%)} = \frac{M_{eq} - M_t}{M_{eq}} 100 \quad (2)$$

Onde, M_{eq} corresponde a massa do hidrogel no equilíbrio de intumescimento e M_t refere-se a massa do hidrogel em um tempo t .

4.3.11.3 Microscopia eletrônica de varredura

Para a análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV), os discos de hidrogel secos foram congelados com nitrogênio líquido e fraturados. Uma vez que não é um material condutor, foi necessário fazer a deposição de uma fina camada de ouro sobre suas superfícies. As amostras foram observadas por um microscópio eletrônico de varredura modelo JSM-6360LV (JOEL®), operando em 10 kV.

4.3.12 Otimização da extração em fase gel (GPE)

4.3.12.1 Otimização da eluição dos analitos

A etapa de eluição dos analitos foi estudada, de forma univariada, para a determinação das condições de compromisso com relação à natureza e volume de solvente, bem como, ao número de eluições. Os solventes avaliados foram metanol, acetato de etila e diclorometano. Selecionado o solvente, fez-se um estudo com relação ao volume de solvente (1 mL ou 2 mL) e ao número de eluições (1 a 6 eluições).

Neste momento, o procedimento de extração sofreu algumas alterações com relação ao que foi previamente apresentado no item 4.3.10, sendo realizado da seguinte forma: os discos de hidrogel foram posicionados nos dispositivos de extração, sem as membranas, e hidratados com 10 mL de água ultrapura. Para a extração, 100 mL de água ultrapura enriquecida com os hormônios ($500 \mu\text{g L}^{-1}$) e o padrão interno ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) foram percolados pelo disco de extração com auxílio de bomba de vácuo e vazão de 2 mL min^{-1} . Os hidrogéis foram secos com vácuo durante 30 minutos e posteriormente, eluiu-se os analitos da fase extratora com seis adições de 1 mL ou 2 mL de solvente e vazão de 1 mL min^{-1} . Cada um dos seis extratos foi coletado separadamente, seco e reconstituído com 200 μL de metanol, dos quais 150 μL foram encaminhados para a etapa de derivatização e posterior injeção no sistema GC-MS/MS.

4.3.12.2 Planejamento composto central: Extração

Realizou-se um estudo de otimização dos parâmetros envolvidos na GPE, com o propósito de definir as condições de compromisso a serem empregadas no

processo de extração para os fatores de pH, volume de amostra e vazão. Isso foi feito através de um planejamento composto central para três variáveis. A **Tabela 8** traz a relação dos fatores e níveis inferiores (-1), superiores (+1) e axiais (-1,68 e +1,68) empregados no planejamento fatorial completo 2^3 com quadruplicata do ponto central (0).

TABELA 8: Condições avaliadas no planejamento composto central.

Variável	Níveis				
	- 1,68	-1	0	+ 1	+ 1,68
pH	3,5	4,5	6,0	7,5	8,5
Volume de amostra/mL	66	100	150	200	234
Vazão/mL min ⁻¹	1,3	2	3	4	4,7

As extrações foram executadas segundo o procedimento descrito no item 4.2.12.1, com as condições de compromisso previamente determinadas para a etapa de eluição, e aplicando-se os diferentes níveis para cada uma das variáveis.

4.3.13 Reutilização dos discos de extração

A possibilidade de reutilização dos discos de extração também foi avaliada neste trabalho, para tal, um mesmo disco de hidrogel foi submetido a dez extrações realizadas em dois dias consecutivos. Para a extração, 100 mL de água ultrapura enriquecida com os hormônios ($500 \mu\text{g L}^{-1}$) e o padrão interno ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) foram percolados pelo disco de extração com auxílio de bomba de vácuo e vazão de 4 mL min^{-1} . Os hidrogéis foram secos com vácuo durante 30 minutos e posteriormente, eluiu-se os analitos da fase extratora com cinco adições de 1 mL de metanol sob vazão de 1 mL min^{-1} . Os extratos foram secos em concentrador e reconstituídos para 200 μL .

Entre cada extração, os discos de hidrogel foram lavados com 10 mL de água:metanol (1:1, v/v) seguidos de 10 mL de água ultrapura, para evitar o efeito de memória. Como as extrações foram conduzidas em dois dias, os dispositivos de extração contendo os hidrogéis foram armazenados imersos em água ultrapura a 4°C .

4.3.14 Análise dos parâmetros de mérito

Os parâmetros de mérito foram avaliados segundo as orientações do *Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis* (IUPAC, 2002).

4.3.14.1 Linearidade

A linearidade foi avaliada para o intervalo de concentração de 0,1 a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$. Para isso, água ultrapura enriquecida com os hormônios em diferentes concentrações, respeitando a faixa mencionada anteriormente, e o padrão interno (25 $\mu\text{g L}^{-1}$) foram extraídas e analisadas pelo sistema GC-MS/MS, no modo MRM, em triplicata.

4.3.14.2 Limite de quantificação

O limite de quantificação (LQ) foi estabelecido como sendo a menor concentração quantificável com precisão (RSD < 20%) e exatidão (entre 80 e 120%).

4.3.14.3 Precisão

Avaliou-se a precisão através de intraensaio e interensaio, sendo que para o primeiro foram realizadas extrações, em um mesmo dia, de água ultrapura enriquecida com os hormônios nas concentrações de 40 e 80 $\mu\text{g L}^{-1}$. Para o interensaio, água ultrapura enriquecida com os hormônios nas concentrações de LQ, 50 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ foram extraídas em três dias distintos. A precisão foi expressa em termos de desvio padrão relativo (RSD – *Relative Standard Deviation*). Neste estudo foi empregado um disco de hidrogel para cada extração.

4.3.14.4 Exatidão

Para a determinação da exatidão, água ultrapura enriquecida com os hormônios nas concentrações de LQ, 40 e 80 $\mu\text{g L}^{-1}$ foram extraídas em triplicata. A exatidão foi expressa pela razão entre a concentração medida experimentalmente e a concentração teórica. Neste trabalho, o parâmetro de recuperação foi avaliado como exatidão.

4.3.14.5 Repetibilidade

A repetibilidade da técnica foi avaliada por meio do desvio padrão relativo (RSD) obtido para cada hormônio no estudo de reutilização do disco de hidrogel (item 4.3.13). Para este estudo foram realizadas 10 extrações utilizando-se o mesmo disco de hidrogel.

4.3.14.6 Reprodutibilidade

A reprodutibilidade da técnica foi avaliada através dos ensaios de precisão (item 4.3.15.4), uma vez que as extrações realizadas empregaram discos de hidrogel distintos (não houve reutilização).

4.3.15 Aplicação

4.3.15.1 Área de estudo: rio Belém

Os recursos hídricos do município de Curitiba estão distribuídos em seis sub-bacias hidrográficas (Rio Atuba, Rio Belém, Rio Barigui, Rio Passaúna, Ribeirão dos Padilha e Rio Iguaçu), cuja qualidade encontra-se comprometida, devido ao crescimento da cidade que levou a uma ocupação desordenada do seu território. A partir da década de 60, houve um aumento populacional em Curitiba e na sua região metropolitana, decorrente do processo de migração da população rural para a área urbana, levando à ocupação irregular de áreas próximas a corpos hídricos, sujeitas a inundações e de proteção ambiental (IPPUC, 2007). Assim, as ocupações irregulares em conjunto com a dificuldade do município de absorver esse excedente populacional, que gera um descompasso no atendimento necessário de infraestrutura, principalmente com relação ao sistema de coleta de esgoto (ÁGUASPARANÁ, 2013), contribuíram com a degradação desses recursos hídricos. Por este motivo, esta região foi selecionada como ponto de estudo para comprovar a eficiência do método proposto neste trabalho.

O rio Belém é um dos principais rios de Curitiba, tendo 17,13 km de extensão, área de drenagem de 87,80 km², que equivale a aproximadamente 20% da área da cidade, 46 afluentes e alta densidade populacional. Esse rio nasce no bairro Cachoeira, corta a cidade no sentido de norte a sul e tem sua foz no rio Iguaçu, no

bairro Boqueirão, sendo então um dos afluentes da margem direita do rio Iguaçu (IPPUC, 2007). A **Figura 11** traz um mapa de localização da Bacia Hidrográfica do Rio Belém com os pontos de amostragem identificados.

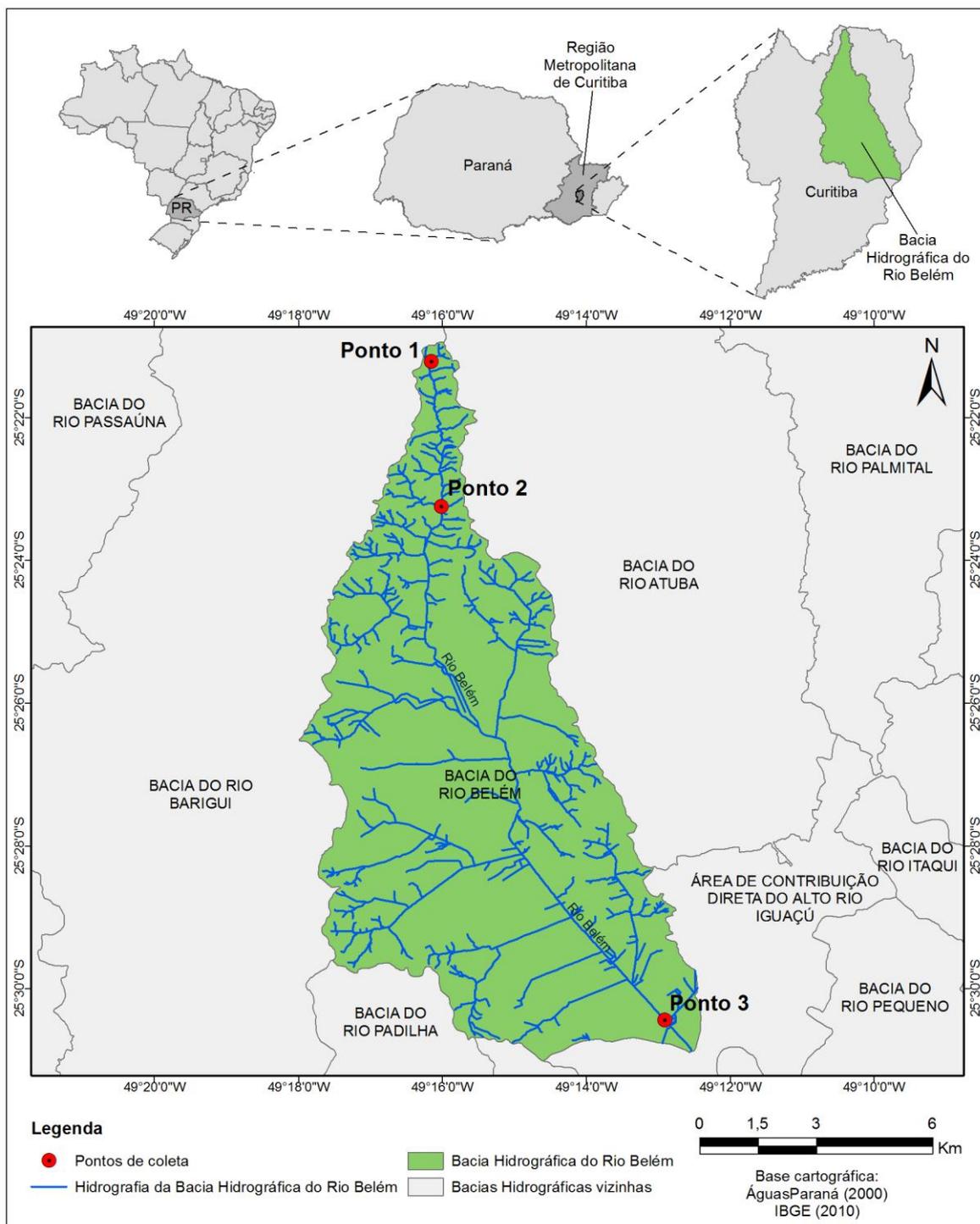


FIGURA 11: Pontos de amostragem na Bacia Hidrográfica do Rio Belém.
FONTE: Adaptado de ÁguasParaná (2000).

Devido à Bacia Hidrográfica do Rio Belém ser uma bacia urbana, esta sofre graves desequilíbrios ambientais, que são consequência de uma infraestrutura precária de esgotamento sanitário, ocupações irregulares em suas margens, descarte inadequado de lixo, desmatamento e alterações na forma original do rio, como o confinamento do seu leito e a impermeabilização do solo (IPPUC, 2007).

4.3.15.2 Extração de amostras reais

Foram coletadas amostras de águas do rio Belém em três pontos do seu curso, sendo o primeiro localizado a 500 m da nascente, próximo ao Parque das Nascentes do Belém. O segundo ponto, a 5,4 km da nascente, encontra-se ao lado do Parque São Lourenço, e o terceiro ponto de coleta está localizado a montante da ETE Belém. A **Tabela 9** traz a coordenadas geográficas de cada ponto amostrado.

TABELA 9: Localização geográfica dos pontos de coleta na Bacia Hidrográfica do Rio Belém.

Pontos de amostragem	Latitude	Longitude
1	25° 21' 13".407 S	49° 16' 08".964 W
2	25° 23' 15".380 S	49° 16' 00".365 W
3	25° 30' 26".753 S	49° 12' 54".156 W

*Sistema de Coordenadas Geográficas: *Datum* Horizontal SIRGAS 2000.

As amostras coletadas foram armazenadas em frascos de vidro âmbar de 4L previamente descontaminados. Para a remoção do material particulado, filtrou-se as amostras em membranas de fibra de vidro com diâmetro de poro de 0,45 µm. A extração dos analitos foi realizada em até 24 horas após a coleta das amostras, período no qual estas ficaram armazenadas em frascos de vidro âmbar a 4°C.

Anteriormente à extração, adicionou-se nas amostras o padrão interno para obter-se uma concentração final de 25 µg L⁻¹. A extração consistiu, então, na percolação de 100 mL de amostra pelo disco de extração, previamente hidratado, com auxílio de bomba de vácuo e vazão de 4 mL min⁻¹. Os hidrogéis foram secos com vácuo durante 30 minutos e posteriormente, eluiu-se os analitos da fase extratora com cinco adições de 1 mL de metanol e vazão de 1 mL min⁻¹. Os 5 mL de extrato foram secos e reconstituídos com 200 µL de metanol, sendo 150 µL transferidos para um insert para posterior derivatização e análise no sistema GC-MS/MS.

4.3.16 GPE x SPE

Com o propósito de comparar a eficiência da fase extratora empregada na GPE com aquelas utilizadas comercialmente na SPE, realizou-se a extração dos hormônios por diferentes fases de SPE. Foram avaliados os desempenhos de cartuchos de C18, Oasis HLB e Strata-X na extração dos hormônios esteroidais, E1, E2, TES, EE2, PRO e E3, presentes em matriz aquosa.

Primeiramente, todos os cartuchos foram condicionados com 5 mL de metanol seguidos por 5 mL de água ultrapura. Após, percolou-se 100 mL de água ultrapura enriquecida com os hormônios ($50 \mu\text{g L}^{-1}$) e o padrão interno ($25 \mu\text{g L}^{-1}$), com o auxílio de uma bomba de vácuo e vazão de 4 mL min^{-1} . Os cartuchos foram secos com vácuo durante 60 minutos. Os analitos foram eluídos com cinco adições de 1 mL de metanol e vazão de 1 mL min^{-1} . Os extratos foram secos em um concentrador de amostras e reconstituídos com 200 μL de metanol, dos quais 150 μL foram encaminhados para a etapa de derivatização, sendo posteriormente analisados pelo sistema GC-MS/MS. Desta forma, garantiu-se que as etapas de extração e dessorção fossem idênticas àquelas aplicadas na GPE, mesmo não representando necessariamente as condições otimizadas para cada uma das fases comerciais. Além da eficiência de extração, outros importantes parâmetros foram levados em consideração nesta comparação e serão apresentados na seção 5.11.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SELEÇÃO DO AGENTE DERIVATIZANTE

5.1.1 Acilação

A avaliação do desempenho da reação de acilação não foi possível de ser realizada, devido à dificuldade de identificação dos produtos da reação pela técnica de GC-MS. Isso porque, a biblioteca utilizada, *Nist 05*, não possui os espectros de massa dos produtos da acilação dos analitos (E1, E2, EE2, E3, PRO e TES), de forma que a interpretação manual dos espectros deveria ser feita. No entanto, problemas de sangramento da coluna, juntamente com a possível presença de subprodutos da reação, impossibilitaram a identificação dos compostos de forma inequívoca. Desta forma, a utilização do anidrido acético como agente de derivatização foi descartada.

5.1.2 Sililação

Os produtos da sililação dos analitos E1, E2, EE2, E3 e TES foram facilmente identificados pela técnica de GC-MS/MS, uma vez que a biblioteca *Nist 05* apresenta os espectros de massa dos produtos da trimetilsililação desses hormônios, os quais são bem característicos, sempre contendo o íon de m/z igual a 73 que corresponde ao TMS. A PRO também foi identificada, porém em sua forma não derivatizada, pois sua molécula não contém hidrogênios ativos, mas apenas grupos cetona.

Para a seleção do agente derivatizante mais adequado, compararam-se as áreas médias dos picos cromatográficos obtidas para cada hormônio após sua derivatização, em triplicata, com os reagentes: BSTFA:1%TMCS, MSTFA e MSTFA:0,1% TMSI. Alguns dos analitos, como o E2, o EE2 e o E3, possuem mais de um hidrogênio ativo em sua estrutura, podendo haver a formação de múltiplos produtos de TMS, devido à ocorrência de reações incompletas. Por exemplo, para o E2 e o EE2, que apresentam dois hidrogênios ativos em suas moléculas, pode ocorrer a formação de produtos mono e dissubstituídos, já para o E3, que possui três hidrogênios ativos, produtos mono, di e trisubstituídos podem ser formados. Quando isso acontece, deve-se considerar as áreas de picos obtidas para todos os produtos

de sililação, o que precisou ser feito quando empregou-se os reagentes BSTFA:1%TMCS e MSTFA.

A **Tabela 10** mostra a média, a estimativa do desvio padrão e o desvio padrão relativo (RSD) encontrados para cada um dos hormônios (E1, E2, EE2, E3, PRO e TES) em função do agente de sililação empregado.

TABELA 10: Resultados obtidos para cada um dos hormônios empregando-se os agentes de sililação: BSTFA:1%TMCS, MSTFA E MSTFA:0,1%TMSI.

Agente Derivatizante		E1	E2	EE2	E3	PRO	TES
BSTFA: 1%TMCS	Média/10 ⁷	15,4	21,8	9,71	25,6	7,53	13,1
	Desvio padrão/10 ⁷	10,8	15,0	7,13	17,8	5,34	9,54
	RSD/%	70,1	68,9	73,4	69,4	70,9	72,7
MSTFA	Média/10 ⁷	11,8	18,9	12,6	22,5	5,45	9,41
	Desvio padrão/10 ⁷	5,15	8,21	6,77	9,76	2,38	4,32
	RSD/%	43,5	43,5	53,8	43,4	43,7	45,9
MSTFA: 0,1%TMSI	Média/10 ⁷	18,4	29,6	26,8	35,6	10,2	18,1
	Desvio padrão/10 ⁷	1,09	3,16	3,10	3,67	1,63	2,23
	RSD/%	5,9	10,7	11,6	10,3	16,1	12,3

A partir dos resultados obtidos fez-se a análise de variância (ANOVA) de fator único para cada um dos compostos estudados. Dentre os seis hormônios, apenas para o 17 α -etinilestradiol ($F_{\text{calc}} = 7,11$) houve diferença significativa entre os agentes de sililação para um nível de confiança de 95% ($F_{95\%} = 5,14$).

Tanto o BSTFA:1%TMCS quanto o MSTFA apresentaram valores extremamente altos para o RSD, de forma que o único reagente que obteve uma reprodutibilidade aceitável foi o MSTFA:0,1%TMSI, cujas áreas dos picos cromatográficos foram as mais intensas. Os valores altos das estimativas do desvio padrão contribuíram com o resultado da ANOVA, que indicou a inexistência de uma diferença significativa entre as áreas de pico. Isso é devido ao valor de F calculado, na análise de variância, ser obtido pela razão entre as médias quadráticas do fator e do resíduo (MQF/MQR). Se a estimativa do desvio é alta, o valor de F calculado será pequeno, sendo neste caso, menor que o F tabelado, indicando que não há diferença significativa entre os agentes de sililação.

O gráfico da **Figura 12** apresenta as áreas médias dos picos cromatográficos para cada esteroide em função do agente derivatizante.

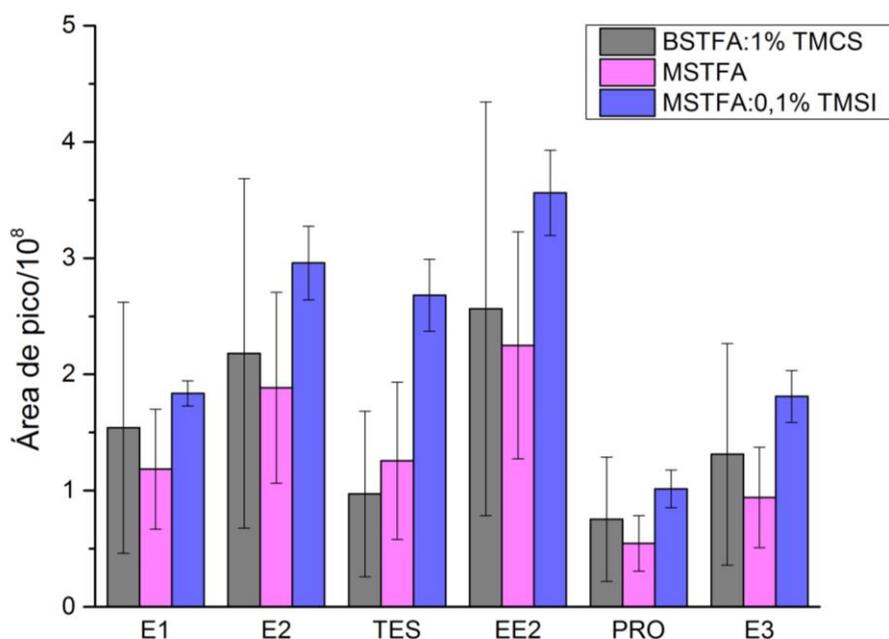


FIGURA 12: Áreas médias dos picos cromatográficos dos hormônios de acordo com o agente de silição empregado.

Tanto o BSTFA:1%TMCS como o MSTFA formaram múltiplos produtos, o que de acordo com a literatura (SEGURA; VENTURA; JURADO, 1998; ZUO; ZHANG, K.; LIN, 2007) acarreta em menores sensibilidade e precisão. Então, como o MSTFA:0,1%TMSI permitiu a obtenção de maiores áreas de pico e precisões, esse agente de silição mostrou-se mais adequado aos hormônios alvos.

5.2 OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE DERIVATIZAÇÃO

A determinação dos hormônios esteróides necessária para a otimização do processo de derivatização, foi realizada em um sistema GC-MS/MS no modo *Full Scan* com intervalo de razão m/z de 60 a 550. A corrida cromatográfica empregada foi otimizada, resultando em uma análise de 13 min. A **Tabela 11** apresenta as massas molares dos hormônios derivatizados, o número de grupos TMS (m/z 73) adicionados às moléculas após etapa de derivatização, juntamente com seus tempos de retenção e valores de m/z dos seus íons principais.

TABELA 11: Massas molares, tempos de retenção e principais íons do espectro de massas dos analitos sililados.

Analito	MM do analito não derivatizado/ g mol ⁻¹	Número de grupos TMS adicionados	MM do analito derivatizado/ g mol ⁻¹	Tempo de retenção/ min	Principais íons do espectro de massas (m/z)
E1	270	1	342	7,27	342, 257, 218, 285
E2	272	2	416	7,52	416, 285, 326, 129
TES	288	1	360	7,74	129, 270, 226, 360
EE2	296	2	440	8,47	425, 285, 232, 196
PRO	314	0	314	9,09	124, 229, 272, 314
E3	288	3	504	9,29	311, 296, 504, 345

MM: massa molar; TMS: grupo trimetilsilano; E1: estrona; E2: 17 β -estradiol; TES: testosterona; EE2: 17 α -etinilestradiol; PRO: progesterona; E3: estriol.

Quando um composto é submetido ao processo de derivatização há um aumento na sua massa molecular e, conseqüentemente, no valor da razão m/z do seu íon molecular. No caso da trimetilsililação, isso é decorrente da substituição dos hidrogênios ativos, de m/z 1, por grupos TMS, de m/z 73, o que leva ao aumento da massa molecular em 72 unidades (**Tabela 11**). Assim, por exemplo, os analitos E1 e TES, que possuem apenas um hidrogênio ativo, sofrem um acréscimo de 72 unidades em suas massas moleculares. Já, E2 e EE2, que possuem dois hidrogênios ativos, tem um aumento de 144 unidades, enquanto que para o E3, cuja molécula contém três hidrogênios ativos, o aumento é de 216 unidades. A PRO não tem a massa molecular alterada, uma vez que não possui hidrogênios ativos em sua estrutura, fato que impossibilita sua sililação.

5.2.1 Planejamento fatorial para a determinação das condições de compromisso

A fim de se obter uma reação de sililação com alta eficiência, aplicou-se um planejamento fatorial completo 2³ com triplicata do ponto central, onde os fatores investigados foram: temperatura (40 e 60 °C), tempo de reação (30 e 60 min) e volume de agente derivatizante (30 e 50 μ L). A **Tabela 12** apresenta a matriz do planejamento, contendo os valores médios das áreas dos picos cromatográficos para cada um dos seis hormônios, cujos ensaios foram realizados em duplicata.

TABELA 12: Resultados do primeiro planejamento fatorial 2^3 para os fatores de temperatura, tempo de reação e volume de agente derivatizante.

Ensaio	T	t	V	Área do pico cromatográfico/ 10^3 *					
				E1	E2	TES	EE2	PRO	E3
1	-	-	-	1037,4	1827,4	711,6	1193,7	342,7	2370,4
2	+	-	-	3104,2	4604,8	2557,5	3842,4	1549,1	5877,9
3	-	+	-	1289,1	2262,0	872,5	1511,3	424,6	2937,5
4	+	+	-	1201,3	1985,0	1053,4	1472,7	642,8	2408,1
5	-	-	+	1226,0	2138,7	776,2	1423,8	371,8	2752,6
6	+	-	+	4097,1	5824,8	3372,0	5073,7	2077,9	7202,7
7	-	+	+	92,4	284,2	30,3	61,0	2,7	273,8
8	+	+	+	2139,2	3343,4	1596,6	2561,7	875,5	4284,1
9	0	0	0	63,7	213,6	23,1	42,2	0	198,3

* Médias aritméticas das áreas dos picos cromatográficos (n = 2). T: temperatura; t: tempo de reação; V: volume de agente derivatizante.

A PRO não apresentou pico cromatográfico para nenhum dos ensaios de triplicata do ponto central, onde as condições utilizadas não foram favoráveis a nenhum dos hormônios. Ao se observar os resultados, nota-se que as maiores áreas de pico foram obtidas nos ensaios 2 e 6, os quais possuem como condições em comum o emprego do nível superior para a temperatura, 60 °C, e do nível inferior para o tempo, 30 min., havendo divergência apenas no volume de MSTFA:0,1%TMSI.

Então, avaliaram-se os efeitos principais de cada fator e das suas interações, para que as melhores condições fossem determinadas e a partir destas se construísse um novo planejamento fatorial. A **Figura 13** mostra os gráficos de Pareto com os valores absolutos dos efeitos para os seis hormônios. Os efeitos, principais e de interação, significativos foram aqueles que apresentaram valores superiores à estimativa do desvio do efeito associada ao valor de t de student para um nível de confiança de 95% ($t_{95\%} = 2,306$; $\nu = 8$), a qual é representada nos gráficos pela linha em vermelho.

Observa-se que todos os efeitos principais foram significativos, com exceção do volume de agente derivatizante para o E3, sendo a temperatura o fator mais influente. Tanto o aumento da temperatura quanto do volume proporciona um ganho na intensidade do pico, porém o primeiro leva a uma resposta consideravelmente maior. Outro fator importante, que não deve ser ignorado, é o tempo de reação, uma vez que o seu aumento acarreta em um efeito negativo e de grandeza semelhante ao efeito da temperatura. Os efeitos de interação de segunda e terceira ordem também foram significativos, apresentando valores superiores à estimativa do desvio

do efeito para um nível de confiança de 95%, indicando, assim, que os fatores estudados não devem ser avaliados separadamente.

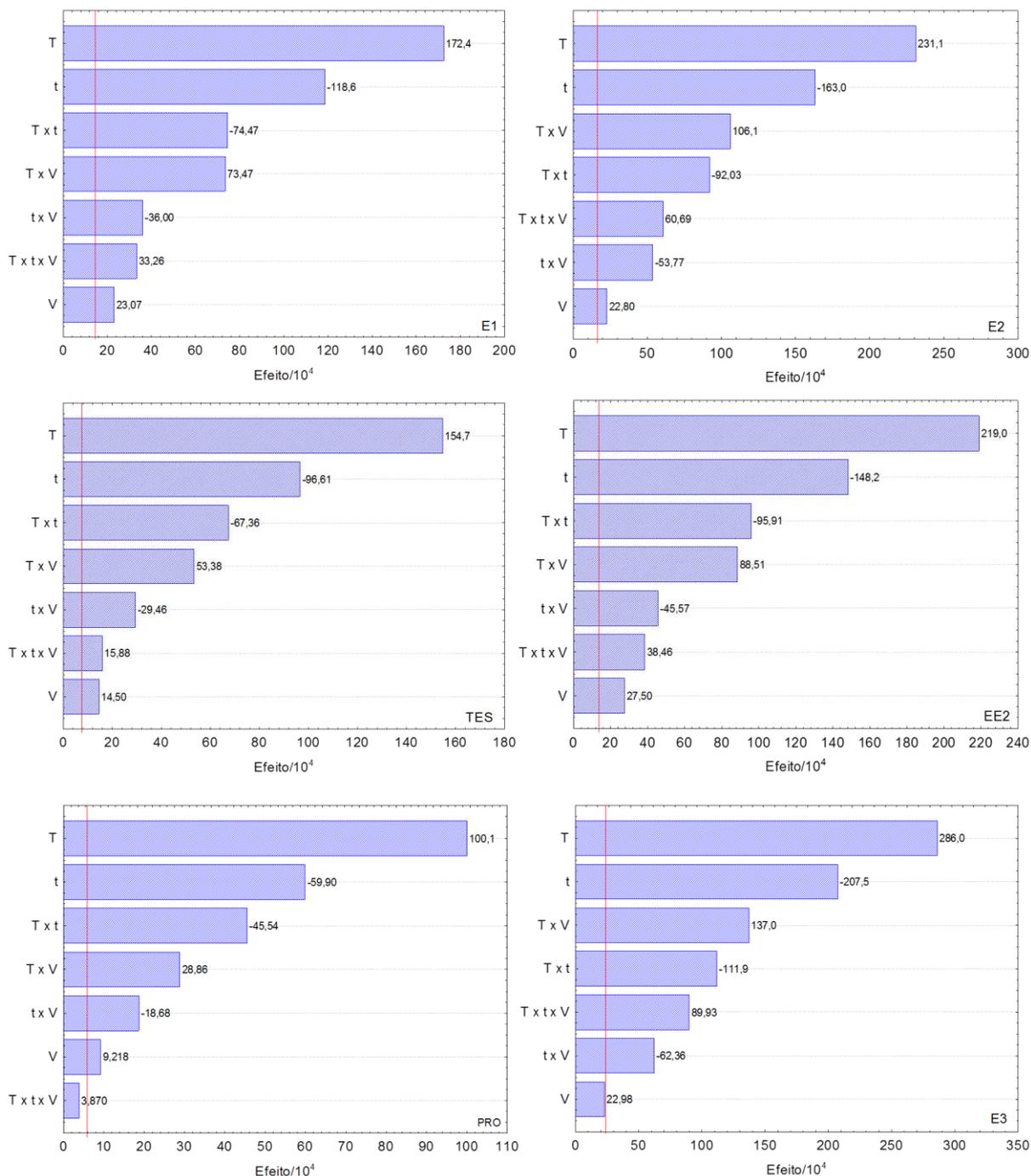


Figura 13: Gráficos de Pareto para os efeitos obtidos no primeiro planejamento fatorial 2^3 . T: temperatura; t: tempo de reação; V: volume de agente derivatizante.

A **Figura 14** traz um gráfico que apresenta a variação das respostas de acordo com os níveis dos três fatores estudados, somente para E1, uma vez que os seis hormônios apresentaram comportamento semelhante.

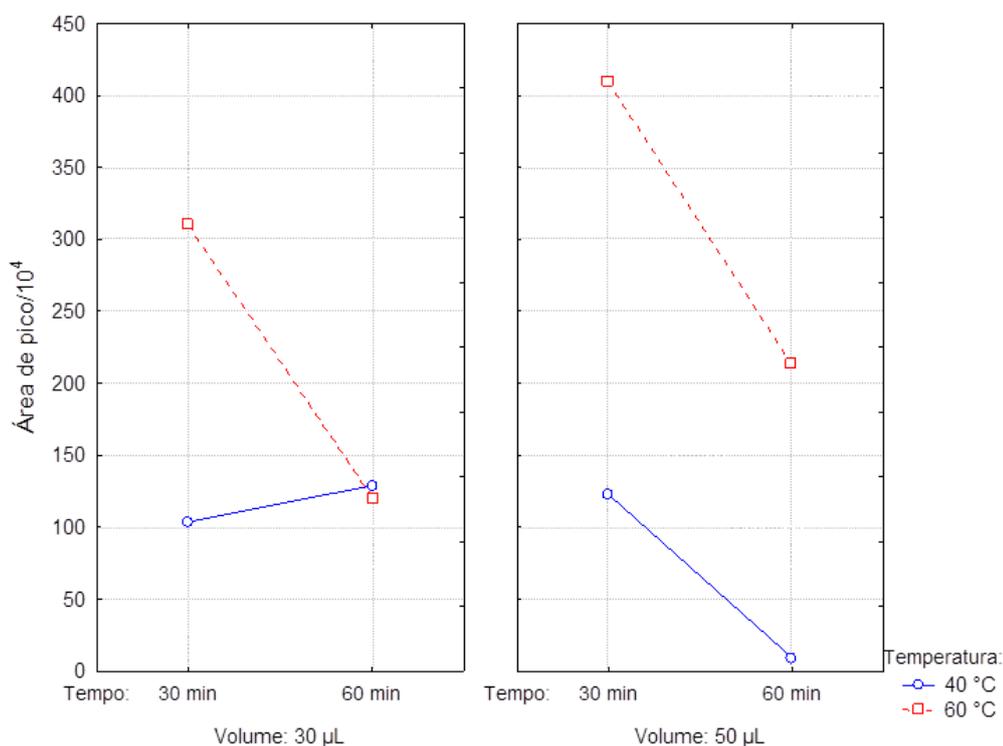


FIGURA 14: Variação das respostas com os níveis dos três fatores do primeiro planejamento fatorial 2^3 para a estrona.

Ao analisar os gráficos da **Figura 14**, nota-se que, para o volume de 30 µL, o aumento do tempo de reação de 30 min para 60 min levou a uma redução da área de pico para a temperatura de 60 °C. Já, quando empregada a temperatura de 40 °C, o que ocorre é um aumento na área de pico ao passar do nível (-) para (+) do fator tempo de reação. Todavia, empregando-se um volume maior de agente derivatizante (50 µL), há redução na área de pico, para ambas as temperaturas empregadas, quando se aumenta o tempo de reação, sendo isso mais pronunciado (maior inclinação da reta) para a temperatura de 60 °C. Assim, essa diferença de comportamento das respostas evidencia a presença dos efeitos de interação de terceira ordem.

Através dos resultados obtidos para o planejamento fatorial, percebe-se que o uso de maiores temperaturas durante um tempo longo de reação não é benéfico à eficiência da reação, sendo um possível motivo disso, a perda dos analitos por evaporação. Então, com base nesses resultados, foi proposto um segundo planejamento fatorial 2^3 com triplicata do ponto central, onde a temperatura de 60 °C foi utilizada como nível inferior, uma vez que o aumento desse fator mostrou-se benéfico para a reação, enquanto que o tempo de reação de 30 min foi fixado como

nível superior, já que, ao contrário da temperatura, o seu aumento afetou a eficiência da reação de forma negativa. Como foram atingidos resultados satisfatórios para os ensaios 2 e 6, que divergiram em relação ao volume de MSTFA:0,1%TMSI utilizado, para o segundo planejamento fatorial foram mantidos os níveis inferior (30 μ L) e superior (50 μ L) do fator volume. A matriz experimental do segundo planejamento é apresentada na **Tabela 14**.

TABELA 13: Resultados do segundo planejamento fatorial 2^3 para os fatores de temperatura, tempo de reação e volume de agente derivatizantes.

Ensaio	T	t	V	Área do pico cromatográfico/ 10^4 *					
				E1	E2	TES	EE2	PRO	E3
10	-	-	-	55,8	133,4	32,4	52,9	17,4	175,6
11	+	-	-	61,8	135,3	35,3	61,6	19,9	178,7
12	-	+	-	49,5	121,1	28,0	46,1	14,6	162,8
13	+	+	-	60,2	131,3	34,4	59,4	19,5	169,6
14	-	-	+	43,1	105,2	23,5	38,5	11,0	133,0
15	+	-	+	77,4	160,3	46,8	79,5	25,5	203,3
16	-	+	+	34,2	82,8	17,7	28,4	9,3	102,2
17	+	+	+	99,7	190,6	63,4	105,0	37,0	242,6
18	0	0	0	50,9	118,9	27,0	46,2	13,6	153,1

* Médias aritméticas das áreas dos picos cromatográficos (n = 2).

T: temperatura; t: tempo de reação; V: volume de agente derivatizante.

No segundo planejamento, os ensaios 11, 15 e 17 apresentaram os melhores resultados, confirmando a importância do fator temperatura. Sendo reportado na literatura (BASHEER *et al.*, 2005), que a utilização de baixas temperaturas pode levar a uma reação de silição incompleta. Os gráficos da **Figura 15** trazem os valores absolutos dos efeitos principais e de interação para os seis hormônios. Os efeitos que foram significativos apresentaram valores superiores à estimativa do desvio do efeito associada ao valor de t de student para um nível de confiança de 95% ($t_{95\%} = 2,306$; $v = 8$), sendo essa representada nos gráficos pela linha em vermelho. Apenas os efeitos da temperatura e da interação da temperatura com o volume foram significativos, para a faixa de valores estudados.

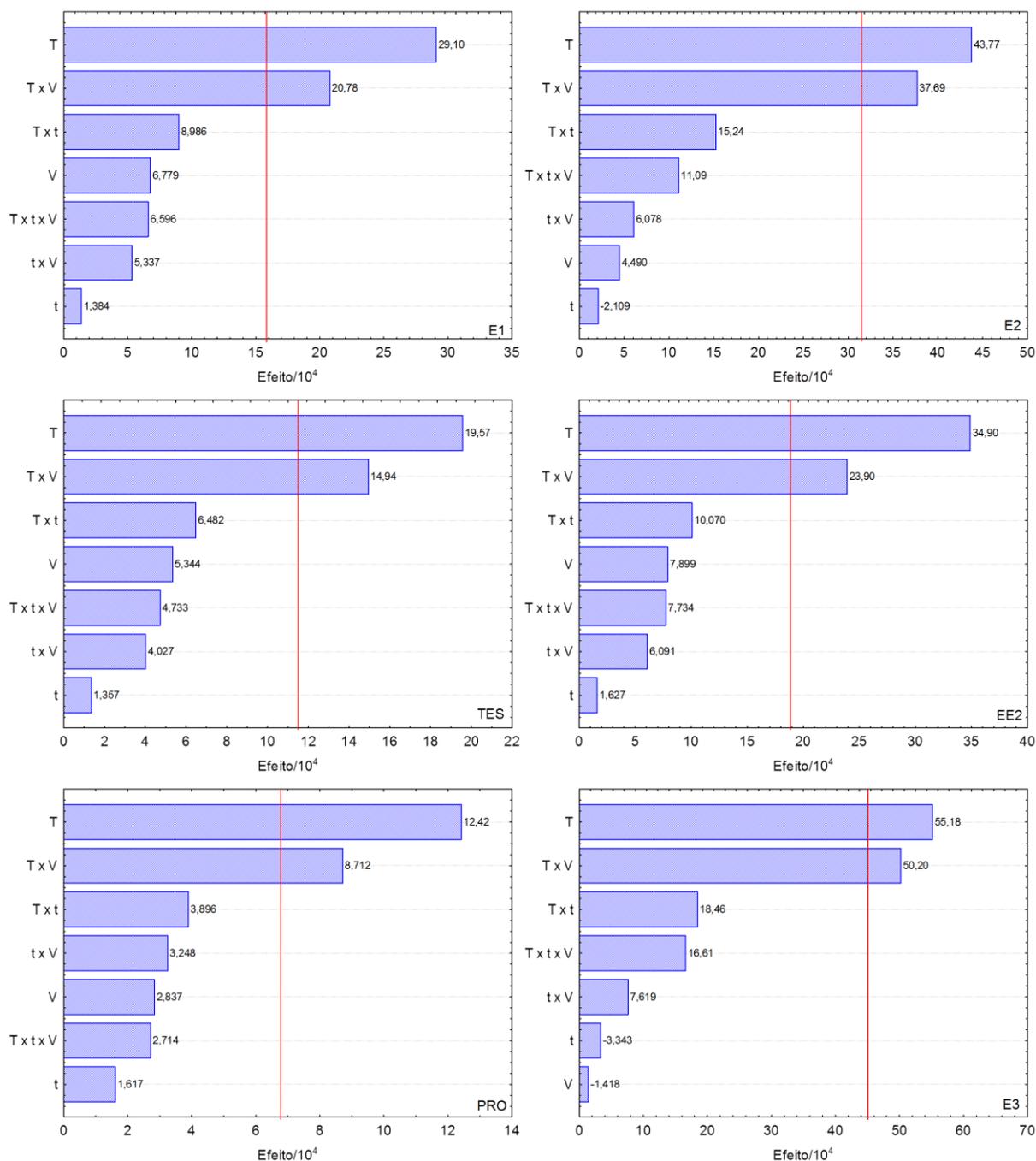


Figura 15: Gráficos de Pareto para os efeitos obtidos no segundo planejamento fatorial 2^3 . T: temperatura; t: tempo de reação; V: volume de agente derivatizante.

A **Figura 16** traz um gráfico representando a variação das respostas para os níveis dos fatores temperatura e volume, uma vez que apenas o efeito de interação de segunda ordem temperatura x volume foi significativo, somente para E1, devido aos seis hormônios apresentarem comportamento semelhante.

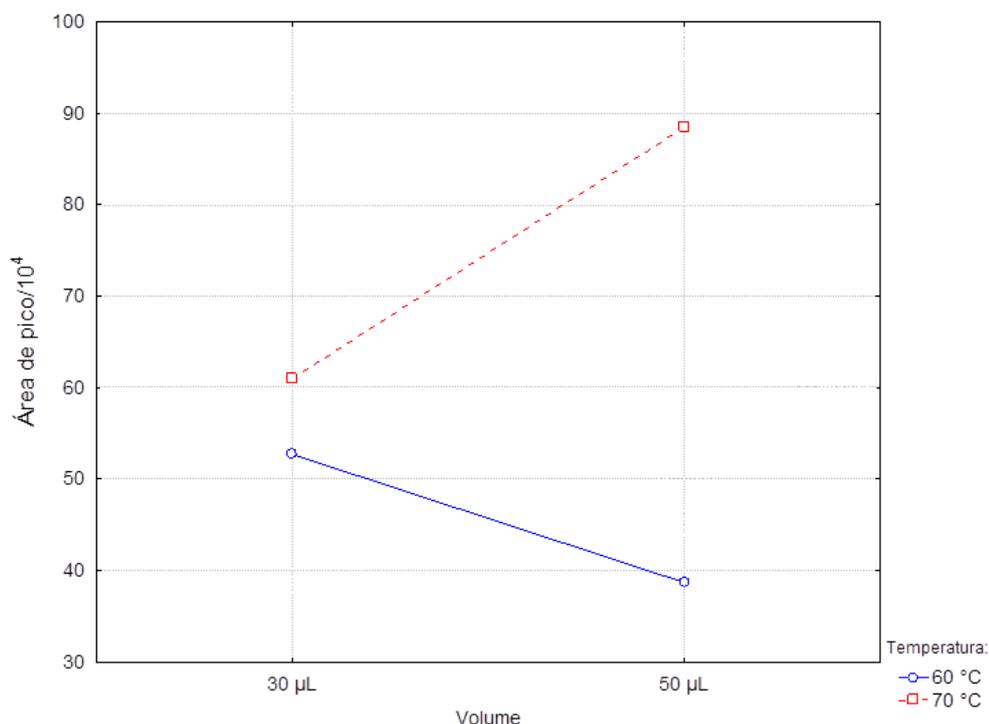


FIGURA 16: Variação das respostas com os níveis dos fatores temperatura e volume do segundo planejamento fatorial 2^3 para a estrona.

Nota-se, na **Figura 16**, que para a temperatura de 70°C, há um aumento significativo na área de pico ao passar do nível (-) para o (+) do fator volume de agente derivatizante. Entretanto, na temperatura de 60°C, o que ocorre é uma redução na área de pico, quando se aumenta o volume do agente derivatizante. Essa diferença nas inclinações das retas, apresentadas no gráfico da **Figura 16**, demonstra a existência do efeito de interação de segunda ordem entre a temperatura e o volume de agente derivatizante. Comprovando mais uma vez a necessidade de avaliar os parâmetros reacionais de forma multivariada, uma vez que a análise univariada pode impossibilitar a determinação das condições ótimas de reação.

Então, devido a ambos os ensaios realizados a temperatura de 70 °C terem apresentado resultados satisfatórios, aliado ao interesse de que a reação fosse rápida e utilizasse um volume menor de reagente sem prejudicar o rendimento da reação, as condições de compromisso estabelecidas para a temperatura, o tempo de reação e o volume de agente derivatizante foram 70 °C, 30 min e 30 µL, respectivamente.

5.2.2 Avaliação da etapa de secagem da amostra

O procedimento de derivatização, mesmo após sua otimização, era moroso devido ao tempo gasto para secar as amostras, uma etapa necessária visto que a solução de trabalho dos analitos é em metanol, um solvente prótico, que pode competir com os analitos pela substituição dos hidrogênios ativos pelo TMS.

A princípio, as amostras eram secas em um sistema de fluxo de N₂, com capacidade para três amostras, cujo processo tinha duração de 1h10min para cada conjunto de três amostras. No entanto, devido à quantidade de amostras analisadas ser normalmente superior à capacidade desse sistema, avaliou-se o procedimento de secagem das amostras em forno, com controle preciso de temperatura, a 80 °C. Este procedimento teve duração de 50 min, e tem como vantagem uma capacidade de amostras muito maior que o sistema de fluxo de N₂.

O gráfico da **Figura 17** traz os resultados obtidos para cada esteroide em função do processo empregado na secagem da amostra.

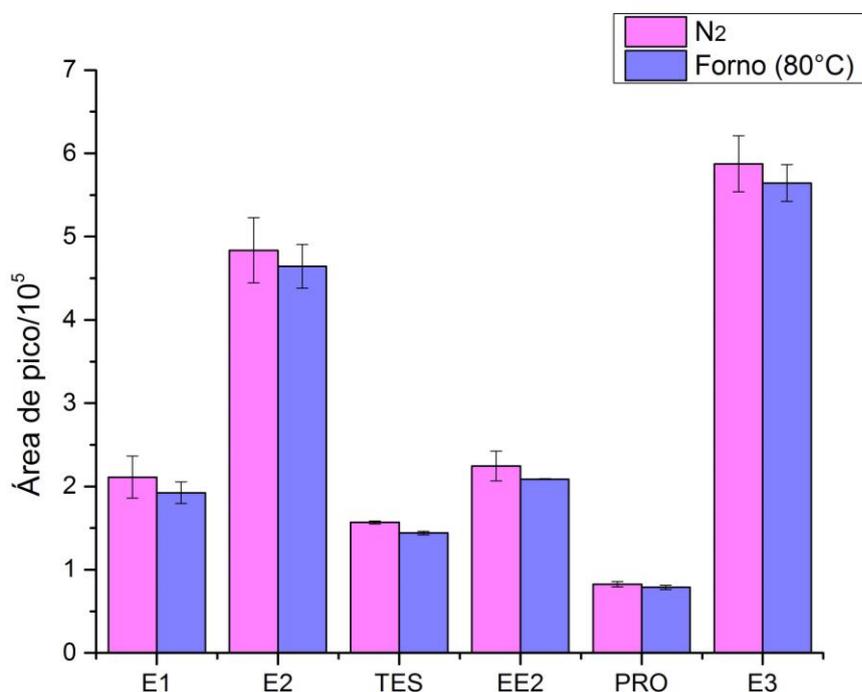


Figura 17: Áreas médias dos picos cromatográficos para cada hormônio de acordo com o processo de secagem empregado.

Através dos testes F e t, para um nível de confiança de 95%, pôde-se constatar que não houve diferenças significativas entre as precisões e as áreas de pico, respectivamente, das metodologias empregadas para esta etapa de secagem. Assim, a evaporação do solvente passou a ocorrer em um forno a 80 °C, que

comporta um número maior de amostras e requer um tempo menor para a completa evaporação do metanol em comparação ao sistema de fluxo de N₂.

5.2.3 Derivatização do 17 α -etinilestradiol

Como mencionado previamente, deve-se ter atenção quando é feita a determinação dos hormônios E1 e EE2 simultaneamente, uma vez que o último quando submetido à reação de silição pode converter-se ao produto de derivatização do E1 (TMS-E1), gerando um falso positivo para o E1 e um falso negativo para o EE2. Diversos autores (SHAREEF *et al.*, 2004; ZHANG, K.; ZUO, 2005; SHAREEF; ANGOVE; WELLS, 2006; MIGOWSKA *et al.*, 2012) já reportaram a ocorrência dessa conversão ao empregar agentes de derivatização como o BSTFA:1%TMSI e o MSTFA, tanto na ausência quanto na presença de solventes como acetato de etila, diclorometano e acetonitrila.

A formação de TMS-E1 ocorre quando a reação de silição do EE2 é incompleta, uma vez que este apresenta uma hidroxila com impedimento estérico e assim, requer condições reacionais mais rigorosas, como o emprego de catalisadores. Nessa situação é formado o produto de silição monosubstituído do EE2 (mono-TMS EE2), o qual pode vir a sofrer degradação, no injetor ou durante a corrida cromatográfica, formando o TMS-E1 (STRECK, 2009). A **Figura 18**, apresentada a seguir, exemplifica esse processo.

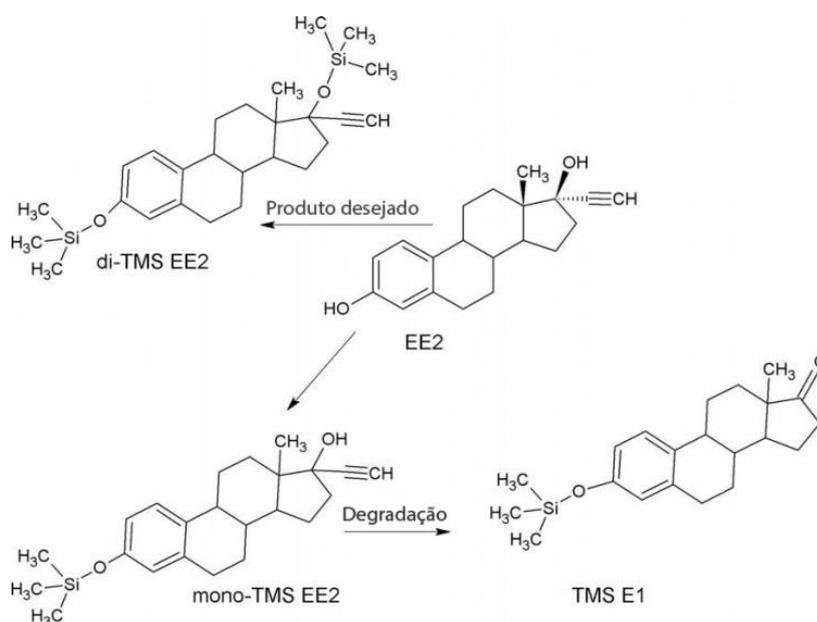


FIGURA 18: Potenciais produtos da silição com TMS do EE2.
 FONTE: Streck (2009)

Então, primeiramente, avaliou-se a silição do EE2 com o MSTFA contendo o catalisador TMSI nas concentrações de 0,1% e 1% (v/v). A média das áreas dos picos cromatográficos ($n = 2$) obtida para a concentração de 1% foi aproximadamente 2,5 vezes superior àquela obtida para a concentração de 0,1%. Desta maneira, pelo incremento de área de pico obtido, passou-se a utilizar uma concentração maior de catalisador (1% de TMSI).

Também foi investigado o comportamento do EE2 quando a silição é realizada empregando-se os reagentes: BSTFA:1%TMCS, MSTFA, MSTFA:1%TMSI no extrato seco, MSTFA:1%TMSI na presença de acetato de etila e MSTFA:1%TMSI na presença de diclorometano (**Figura 19**).

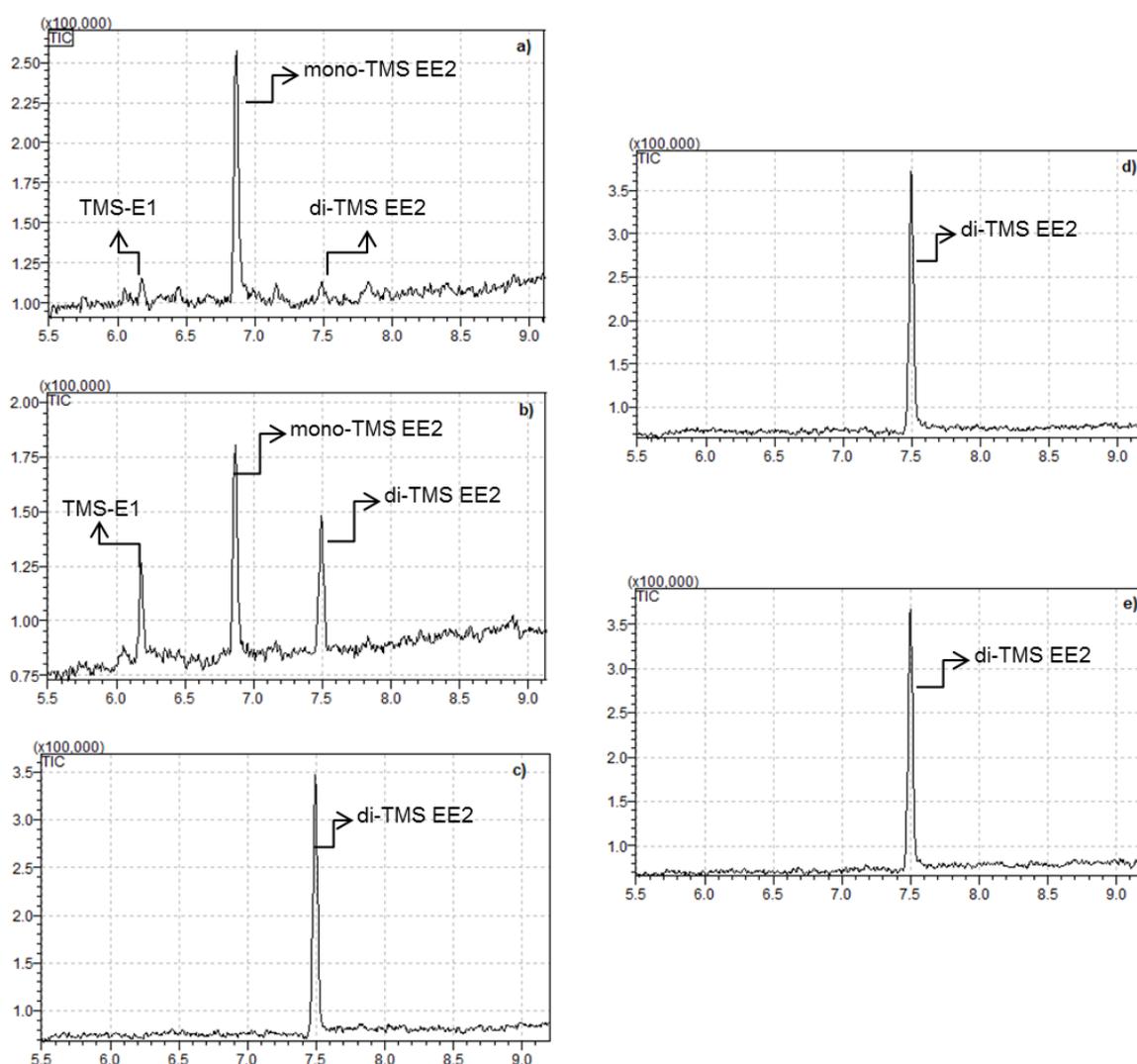


FIGURA 19: Cromatogramas obtidos para o produto de silição do EE2. (a) BSTFA:1%TMCS; (b) MSTFA; (c) MSTFA:1%TMSI no extrato seco; (d) MSTFA:1%TMSI em acetato de etila; (e) MSTFA:1%TMSI em diclorometano.

*As condições cromatográficas empregadas são descritas no item 4.3.2.

Para o BSTFA:1%TMCS, foi identificada a formação dos produtos TMS-E1, mono-TMS EE2 e di-TMS EE2, sendo que o primeiro e o último em quantidades bem menores do que o mono-TMS EE2. O MSTFA puro também produziu TMS-E1, mono-TMS EE2 e di-TMS EE2, porém quando o catalisador TMSI passa a ser utilizado esse problema é resolvido, pois há a formação apenas do produto di-TMS EE2, mesmo na presença dos solventes acetato de etila e diclorometano, garantindo seletividade à etapa de derivatização.

A relevância desses últimos resultados pode ser justificada pela possibilidade de se evitar a etapa de secagem da amostra, realizando a reação de sililação na presença do acetato de etila e do diclorometano. Além disso, a formação de apenas um produto de derivatização garante maior detectabilidade e precisão, como mencionado anteriormente.

5.3 COMPARAÇÃO DO DESEMPENHO CROMATOGRÁFICO DOS HORMÔNIOS NA SUA FORMA DERIVATIZADA E NÃO DERIVATIZADA

A fim de se averiguar o efeito da reação de derivatização na determinação dos hormônios por GC, realizou-se a análise, em duplicata, de amostras submetidas ou não ao processo de derivatização. Os cromatogramas obtidos podem ser visualizados na **Figura 20**, onde nota-se a melhora da resolução dos picos cromatográficos quando é empregada a reação de sililação com as condições de compromisso previamente estabelecidas e, mais intensamente, o incremento de detectabilidade, sendo na ordem de 10 vezes maior.

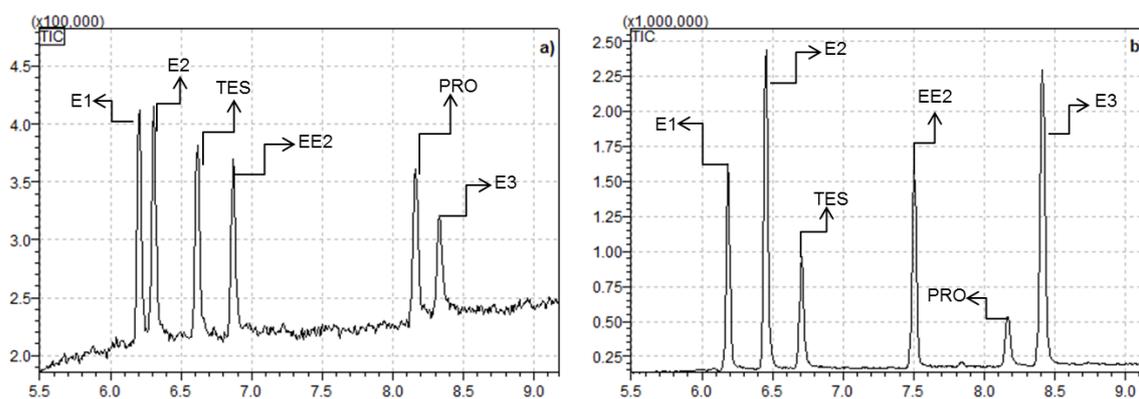


FIGURA 20: Cromatogramas da determinação dos hormônios nas suas formas não derivatizada (a) e derivatizada com MSTFA:1%TMSI (b).

Modo de registro de íons: *Scan*.

*As condições cromatográficas empregadas são descritas no item 4.3.2.

O aumento significativo na intensidade dos picos, em termos de área, para os hormônios na sua forma derivatizada e não derivatizada, é representado na **Figura 21**.

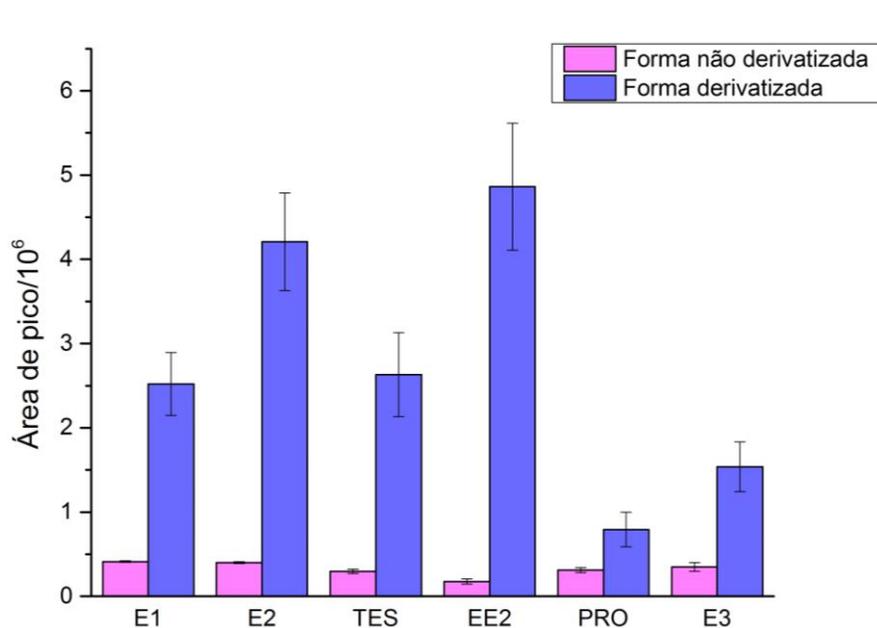


FIGURA 21: Áreas médias dos picos cromatográficos dos hormônios na sua forma derivatizada e não derivatizada.

Através dos testes F e t, constatou-se que para um nível de confiança de 95% ($F_{95\%} = 161,4$; $t_{95\%} = 4,303$) não há diferenças significativas entre as precisões e as metodologias para a PRO ($F_{\text{calc}} = 46,8$; $t_{\text{calc}} = 3,312$), o que não surpreende uma vez que esse hormônio não sofre sililação. De forma que, a diferença entre as áreas de pico da progesterona observada no gráfico da **Figura 21**, é atribuída às razões sinal/ruído e não à reação de derivatização. A PRO é um hormônio esteroide que contém apenas grupos cetona em sua estrutura, de forma que a sililação não é capaz de reduzir a sua polaridade.

5.4 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO MRM

Para a otimização do método MRM, primeiramente foi feita uma análise no modo *Full Scan* dos analitos derivatizados empregando-se as condições de compromisso. Com o resultado dessa análise, selecionou-se o íon com maior intensidade no espectro de massas de cada composto (E1, E2, TES, EE2, PRO e E3) como sendo o íon precursor. Prosseguiu-se então com a análise no modo *Product Ion Scan*, para determinar quais transições de íon precursor para íon

produto geravam a melhor resposta, e com qual energia de colisão isso ocorria. A energia de colisão foi avaliada em um intervalo de 1 a 58 V, sendo variada de 3 em 3 V.

Para a seleção do íon precursor, o ideal é a utilização de um íon de alta razão m/z, como o íon molecular, para haver uma maior seletividade, mas que possua alta intensidade, a fim de se obter uma maior detectabilidade. Porém, pode ser difícil conseguir conciliar essas duas características. Dentre os analitos, o uso do íon molecular como íon precursor só foi possível no caso do E1. Então, para os demais compostos (E2, TES, EE2, PRO e E3), optou-se pelos íons (fragmentos) com maior intensidade no espectro, os quais não eram seus respectivos íons moleculares.

Foram selecionadas três transições íon precursor > íon produto, que apresentaram as maiores respostas, sendo uma utilizada para a quantificação dos compostos e as outras duas para a confirmação destes. As energias de colisão empregadas para cada transição foram determinadas com base na área do pico cromatográfico, ou seja, foram escolhidas as energias que proporcionaram a obtenção dos picos cromatográficos de maior intensidade (sinal/ruído).

Esses resultados são mostrados na **Figura 22** na forma de gráficos para cada um dos hormônios, onde são apresentadas as intensidades relativas em função da energia de colisão para as três transições íon precursor > íon produto de melhor resposta. As transições representadas no gráfico pela cor azul correspondem às transições cujos íons produtos são obtidos com maior abundância, sendo essas selecionadas para fazer a quantificação dos analitos. Já em rosa e cinza, estão representadas as transições que serão utilizadas para a confirmação dos compostos, uma vez que seus íons produtos apresentam grande abundância no espectro, porém menor que a dos fragmentos formados pelas transições de quantificação. Observando os gráficos, nota-se que cada uma das três transições pode apresentar uma energia ótima de colisão diferente, como é o caso da E1, TES, PRO e do E3, mostrando que a abundância dos íons produtos é dependente da energia de colisão aplicada. Assim, para o método MRM serão empregadas as energias de colisão que geraram a maior resposta para cada uma das três transições.

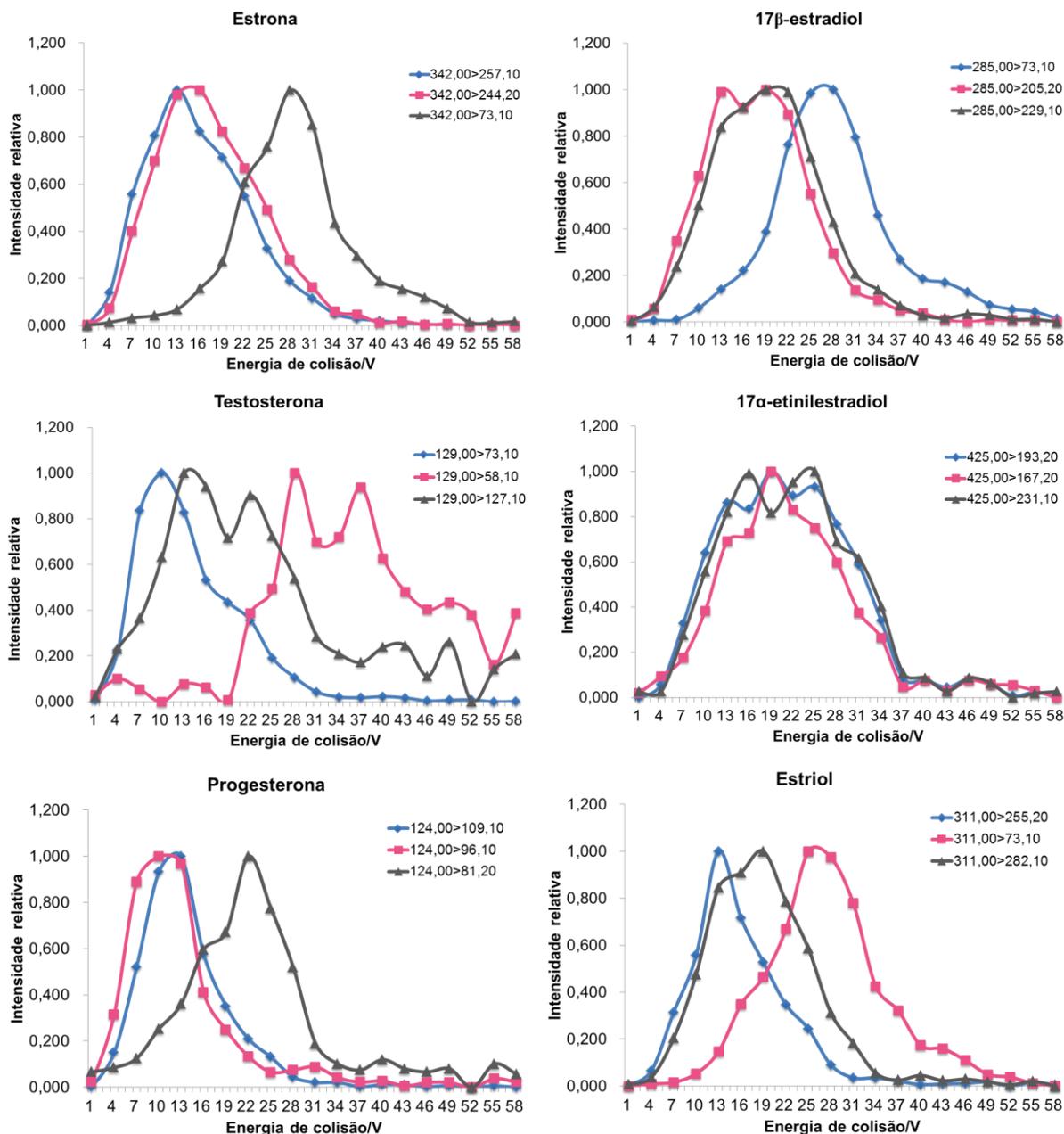


FIGURA 22: Resposta para cada transição MRM em função da energia de colisão empregada para cada hormônio.

A **Figura 23** mostra os cromatogramas obtidos na determinação do bisfenol A – d₁₆ e dos hormônios nas concentrações de 100 µg L⁻¹ e 500 µg L⁻¹, respectivamente, no modo MRM para as transições de quantificação selecionadas de cada analito.

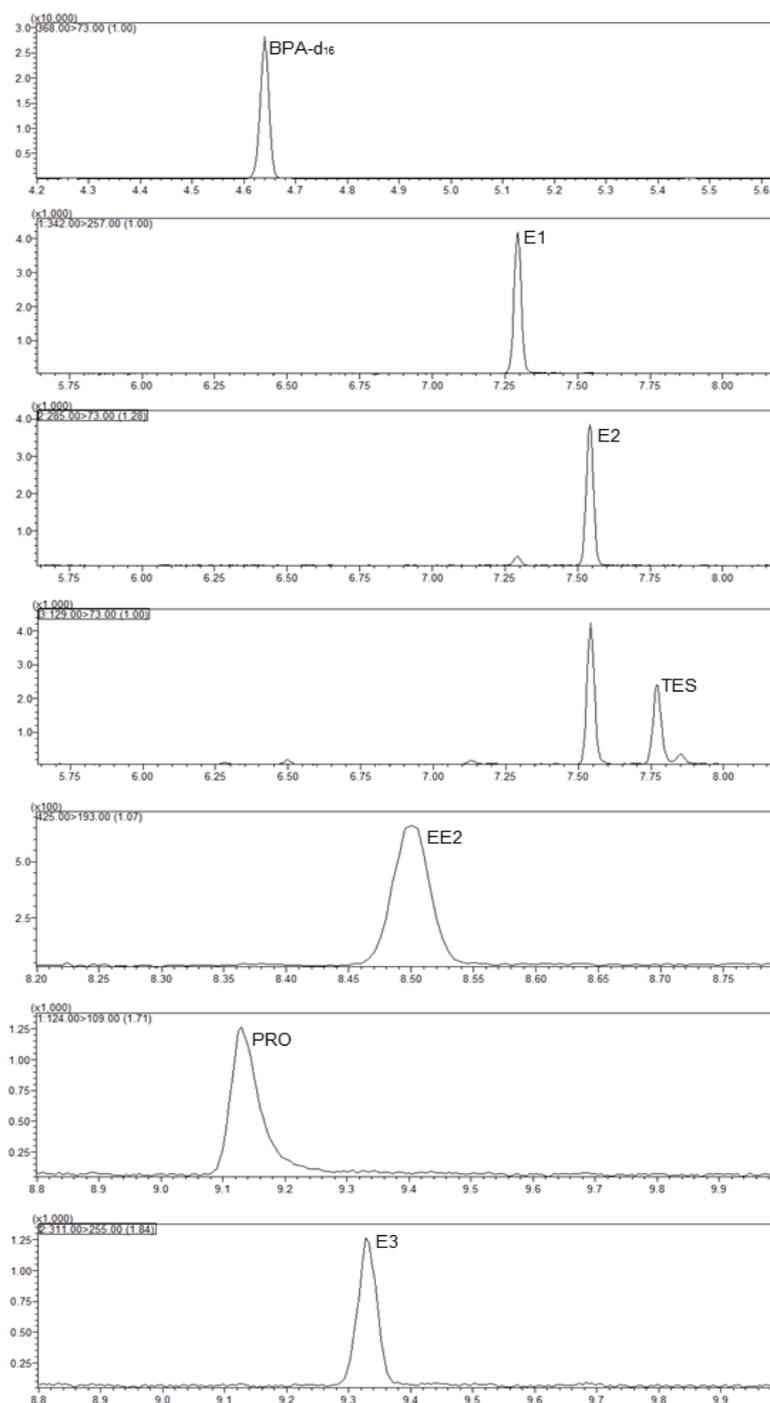


FIGURA 23: Cromatogramas da determinação do bisfenol A - d₁₆ (100 µg L⁻¹) e dos hormônios (500 µg L⁻¹) no modo MRM.

*As condições cromatográficas empregadas são descritas no item 4.3.2.

Os parâmetros otimizados (transição MRM e energia de colisão) do método MRM, para cada um dos hormônios esteroidais (E1, E2, TES, EE2, PRO e E3) e para o padrão interno (BPA – d₁₆), são apresentados na **Tabela 16**, juntamente com os seus tempos de retenção.

TABELA 14: Parâmetros do MRM otimizados para cada analito.

Analito	Transição MRM (m/z)	Tempo de retenção/min	Energia de colisão/V
BPA-d16	368 > 73	4,58	25
	368 > 197		22
	368 > 296		25
E1	342 > 257	7,18	13
	342 > 244		16
	342 > 73		28
E2	285 > 73	7,38	28
	285 > 205		19
	285 > 229		19
TES	129 > 73	7,60	10
	129 > 58		28
	129 > 127		13
EE2	425 > 193	8,31	19
	425 > 167		19
	425 > 231		25
PRO	124 > 109	8,91	13
	124 > 96		10
	124 > 81		22
E3	311 > 255	9,12	13
	311 > 73		25
	311 > 282		19

BPA-d16: bisfenol A – d16; E1: estrona; E2: 17 β -estradiol; TES: testosterona; EE2: 17 α -etinilestradiol; PRO: progesterona; E3: estriol. Em negrito destacam-se as transições de quantificação.

5.5 AVALIAÇÃO DOS HIDROGÉIS COMO FASES EXTRATORAS

5.5.1 Discos de extração

Os primeiros discos de hidrogel foram sintetizados a partir da reticulação do PVA com ácido cítrico 10% (m/m), sem a presença dos biopolímeros. No entanto, houve dificuldade para permear água através desse gel, o que pode ser atribuído à formação de uma rede polimérica muito compacta.

O PVA, como mencionado previamente, é sintetizado a partir da hidrólise do acetato de polivinila, sendo disponibilizado comercialmente nas formas altamente ou parcialmente hidrolisado. Segundo Huha e Lewis (2000), em solução, a distância entre as cadeias de PVA diminui com o aumento do grau de hidrólise do polímero, o que leva a uma competição entre as interações polímero-solvente e polímero-polímero. Ou seja, quanto menor for a presença de grupos acetato na estrutura do PVA, menor será a distância entre as cadeias poliméricas, e por consequência, menor será o espaço disponível para a penetração do solvente. Para a síntese dos discos de hidrogel, foi empregado um PVA altamente hidrolisado (> 99%), desta

forma pode-se ter obtido um gel com alto grau de fechamento do retículo, dificultando a permeação de água por este.

Então, para se obter um gel com maior espaço entre as cadeias da rede polimérica, foram sintetizados hidrogéis de PVA com os biopolímeros alginato e pectina. Essa mistura de polímeros de origem natural e sintética mostrou-se vantajosa, uma vez que permitiu o emprego desse material como fase extratora da GPE, sem, contudo, haver perda nas propriedades mecânicas do PVA.

Inicialmente, para haver a reticulação e secagem do gel, este foi deixado em estufa a 60 °C durante 24 horas, resultando em um hidrogel frágil e pouco elástico. No entanto, a elasticidade é uma característica importante do gel, pois garante flexibilidade às cadeias reticuladas, facilitando assim o movimento dos solutos (DATTA, 2007). Então, o tempo de duração dos processos de reticulação e secagem foi reduzido para 14 horas, mantendo-se a mesma condição de temperatura (60 °C), o que assegurou melhores propriedades mecânicas para o gel. A **Figura 24** mostra um disco de hidrogel (P10PC2) seco e intumescido, após sua hidratação.

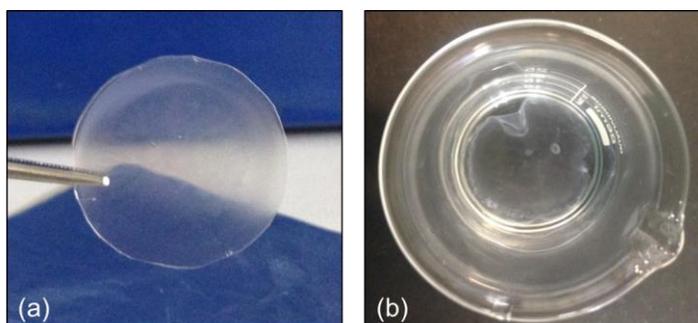


FIGURA 24: Fotos do discos de extração seco (a) e intumescido (b).

5.5.2 Alginato x Pectina

Primeiramente, foram sintetizados os discos de hidrogel de PVA/alginato (P5AL1 e P10AL2) para serem aplicados na extração dos hormônios, E1, E2, EE2, E3, PRO e TES, de amostras aquosas. Esses géis permitiram a extração dos seis compostos estudados, no entanto, os hormônios de menor polaridade, como a progesterona, apresentaram baixas taxas de recuperação (em termos de área de pico). Avaliou-se, então, a substituição do alginato pela pectina, que possui um maior caráter anfifílico, devido à presença de grupos éster metílico em sua estrutura. A **Figura 25** mostra os cromatogramas obtidos, no modo *Scan*, para a determinação

dos hormônios (1 mg L^{-1}) após a sua extração com os discos de extração de PVA/alginato (P5AL1 e P10AL2) e PVA/pectina (P5PC1 e P10PC2).

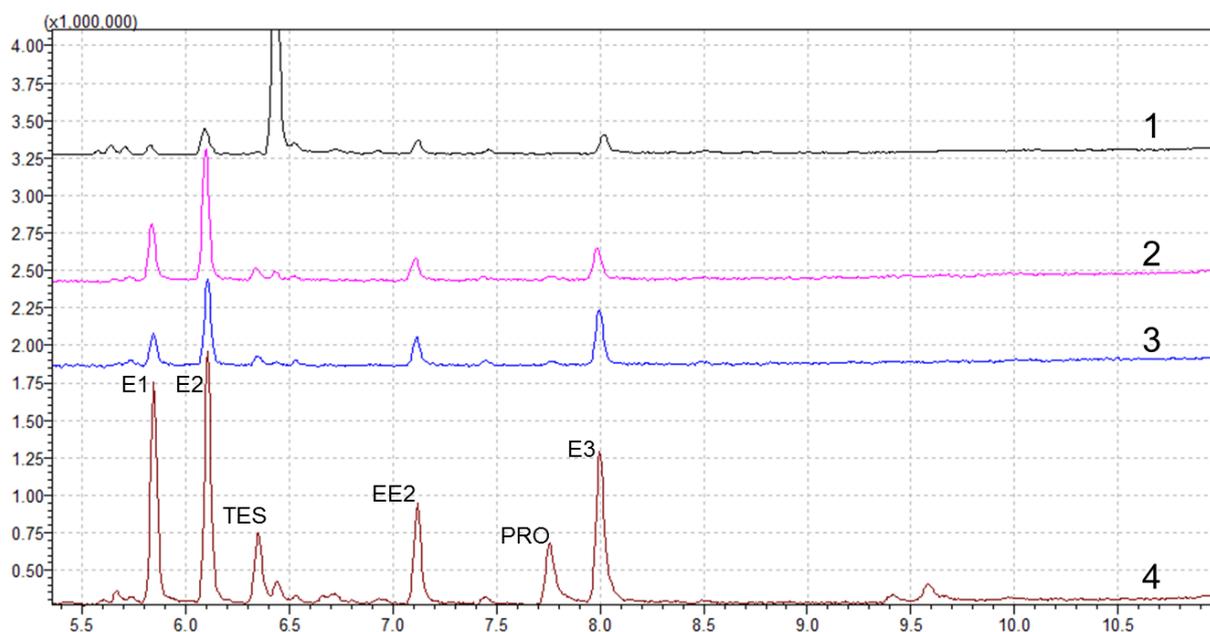


FIGURA 25: Cromatogramas da determinação dos hormônios (1 mg L^{-1}) extraídos com discos de hidrogel de diferentes composições.

1. PVA 5% e alginato 1%; 2. PVA 10% e alginato 2%; 3. PVA 5% e pectina 1%; 4. PVA 10% e pectina 2%.

*As condições cromatográficas empregadas são descritas no item 4.3.2.

Através da **Figura 25**, pode-se observar que a substituição do alginato pela pectina com alto grau de metoxilação ($\text{GM} > 50\%$), devido ao processo de diálise, promoveu um aumento no caráter anfifílico da fase extratora, acarretando em uma maior eficiência de extração para todos os hormônios, mas em especial para a progesterona, que possui o maior valor da constante de $K_{o/w}$ dentre os analitos e exibia as menores taxas de recuperação. Desse modo, o hidrogel de PVA/pectina foi selecionado para ser aplicado na extração dos hormônios E1, E2, EE2, E3, PRO e TES.

5.5.3 Influência da massa de polímero

Na **Figura 25**, ao comparar-se os cromatogramas 3 e 4 é observado um aumento na eficiência da extração com o aumento da massa dos polímeros. Então, realizou-se um estudo a respeito da influência das massas dos polímeros na eficiência da extração, a fim de se encontrar uma condição de composição do gel

que promovesse maior extração dos analitos. Para isso, discos de hidrogel de PVA/pectina foram preparados, mantendo-se a proporção 5:1 (m/m) de PVA para pectina, com maiores massas de polímero (P5PC1, P10PC2, P15PC3 e P20PC4). A **Figura 26** traz um gráfico com os resultados das extrações dos hormônios (1 mg L^{-1}) de amostra aquosa, realizadas em duplicata. No gráfico são dadas as médias das áreas de pico de cada analito divididas pela área de pico do padrão interno (BPA- d_{16}) de acordo com o disco de extração utilizado.

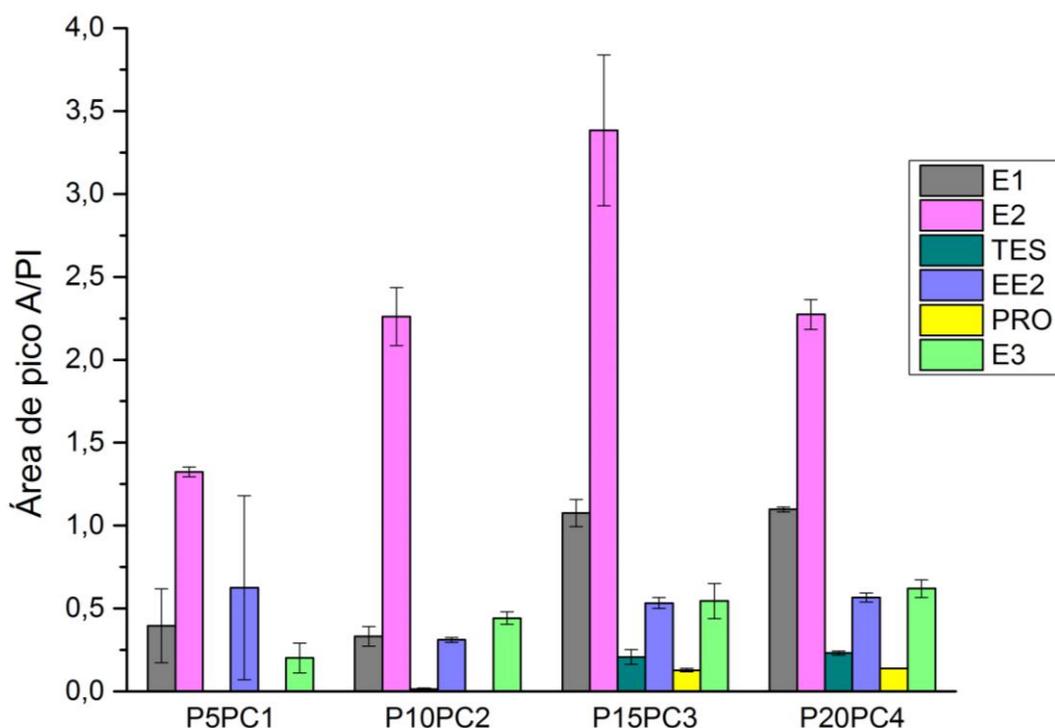


FIGURA 26: Áreas médias dos picos cromatográficos ($n = 2$) dos hormônios de acordo com a composição do hidrogel empregado na extração. P5PC1: PVA 5% e pectina 1%; P10PC2: PVA 10% e pectina 2%; P15PC3: PVA 15% e pectina 3%; P20PC4: PVA 20% e pectina 4%.

Observando o gráfico da **Figura 26**, constatou-se que o aumento na massa dos polímeros leva a uma melhora na eficiência de extração, como era esperado. Porém, de acordo com os resultados, isso ocorreu até o emprego das soluções de PVA e pectina com concentrações de 15% e 3% (m/v), respectivamente, para o hidrogel P15PC3. O motivo do disco P20PC4 não apresentar maior eficiência de extração frente ao hidrogel P15PC3 pode estar ligado a um aumento dos caminhos de percolação da amostra com o aumento da massa dos polímeros, o que dificultaria a dessorção dos analitos.

Além disso, o preparo do hidrogel P20PC4 apresentou maiores dificuldades, uma vez que as soluções de PVA e pectina nas concentrações de 20 e 4% (m/v) possuem viscosidade elevada, resultando em uma fase pouco uniforme, em comparação com as demais (**Figura 27**).

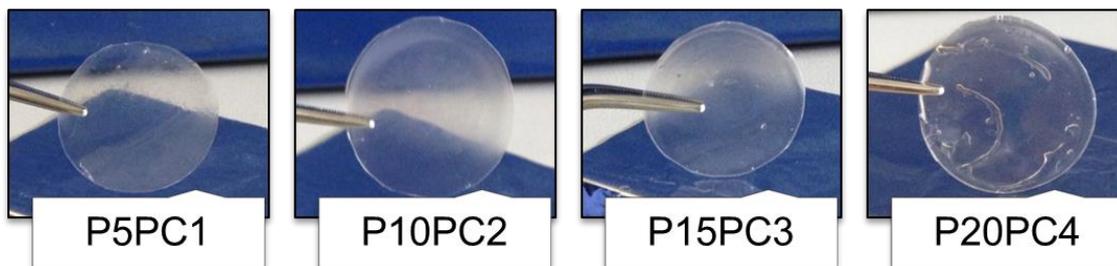


FIGURA 27: Discos de extração P5PC1, P10PC2, P15PC3 e P20PC4.

Também foram avaliadas diferentes proporções de PVA para pectina, como 2,5:1 (m/m) (P5PC2), 3,3:1 (m/m) (P10PC3), 7,5:1 (m/m) (P15PC2) e 10:1 (m/m) (P10PC1). Os resultados das extrações, para todos os hidrogéis de PVA/pectina investigados, estão apresentados no gráfico da **Figura 28**, onde são dadas as médias das áreas de pico de cada analito de acordo com o disco de extração utilizado.

A extração que obteve maior eficiência foi realizada com o disco de hidrogel P15PC2, sintetizado a partir de soluções de PVA 15% (m/v) e pectina 2% (m/v). Para os géis preparados com soluções mais concentradas de PVA e pectina houve uma redução na eficiência da extração, o que pode ser atribuído a uma eluição ineficiente dos analitos das fases P15PC3 e P20PC4. Isso por que, maiores massas de polímero podem levar à formação de géis com um número maior de canais, como mencionado anteriormente, de forma que o processo de dessorção dos analitos torna-se mais moroso. Portanto, o hidrogel adotado para a extração dos hormônios esteroidais foi o denominado P15PC2.

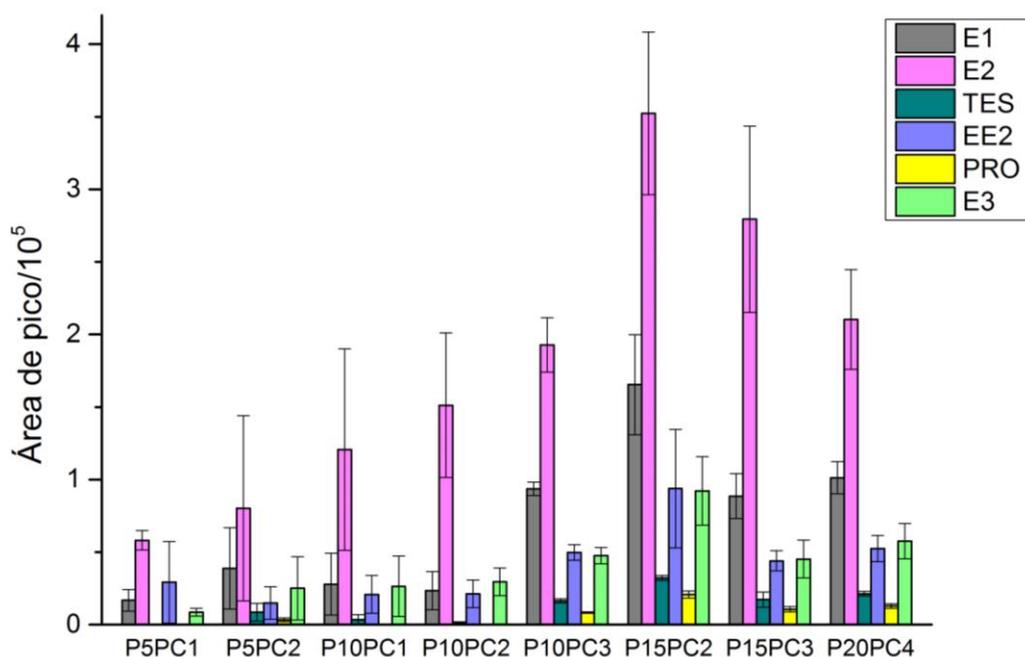


FIGURA 28: Áreas médias dos picos cromatográficos (n =2) dos hormônios de acordo com a composição do hidrogel empregado na extração.

P5PC1: pva 5% e pectina 1%; P5PC2: PVA 5% e pectina 2%; P10PC1: PVA 10% e pectina 1%; P10PC2: PVA 10% e pectina 2%; P10PC3: PVA 10% e pectina 3%; P15PC2: PVA 15% e pectina 2%; P15PC3: PVA 15% e pectina 3%; P20PC4: PVA 20% e pectina 4%.

O disco de extração P15PC2 possui uma massa de aproximadamente 50,00 mg, com desvio padrão relativo de 4,5% (n=10). Considerando que cada disco de hidrogel é preparado separadamente, o processo de obtenção da fase extratora mostrou-se reproduzível.

Nos testes iniciais, onde se empregou os discos P5PC1 e P10PC2, houve a necessidade de utilização de uma membrana de celulose regenerada (0,45 μ m) para dar suporte ao hidrogel. Isso porque esses géis, quando hidratados, tornavam-se extremamente maleáveis e acabavam dobrando dentro do suporte de policarbonato, com isso ocorria a formação de caminhos preferenciais, já que o disco não cobria toda a superfície do suporte, podendo levar a uma perda na eficiência da extração. Todavia, com a utilização do gel P15PC2, que possui menor grau de intumescimento (166,5%) em relação ao P5PC1 (277,2%) e ao P10PC2 (202,0%), o uso da membrana tornou-se desnecessário, devido a esse hidrogel manter melhor a sua forma de disco.

Essa não obrigatoriedade de utilização da membrana foi bastante relevante, uma vez que extrações efetuadas empregando-se apenas a membrana revelaram que os compostos estudados adsorviam nesta de forma significativa e não

reprodutível, o que contribuiu para a obtenção de estimativas do desvio padrão elevadas, como pode ser verificado no gráfico da **Figura 28**. Portanto, o uso exclusivo do disco de extração P15PC2 garantiu maiores eficiências de extração e satisfatória precisão para os estudos seguintes. Deste modo o hidrogel denominado P15PC2 foi o selecionado para os demais estudos referentes à otimização das etapas de extração e dessorção do método proposto.

5.6 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS HIDROGÉIS

5.6.1 Grau de intumescimento

O grau de intumescimento do hidrogel é dependente de diversos fatores, como estrutura química, massa molar, composição e grau de reticulação da matriz polimérica (PEPPAS *et al.*, 2000). O gráfico da **Figura 29** mostra o comportamento de intumescimento dos géis P5PC1, P10PC2, P15PC3, P20PC4, P15PC2 e do PVA puro reticulado com ácido cítrico.

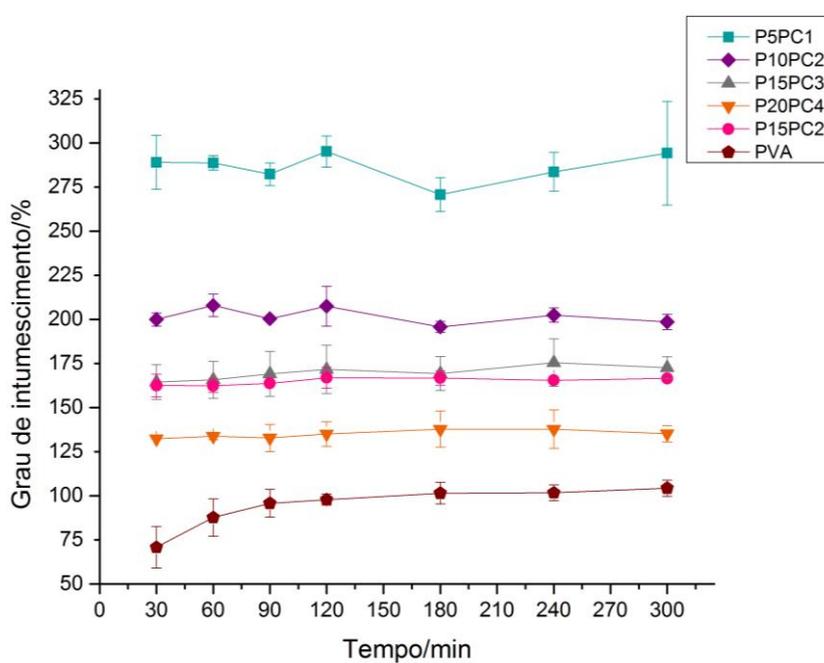


FIGURA 29: Grau de intumescimento (% m/m) dos hidrogéis a temperatura de 25°C.

Os hidrogéis contendo pectina em sua composição atingiram o equilíbrio de intumescimento já na primeira medida, realizada em 30 minutos, enquanto que o gel de PVA puro precisou de 90 minutos para alcançar o equilíbrio. Além disso, a presença de pectina na composição dos géis resultou em uma maior absorção de

água, enquanto que para o PVA o GI% foi de 104,3%. Os géis contendo pectina apresentaram valores para o GI% variando entre 277,2% (P5PC1) e 135,2% (P20PC4).

Os discos de extração P5PC1 e P10PC2 absorveram as maiores quantidades de água e obtiveram as menores eficiências de extração, em comparação aos demais. Esse fato indica que o grau de intumescimento do hidrogel é um fator limitante da extração. O processo de inchamento do gel é governado pela mobilidade da rede polimérica, a qual determina a distância entre as cadeias e por consequência, o volume disponível para o solvente, onde ocorre, essencialmente, o transporte dos solutos (GERLACH *et al.*, 2005). Portanto, nos hidrogéis que absorvem maiores volumes de água, a distância entre as cadeias da rede polimérica é maior, o que prejudica a retenção dos analitos pela fase sorvente. Além disso, nessa situação, a difusão dos solutos é maior, de forma que a extração de compostos polares, que deveria ser favorecida pelo uso do hidrogel, é prejudicada, devido à alta afinidade desses compostos com a água.

5.6.2 Perda de Água

O processo de perda de água pelo gel foi estudado a temperatura ambiente (25°C) e sob refrigeração (4°C) para os hidrogéis P5PC1, P10PC2, P15PC3, P20PC4, P15PC2 e PVA. Os resultados obtidos no estudo de sinérese, que é o processo de expulsão da água causado pela contração da rede polimérica, são apresentados nos gráficos da **Figura 30**.

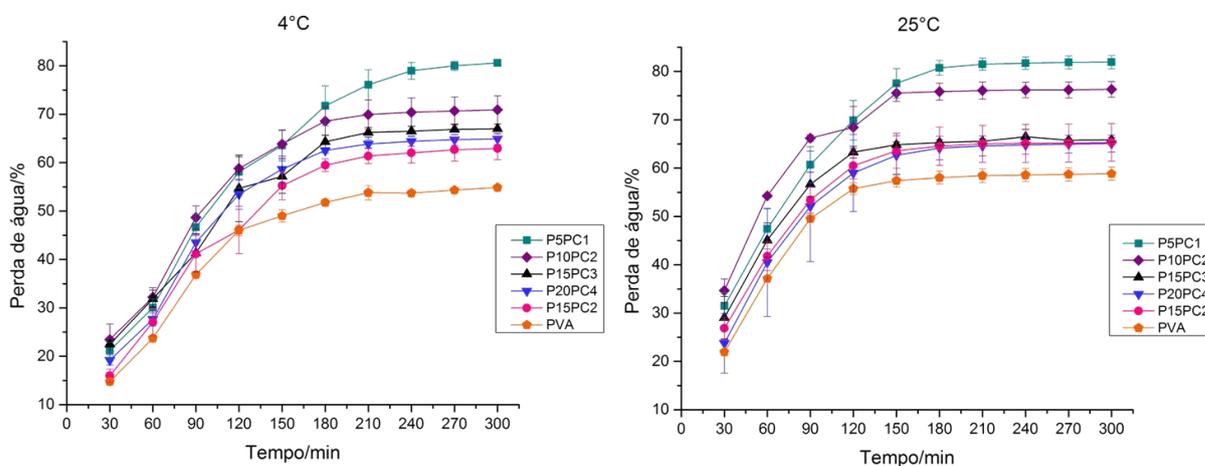


FIGURA 30: Perda de água (% m/m) dos hidrogéis sob as temperaturas de 4°C e 25°C.

Os hidrogéis apresentaram comportamentos semelhantes quanto ao processo de perda de água, sendo que a maior taxa foi cerca de 80% para o P5PC1 e a menor cerca de 50% para o PVA. Assim, para os géis preparados com menor massa de polímero o processo de difusão do solvente para dentro e fora da rede polimérica foi mais pronunciado. Maiores taxas de difusão não favoreceram a extração dos hormônios, uma vez que estes compostos possuem alta afinidade com a matriz aquosa e um menor tempo de contato da amostra com a fase sorvente pode ter contribuído para as baixas eficiências de extração dos géis P5PC1 e P10PC2.

A perda de água dos hidrogéis para as duas temperaturas empregadas (4°C e 25°C) foi praticamente a mesma, no entanto atingiu-se o equilíbrio de massa mais rapidamente em temperatura de 25°C.

5.6.3 Espectroscopia de infravermelho

Os discos de extração P5PC1, P10PC2, P15PC3, P20PC4, P15PC2 e PVA também foram caracterizados por espectroscopia de infravermelho (FTIR-ATR), cujos espectros são apresentados na **Figura 31**.

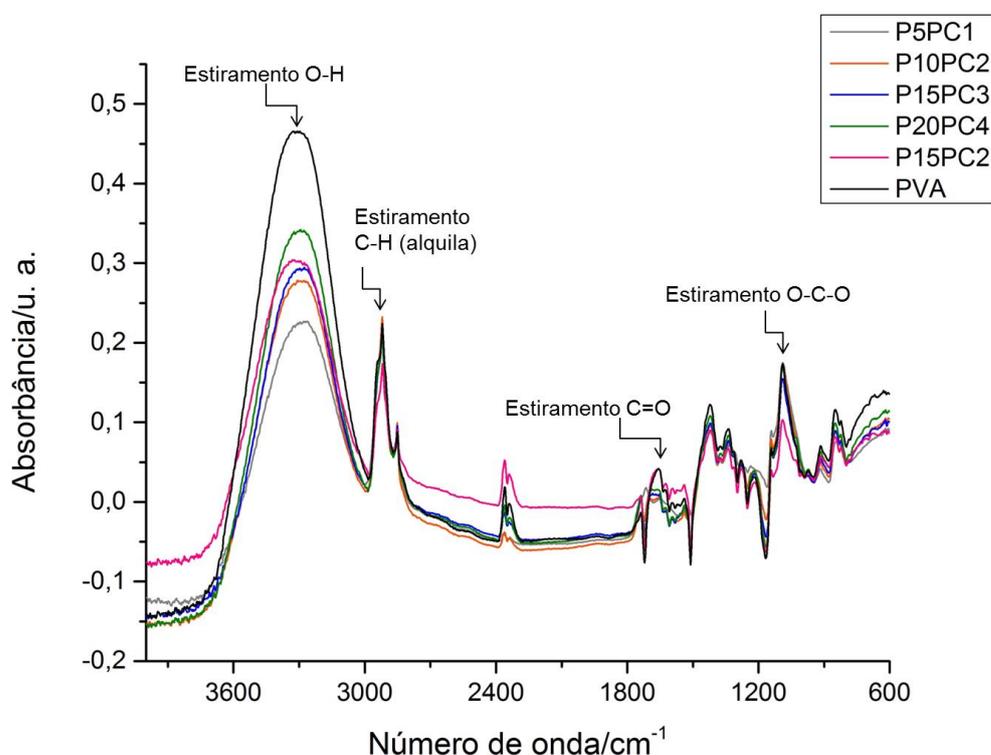


FIGURA 31: Espectro de FTIR-ATR para os hidrogéis P5PC1, P10PC2, P15PC3, P20PC4, P15PC2 e PVA.

Nota-se, na **Figura 31**, que não há diferença significativa entre os espectros dos géis contendo pectina e do PVA puro com relação aos grupos funcionais. A presença de grupos hidroxila na cadeia polimérica pode ser verificada pela existência de uma banda em 3300 cm^{-1} , característica do estiramento O-H com ligação intermolecular de hidrogênio. A banda de absorção em 3000 cm^{-1} refere-se ao estiramento C-H sp^3 (PAVIA *et al.* 2010). O estiramento C=O em 1750 cm^{-1} , segundo Mansur e colaboradores (2008), é devido aos grupos acetatos remanescentes do PVA, uma vez que foi utilizado um PVA altamente hidrolisado, essa banda tem baixa intensidade.

5.6.4 Microscopia eletrônica de varredura

Os aspectos morfológicos dos discos de extração desenvolvidos (P5PC1, P10PC2, P15PC3, P20PC4, P15PC2 e PVA) são mostrados nas imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) da **Figura 32**. Para a observação dos hidrogéis, estes foram secos, congelados com nitrogênio líquido e fraturados, de forma que as imagens apresentadas a seguir referem-se às seções dos discos que sofreram essa fratura. Pode-se observar na imagem do PVA (Figura 32a) a presença de estrias na superfície do gel, o que é característico de materiais dúcteis.

No entanto, nas imagens dos discos P5PC1 (Figura 32b), P10PC2 (Figura 32c), P15PC3 (Figura 32d) e P20PC4 (Figura 32e) pode-se observar a presença de depressões ou elevações esféricas na superfície dos hidrogéis devido à presença da pectina. As partículas deste biopolímero apresentaram formato esférico quando dispersas no PVA, o que evidenciou a imiscibilidade entre as duas fases poliméricas. Sem a adição da pectina no gel, não foi possível permear a amostra aquosa através dos discos de extração, indicando que a estrutura do gel de PVA teria características hidrofóbicas. A presença da pectina nos hidrogéis permitiu a permeação da amostra, aumentou a área superficial do PVA deixando os seus grupos funcionais disponíveis para interagir com os analitos, além de atribuir um carácter anfifílico à fase extratora.

A obtenção de um disco de extração de pectina reticulado com ácido cítrico não foi possível, devido a esse gel ser muito frágil. Neste caso, após a reticulação e secagem, o disco de hidrogel quebrava-se por inteiro na tentativa da sua remoção do molde. Como o PVA é o componente majoritário dos hidrogéis de PVA/pectina, não houve perda das propriedades mecânicas desse polímero com a adição da

pectina. Então, a possibilidade de combinação das características do PVA e da pectina faz com que o uso deste hidrogel seja tão atrativo.

Para os discos P5PC1 (a), P10PC2 (b), P15PC3 (c) e P15PC2 (d) foi possível obter imagens mostrando a espessura dos hidrogéis, a qual aumenta com o aumento da massa dos polímeros, como já era esperado.

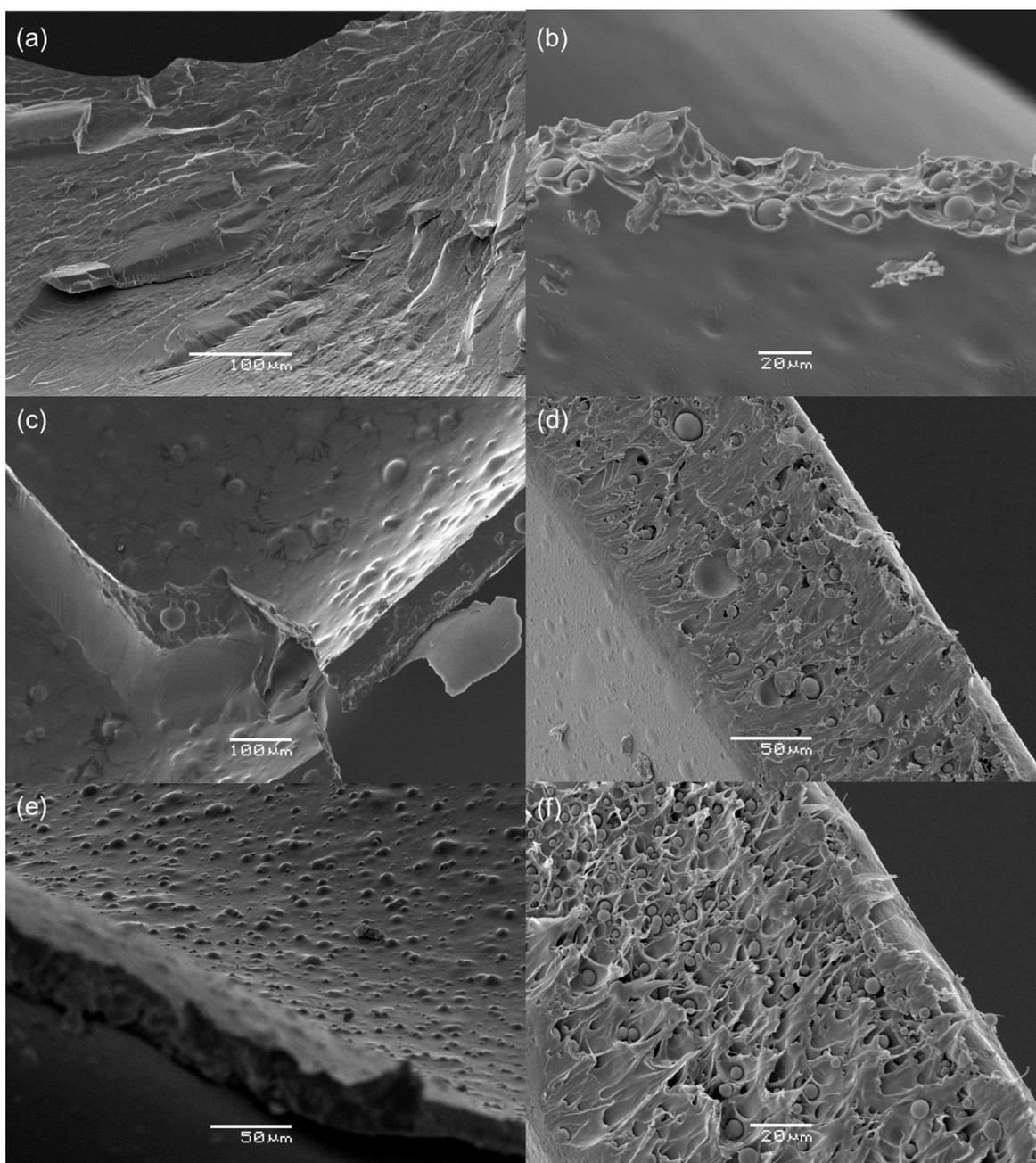


FIGURA 32: Imagens de microscopia eletrônica de varredura dos discos de extração (a) PVA ampliado 250x, (b) P5PC1 ampliado 650x, (c) P10PC2 ampliado 150x, (d) P15PC3 ampliado 400x, (e) P20PC4 ampliado 400x e (f) P15PC2 ampliado 750x.

5.7 OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO EM FASE GEL (GPE)

5.7.1 Otimização da eluição dos analitos

A etapa de dessorção foi avaliada com o propósito de se empregar o menor volume possível de solvente orgânico, além de avaliar a possibilidade de efeito de memória em extrações consecutivas utilizando-se um mesmo hidrogel. O processo de otimização da etapa de eluição dos analitos foi realizado, de forma univariada, levando-se em consideração os seguintes parâmetros: natureza do solvente, volume de solvente e número de eluições.

Com relação à natureza do solvente, o intuito foi avaliar o uso de metanol, acetato de etila e diclorometano, devido à afinidade dos compostos estudados com esses solventes. Todavia, tanto o acetato de etila quanto o diclorometano não apresentaram compatibilidade com o suporte de policarbonato, levando a deterioração deste. Assim, a possibilidade de utilizar esses solventes na eluição dos analitos foi descartada. Sendo assim, o metanol foi selecionado como solvente de eluição.

Estabelecido o solvente, iniciou-se o estudo a respeito do volume e número de eluições que garantissem alta eficiência na dessorção dos analitos da fase extratora, levando a uma maior resposta (intensidade de pico cromatográfico). Primeiramente, foram avaliadas quatro eluições com 1 ou 2 mL de metanol cada, cujos extratos foram injetados individualmente no sistema GC-MS/MS. Os resultados desses ensaios são apresentados nos gráficos da **Figura 33**.

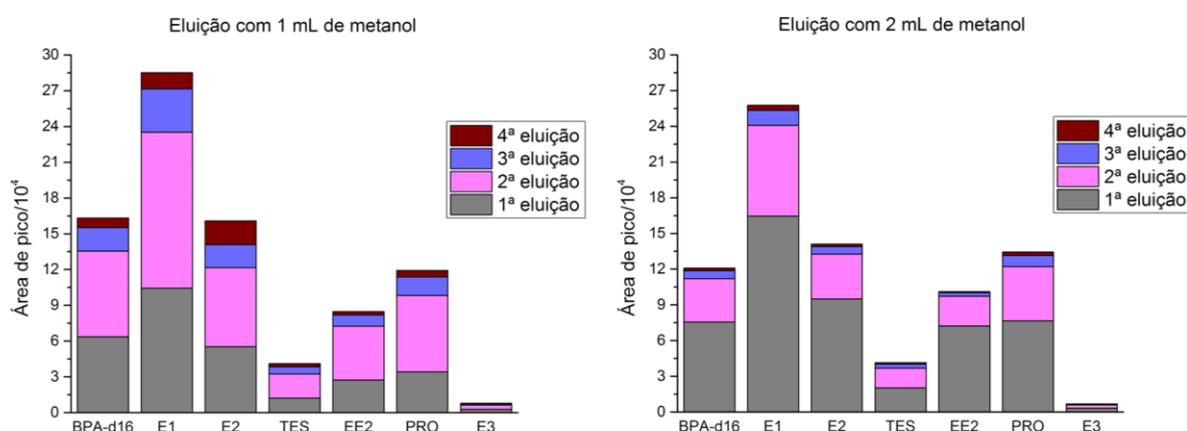


FIGURA 33: Áreas dos picos cromatográficos dos hormônios extraídos com o disco de hidrogel P15PC2 e eluídos em quatro etapas com 1 e 2 mL de metanol. Modo de registro de íons: MRM.

A partir dos gráficos apresentados na **Figura 33**, pode-se observar que os resultados obtidos para o uso de 1 mL são semelhantes àqueles encontrados para o uso de 2 mL, sendo ainda que no caso dos compostos BPA-d₁₆, E1 e E2, o menor volume de solvente acabou garantindo maiores áreas de pico. Desta forma, a utilização de 1 mL de metanol, mostrou-se mais vantajosa, já que proporcionou melhor resposta empregando-se metade do volume de solvente.

A primeira e segunda eluições foram responsáveis por dessorver a maior parte dos analitos da fase extratora, para ambos os volumes avaliados, entretanto, a terceira e quarta eluição ainda contribuíram com cerca de 20% da área total para todos os hormônios. Devido a isso, novos ensaios foram realizados para determinar a necessidade de se empregar mais de quatro eluições. Para isso avaliou-se, em triplicata, o uso de seis etapas de eluição. A **Tabela 17** traz os resultados percentuais para as áreas de pico obtidas em cada eluição juntamente com o percentual acumulado com relação à área de pico total.

TABELA 15: Áreas de pico percentuais para cada eluição.

Analito	Áreas de pico proporcional e acumulada de cada eluição/%											
	1	T	2	T	3	T	4	T	5	T	6	T
BPA-d ₁₆	47,65	47,65	24,09	71,74	13,32	85,06	7,39	92,45	4,85	97,30	2,70	100
E1	35,78	35,78	33,44	69,21	9,57	78,78	11,26	90,04	5,90	95,95	4,05	100
E2	52,43	52,43	25,76	78,19	8,94	87,13	5,89	93,02	4,42	97,43	2,57	100
TES	49,52	49,52	16,06	65,59	7,79	73,38	9,48	82,86	11,84	94,70	5,30	100
EE2	36,99	36,99	31,26	68,25	10,50	78,74	6,82	85,57	4,64	90,21	9,79	100
PRO	37,71	37,71	10,93	48,63	5,63	54,27	8,93	63,20	32,89	96,09	3,91	100
E3	45,42	45,42	23,47	68,89	9,53	78,42	10,72	89,15	5,245	94,40	5,60	100

1 – 6: áreas de pico proporcionais das eluições de 1 a 6; T áreas de pico acumuladas.

Os resultados apresentados na **Tabela 17** confirmam que a maior porção dos analitos é dessorvida nas duas primeiras eluições, exceto para o caso da PRO cujo valor da área acumulada (T) é de apenas 48,63%. Este hormônio é o que possui maior coeficiente de partição octanol:água em comparação com os demais, de forma que os resultados encontrados demonstram que a PRO tem grande afinidade com a fase extratora, cujo caráter anfílico também permite uma extração satisfatória dos hormônios de maior polaridade, como por exemplo o E3.

Para a determinação do número de eluições, foi estabelecido que o valor da área de pico acumulada deveria ser superior a 90%, o que foi atingido com um total de cinco eluições, sendo esta, então, a condição de compromisso selecionada. Entretanto, é importante salientar, que para a reutilização dos discos de extração, deve-se efetuar uma etapa de limpeza da fase extratora entre extrações sucessivas,

a fim de se evitar efeito de memória, visto que uma pequena porção dos compostos (< 10%) permanece na fase extratora.

5.7.2 Planejamento fatorial

Para a otimização da etapa de extração realizou-se um estudo multivariado através de um planejamento composto central (CCD), onde foram avaliadas as variáveis: pH, volume de amostra e vazão. Sendo assim, foi empregado um planejamento 2^3 com pontos em estrela e quadruplicata do ponto central. A **Tabela 18** traz a matriz do planejamento fatorial.

TABELA 16: Matriz do planejamento fatorial 2^3 com pontos em estrela e quadruplicata do ponto central.

Ensaio	pH	Volume/mL	Vazão/mL min ⁻¹
1	4,5 (-)	100 (-)	2 (-)
2	7,5 (+)	100 (-)	2 (-)
3	4,5 (-)	200 (+)	2 (-)
4	7,5 (+)	200 (+)	2 (-)
5	4,5 (-)	100 (-)	4 (+)
6	7,5 (+)	100 (-)	4 (+)
7	4,5 (-)	200 (+)	4 (+)
8	7,5 (+)	200 (+)	4 (+)
9	3,5 (-1,68)	150 (0)	3 (0)
10	8,5 (+1,68)	150 (0)	3 (0)
11	6 (0)	66 (-1,68)	3 (0)
12	6 (0)	234 (+1,68)	3 (0)
13	6 (0)	150 (0)	1,3 (-1,68)
14	6 (0)	150 (0)	4,7 (+1,68)
15	6 (0)	150 (0)	3 (0)
16	6 (0)	150 (0)	3 (0)
17	6 (0)	150 (0)	3 (0)
18	6 (0)	150 (0)	3 (0)

Na **Tabela 19**, pode-se observar os resultados obtidos, em termos da razão entre as áreas dos picos cromatográficos do analito pelo padrão interno (A_A/A_{PI}), para o planejamento aplicado. A condição que garantiu maior eficiência de extração para a maior parte dos analitos foi a empregada no ensaio 6, onde as condições de pH, volume de amostra e vazão são respectivamente, 7,5, 100 mL e 4 mL min⁻¹.

TABELA 17: Resultados obtidos para o planejamento composto central (CCD) avaliando os fatores de pH, volume de amostra e vazão.

Ensaio	Razão Aa/API					
	E1	E2	TES	EE2	PRO	E3
1	2,111	1,357	1,241	0,1906	2,194	0,2572
2	2,041	1,203	1,271	0,2694	2,363	0,2569
3	3,114	1,491	2,238	0,4339	4,422	0,2550
4	2,392	1,424	1,536	0,4039	3,106	0,2552
5	2,832	1,424	1,472	0,4018	1,944	0,3112
6	6,230	1,772	1,988	0,4105	4,131	0,3988
7	3,281	1,660	1,662	0,4712	2,831	0,3463
8	2,230	1,370	1,494	0,4090	2,527	0,2699
9	3,570	1,504	1,962	0,4374	4,232	0,3023
10	3,086	1,480	1,685	0,4222	2,373	0,2771
11	2,210	1,465	1,303	0,3307	2,026	0,2515
12	3,297	1,742	2,119	0,5606	2,308	0,4055
13	3,478	1,267	2,052	0,3736	5,981	0,2328
14	4,928	1,676	1,548	0,4272	2,879	0,3908
15	2,752	1,537	1,673	0,4557	2,810	0,3244
16	3,474	1,546	1,520	0,4541	2,599	0,3227
17	3,404	1,455	1,237	0,4378	1,839	0,3079
18	2,904	1,487	1,244	0,4550	1,667	0,3006

Para uma maior eficiência na extração, é interessante que os analitos estejam na sua forma não ionizada, pois assim, a afinidade destes com a fase extratora é maior. Os valores de pKa dos hormônios estudados são superiores a 10 (BIZKARGUENAGA *et al.*, 2012), de forma que para o intervalo de pH avaliado (3,5 a 8,5) todos os analitos encontram-se não ionizados. Além disso, o hidrogel estudado (P15PC2) apresentou estabilidade química e mecânica nessa faixa de pH.

A utilização de maiores volumes de amostra leva a uma maior concentração dos analitos, no entanto, deve-se atentar para o fato de que maiores volumes de amostra podem causar a dessorção, mesmo na etapa de extração, dos compostos da fase extratora, principalmente quando estes são polares, tendo então, grande afinidade com a água. Comparando-se os ensaios 6 e 8, onde são empregadas as mesmas condições de pH e vazão, é constatado que o aumento do volume de amostra de 100 mL para 200 mL não promoveu um aumento na eficiência de extração, pelo contrário, para a maioria dos analitos a razão A/PI foi menor quando o volume de amostra utilizado foi de 200 mL.

A vazão foi o fator que mais influenciou a extração dos hormônios pelo hidrogel P15PC2, o que pode ser observado contrapondo-se os resultados dos ensaios 6 com 2, nos quais o pH e o volume de amostra são respectivamente, 7,5 e 100 mL. A redução da vazão de 4 para 2 mL min⁻¹ não somente promoveu uma

menor extração dos analitos, como foi responsável por uma das menores respostas obtidas para todos os hormônios. O uso de baixas vazões pode atuar de duas formas: primeiro, aumentando a eficiência da extração devido ao maior tempo de contato da amostra com a fase extratora, ou segundo, diminuindo a eficiência da extração em consequência desse maior tempo de contato da amostra com a fase extratora que leva a dessorção dos analitos. Como os compostos estudados apresentam média a alta polaridade, um maior tempo de contato da amostra com o hidrogel, devido ao uso de menores vazões, não é benéfico ao processo de extração, porque promove a eluição dos hormônios pela amostra.

Somente os compostos E1, E2, EE2 e E3 apresentaram efeitos principais e de interação significativos. A **Figura 34** traz os gráficos de Pareto com os valores absolutos dos efeitos para esses quatro hormônios.

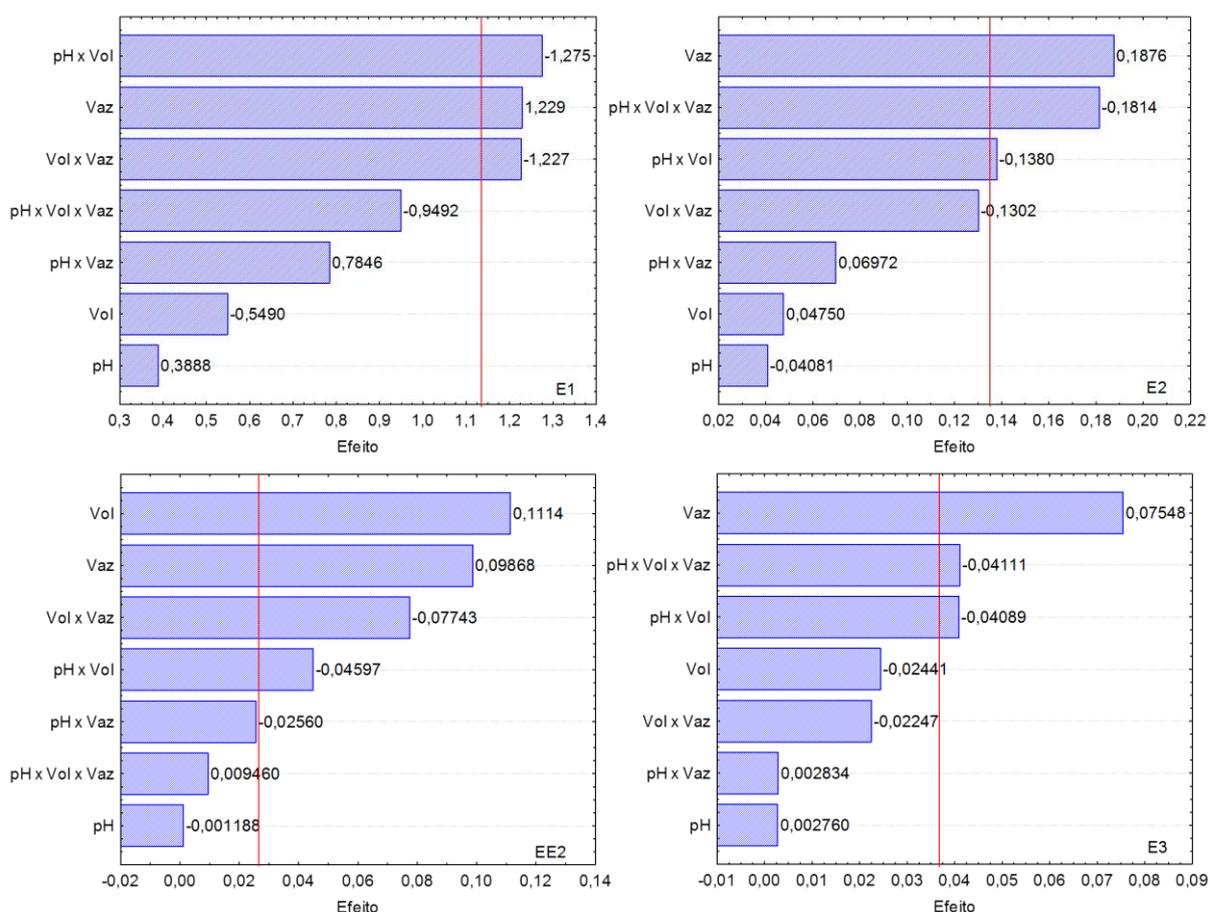


FIGURA 34: Gráficos de Pareto para os efeitos obtidos no planejamento composto central (CCD).

Os efeitos principais e de interação que foram significativos são aqueles que apresentam valor superior à estimativa do desvio padrão associada ao valor de t de

student para um nível de confiança de 95% ($t_{v=3} = 3,182$), sendo esta representada no gráfico de Pareto de cada hormônio, pela linha em vermelho. Assim, por exemplo, para a estrona (E1), apenas os efeitos principal da vazão e de interações do pH x volume e do volume x vazão foram significativos.

O efeito principal da vazão foi significativo para os quatro hormônios (E1, E2, EE2 e E3) enquanto que o efeito do pH não foi significativo para nenhum, no entanto, este último fator apresentou efeitos de interação de segunda ordem, com a vazão, e de terceira ordem (pH x volume x vazão). A **Figura 35** mostra as variações das respostas dos fatores para a estrona e o 17 α -etinilestradiol, que apresentaram somente efeitos de interação de segunda ordem.

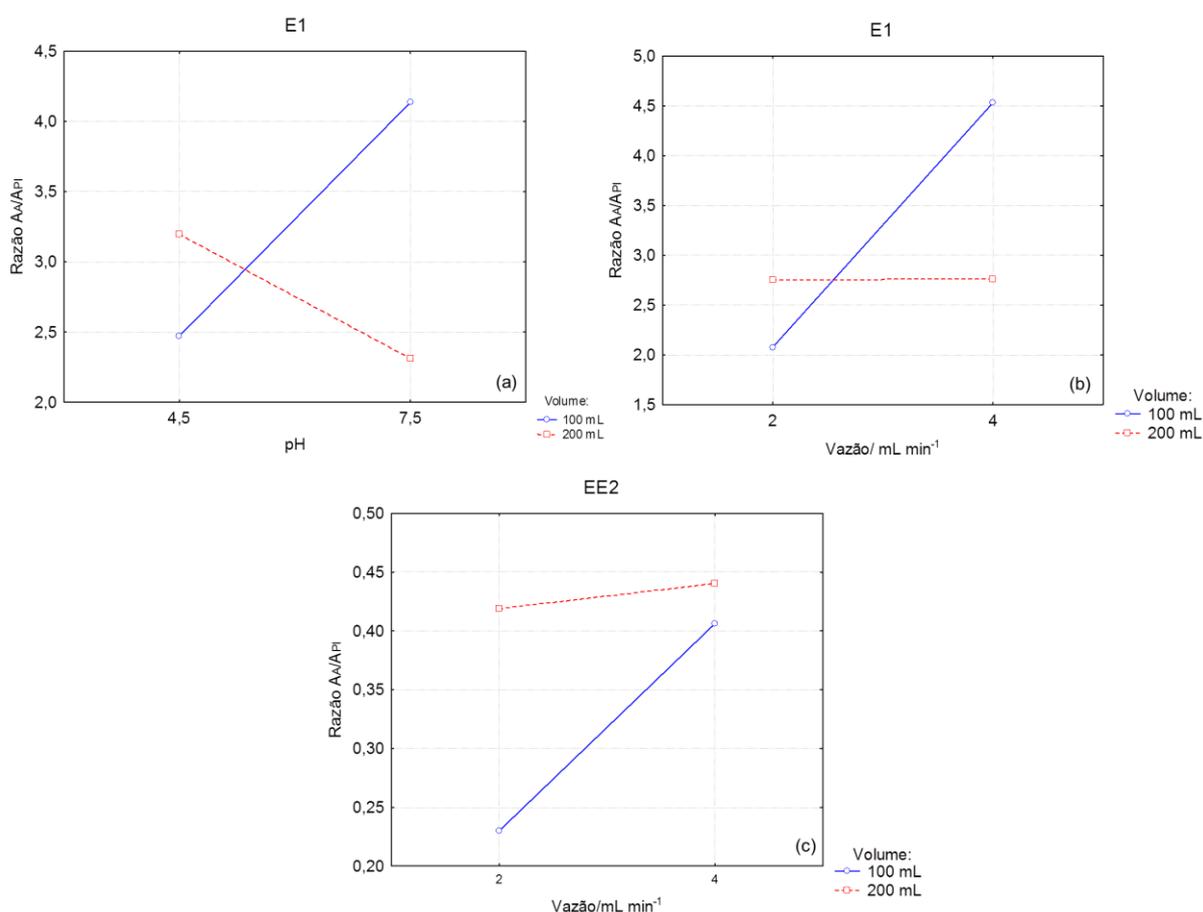


FIGURA 35: Variações das respostas com os níveis dos fatores para a estrona (pH x Vol e Vol x Vaz) e para o 17 α -etinilestradiol (Vol x Vaz).

A existência de efeitos de segunda ordem, para E1 e EE2, pode ser verificada através da **Figura 35**. Por exemplo, para a estrona (E1), o efeito de pH x volume foi significativo, uma vez que, observando o gráfico da Figura 35a, nota-se que ao manter o volume de amostra em 100 mL e variar o pH do nível (-) para o (+), há um

ganho na razão AA/API de 1,6 unidades. Se não houvesse efeito de interação, ao fixar o volume de amostra em 200 mL e variar o pH do nível (-) ao nível (+) o ganho de eficiência deveria ser o mesmo, no entanto o que ocorre é uma redução na razão AA/API, demonstrando então a interação entre as variáveis pH e volume de amostra.

O fator pH não influenciou a eficiência da extração com relação a forma do analito, ionizado ou não ionizado, já que, como mencionado previamente, os hormônios apresentam pKa maior que 10, encontrando-se não ionizados no intervalo de pH estudado. No entanto, os resultados demonstram a interação dessa variável com o volume de amostra (pH x volume) para E1, e com o volume de amostra e a vazão (pH x volume x vazão) para E2 e E3. Pode-se entender, deste modo, que o pH deve ter influência também sobre a fase extratora.

A presença de grupos ácidos ou básicos na cadeia polimérica pode alterar o grau de intumescimento do hidrogel, abrindo ou fechando a rede, pela ionização ou dissociação desses grupos, respectivamente. Por exemplo, quando se eleva o pH, os íons OH⁻ hidrolisam os grupos acetatos remanescentes (pKa = 4,76). As cargas presentes na cadeia polimérica, devido aos grupos ionizados, repelem-se e o grau de intumescimento aumenta (ELLIOTT *et al.*, 2004). Pela abertura da rede, devido à entrada de água no hidrogel, supõe-se que haveria um aumento na taxa de difusão do solvente para na rede. Mansur e colaboradores (2008) relataram um aumento na taxa de difusão do PVA aumentando-se o pH de 3 para 6, todavia, quando o pH passa de 6 para 9, ocorre uma redução na taxa de difusão do PVA, a qual foi atribuída, pelos autores do trabalho, ao aumento da força iônica que levaria a neutralização da carga negativa dos grupos acetato. Em suma, é provável que a contribuição da variável pH para os efeitos de segunda e terceira ordem, esteja relacionada à ionização dos grupos acetato residuais do PVA e da pectina.

O efeito de interação volume x vazão, também pode ser visualizado nos gráficos da **Figura 35**, para E1 (b) e EE2 (c). Aqui, para ambos os hormônios, o aumento da vazão acarreta em maior razão A/PI, para o nível (-) do volume de amostra. A **Figura 36** mostra as variações das respostas dos fatores para o 17β-estradiol e o estriol, que apresentaram efeito de interação de terceira ordem.

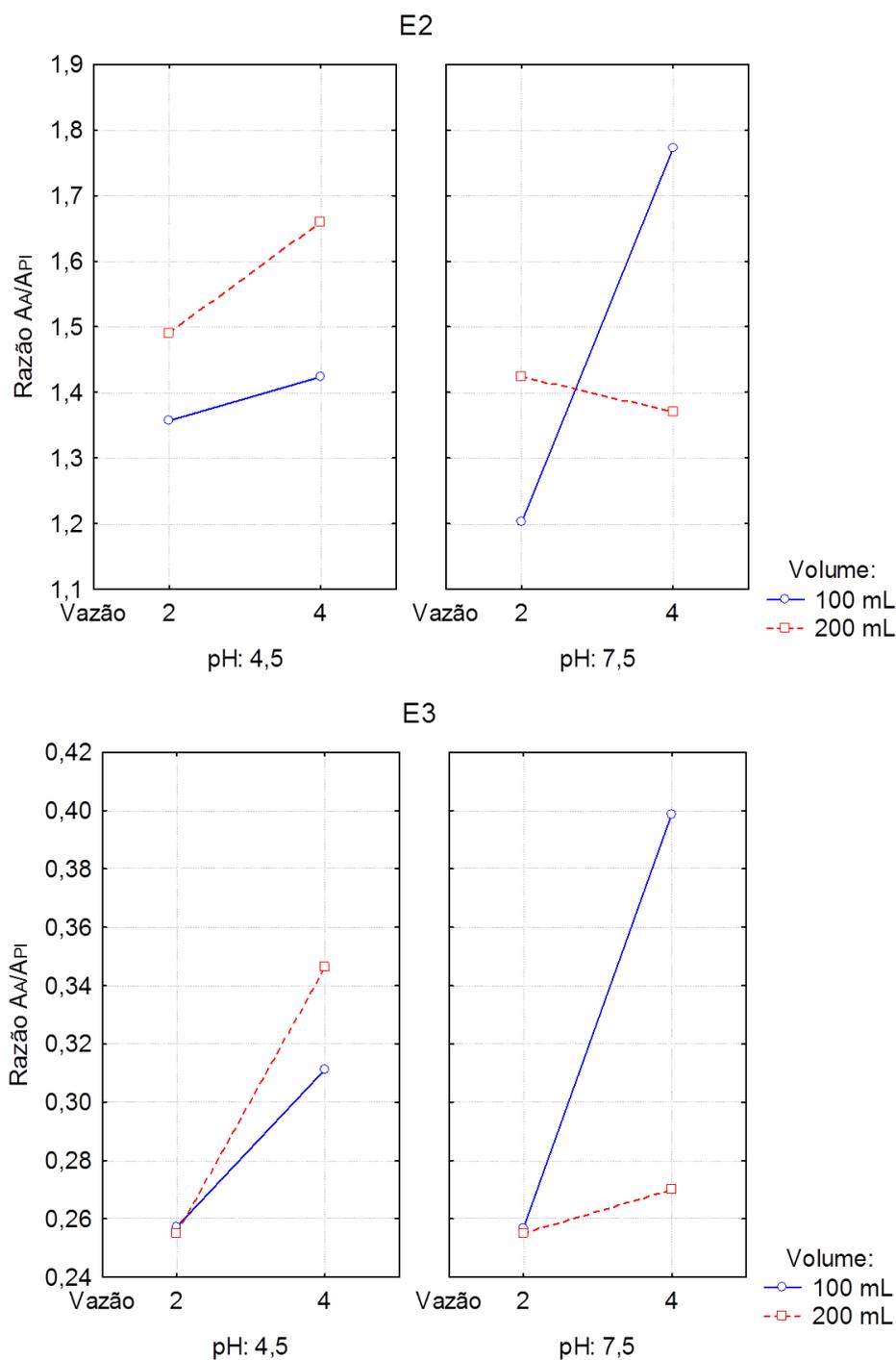


FIGURA 36: Variações das respostas com os níveis dos três fatores para o 17β -estradiol (E2) e o estriol (E3).

Através dos gráficos da **Figura 36**, observa-se a presença de efeitos de interação de terceira ordem (pH x volume x vazão). Para o 17β -estradiol, por exemplo, isso é verificado pela mudança de inclinação das retas. Em pH 4,5, tanto para o volume de amostra quanto para a vazão, há aumento da razão A/PI do nível (-) para o nível (+), sendo esse acréscimo mais pronunciado quando emprega-se 200 mL como o volume de amostra. Já no pH 7,5, para este mesmo volume

(200 mL) o que ocorre é um decréscimo na razão A/PI ao variar a vazão do nível (-) para o (+). Porém, em contrapartida, para o volume de amostra de 100 mL, em pH 7,5, há um aumento na razão A/PI quando a vazão passa de 2 mL min⁻¹ para 4 mL min⁻¹. Essa diferença de comportamento dos resultados é decorrente da interação entre os fatores pH, volume de amostra e vazão.

Mesmo havendo efeitos principais e de interação significativos para E1, E2 EE2 e E3, não foi possível construir superfícies de respostas para nenhum desses hormônios, uma vez que a análise de variância (ANOVA) indicou falta de ajuste em todos os modelos gerados.

Então, as condições de compromisso selecionadas foram: pH de 7,5, volume de amostra de 100 mL e vazão de 4 mL min⁻¹. No entanto, como o valor de pH igual a 7,5, encontra-se próximo da neutralidade e o pH das amostras varia entre 6 e 7, optou-se por não fazer o ajuste de pH das amostras nos estudos seguintes.

5.8 REUTILIZAÇÃO DO DISCO DE EXTRAÇÃO

Desde o início deste estudo, uma das principais características vislumbrada para a fase extratora baseada em hidrogel, era a de esta ser reutilizável, o que garantiria não somente apelo comercial a este novo material, mas também uma maior facilidade e aceitação da técnica GPE. A fase extratora desenvolvida neste trabalho, baseada em um hidrogel de PVA e pectina, apresentou satisfatoriamente a possibilidade de reuso.

Cada disco de hidrogel passou por dez extrações sucessivas, sem ser danificado, sendo que entre uma extração e outra se realizou a limpeza do material com metanol e água ultrapura. Esta etapa de limpeza e acondicionamento tem sido comum nas fases extradoras com caráter de reutilização, com o principal intuito de evitar-se o efeito de memória. Os resultados das dez extrações (n = 3) para os seis hormônios são apresentados no gráfico da **Figura 37**.

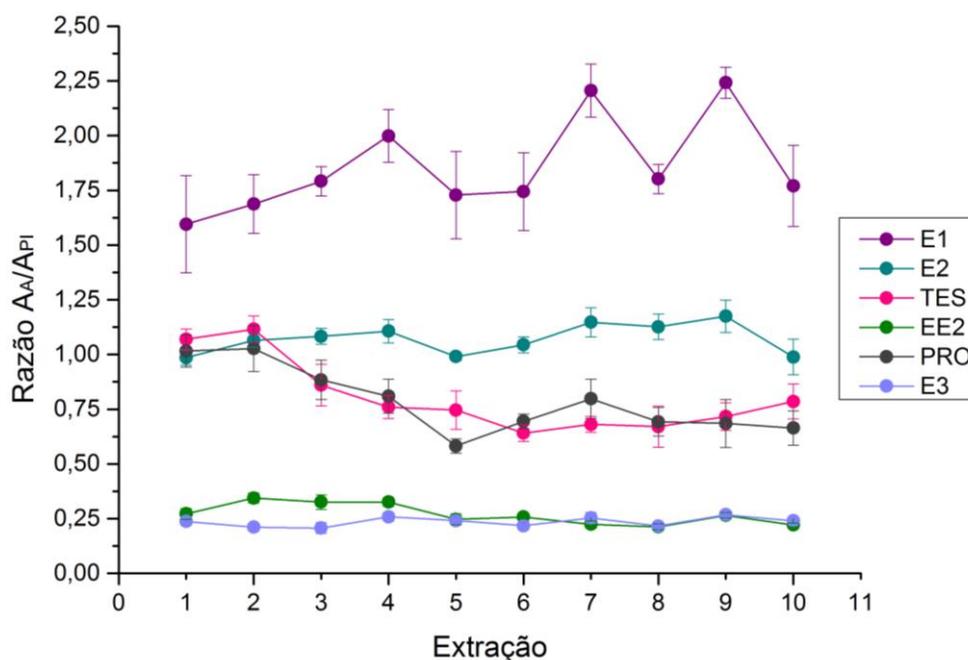


FIGURA 37: Razões A_A/A_{PI} das 10 extrações consecutivas (n=3) para cada hormônio. Modo de registro de íons: MRM.

Para todos os hormônios houve uma diferença de até 20% entre os resultados de uma extração e outra, sendo que para E1, E2 e E3 esse desvio foi apenas 10% para a maioria dos pontos. Já os hormônios EE2, PRO e TES apresentaram desvio superior a 10% para a maioria das extrações, podendo ser acima de 20% para os dois últimos em alguns dos seus pontos. No entanto, vale-se destacar que PRO e TES são os hormônios que normalmente apresentam maior variância nos seus resultados em relação aos demais.

Pode-se observar no gráfico da **Figura 37** que a dispersão dos resultados é aleatória, não sendo identificada a existência de efeito de memória. Segundo Górecki, Yu e Pawliszyn (1999) em fases extratoras cujo mecanismo de extração é por adsorção, é possível a manifestação de um efeito de memória persistente, o que não foi observado no ensaio de reutilização do hidrogel, podendo ser um indicativo de que o mecanismo envolvido na GPE seja de absorção.

Apesar de estudos mais criteriosos quanto à síntese e fabricação dos discos de hidrogéis serem ainda alvo de estudos futuros, os resultados apresentados demonstram que é possível realizar a reutilização dos discos de extração, o que é uma vantagem em relação às fases sorventes empregadas na SPE, cuja reutilização é inviável.

5.9 ANÁLISE DOS PARÂMETROS DE MÉRITO

Para demonstrar a aplicabilidade do hidrogel de PVA:pectina desenvolvido neste trabalho como fase extratora, realizou-se a análise de alguns parâmetros de mérito (linearidade, limite de quantificação – LQ, precisão e exatidão). A estabilidade dos discos de hidrogel foi avaliada através do estudo de reutilização (item 5.8), no qual os discos de extração foram utilizados em dois dias diferentes. Os dispositivos foram armazenados imersos em água ultrapura à temperatura de 4°C. Nesse período, os hidrogéis apresentaram estabilidade, uma vez que não houve diferença entre as razões AA/API dos hormônios extraídos em dias diferentes.

Com relação à linearidade, foi estudada uma faixa de concentração de 0,1 µg L⁻¹ a 100 µg L⁻¹, a qual foi selecionada por ser correspondente a uma faixa de concentração possível de ser encontrada em amostras reais (BIZKARGUENAGA *et al.*, 2012; ALMEIDA; NOGUEIRA, 2015). O intervalo linear, onde a resposta encontrada é diretamente proporcional à concentração do analito, se deu para a faixa de LQ à 100 µg L⁻¹. Os hormônios apresentaram para o LQ valores de RSD inferiores a 12% e exatidão entre 85,1% a 107,3%. Além disso, todos os coeficientes de correlação obtidos foram superiores a 0,99. A **Tabela 20** traz os dados da regressão linear (coeficientes angular, linear e de correlação) juntamente com os resultados de precisão (interensaio) e exatidão do LQ.

TABELA 18: Regressão linear e limite de quantificação (LQ).

Composto	Regressão linear				LQ (n=3)		
	Faixa linear/ µg L ⁻¹	Inclinação	Intercepto	R	Conc./ µg L ⁻¹	RSD/%	Exatidão/ %
E1	0,5 - 100	0,01075	0,02009	0,9973	0,500	0,23	100,1
E2	0,5 - 100	0,00827	0,0462	0,9997	0,500	8,98	97,9
TES	1 - 100	0,00776	0,0379	0,9990	1,00	8,47	85,1
EE2	1 - 100	0,00238	0,01041	0,9982	1,00	11,1	107,3
PRO	1 - 100	0,00916	0,06248	0,9971	1,00	11,7	93,0
E3	1 - 100	0,00137	0,00311	0,9954	1,00	6,77	105,8

R: coeficiente de regressão linear; LQ: limite de quantificação

Foi possível quantificar com precisão (RSD < 20%) os hormônios E1 e E2 na concentração de 0,1 µg L⁻¹, no entanto, essa concentração não pôde ser empregada como LQ uma vez que não foi obtida uma exatidão adequada (entre 80 e 120%), sendo então utilizado como LQ o valor de 0,5 µg L⁻¹. Já para a TES, o EE2 e o E3, pôde-se quantificar esses compostos na concentração de 0,5 µg L⁻¹ com precisão

(RSD < 20%), mas este valor também não foi utilizado como LQ devido à sua baixa exatidão (< 80%). Para a PRO foi possível quantificar ambas as concentrações de 0,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ com RSD < 20%, porém nenhum desses valores apresentou exatidão adequada, de forma que o LQ desse hormônio foi de 1 $\mu\text{g L}^{-1}$.

A **Figura 38** mostra as curvas analíticas obtidas para a extração dos hormônios, no intervalo de concentração de LQ a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$.

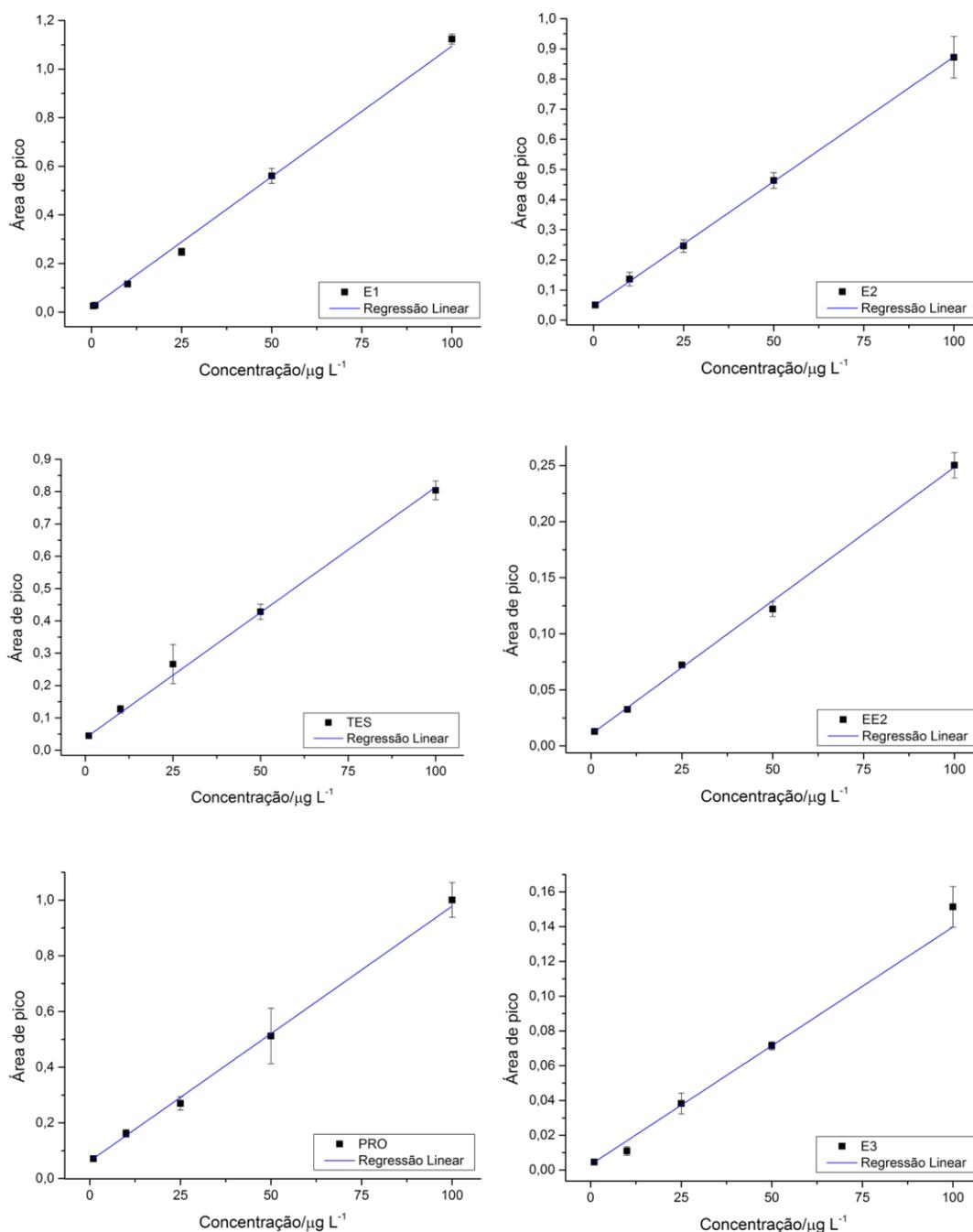


FIGURA 38: Curvas analíticas extraídas obtidas para os 6 hormônios: E1, E2, TES, EE2, PRO E E3.

As extrações das curvas analíticas foram realizadas em triplicata, sendo que a curva para E1 apresenta seis níveis de concentração, enquanto que para E2, TES, EE2, PRO e E3 empregou-se cinco níveis de concentração. As regressões lineares foram significativas para todos os hormônios, uma vez que o F calculado (MQR/MQr), na análise de variância (ANOVA), apresentou valores superiores ao F tabelado, para um nível de confiança de 95%. Além disso, a distribuição dos resíduos foi aleatória.

Os experimentos de precisão intraensaio e interensaio (**Tabela 21**) foram realizados em triplicata, em dois níveis de concentração, sendo obtidos valores de desvio padrão relativo inferiores a 13%, com exceção para o interensaio da PRO na concentração de $50 \mu\text{g L}^{-1}$. Porém, deve-se ressaltar que esse hormônio apresenta, normalmente, uma variância maior nos seus resultados em relação aos demais.

Na **Tabela 21** são apresentados os resultados dos ensaios de precisão e exatidão.

TABELA 19: Resultados dos ensaios de precisão e exatidão.

Composto	Intraensaio (n=3)				Interensaio (n=3)			
	C/ $\mu\text{g L}^{-1}$	Conc. medida/ $\mu\text{g L}^{-1}$	RSD/%	Exatidão/ %	C/ $\mu\text{g L}^{-1}$	Conc. medida/ $\mu\text{g L}^{-1}$	RSD/%	Exatidão/ %
E1	40,0	38,6±0,21	0,5	96,7	50,0	50,3±2,9	5,7	100,5
	80,0	71,8±2,9	4,1	89,7	100,0	102,6±1,9	1,9	102,6
E2	40,0	33,1±1,5	1,9	82,6	50,0	50,5±3,1	6,2	100,9
	80,0	63,9±1,5	2,4	80,0	100,0	99,8±8,29	8,3	99,8
TES	40,0	38,1±4,0	10,4	95,4	50,0	50,3±3,0	6,0	100,6
	80,0	72,8±5,2	7,2	91,0	100,0	98,7±3,8	3,8	98,7
EE2	40,0	37,6±2,0	5,4	94,0	50,0	46,9±2,8	6,0	93,7
	80,0	85,1±7,6	8,9	106,3	100,0	100,8±4,8	4,7	100,8
PRO	40,0	35,6±4,1	11,5	88,9	50,0	49,1±10,9	22,2	98,1
	80,0	83,7±10,3	12,3	104,7	100,0	102,4±6,8	6,6	102,4
E3	40,0	40,4±3,0	7,3	101,0	50,0	49,9±1,7	3,4	99,7
	80,0	85,0±6,5	7,6	106,2	100,0	108,2±8,6	7,9	108,2

C: concentração teórica; RSV: desvio padrão relativo.

A utilização dos discos de hidrogel na extração dos hormônios esteroidais de matriz aquosa mostrou-se reprodutível, uma vez que o RSD foi inferior a 13%, empregando-se um disco de extração diferente para cada ensaio de precisão. Além disso, os resultados de exatidão, entre 80% e 110%, demonstram que é possível utilizar a técnica de GPE na quantificação dos hormônios E1, E2, TES, EE2, PRO e E3 presentes em matrizes aquosas.

5.10 APLICAÇÃO

Após serem realizadas a otimização da técnica e a análise dos parâmetros de mérito, aplicou-se a GPE na análise de amostras de águas do rio Belém, coletadas em janeiro de 2017. Foram amostrados três pontos ao longo do curso do rio, sendo que em todos os pontos coletados encontrou-se mais de um analito em concentrações superiores aos seus limites de quantificação. O único hormônio cuja presença não foi identificada em nenhuma das amostras foi o estriol.

No ponto 1, foram identificados os analitos E1, E2, TES, EE2 e PRO, no entanto, apenas a estrona e a testosterona apresentaram concentrações superiores aos seus LQ, sendo essas, respectivamente, $1,11 \mu\text{g L}^{-1}$ e $3,58 \mu\text{g L}^{-1}$. A presença desses cinco hormônios no ponto 1, localizado a apenas 500 m da nascente do rio, é explicada pelo fato de haver neste local ocupações irregulares próximas a margem do rio Belém, as quais não possuem sistema adequado de coleta de esgoto e acabam descartando seus efluentes por meio de ligações clandestinas. Na **Tabela 22** podem ser visualizados todos os resultados da determinação dos hormônios nas amostras de águas do rio Belém.

TABELA 20: Concentrações dos hormônios nos pontos amostrados do rio Belém.

Composto	Concentração/ $\mu\text{g L}^{-1}$		
	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3
E1	1,11	1,41	< LQ
E2	< LQ	1,44	< LQ
E3	ND	ND	ND
TES	3,58	5,79	5,84
EE2	< LQ	< LQ	1,59
PRO	< LQ	< LQ	< LQ

LQ: Limite de quantificação; ND – não detectado.

O 17β -estradiol foi identificado nas três amostras coletadas, todavia apresentou concentração superior ao seu LQ apenas no ponto 2, com valor igual a $1,44 \mu\text{g L}^{-1}$. Já o 17α -etinilestradiol teve concentração superior ao seu LQ apenas no ponto 3, sendo esta igual a $1,59 \mu\text{g L}^{-1}$. O rio Belém corta a região central de Curitiba, que possui alta densidade populacional, e recebe tanto esgoto doméstico quanto resíduos sólidos produzidos nessa região, chegando no ponto 3, localizado a montante de ETE Belém, altamente degradado. Nesse ponto, também foi possível quantificar a testosterona, cuja concentração obtida ($5,84 \mu\text{g L}^{-1}$) foi a maior entre os hormônios estudados. A progesterona também pôde ser identificada em todas as

amostras, porém em concentrações inferiores ao LQ. Esses resultados demonstram então, que a fase estudada pode ser empregada na extração de hormônios presentes, em baixas concentrações ($\mu\text{g L}^{-1}$), em amostras complexas como são as de águas superficiais.

Ide (2014) também determinou hormônios esteroidais (E1, E2 e EE2) em amostras de águas do rio Belém por HPLC-DAD, conseguindo quantificar os hormônios E2 e EE2. O 17β -estradiol foi encontrado nas amostras de águas do rio Belém em concentração de $0,32 \mu\text{g L}^{-1}$ a $5,88 \mu\text{g L}^{-1}$. O 17α -etinilestradiol foi determinado no mesmo ponto de amostragem, estudado neste trabalho, ao lado do parque São Lourenço (ponto 2), em concentração de $0,72 \mu\text{g L}^{-1}$.

Ainda no Brasil, Sodré e colaboradores (2010) determinaram os hormônios E1, E2, EE2 e E3 por LC-MS/MS, em amostras de águas do rio Atibaia (Campinas, SP) e em amostra de esgoto. Obtendo concentrações de $2,3 \text{ ng L}^{-1}$ a 39 ng L^{-1} para esses compostos nas amostras de água superficial e 182 ng L^{-1} para o E3 na amostra de esgoto bruto.

5.11 SPE X GPE

A performance do hidrogel P15PC2, como fase extratora de GPE, foi comparada com três fases empregadas em SPE: C18 (500 mg), Strata-X (200 mg) e Oasis HLB (500 mg), para a extração dos hormônios (E1, E2, TES, EE2, PRO e E3). Para isso, as extrações foram realizadas, em triplicata, sob as condições de compromisso previamente otimizadas utilizadas na GPE, com diferença apenas para o condicionamento das fases extratoras, no qual, para os cartuchos, além da água ultrapura foi utilizado metanol.

Uma vez que, as fases de SPE estudadas possuíam maiores massas que o hidrogel, os resultados serão apresentados normalizados para 50 mg de fase, sendo assim, os valores das áreas dos hormônios foram divididos por 4, no caso do Strata-X, e por 10, para o C18 e o Oasis HLB. Mesmo considerando essa normalização, os picos cromatográficos obtidos para os hormônios, empregando-se as fases sorventes de SPE, foram de 10 (C18) a 100 (Strata-X) vezes maiores que os obtidos para o disco de hidrogel. Esse fato corrobora para menores valores de LD e LQ para as fases comerciais frente à fase de hidrogel desenvolvida, ao menos nas condições empregadas neste trabalho. O Strata-X foi a fase que apresentou maior

eficiência para a extração dos hormônios de amostra aquosa. Este sorvente trata-se de uma fase mista, cujos mecanismos de retenção do analito podem ter natureza hidrofóbica ou hidrofílica.

Comparando-se os resultados da fase C18 com Oasis HLB, o primeiro apresentou melhor performance na extração de compostos com maior coeficiente de partição octanol/água, como a progesterona, uma vez que essa fase é um sorvente apolar. Já o Oasis HLB, teve melhor performance, que o C18, para os compostos de menor $\log K_{O/w}$, como o E3, mantendo ainda assim, uma extração adequada dos analitos de menor polaridade, como o EE2.

A **Figura 39**, mostra os resultados obtidos para cada fase extratora em termos da razão das áreas de pico cromatográfico do analito pelo padrão interno, considerando os resultados normalizados para uma massa de fase extratora de 50 mg.

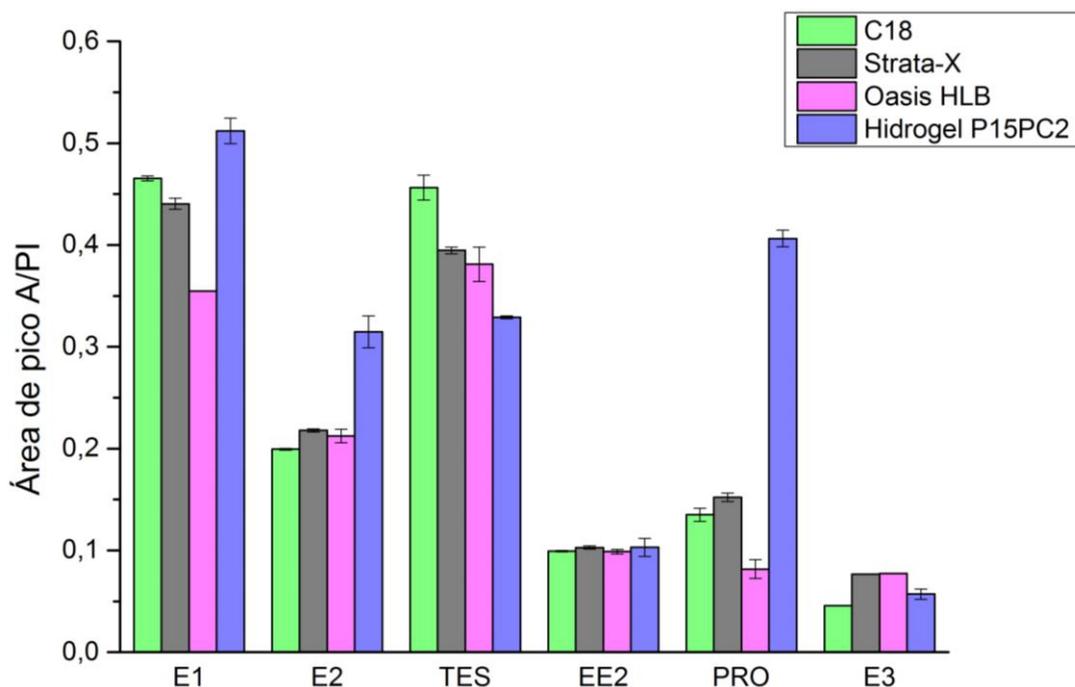


FIGURA 39: Comparação entre as fases extratoras C18, Strata-X, Oasis HLB e hidrogel P15PC2, para a extração de hormônios ($50 \mu\text{g L}^{-1}$) de matriz aquosa. Modo de registro de íons: MRM.

Comparando-se as razões A_A/A_{PI} , nota-se na **Figura 39** que o hidrogel apresentou uma performance muito semelhante a das fases Strata-X e Oasis HLB, sendo essa até superior para os hormônios: E1 ($\log K_{O/w} = 3,13$), E2 ($\log K_{O/w} = 3,30$)

e PRO ($\log K_{o/w} = 3,87$). Destacando-se a resposta da progesterona, para o hidrogel, que foi mais de duas vezes superior que a dos cartuchos comerciais de SPE.

Então, sob as mesmas condições de extração e para a mesma concentração, o hidrogel apresentou eficiência semelhante e até melhor que as fases mistas comerciais (Strata-X e Oasis HLB), com a vantagem de ter um custo muito menor, empregar pequenos volumes de solvente e não apresentar efeito de memória, fato que o destaca como uma fase potencialmente reutilizável. Os cartuchos comerciais, no entanto, são capazes de obter menores limites que quantificação, já que a os picos cromatográficos dos analitos foram maiores.

Todavia, estudos futuros a respeito do uso de hidrogéis como fase extratora para a determinação de hormônios, ou outros contaminantes orgânicos, presentes, em nível traço, em amostras ambientais, podem ser realizados com o propósito de alcançar menores limites de detecção e quantificação. O aumento do diâmetro ou espessura do disco de hidrogel, acarretando em uma maior massa, e a obtenção de maiores fatores de enriquecimento pelo aumento do volume de amostra, devendo este estar aliado ao aumento da vazão, são caminhos a serem seguidos a fim de aumentar a detectabilidade da técnica.

Considerando apenas os gastos com os reagentes (PVA, pectina e ácido cítrico), um disco de hidrogel tem um custo, aproximado, 100 vezes menor que o preço comercial de um cartucho de C18 de 500 mg e mais de 300 vezes menor que o preço comercial de um cartucho Oasis HLB. Neste trabalho, o custo aproximado de um único disco de hidrogel foi calculado como sendo inferior à 15 centavos de real (R\$ 0,15). O custo do dispositivo de filtro seringa não foi levado em consideração uma vez que é reutilizável. O **Quadro 1** faz uma comparação entre a GPE e a SPE (cartucho Oasis HLB) com relação às principais características dessas duas técnicas, para aplicação na determinação de hormônios em amostras de águas superficiais.

Portanto, considerando os resultados apresentados neste trabalho e comparando-os com a informações do **Quadro 1**, concluiu-se que o uso de fases extratoras baseados em hidrogéis, na GPE, é inovador e extremamente promissor, podendo ser avaliado para outros analitos orgânicos em diferentes matrizes complexas.

QUADRO 1: Características das técnicas de SPE e GPE.

Característica	GPE	SPE
Fase extratora	Hidrogel PVA:pectina	Oasis HLB
Massa de fase extratora	50 mg	200 - 500 mg
Solventes para o condicionamento de fase extratora	Água	Água Metanol Acetato de etila
Volume de amostra	100 mL	500 – 1000 mL
Solventes de eluição	Metanol (5 mL)	Metanol Acetato de etila (6 – 12 mL)
LQ	0,5 – 1 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,1 – 10 ng L^{-1}
Possibilidade de caminhos preferenciais	Não	Sim
Efeito de memória	Não	Sim
Reutilização	Viável	Inviável
Custo	Baixo	Elevado

FONTE: Zhang, Z. L.; Hibberd; Zhou, J. L., 2006; Pailler *et al.*, 2009; Trinh *et al.*, 2011; ; Liu, s. *et al.*, 2011; Bizkarguenaga *et al.*, 2012; Migowska *et al.*, 2012.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foi desenvolvida e proposta a técnica de extração em fase gel (*Gel Phase Extraction* - GPE), a qual foi aplicada na extração de hormônios esteroidais presentes em amostras aquosas. Para a determinação dos analitos empregou-se a GC-MS/MS, cujas condições da programação de temperatura precisaram ser otimizadas, a fim de garantir maiores eficiência e resolução à separação cromatográfica.

A derivatização foi uma etapa extremamente importante para a determinação dos hormônios esteroidais pela técnica de GC, interferindo diretamente nas propriedades cromatográficas, como poder de resolução e sensibilidade. O agente derivatizante mais adequado para os compostos estudados foi o MSTFA:1%TMSI, que apresentou maiores respostas e precisões. Para otimização da reação de sililação, aplicou-se dois planejamentos fatoriais completos 2^3 com ponto central. Isso permitiu a identificação dos parâmetros com maior influência sobre a reação de sililação, estabelecendo-se como condições de compromisso dos parâmetros temperatura, tempo de reação e volume do agente derivatizante, respectivamente, 70°C, 30 minutos e 30 μ L. A partir do cálculo dos efeitos principais e de interação, constatou-se a existência de efeitos de interação de segunda e terceira ordem, demonstrando a necessidade em se avaliar as variáveis da reação de derivatização de forma multivariada.

A utilização de hidrogéis como fase extratora para GPE foi possível, de forma que, tanto os géis de PVA/alginato quanto os de PVA/pectina foram capazes de extrair os hormônios estudados (E1, E2, TES, EE2, PRO e E3) de amostras aquosas. Entretanto, o maior caráter anfifílico da fase extratora obtido pela substituição do alginato pela pectina levou a uma maior eficiência de extração, principalmente para progesterona, que apresenta o maior coeficiente de partição octanol/água dentre os compostos estudados. O uso de maiores quantidades de fase extratora também levou ao aumento da eficiência de extração, sendo que a composição ótima encontrada para o hidrogel foi P15PC2, a qual é obtida empregando-se soluções de PVA e pectina nas concentrações de 15% e 2% (m/v), respectivamente.

A otimização das variáveis da extração em fase gel (GPE) foi realizada de forma multivariada para os fatores de pH, volume de amostra e vazão, cujas

condições de compromisso foram, respectivamente, 7,5, 100 mL e 4 mL min⁻¹. A vazão influenciou a eficiência da extração de forma mais pronunciada, em relação aos demais parâmetros, sendo que maiores respostas foram obtidas empregando-se altas vazões. Pôde-se observar a presença de efeitos principais e de interação de segunda (E1 e EE2) e terceira (E2 e E3) ordem para as variáveis estudadas.

Um resultado muito interessante do trabalho refere-se à possibilidade de reutilização dos discos de extração. Para dez extrações consecutivas, os hidrogéis mantiveram sua integridade e não apresentaram efeito de memória. Ainda, cada disco de hidrogel apresentou um custo inferior a 15 centavos de real (R\$ 0,15), considerando apenas os custos dos polímeros e do agente reticulante. De forma que, um disco de hidrogel, na condição estudada, tem um custo, no mínimo, 100 vezes menor que dos cartuchos comerciais.

A técnica de GPE apresentou linearidade para o intervalo de LQ a 100 µg L⁻¹, com valores de coeficiente de correlação superiores a 0,99. Os limites de quantificação foram iguais a 0,5 µg L⁻¹, para E1 e E2 e a 1 µg L⁻¹ para TES, EE2, PRO e E3. Os valores de exatidão ficaram entre o intervalo de 80% a 110%, enquanto que a precisão interensaio variou entre 0,23 % a 22,2 % e a intraensaio entre 0,55 % a 12,3 %.

Então, o uso do hidrogel como fase extratora mostrou-se muito promissor para extração de compostos de média e alta polaridade, o que é decorrente das suas características de responder a estímulos externos, ser modulável e conter diversos grupos polares. Foi possível, neste trabalho, obter uma fase sorvente de caráter anfifílico, reproduzível, livre de efeito de memória e de baixo custo. Todavia, não foi possível atingir limites de quantificação tão baixos quanto os obtidos em SPE, empregando-se principalmente o cartucho Oasis HLB.

Portanto, é necessária a continuação dos estudos a respeito da técnica de GPE e dos hidrogéis, a fim de se obter maior detectabilidade na determinação dos hormônios, ou de outros contaminantes orgânicos, presentes em nível traço, em amostras complexas. O aumento do diâmetro do disco de hidrogel, acarretando em uma maior massa, e a obtenção de maiores fatores de enriquecimento pelo aumento do volume de amostra, aliando este, necessariamente, ao aumento da vazão, são caminhos a serem seguidos a fim de aumentar a detectabilidade da técnica de GPE.

REFERÊNCIAS

AGUASPARANÁ - Instituto das Águas do Paraná. Site: <http://www.aguasparana.pr.gov.br>> Acesso em 13 jan 2017.

AGUASPARANÁ - Instituto das Águas do Paraná. **Finalização do plano das bacias do Alto Iguaçu e afluentes do Alto Ribeira**. 2013.

AHMED, E. M. Hydrogel: preparation, characterization, and applications: a review. **Journal of Advanced Research**, v. 6, n. 2, p. 105–121, 2015.

ALBERO, B. *et al.* Analysis of natural-occurring and synthetic sexual hormones in sludge-amended soils by matrix solid-phase dispersion and isotope dilution gas chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1283, p. 39–45, 2013.

ALBERO, B. *et al.* Rapid determination of natural and synthetic hormones in biosolids and poultry manure by isotope dilution GC-MS/MS. **Journal of Separation Science**, v. 37, n. 7, p. 811–819, 2014.

ALEMÁN, J. V. *et al.* Definitions of terms relating to the structure and processing of sols, gels, networks, and inorganic-organic hybrid materials (iupac recommendations 2007). **Pure and Applied Chemistry**, v. 79, n. 10, p. 1801–1829, 2007.

ALMEIDA, C.; NOGUEIRA, J. M. F. Determination of steroid sex hormones in water and urine matrices by stir bar sorptive extraction and liquid chromatography with diode array detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, n. 4, p. 1303–1311, 2006.

ALMEIDA, C.; NOGUEIRA, J. M. F. Determination of steroid sex hormones in real matrices by bar adsorptive microextraction (baµe). **Talanta**, v. 136, p. 145–154, 2015.

AUFARTOVÁ, J. *et al.* Determination of steroid hormones in biological and environmental samples using green microextraction techniques: an overview. **Analytica Chimica Acta**, v. 704, n. 1–2, p. 33–46, 2011.

AUGUSTO, F. *et al.* New sorbents for extraction and microextraction techniques. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2533–2542, 2010.

BAGHERI, H.; SARAJI, M. Conductive polymers as new media for solid-phase extraction: isolation of chlorophenols from water sample. **Journal of Chromatography A**, v. 986, n. 1, p. 111–119, 2003.

BAHRAM, M.; KESHVARI, F.; MOHSENI, N. A novel hydrogel based microextraction of analytes. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 20, n. 1, p. 624-631, 2013.

BAHRAM, M.; KESHVARI, F.; NAJAFI-MOGHADDAM, P. Development of cloud point extraction using pH-sensitive hydrogel for preconcentration and determination of malachite green. **Talanta**, v. 85, n. 2, p. 891–896. 2011.

BASHEER, C. *et al.* Polymer-coated hollow-fiber microextraction of estrogens in water samples with analysis by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1100, n. 2, p. 137–143, 2005.

BIZKARGUENAGA, E. *et al.* Solid-phase extraction combined with large volume injection-programmable temperature vaporization-gas chromatography-mass spectrometry for the multiresidue determination of priority and emerging organic pollutants in wastewater. **Journal of Chromatography A**, v. 1247, p. 104–117, 2012.

BOWDEN, J. A. *et al.* Enhanced analysis of steroids by gas chromatography/mass spectrometry using microwave-accelerated derivatization. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 16, p. 6725–6734, 2009.

BRITO, C. W. *et al.* Síntese e caracterização de hidrogéis compósitos a partir de copolímeros acrilamida-acrilato e caulim: efeito da constituição de diferentes caulins do nordeste brasileiro. **Química Nova**, v. 36, n. 1, p. 40–45, 2013.

BUCHBERGER, W. W. Current approaches to trace analysis of pharmaceuticals and personal care products in the environment. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 4, p. 603–618, 2011.

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

CAMPESE, G. M. *et al.* Resistência mecânica de hidrogéis termo-sensíveis constituídos de alginato- Ca^{2+} /PNIPAAm, tipo SEMI-IPN. **Química Nova**, v. 30, n. 7, p. 1649–1652, 2007.

CARPINTEIRO, J. *et al.* Applicability of solid-phase microextraction followed by on-fiber silylation for the determination of estrogens in water samples by gas chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1056, n. 1–2, p. 179–185, 2004.

CHEN, B. *et al.* Hollow fiber liquid-liquid microextraction combined with high performance liquid chromatography-ultraviolet detection for the determination of various environmental estrogens in environmental and biological samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1305, p. 17–26, 2013.

CHEN, Y. *et al.* Sample preparation. **Journal of Chromatography A**, v. 1184, n. 1–2, p. 191–219, 2008.

CHILDS, A. *et al.* Fabricating customized hydrogel contact lens. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1-9, 2016.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Ed. de UNICAMP, 2006.

COMBALBERT, S. *et al.* Enhanced methods for conditioning, storage, and extraction of liquid and solid samples of manure for determination of steroid hormones by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 398, n. 2, p. 973–984, 2010.

DALLEGRAVE, A. Determinação de hormônios estrógenos e progestágenos em amostras ambientais por GC-MS. **Dissertação** - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

DATTA, A. Characterization of polyethylene glycol hydrogels for biomedical applications. **Tese** - Louisiana State University, Baton Rouge, 2007.

DEBLONDE, T.; COSSU-LEGUILLE, C.; HARTEMANN, P. Emerging pollutants in wastewater: a review of the literature. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 214, n. 6, p. 442–448, 2011.

DELBÈS, G.; LEVACHER, C.; HABERT, R. Estrogen effects on fetal and neonatal testicular development. **Reproduction**, v. 132, n. 4, p. 527–538, 2006.

ELLIOTT, J. E. *et al.* Structure and swelling of poly(acrylic acid) hydrogels: effect of pH, ionic strength, and dilution on the crosslinked polymer structure. **Polymer**, v. 45, n. 5, p. 1503–1510, 2004.

FARAJZADEH, M. A.; NOURI, N.; KHORRAM, P. Derivatization and microextraction methods for determination of organic compounds by gas chromatography. **Trac - Trends in Analytical Chemistry**, v. 55, p. 14–23, 2014.

FARRÉ, M. *et al.* Achievements and future trends in the analysis of emerging organic contaminants in environmental samples by mass spectrometry and bioanalytical techniques. **Journal of Chromatography A**, v. 1259, p. 86–99, 2012.

FARRÉ, M. La *et al.* Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment. **Trac - Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, n. 11, p. 991–1007, 2008.

FATTA, D. *et al.* Analytical methods for tracing pharmaceutical residues in water and wastewater. **Trac - trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 6, p. 515–533, 2007.

FONTANALS, N.; MARCÉ, R. M.; BORRULL, F. New hydrophilic materials for solid-phase extraction. **Trac - Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 5, p. 394–406, 2005.

FONTANALS, N.; MARCÉ, R. M.; BORRUL, F.. New materials in sorptive extraction techniques for polar compounds. **Journal of Chromatography A**, v. 1152, n. 1–2, p. 14–31, 2007.

GERLACH, G. *et al.* Chemical and pH sensors based on the swelling behavior of hydrogels. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 111–112, p. 555–561, 2005.

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

GÓRECKI, T.; YU, X.; PAWLISZYN, J. Theory of analyte extraction by selected porous polymer spme fibres. **The Analyst**, v. 124, n. 5, p. 643–649, 1999.

HALKET, J. M.; ZAIKIN, V. G. Derivatization in mass spectrometry - 1. silylation. **European journal of Mass Spectrometry**, v. 9, n. 1, p. 1–21, 2003.

HAMID, H.; ESKICIOGLU, C. Fate of estrogenic hormones in wastewater and sludge treatment: a review of properties and analytical detection techniques in sludge matrix. **Water Research**, v. 46, n. 18, p. 5813–5833, 2012.

HERNÁNDEZ-BORGES, J. *et al.* Sample treatments prior to capillary electrophoresis-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1153, n. 1–2, p. 214–226, 2007.

HOFFMAN, A. S. Hydrogels for biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 18–23, 2002.

HUANG, B. *et al.* New discoveries of heating effect on trimethylsilyl derivatization for simultaneous determination of steroid endocrine disrupting chemicals by GC–MS. **Chromatographia**, v. 71, n. 1–2, p. 149–153, 2010.

HUCK, C. W.; BONN, G. K. Recent developments in polymer-based sorbents for solid-phase extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 885, n. 1–2, p. 51–72, 2000.

HUHA, M. A; LEWIS, J. A. Polymer effects on the chemorheological and drying behavior of alumina–poly (vinyl alcohol) gelcasting suspensions. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 63, n. 189134, p. 1957–1963, 2000.

IDE, A. H. Produtos farmacêuticos e de higiene pessoal no rio Iguaçu e seus afluentes. **Dissertação** - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

IPPUC - Instituto de Pesquisa e Planejamento Urbano de Curitiba. **Plano municipal de regularização fundiária em áreas de preservação permanente**, 2007.

IRWIN, L. K.; GRAY, S.; OBERDÖRSTER, E. Vitellogenin induction in painted turtle, *Chrysemys picta*, as a biomarker of exposure to environmental levels of estradiol. **Aquatic Toxicology**, v. 55, n. 1–2, p. 49–60, 2001.

IUPAC. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835–855, 2002.

JARDIM, I. C. S. F. Extração em fase sólida: fundamentos teóricos e novas estratégias para preparação de fases sólidas. **Scientia Chromatographica**, v. 2, p. 13–25, 2010.

JIANG, J. Q.; ZHOU, Z.; SHARMA, V. K. Occurrence, transportation, monitoring and treatment of emerging micro-pollutants in waste water - a review from global views. **Microchemical Journal**, v. 110, p. 292–300, 2013.

KIDD, K. A. *et al.* Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 21, p. 8897–8901, 2007.

KUMIRSKA, J. *et al.* Simultaneous determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs and oestrogenic hormones in environmental solid samples. **Science of the Total Environment**, v. 508, p. 498–505, 2015.

LEE, C. T.; KUNG, P. H.; LEE, Y. Der. Preparation of poly(vinyl alcohol)-chondroitin sulfate hydrogel as matrices in tissue engineering. **Carbohydrate Polymers**, v. 61, n. 3, p. 348–354, 2005.

LIU, S. *et al.* Trace analysis of 28 steroids in surface water, wastewater and sludge samples by rapid resolution liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography. A**, v. 1218, n. 10, p. 1367–1378, 2011.

LOPES, L. C. Obtenção de géis eletroativos a partir de polipirrol e pectina cítrica. **Dissertação** - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

LOPEZ, B. *et al.* Science of the total environment screening of french groundwater for regulated and emerging contaminants. **Science of the Total Environment**, v. 518–519, p. 562–573, 2015.

MANSUR, H. S. *et al.* FTIR spectroscopy characterization of poly (vinyl alcohol) hydrogel with different hydrolysis degree and chemically crosslinked with glutaraldehyde. **Materials Science and Engineering C**, v. 28, n. 4, p. 539–548, 2008.

MCLACHLAN, J. A; SIMPSON, E.; MARTIN, M. Endocrine disrupters and female reproductive health. **Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 20, n. 1, p. 63–75, 2006.

MIÈGE, C. *et al.* Evaluation of estrogenic disrupting potency in aquatic environments and urban wastewaters by combining chemical and biological analysis. **Trac - Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 2, p. 186–195, 2009.

MIGOWSKA, N. *et al.* Simultaneous analysis of non-steroidal anti-inflammatory drugs and estrogenic hormones in water and wastewater samples using gas chromatography-mass spectrometry and gas chromatography with electron capture detection. **The Science of the Total Environment**, v. 441, p. 77–88, 2012.

MOREIRA, H. R. *et al.* Injectable pectin hydrogels produced by internal gelation: pH dependence of gelling and rheological properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 103, n. 1, p. 339–347, 2014.

MOURA, M. R. De. Caracterização de matriz polimérica de hidrogel termosensível sintetizada a partir de alginato-Ca²⁺ e poli(n-isopropil acrilamida), do tipo IPN e SEMI-IPN. **Dissertação** - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2005.

NOPPE, H. *et al.* Novel analytical methods for the determination of steroid hormones in edible matrices. **Analytica Chimica Acta**, v. 611, n. 1, p. 1–16. 2008.

ORATA, F. Derivatization reactions and reagents for gas chromatography analysis. **Advanced Gas Chromatography - progress in agricultural, biomedical and industrial applications**, p. 83–156. 2012.

PAILLER, J. Y. *et al.* Solid phase extraction coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of sulfonamides, tetracyclines, analgesics and hormones in surface water and wastewater in luxembourg. **Science of the Total Environment**, v. 407, n. 16, p. 4736–4743, 2009.

PAL, K.; BANTHIA, A.; MAJUMDAR, D. Polymeric hydrogels: characterization and biomedical applications. **Designed Monomers and Polymers**, v. 12, p. 197–220, 2009.

PANTER, G. H.; THOMPSON, R. S.; SUMPTER, J. P. Adverse reproductive effects in male fathead minnows (*pimephales promelas*) exposed to environmentally relevant concentrations of the natural oestrogens, oestradiol and oestrone. **Aquatic Toxicology**, v. 42, n. 4, p. 243–253, 1998.

PARK, J.; PARK, J.; RUCKENSTEIN, E. L. I. On the viscoelastic properties of poly (vinyl alcohol) and chemically crosslinked poly (vinyl alcohol). **Journal of Applied Polymer Science**, v. 82, p. 1816–1823, 2001.

PAVIA, D. L. *et al.* **Introdução à espectroscopia**. 3. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

PEDROUZO, M. *et al.* Estrogens and their conjugates: determination in water samples by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 78, n. 4–5, p. 1327–1331, 2009.

PEPPAS, N. A. *et al.* Hydrogels in pharmaceutical formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, n. 1, p. 27–46, 2000.

QUINTANA, J. B. *et al.* Determination of natural and synthetic estrogens in water by gas chromatography with mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1024, n. 1–2, p. 177–185, 2004.

RODRÍGUEZ, I. *et al.* Determination of chlorophenols at the sub-ppb level in tap water using derivatization, solid-phase extraction and gas chromatography with plasma atomic emission detection. **Journal of Chromatography A**, v. 721, n. 2, p. 297–304, 1996.

SANAGI, M. M. *et al.* Molecularly imprinted polymer solid-phase extraction for the analysis of organophosphorus pesticides in fruit samples. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 32, n. 2, p. 155–161, 2013.

SARAVANABHAVAN, G.; HELLEUR, R.; HELLOU, J. GC-MS/MS measurement of natural and synthetic estrogens in receiving waters and mussels close to a raw sewage ocean outfall. **Chemosphere**, v. 76, n. 8, p. 1156–1162, 2009.

SEGURA, J.; VENTURA, R.; JURADO, C. Derivatization procedures for gas chromatographic-mass spectrometric determination of xenobiotics in biological samples, with special attention to drugs of abuse and doping agents. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**, v. 713, n. 1, p. 61–90, 1998.

SHAREEF, A. *et al.* Suitability of n,o-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide and n-(tert-butyl)dimethylsilyl)-n-methyltrifluoroacetamide as derivatization reagents for the determination of the estrogens estrone and 17 α - ethinylestradiol by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1026, n. 1–2, p. 295–300, 2004.

SHAREEF, A.; ANGOVE, M. J.; WELLS, J. D. Optimization of silylation using n-methyl-n-(trimethylsilyl)- trifluoroacetamide, n,o-bis-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide and n-(tert-butyl)dimethylsilyl)-n-methyltrifluoroacetamide for the determination of the estrogens estrone and 17 α -ethinylestradiol. **Journal of Chromatography A**, v. 1108, n. 1, p. 121–128, 2006.

SHIMADZU. *Operation Guide: Method Development*. Japão: 2014.

SIKAREEPAISAN, P.; RUKTANONCHAI, U.; SUPAPHOL, P. Preparation and characterization of asiaticoside-loaded alginate films and their potential for use as effectual wound dressings. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 4, p. 1457–1469, 2011.

SMITH, R. M. Before the injection--modern methods of sample preparation for separation techniques. **Journal of Chromatography. A**, v. 1000, n. 1–2, p. 3–27, 2003.

SODRÉ, F. F. *et al.* Assessing selected estrogens and xenoestrogens in Brazilian surface waters by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 96, n. 1, p. 92–98, 2010.

STONE, S. A. *et al.* In situ citric acid crosslinking of alginate/polyvinyl alcohol electrospun nano fibers. **Materials Letters**, v. 112, p. 32–35, 2013.

STRECK, G. Chemical and biological analysis of estrogenic, progestagenic and androgenic steroids in the environment. **Trac - Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 6, p. 635–652, 2009.

TANG, Y. *et al.* Rheological characterisation of a novel thermosensitive chitosan / poly (vinyl alcohol) blend hydrogel. **Carbohydrate Polymers**, v. 67, p. 491–499, 2007.

TOGOLA, A.; BUDZINSKI, H. Analytical development for analysis of pharmaceuticals in water samples by SPE and GC-MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 388, n. 3, p. 627–635, 2007.

TOMŠÍKOVÁ, H. *et al.* High-sensitivity analysis of female-steroid hormones in environmental samples. **Trac - Trends in Analytical Chemistry**, v. 34, p. 35–57, 2012.

TRINH, T. *et al.* Simultaneous determination of estrogenic and androgenic hormones in water by isotope dilution gas chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 12, p. 1668–1676, 2011.

U. S. PHARMACOPEIA. *Estrone*. Safety data sheet. Rockville - US: 2005.

U. S. PHARMACOPEIA. *Progesterone*. Safety data sheet. Rockville - US: 2006

U. S. PHARMACOPEIA. *Estradiol*. Safety data sheet. Rockville - US: 2010a.

U. S. PHARMACOPEIA. *Ethinyl Estradiol*. Safety data sheet. Rockville - US: 2010b

WEN, Y. *et al.* Recent advances in solid-phase sorbents for sample preparation prior to chromatographic analysis. **Trac - Trends in Analytical Chemistry**, v. 59, p. 26–41, 2014.

YING, G. G.; KOOKANA, R. S.; RU, Y. J. Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. **Environment International**, v. 28, n. 6, p. 545–551, 2002.

ZAIKIN, V. G.; HALKET, J. M. Derivatization in mass spectrometry - 2. acylation. **European Journal of Mass Spectrometry**, v. 9, p. 421–434, 2003.

ZAPF, A.; HEYER, R.; STAN, H.-J. Rapid micro liquid-liquid extraction method for trace analysis of organic contaminants in drinking water. **Journal of Chromatography A**, v. 694, p. 453–461, 1995.

ZHANG, K.; ZUO, Y. Pitfalls and solution for simultaneous determination of estrone and 17 α -ethinylestradiol by gas chromatography-mass spectrometry after derivatization with n,o-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide. **Analytica Chimica Acta**, v. 554, n. 1–2, p. 190–196, 2005.

ZHANG, Z. L.; HIBBERD, A.; ZHOU, J. L. Optimisation of derivatisation for the analysis of estrogenic compounds in water by solid-phase extraction gas chromatography-mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 577, n. 1, p. 52–61, 2006.

ZUO, Y.; ZHANG, K.; LIN, Y. Microwave-accelerated derivatization for the simultaneous gas chromatographic-mass spectrometric analysis of natural and synthetic estrogenic steroids. **Journal of Chromatography A**, v. 1148, n. 2, p. 211–218, 2007.