



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



Dissertação de Mestrado

**Desenvolvimento de uma metodologia analítica
utilizando nanopartículas magnéticas
funcionalizadas no preparo de amostra para
determinação de hormônios em águas**

Ana Rosa da Silva Neta

João Pessoa

Setembro de 2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



Dissertação de Mestrado

**Desenvolvimento de uma metodologia analítica
utilizando nanopartículas magnéticas
funcionalizadas no preparo de amostra para
determinação de hormônios em águas**

Ana Rosa da Silva Neta

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Kátia Messias Bichinho

Coorientador: Dr. Gilvan Pozzobon Pires

João Pessoa

Setembro de 2020

**Catalogação na publicação
Seção de Catalogação e Classificação**

S586d Silva Neta, Ana Rosa da.

Desenvolvimento de uma metodologia analítica utilizando nanopartículas magnéticas funcionalizadas no preparo de amostra para determinação de hormônios em águas / Ana Rosa da Silva Neta. - João Pessoa, 2020.

111 f. : il.

Orientação: Kátia Messias Bichinho.

Coorientação: Gilvan Pozzobon Pires.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN.

1. Química. 2. Estrogênios. 3. Interferentes endócrinos. 4. MSPE. 5. HPLC-DAD. I. Bichinho, Kátia Messias. II. Pires, Gilvan Pozzobon. III. Título.

UFPB/BC

CDU 54(043)

Desenvolvimento de uma metodologia analítica utilizando nanopartículas magnéticas funcionalizadas no preparo de amostras para determinação de hormônios em águas.

Dissertação de Mestrado apresentada pela aluna Ana Rosa da Silva Neta e aprovada pela banca examinadora em 25 de setembro de 2020.



Profa. Dra. Kátia Messias Bichinho
Orientadora/Presidente



Dr. Gilvan Pozzobon Pires
2º Orientador



Prof. Dr. Fernando José Volpi Eusébio de Oliveira
Examinador



Profa. Dra. Liliana de Fátima Bezerra Lira Pontes
Examinadora

Assinaturas da Banca realizadas em modo webconferência em 25/09/2020, digitalizadas e certificadas pela Prof. Dra. Kátia Messias Bichinho (SIAPE 1774131) em 25/09/2020. 

*À minha mãe
Por toda a dedicação
e carinho.*

A GRADECIMENTOS

Este trabalho foi desenvolvido com o auxílio de muitas pessoas, seja de forma direta ou indireta, à todos serei eternamente grata.

- Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado força para concluir este trabalho.
- À minha mãe por todo o cuidado e incentivo.
- À professora Dr^a. Kátia Messias Bichinho pela orientação, todos os ensinamentos, conselhos e amizade.
- Ao Dr. Gilvan Pozzobon Pires pela coorientação e toda a ajuda no desenvolvimento desse trabalho.
- Aos professores doutores Fernando Volpi, Iêda Garcia e Liliana Lira pelas contribuições nas bancas examinadoras.
- Agradeço imensamente à José Licarion por disponibilizar seu tempo para ensinar muito do que aprendi desde que entrei no LAQA.
- Aos grandes amigos que fiz nos anos da graduação e durante no período do mestrado. São pessoas maravilhosas, que sempre me incentivaram e me deram coragem quando eu mesma não acreditava em mim. Em especial, agradeço à Carla Priscila,

Daniella Iris, Denise Nóbrega, Gessika Dantas, Jainny Rityelle, Jaqueline Patrício, João Batista, Juliana Cruz, Kelly Danubia, Laila Barbosa, Larissa Souza, Nayara Lima, Samantha Dantas, Thyago Marques e Wallis Cavalcante.

- À Cintia Jimena pela parceria nos estudos.
- À Amália, Edilene, Emanuella, Mayara e Railson por sempre estarem disponíveis a ajudar, tirar dúvidas e discutir sobre os trabalhos no laboratório.
- À Flaviano por estar sempre disposto a colocar o laboratório em ordem, proporcionando um ambiente de trabalho melhor a todos.
- À todos os membros do LAQA que tornam os dias de trabalho mais divertidos, pelos momentos de descontração e produtivas discussões durante os cafézinhos.
- Aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Química.
- À CAPES pela bolsa de estudos.
- Ao INCTAA e ao CNPq.
- À Universidade Federal da Paraíba.

"Um líquido é um estado da matéria sem formato específico.
Ele muda facilmente e se molda ao recipiente que o contém.
O corpo humano é 70 % água."

Vis a Vis

RESUMO

Os estrogênios estriol (E3), 17β -estradiol (E2), 17α -etinilestradiol (EE2) e estrona (E1) são contaminantes emergentes pertencentes a classe dos interferentes endócrinos. As principais formas de introdução desses compostos nos corpos d'água é pela descarga de esgoto. Estudos apontam que a exposição contínua a esses contaminantes pode ocasionar feminilização de peixes, anomalias no sistema reprodutor de algumas espécies de animais, incidência de alguns tipos de câncer em seres humanos, diminuição de espermas em homens entre outros efeitos. Diante disso, torna-se necessário o desenvolvimento de métodos para identificar e quantificar a presença dessas substâncias nas águas superficiais. Nesse trabalho foi validada uma metodologia analítica para determinar os quatro estrogênios, utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada ao arranjo de diodos (DAD). A validação do método se mostrou seletiva, com faixa linear entre 10 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ e $r = 0,99$ para todos os hormônios, a repetibilidade intradia e a precisão intermediaria apresentaram $CV < 4,43\%$. Na etapa de preparo das amostras foi empregada a técnica de extração em fase sólida magnética (MSPE), para tanto, foram sintetizadas nove nanopartículas magnéticas e testadas mediante o desenvolvimento de planejamento de experimentos para otimizar as condições de extração, os melhores resultados foram obtidos utilizando 10 mg da nanopartícula 50TEOS:1C16 inicialmente dispersa em 1 mL de metanol que ficam 10 minutos em contato com a solução de trabalho sob agitação magnética. Para a eluição, 1,8mL de uma mistura de água:metanol 25:75 % v v^{-1} ficou em contato com as nanopartículas por 10 minutos.

Palavras chave: estrogênios, interferentes endócrinos, MSPE, HPLC-DAD.

ABSTRACT

Estrogens estriol (E3), 17 β -estradiol (E2), 17 α -ethinylestradiol (EE2) and estrone (E1) are emerging contaminants belonging to the endocrine interfering class. The main ways of introducing these compounds into water bodies is through the discharge of sewage. Studies indicate that continuous exposure to these contaminants can cause feminization of fish, anomalies in the reproductive system of some animals species, incidence of some types of cancer in humans, decrease in sperm in men, among other effects. Therefore, it is necessary to develop methods to identify and quantify the presence of these substances in surface waters. In this work, an analytical methodology was validated to determine the four estrogens, using high performance liquid chromatography (HPLC) coupled to the diode array (DAD). The validation of the method was selective, with a linear range from 10 to 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ and $r = 0.99$ for all hormones, intraday repeatability and intermediate precision showed $\text{CV} < 4, 43 \%$. In the stage of sample preparation, the magnetic solid phase extraction technique (MSPE) was used. For this purpose, nine magnetic nanoparticles were synthesized and tested through the development of design experiments to optimize the extraction conditions, the best results were obtained using 10 mg of the nanoparticle 50TEOS:1C16 initially dispersed in 1 mL of methanol that remain in contact with the working solution for 10 minutes under magnetic stirring. For elution, 1,8mL of a mixture of water:methanol 25:75 % v v $^{-1}$ stayed in contact with the nanoparticles for 10 minutes.

Keywords: estrogens, endocrine disruptors, MSPE, HPLC-DAD.

SUMÁRIO

Agradecimentos

Resumo

Abstract

| | | |
|----------|---|----------|
| 1 | Introdução | 1 |
| 1.1 | Objetivos | 3 |
| 1.2 | Objetivos específicos | 3 |
| 2 | Fundamentação Teórica | 4 |
| 2.1 | Contaminantes emergentes | 5 |
| 2.1.1 | Interferentes endócrinos | 6 |
| 2.1.2 | Estrogênios | 8 |
| 2.2 | Cromatografia líquida de alta eficiência | 10 |
| 2.3 | Métodos de determinação de hormônios | 11 |
| 2.3.1 | Preparo de amostras | 12 |
| 2.3.2 | Nanopartículas magnéticas | 13 |
| 2.4 | Planejamento e otimização de experimentos | 14 |
| 2.5 | Validação de métodos analíticos | 16 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 2.5.1 | Seletividade | 16 |
| 2.5.2 | Linearidade | 17 |
| 2.5.3 | Limite de detecção e limite de quantificação | 18 |
| 2.5.4 | Exatidão | 18 |
| 2.5.5 | Precisão | 20 |
| 3 | Parte experimental | 22 |
| 3.1 | Reagentes e soluções | 23 |
| 3.2 | Análise cromatográfica | 24 |
| 3.3 | Síntese de nanopartículas | 25 |
| 3.4 | Caracterização das nanopartículas | 27 |
| 3.4.1 | Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) | 28 |
| 3.4.2 | Espectrometria de fluorescência de raios X por dispersão em energia | 28 |
| 3.5 | Extração em fase sólida magnética | 28 |
| 3.5.1 | Teste de dispersão | 29 |
| 3.5.2 | Análise de sobrenadante | 30 |
| 3.5.3 | Planejamento e otimização de experimentos | 30 |
| 3.6 | Validação do método HPLC-DAD | 32 |
| 3.6.1 | Seletividade | 32 |
| 3.6.2 | Linearidade e faixa de concentração | 33 |
| 3.6.3 | Limite de detecção e de quantificação | 33 |
| 3.6.4 | Exatidão | 33 |
| 3.6.5 | Precisão | 33 |
| 4 | Resultados e Discussão | 35 |
| 4.1 | Caracterização das nanopartículas | 36 |
| 4.1.1 | Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) | 36 |
| 4.1.2 | Espectrometria de raios X por dispersão de energia | 39 |
| 4.2 | Otimização do processo de extração | 39 |
| 4.2.1 | Extração assistida por ultrassom | 39 |
| 4.2.2 | Extração assistida por agitação magnética | 52 |

| | | |
|--------------------|--|-----------|
| 4.2.2.1 | Avaliação da nanopartícula 50TEOS:2C16 | 57 |
| 4.2.2.2 | Avaliação da nanopartícula sem funcionalização | 61 |
| 4.2.2.3 | Avaliação das nanopartículas 50TEOS: 1C16: 1TVS e 60TEOS: 06C16: 12TVS | 63 |
| 4.2.2.4 | Avaliação das nanopartículas 50TEOS: 1C16: 05TMS, 50TEOS: 1C16: 1TMS e 50TEOS:1C16:2TMS | 64 |
| 4.3 | Validação analítica | 66 |
| 4.3.1 | Seletividade | 66 |
| 4.3.2 | Linearidade | 69 |
| 4.3.3 | Sensibilidade | 73 |
| 4.3.4 | Exatidão | 74 |
| 4.3.5 | Precisão | 75 |
| 5 | Conclusões | 78 |
| Referências | | 80 |
| A | Testes de dispersão e extrações iniciais | 91 |

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-----|---|----|
| 2.1 | Representação esquemática das fontes e destinos de contaminantes emergentes no meio ambiente. Fonte: adaptado de Barbosa <i>et al.</i> ^[14] | 5 |
| 2.2 | Representação do sistema endócrino humano. Fonte: Moreira, 2015 ^[19] . . . | 6 |
| 2.3 | Representação esquemática dos mecanismos de atuação dos interferentes endócrinos: a)resposta normal; b)efeito agonista; c)efeito antagonista. Fonte: Ghiselli <i>et al.</i> ^[18] | 7 |
| 2.4 | Estrutura química dos estrogênios: A)Estrona; B) 17β -estradiol; C) 17α -etinilestradiol; D)Estriol. | 9 |
| 2.5 | Procedimento geral para a realização e interpretação de planejamento de experimentos. Fonte: Adaptado de Pereira <i>et al.</i> ^[70] | 15 |
| 3.1 | Representação esquemática da composição do gradiente da fase móvel utilizada nas análises cromatográficas. | 25 |
| 3.2 | Representação esquemática do processo de síntese das nanopartículas magnéticas. | 26 |
| 3.3 | Representação esquemática do processo de extração. Fonte: adaptado de Li <i>et al.</i> ^[85] | 29 |
| 4.1 | Espectros de FT-IR das nanopartículas sintetizadas. | 38 |

| | | |
|------|--|----|
| 4.2 | Gráfico de Pareto dos efeitos para os quatro estrogênios no planejamento fatorial fracionado 2^{7-3}_{IV} | 42 |
| 4.3 | Gráficos de Pareto dos efeitos para os quatro estrogênios no planejamento fatorial completo 2^3 recalculado | 44 |
| 4.4 | Gráficos de Pareto dos efeitos para os estrogênios no planejamento fatorial 2^2 | 47 |
| 4.5 | Gráficos de médias para interação dos efeitos entre os fatores solvente e tempo | 47 |
| 4.6 | Gráficos de Pareto dos efeitos para os estrogênios no segundo planejamento fatorial completo 2^2 | 50 |
| 4.7 | Gráficos de médias para interação dos efeitos entre os fatores solvente e tempo para os estrogênios | 51 |
| 4.8 | Gráficos de Pareto dos efeitos para os estrogênios no terceiro planejamento fatorial 2^2 | 54 |
| 4.9 | Gráficos de médias para interação dos efeitos entre os fatores solvente e tempo | 55 |
| 4.10 | Gráfico de Pareto dos efeitos para os estrogênios no planejamento fatorial completo 2^3 | 60 |
| 4.11 | Gráfico de médias para interação dos efeitos para o 17β -estradiol | 60 |
| 4.12 | Cromatogramas de: (A) mistura padrão dos quatro estrogênios com concentração de $500 \mu\text{g L}^{-1}$, (B) de uma amostra de água coletada na torneira do laboratório e fortificada com $500 \mu\text{g L}^{-1}$ dos quatro estrogênios, (C) amostra de água coletada na torneira do laboratório sem fortificação. Todos os cromatogramas foram registrados por HPLC-DAD | 67 |
| 4.13 | Espectros de absorção molecular UV-Vis de: (1) Estriol; (2) 17β -estradiol; (3) 17α -etinilestradiol e (4) Estrona em preto o padrão de $500 \mu\text{g L}^{-1}$ e em azul amostra testemunha fortificada também com $500 \mu\text{g L}^{-1}$ | 68 |
| 4.14 | Cromatogramas das soluções padrão analíticas dos estrogênios em concentrações crescentes utilizados na construção das curvas analíticas | 69 |
| 4.15 | Faixa de concentração estudada para a construção das curvas analíticas | 70 |

| | |
|--|----|
| 4.16 Curvas analíticas dos estrogênios na faixa de concentração de 21,97 a 1.000 $\mu\text{g L}^{-1}$ para estriol, 11,07 a 1.000 $\mu\text{g L}^{-1}$ para 17β -estradiol, 6,93 a 1.000 $\mu\text{g L}^{-1}$ para 17α -etinilestradiol e 7,27 a 1.000 $\mu\text{g L}^{-1}$ para estrona. | 71 |
| 4.17 Gráficos dos resíduos das curvas analíticas dos estrogênios. | 72 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-----|---|----|
| 2.1 | Excreção média de estrogênio por pessoa em µg por dia. Fonte: adaptado de Adeel <i>et al.</i> ^[32] | 10 |
| 2.2 | Critério de aceitação para recuperação sugeridos pela AOAC. Fonte: AOAC <i>Official Methods of Analysis</i> ^[82] | 19 |
| 3.1 | Composição das soluções preparadas para construir a curva analítica. | 24 |
| 3.2 | Nanopartículas sintetizadas. | 27 |
| 3.3 | Fatores estudados no planejamento fatorial fracionado 2_{IV}^{7-3} | 31 |
| 3.4 | Fatores estudados no primeiro planejamento fatorial completo 2^2 | 31 |
| 3.5 | Fatores estudados no segundo planejamento fatorial completo 2^2 | 31 |
| 3.6 | Fatores estudados no terceiro planejamento fatorial completo 2^2 | 32 |
| 3.7 | Fatores estudados no planejamento fatorial completo 2^3 | 32 |
| 4.1 | Análise elementar por fluorescência de raios X das nanopartículas sintetizadas. | 39 |
| 4.2 | Matriz de resposta para os quatro estrogênios no planejamento fatorial fracionado 2_{IV}^{7-3} | 41 |
| 4.3 | Matriz de resposta para os quatro estrogênios no planejamento fatorial completo 2^3 recalculado. | 43 |
| 4.4 | Resultado dos níveis fixados no planejamento fatorial fracionado 2_{IV}^{7-3} | 46 |
| 4.5 | Matriz de resposta para os analitos no planejamento fatorial 2^2 | 46 |

| | | |
|------|--|----|
| 4.6 | Percentual dos analitos presentes nas soluções de trabalho após a extração. | 48 |
| 4.7 | Somatório dos percentuais de recuperação e sobrenadante dos analitos. | 49 |
| 4.8 | Matriz de resposta para os hormônios no segundo planejamento fatorial completo 2^2 que avaliou a eluição dos analitos. | 49 |
| 4.9 | Percentual de estrogênios presentes nas soluções de trabalho após a extração. | 51 |
| 4.10 | Soma percentual dos valores de recuperação e sobrenadante dos analitos após o processo de extração. | 52 |
| 4.11 | Matriz de resposta para os analitos no terceiro planejamento fatorial 2^2 . . | 53 |
| 4.12 | Percentual de hormônios presentes nas soluções de trabalho após o processo de extração. | 56 |
| 4.13 | Soma dos percentuais de recuperação e remanescente nas soluções de trabalho após o processo de extração. | 56 |
| 4.14 | Fatores escolhidos para o processo de extração e eluição | 57 |
| 4.15 | Resultados percentuais obtidos no teste da nanopartícula 50TEOS:2C16. . | 58 |
| 4.16 | Matriz de resposta para os quatro estrogênios no planejamento fatorial completo 2^3 | 59 |
| 4.17 | Fatores fixados para o processo de extração | 61 |
| 4.18 | Percentuais de recuperação obtidos utilizando as nanopartículas sem funcionalização. | 62 |
| 4.19 | Percentuais de hormônios presentes no sobrenadante da extração realizada com nanopartículas sem funcionalização. | 62 |
| 4.20 | Percentuais de recuperação obtidos no teste de extração com as nanopartículas 50TEOS:1C16:1TVS e 60TEOS:06C16:12TVS | 63 |
| 4.21 | Percentuais de estrogênios presentes na solução de trabalho dos testes com as nanopartículas 50TEOS:1C16:1TVS e 60TEOS:06C16:12TVS | 64 |
| 4.22 | Percentuais de recuperação obtidos no teste de extração com as nanopartículas 50TEOS:1C16:05TMS, 50TEOS:1C16:1TMS e 50TEOS:1C16:2TMS. . | 65 |
| 4.23 | Percentual estrogênico remanescente após os ensaios com as nanopartículas 50TEOS:1C16:05TMS, 50TEOS:1C16:1TMS e 50TEOS:1C16:2TMS. . . . | 65 |
| 4.24 | Valores de pureza de pico e resolução para os quatro estrogênios. | 68 |
| 4.25 | Equações das retas, faixa linear dinâmica e coeficientes de correlação linear das curvas analíticas dos quatro estrogênios. | 71 |

| | |
|---|----|
| 4.26 Dados obtidos pela aplicação do teste de análise da variância (ANOVA) | 72 |
| 4.27 Limites de detecção e de quantificação obtidos para os estrogênios pelo método HPLC-DAD. | 73 |
| 4.28 Valores de recuperação (%) obtido na avaliação da exatidão do método desenvolvido nos quatro níveis de concentração. | 74 |
| 4.29 Coeficiente de variação obtidos na avaliação da precisão (repetibilidade intradia) do método HPLC-DAD para os estrogênios, em quatro níveis de concentração. | 75 |
| 4.30 Coeficiente de variação obtidos na avaliação da precisão intermediária do método HPLC-DAD para os estrogênios, em quatro níveis de concentração. | 76 |
| 4.31 Valores de precisão intradia e precisão intermediária (interdia) obtidos a partir do teste t de Student para as quatro semanas de estudo com 95% de confiança. | 77 |
| A.1 Percentual de extração para cada um dos estrogênios com as diferentes nanopartículas | 92 |
| A.2 Percentual de extração em amostra preparada com diferentes proporções de solventes orgânico. | 93 |

CAPÍTULO

1

INTRODUÇÃO

A temática relacionada à qualidade dos corpos d'água é amplamente abordada em pesquisas de todo o mundo, isso acontece por se tratar de um recurso natural que é imprescindível para a manutenção da vida na terra que vem sendo continuamente contaminado por inúmeras substâncias, que podem apresentar potenciais riscos à saúde humana e aos organismos aquáticos^[1,2].

Nesse cenário, apresenta-se como um crescente desafio para os órgãos reguladores e gestores da água a missão de monitorar essas substâncias, tendo em vista que pouco se sabe sobre a identidade de muitos compostos e seu destino no meio ambiente. Sabendo que 2,5 % de toda a água do mundo corresponde a água doce e desse percentual, 69 % estão concentrados nas geleiras, 30 % são águas subterrâneas e apenas 1 % encontra-se nos rios, torna-se necessário o desenvolvimento de políticas públicas que visem o cuidado com a qualidade e acessibilidade para evitar que a utilização desse recurso seja prejudicada^[1,3].

Em termos da legislação brasileira, em 1997 entrou em vigor a lei 9.433/1997 que deu inicio à Política Nacional de Recursos Hídricos (PNRH) e criou o Sistema Nacional de Gerenciamento de Recursos Hídricos (SINGREH). Um dos objetivos da PNRH é "assegurar à atual e às futuras gerações a necessária disponibilidade de água, em padrões de qualidade adequados aos respectivos usos"^[4], evidenciando que para cada uso, deve haver uma exigência referente à sua qualidade, ou seja, atribuir parâmetros para avaliar sua qualidade e estabelecer valores limites.

A Resolução CONAMA 357/2005 dispõe sobre a classificação dos corpos d'água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões para o lançamento de efluentes nos corpos hídricos. Qualifica ainda os corpos d'água por meio de características físicas e químicas, organolépticas, biológicas e quanto a toxicidade, atribui parâmetros de qualidade para águas doces, salobras e salinas e confere valores limites de substâncias inorgânicas e orgânicas, dentre elas estão os metais, HPA's, alguns pesticidas e outros^[5]. Essa resolução foi parcialmente alterada pela Resolução 430/2011 onde o controle ecotoxicológico de efluentes industriais tornou-se obrigatório^[6]. Por fim, a Resolução CONAMA 396/2008 dispõe sobre a classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento, prevenção e controle da poluição das águas subterrâneas^[7].

A portaria N° 2.914 do Ministério da Saúde, de 12 de dezembro de 2011 e a portaria de consolidação n° 5, de 28 de setembro de 2017, dispõem sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade.

Destaca-se que entre outras mudanças, o aumento de substâncias químicas controladas, de 74 para 87 e a inclusão das cianotoxinas (microcistinas e saxitoxinas) que compõem comunidades fitoplanctônicas e causam intoxicações agudas ou crônicas, podendo ter ação hepática ou neurológica com consequências que não são completamente conhecidas^[8,9].

Mesmo existindo essa quantidade de normas que visam garantir a qualidade dos corpos hídricos e a prevenção contra poluição, estudos do mundo todo relatam a presença de mais de 800 espécies presentes em compartimentos aquáticos provenientes das ações antrópicas e não possuem a obrigatoriedade de serem monitoradas^[1]. A *United States Environmental Protection Agency* (USEPA) disponibiliza quatro listas completas com nomes de substâncias candidatas a contaminantes de água potável, a quinta lista está em construção^[10].

1.1 Objetivos

Validar uma metodologia analítica para determinação simultânea de estriol, 17β -estradiol, 17α -etinilestradiol e estrona, utilizando a técnica de extração em fase sólida magnética e cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos.

1.2 Objetivos específicos

- i. Síntese e caracterização das nanopartículas magnéticas;
- ii. Otimização do processo de extração empregando planejamento de experimentos;
- iii. Validação da metodologia para determinação dos estrogênios.

CAPÍTULO

2

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Contaminantes emergentes

O termo "contaminante emergente" é usado para designar centenas de compostos não regulamentados encontrados em diversos compartimentos ambientais e que são provenientes de fontes antrópicas ou naturais (**Figura 2.1**)^[11,12].

Exemplos de contaminantes emergentes que estão cada vez mais presentes em águas superficiais, mesmo que em baixas concentrações são os fármacos, compostos usados em produtos de higiene pessoal, alquilfenóis e seus derivados, drogas ilícitas, sucralose e outros adoçantes artificiais, pesticidas, interferentes endócrinos, alquilfenóis, retardantes de chama bromados, compostos perfluorados, nanomateriais, líquidos iônicos e microplásticos, alguns microorganismos e toxinas de algas também são considerados contaminantes emergentes. Esses compostos podem apresentar risco ao ecossistema e dependendo dos resultados de estudos sobre ecotoxicidade, efeitos à saúde humana, bioacumulação, concentração no ambiente entre outros, podem se tornar candidatos a serem regulamentados no futuro, como aconteceu com as cianotoxinas que foram incluídas na portaria de controle da qualidade da água potável^[11,13].

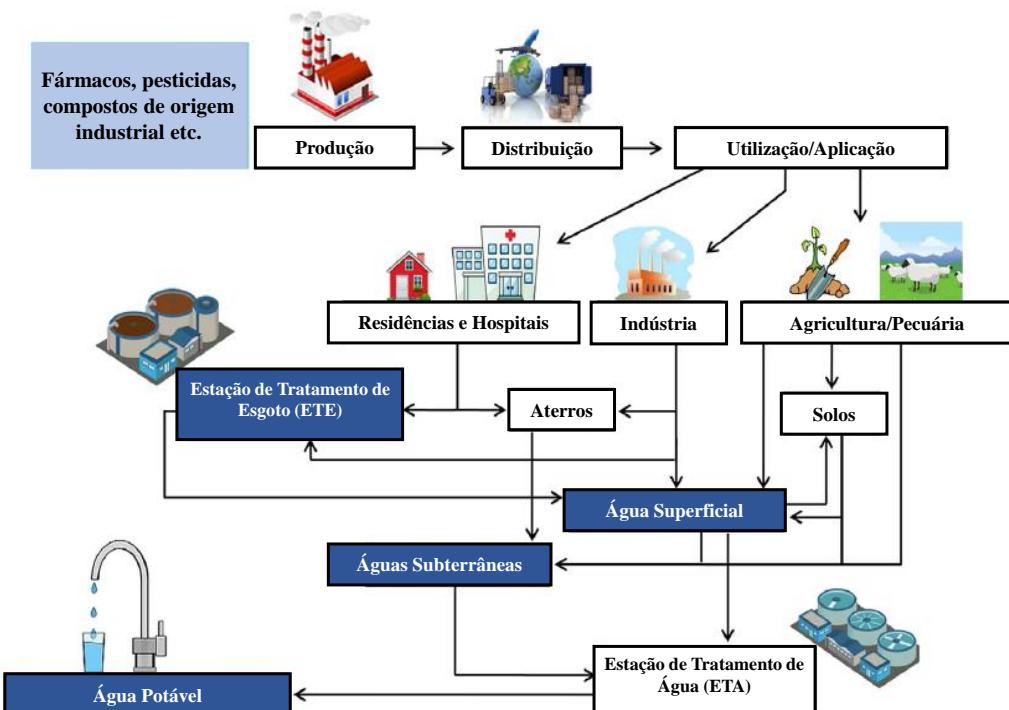


Figura 2.1 – Representação esquemática das fontes e destinos de contaminantes emergentes no meio ambiente. Fonte: adaptado de Barbosa *et al.*^[14]

2.1.1 Interferentes endócrinos

A *United States Environmental Protection Agency* (USEPA) define interferentes endócrinos como "agente exógeno que interfere na síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação de hormônio natural no corpo que são responsáveis pela manutenção, reprodução, desenvolvimento e/ou comportamento dos organismos"^[15]. Essas substâncias podem ser encontradas no meio ambiente em concentrações na ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ e ng L^{-1} ^[16].

O sistema endócrino (**Figura 2.2**) é constituído por um conjunto glândulas distribuídas por todo o corpo e é responsável pelo controle de funções biológicas como diferenciação e maturidade sexual, reprodução, desenvolvimento embrionário, crescimento e metabolismo. Seu papel é desempenhado por meio da secreção de hormônios que são responsáveis por realizar a comunicação entre as células, através de receptores nucleares. Em decorrência dessa comunicação é desencadeada uma série de reações bioquímicas, resultando em respostas biológicas específicas^[17,18].

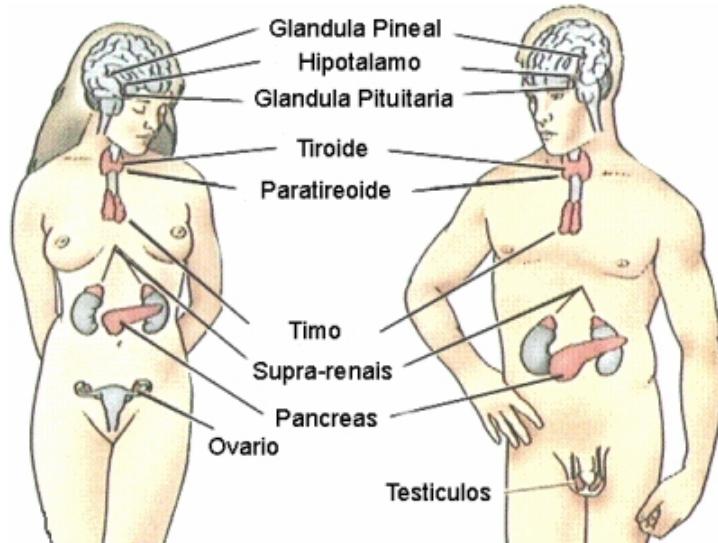


Figura 2.2 – Representação do sistema endócrino humano. Fonte: Moreira, 2015^[19]

Os interferentes endócrinos são normalmente classificados em quatro categorias principais: estrogênios naturais (estrona, 17β -estradiol, estriol), estrogênios sintéticos (17α -etinilestradiol), fitoestrogênios (toxinas produzidas por plantas e toxinas produzidas por fungos) e xenoestrogênios, a exemplo do bisfenol A que é empregado na produção de po-

licarbonato e em vernizes epoxi, o nonilfenol que pertence a família dos alquilfenóis e é utilizado na fabricação de detergente e o dicloro-difenil-tricloroetano pesticida conhecido como DDT^[20,21].

Tendo em vista que os interferentes endócrinos agirão como hormônios no organismo, existem duas formas de atuação mediante a interação interferente-receptor. A primeira é a forma agonista, ocorre quando uma espécie se liga ao receptor e provoca uma resposta que gerará um efeito biológico diferente do efeito que ocorreria naturalmente. O segundo efeito é chamado de antagonista e ocorre quando uma espécie se liga ao receptor e bloqueia a ação de outro hormônio^[17,22,23]. A representação dessas interações estão representadas na **Figura 2.3**.

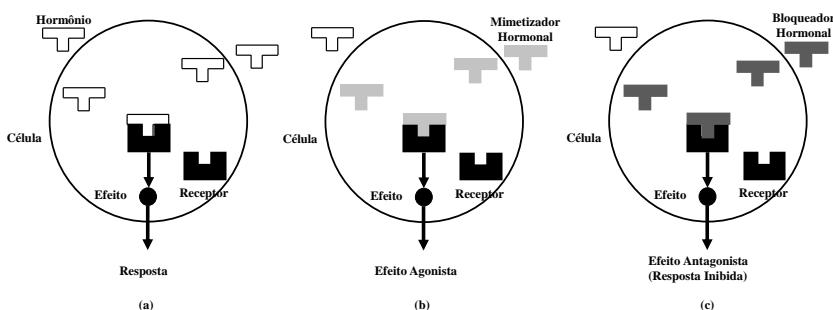


Figura 2.3 – Representação esquemática dos mecanismos de atuação dos interferentes endócrinos: a)resposta normal; b)efeito agonista; c)efeito antagonista. Fonte: Ghiselli *et al.*^[18]

A presença de xenoestrogênios no meio ambiente foi relatada pela primeira vez no final dos anos 30 em um trabalho que avaliou a atividade estrogênica do bisfenol A^[24]. Em 1962, Rachel Carson publicou o livro intitulado "A Primavera Silenciosa" e alertou o mundo sobre os efeitos prejudiciais à saúde humana e dos animais mediante a exposição ao DDT^[25]. Um dos relatos mais conhecidos ocorreu em 1980 e envolveu a contaminação de crocodilos no lago Apopka (Flórida/EUA), onde os pesquisadores observaram que a população desses animais estava diminuindo e estudos adicionais permitiram evidenciar que a exposição contínua dos ovos dessa espécie a alguns pesticidas provocou problemas no sistema reprodutor dos animais, tornando-os inférteis^[26].

Entre os anos de 50 e 70, a maioria das gestantes que fez uso do estrogênio sintético dienilestrol para evitar aborto espontâneo e estimular o crescimento do feto, concebeu meninas que nasceram estéreis e algumas desenvolveram um tipo raro de câncer

vaginal. Os meninos tiveram anormalidades nos órgãos reprodutores, baixa contagem de espermatozoides e tendência a desenvolver câncer nos testículos^[27].

Mesmo que os efeitos sobre a saúde humana não sejam completamente comprovados, existem evidências que ligam a exposição aos interferentes endócrinos à antecipação da idade da menarca (primeira menstruação), diminuição da qualidade do sêmen, o aumento da incidência de câncer de mama, obesidade e o desenvolvimento precoce do cérebro^[11].

É importante destacar que as leis que visam manter a qualidade dos corpos d'água no Brasil não estabelecem valores máximos permissíveis para esses compostos mesmo que sua presença nesses compartimentos ambientais venha sendo detectada há anos por diversos estudos.

2.1.2 Estrogênios

Os estrogênios são compostos que constituem uma família de hormônios sexuais, fazem parte dela os estrogênios naturais: estrona (E1), 17 β -estradiol (E2) e estriol (E3), que desempenham o importante papel de regular o desenvolvimento sexual feminino e funções reprodutivas de espécies animais, incluindo os seres humanos. Seus derivados sintéticos, a exemplo do 17 α -etinilestradiol (EE2), são empregados como inibidores de ovulação e no controle dos sintomas desenvolvidos no período da menopausa, e no tratamento do câncer de mama e de próstata. A exposição indevida a essas substâncias pode alterar o funcionamento natural do sistema endócrino e interferindo negativamente no processo de desenvolvimento^[28,29].

A estrutura química dos estrogênios é derivada do colesterol e possui dezoito átomos de carbono distribuídos em estruturas cíclicas, em alguns casos grupos carbonílicos e hidroxílicos, além de um grupo fenólico^[30-32], como pode ser conferido na **Figura 2.4**.

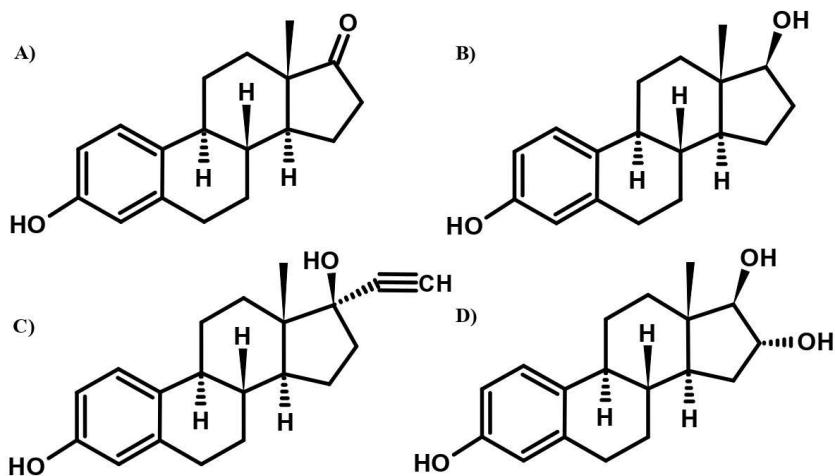


Figura 2.4 – Estrutura química dos estrogênios: A)Estrona; B)17 β -estradiol; C)17 α - etinilestradiol; D)Estriol.

Os seres humanos e os animais produzem hormônios e os excretam principalmente pela urina, na forma biologicamente inativa, e em menor proporção pelas fezes na forma livre. Na **Tabela 2.1** estão apresentadas as quantidades excretadas em μg por dia, os valores podem variar de acordo com a idade, o estado de saúde, dieta ou gravidez^[17].

Tabela 2.1 – Excreção média de estrogênio por pessoa em µg por dia. Fonte: adaptado de Adeel *et al.*^[32]

| | E3 | E2 | EE2 | E1 |
|---------------------------------|--------|-------|------------------|------|
| | µg/dia | | | |
| Meninas | 0,918 | 2,50 | 0 | 0,60 |
| Meninas menstruando | 4,80 | 8,00 | NDA ¹ | 3,50 |
| Mulheres | 4,40 | 2,40 | NDA | 7,00 |
| Mulher menstruando | 17,40 | 6,14 | 0 | 9,32 |
| Mulheres grávidas | 9850 | 277 | 0 | 787 |
| Menopausa, com TRH ² | 90,70 | 59,20 | 0 | 31,5 |
| Menopausa, sem TRH | 3,90 | 1,49 | 0 | 2,93 |
| Meninos | - | 0,54 | 0 | 0,63 |
| Homem adulto | 3,21 | 1,83 | NDA | 3,50 |

¹ Dados não acessíveis

² Tratamento de reposição hormonal

Devido a contínua introdução dessas substâncias no meio ambiente cresce a preocupação com o potencial de causarem alterações no sistema endócrino uma vez que exercem os seus efeitos biológicos em baixas concentrações, sendo rapidamente absorvidos e metabolizados no fígado^[17,33].

2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma das técnicas de separação de substâncias não voláteis e/ou termicamente instáveis presentes especialmente em matrizes complexas^[34,35].

A principal diferença da CLAE em relação à cromatografia líquida clássica é a utilização de colunas fechadas, que podem ser reutilizadas realizando centenas de separações. As colunas podem ser recheadas com materiais que garantem alta resolução, devido ao aumento da superfície de contato e em consequência disso, o aumento do número de

pratos teóricos. Entretanto, essa característica confere às colunas resistência à vazão da fase móvel, tornando-se necessária a utilização de alta pressão que viabilizam a passagem da fase móvel a uma velocidade aceitável, resultando em medidas mais reproduutíveis e precisas^[36,37].

A fase estacionária mais comum de ser utilizada é a de fase reversa que é formada por cadeias orgânicas como octilsilano (C8) e octadecilsilano (C18) quimicamente ligadas à sílica cujo mecanismo de separação utilizado é o de partição^[36,37].

Como a cromatografia é essencialmente uma técnica de separação, é necessária a utilização de técnicas acopladas para a detecção das substâncias separadas. O detector mais comum é o de ultravioleta, este pode ser de dois tipos: com comprimento de onda variável (espectrofotômetro), e os que monitoram apenas um ou dois comprimentos de onda fixos (fotômetro). Um exemplo de detector com comprimento de onda variável é o arranjo de diodos que permite registrar o espectro de absorção de cada soluto no momento em que é eluído^[34,37,38].

Outros exemplos de detectores são os de fluorescência que possui alta sensibilidade mas é específico para substâncias que fluorescem e por fim os detectores de massas que são normalmente os mais robustos devido a sua capacidade de realizar tanto medidas qualitativas quanto quantitativas^[35,37].

2.3 Métodos de determinação de hormônios

Para o monitoramento dessas substâncias é de suma importância o desenvolvimento de técnicas analíticas que sejam sensíveis e seletivas o suficiente para detectar concentrações muito baixas. Além disso, é ainda mais desafiador analisar matrizes complexas como alimentos e fluidos biológicos.

Muitos estudos vêm sendo realizados rendendo publicações com desenvolvimento de novos métodos com grandes avanços, principalmente na determinação de estrogênios em matrizes complexas.

Huang *et al.*^[39] investigou a ocorrência, remoção e destino de um progestogênio, três androgênios, quatro estrogênios e seis fenóis no Lago Dianchi na China. O preparo das amostras envolveu diferentes procedimentos como a liofilização, extração assistida por

micro-ondas e filtração para as amostras de lodo, filtração e extração para as amostras de água e derivatização para as amostras de lama. Em seguida a análise e detecção foi realizada por cromatografia a gás acoplada ao espectrômetro de massas.

Chaves^[40] desenvolveu e validou um método HPLC-UV para detecção de bisfenol-A, β -estradiol, 17 α -etinilestradiol e estrona nas águas do Rio Paraíba do Sul em Minas Gerais. O preparo da amostra utilizado foi a extração em fase sólida.

Otomo^[41] estudou a contribuição antrópica na qualidade das águas da represa do Guarapiranga em São Paulo, monitorando 14 interferentes endócrinos e marcadores antrópicos. Foram analisadas amostras de água e sedimentos. A validação do método envolveu a utilização da extração em fase sólida no preparo das amostras e posterior análise em cromatografia a gás acoplada ao espectrômetro de massas como detector.

Procópio *et al.*^[42] aplicou a casca de amendoim como biosorvente para a remoção do 17 α -etinilestradiol (EE2) em matrizes de água. Para tanto, desenvolveu e validou um método HPLC-FLU.

2.3.1 Preparo de amostras

Comumente são realizados procedimentos de preparo de amostra para analisar amostras por cromatografia líquida, entre suas principais funções é possível citar a extração e pré-concentração dos analitos de matrizes complexas, além de limpar a amostra de modo a não danificar o sistema cromatográfico e garantir melhores limites de detecção e quantificação da técnica.

Entre os diversos procedimentos de preparo de amostra para cromatografia líquida empregadas na determinação de contaminantes emergentes destaca-se a extração líquido-líquido (LLE, do inglês, *liquid liquid extraction*), que baseia-se na transferência do analito de um líquido para outro valendo-se da afinidade do analito com um solvente imiscível com a água^[43,44]; a micro extração líquido-líquido dispersiva (DLLME, do inglês *dispersive liquid liquid extraction*), uma das derivadas da LLE que foi desenvolvida para diminuir as quantidades de solventes orgânicos utilizadas tornando-se um procedimento amigável ao meio ambiente^[45,46]; a extração do tipo QuEChERS que é uma sigla do inglês para *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe*, ou seja, é uma metodologia rápida, fácil, barata, efetiva, robusta e segura. É mais uma metodologia de extração líquido-líquido

com a adição de uma etapa de limpeza^[47]; e por fim a extração em fase sólida (SPE, do inglês *Solid Phase Extraction*) que se baseia na adsorção dos constituintes da matriz num material adsorvente, semelhante ao que acontece numa coluna cromatográfica^[48,49].

Neste trabalho foi utilizada a extração em fase sólida magnética, para tanto, foram sintetizados os materiais utilizados. Esta técnica de extração pode ser realizada de diversas formas, seja assistida por agitação magnética^[50,51], por ultrassom^[52,53] ou ainda seguindo o procedimento de um extração em fase sólida convencional^[54].

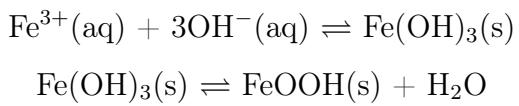
2.3.2 Nanopartículas magnéticas

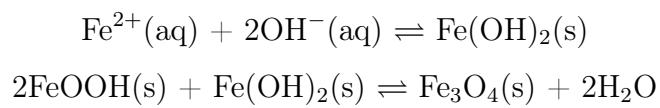
A nanociência, ao longo dos anos tem se empenhado na obtenção novos materiais com propriedades magnéticas devido ao amplo número de aplicações em áreas da ciência como a Física, Química, Biologia e Medicina. Materiais de dimensões nanométricas possuem propriedades físicas e químicas específicas como o superparamagnetismo à temperatura ambiente, ou seja, quando o material é colocado na presença de um campo magnético seu momento magnético se alinha na direção do campo aplicado, ao passo de que quando o campo magnético é retirado, o momento magnético do material retorna a zero^[55].

Ligas metálicas com diferentes composições são estudadas, entretanto, a utilização de metais tóxicos podem impedir as aplicações em sistemas biológicos portanto os materiais que são constituídos de óxido de ferro são os mais estudados. Entre as principais aplicações desses materiais pode-se citar a utilização em ressonância magnética de imagem^[56], *drug delivery*^[57], remoção de agentes poluentes^[53,58] entre outras. Essa diversidade de aplicações é possibilitada pela sua capacidade de funcionalização^[59].

Existem diferentes métodos de obtenção desses materiais pode ser realizada por meio de processos biológicos^[60,61], físicos^[62,63] e químicos^[64,65]. Entre os processos químicos mais estudados está o da coprecipitação por ser a via química mais simples e eficiente^[66].

O método da coprecipitação baseia-se na reação entre as soluções aquosas dos sais de Fe³⁺ e Fe²⁺ por meio da adição de uma base em uma atmosfera inerte. A forma e o tamanho das nanopartículas magnéticas dependem dos reagentes utilizados, temperatura e força iônica do meio^[67]. As equações a seguir mostram as reações do processo:





Onde a reação global é dada por:



Reações de modificação da superfície desses materiais influenciam na eficiência e selectividade dos processos em que serão aplicados. Neste trabalho, as nanopartículas sintetizadas tiveram sua superfície recobertas com Tetraetoxissilano (TEOS) visando aumentar a estabilidade do material e garantir uma superfície organizada com grupos terminais que se conectem a outros metais, polímeros e biomoléculas com facilidade^[68]. A funcionalização foi realizada majoritariamente com Hexadeciltrimetilsilano (C16), com o objetivo de produzir interações material-analito semelhantes com as que ocorrem em uma coluna cromatográfica.

2.4 Planejamento e otimização de experimentos

Ferramentas quimiométricas que envolvem o planejamento de experimentos são amplamente aplicadas em laboratórios de pesquisa e na indústria com o objetivo de extrair a maior quantidade de informação possível a partir de um banco de dados^[69,70]. Entre as vantagens da utilização dos planejamentos estão:

- Execução de um número reduzido de ensaios em comparação com estudos univariados;
- Economia de tempo, insumos laboratoriais e consequentemente recursos financeiros;
- Obtenção de resultados com confiabilidade estatística;
- Fazer previsões de resultados não testados a partir de modelos matemáticos.

Os planejamentos fatoriais completos ou fracionários se baseiam na variação simultânea de fatores a um número determinado de níveis, normalmente dois, um baixo e um alto. São interessantes de serem realizados no início de estudos experimentais por possibilitarem a triagem de fatores destacando os que são estatisticamente significativos por

meio do cálculo e avaliação dos seus efeitos principais e suas interações^[71] como pode ser visto na **Figura 2.5**.

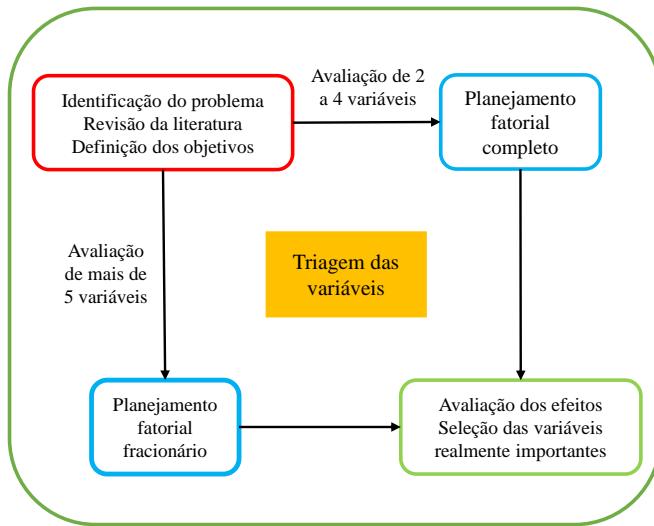


Figura 2.5 – Procedimento geral para a realização e interpretação de planejamento de experimentos. Fonte: Adaptado de Pereira *et al.*^[70]

Para melhor entendimento dos planejamentos, é necessário compreender algumas definições^[72]:

- Fator: são as variáveis de estudo.
- Níveis: condições de manipulação dos fatores, normalmente são utilizados um nível baixo (-) e um nível alto (+).
- Efeito: alteração da resposta quando se troca o nível baixo (-) para o nível alto (+).
- Efeito principal: diferença média das respostas observadas no nível superior e no nível inferior, dada matematicamente por:

$$Efeito = \frac{1}{n_{(+)}} \sum_{i=1}^{n_{(+)}} y_{i(+)} - \frac{1}{n_{(-)}} \sum_{i=1}^{n_{(-)}} y_{i(-)} \quad (2.1)$$

onde $y_{i(+)}$ e $y_{i(-)}$ são as respostas observadas no nível superior (+) e inferior (-) do fator e $n_{(+)}$ e $n_{(-)}$ corresponde ao número total de respostas em cada nível.

- Efeito de interação: é a metade da diferença obtida entre os efeitos para um fator nos níveis de outro fator, dado por:

$$Efeito X Z = \frac{Efeito X_{Z(-)} - Efeito X_{Z(+)}}{2} \quad (2.2)$$

onde X e Z representam dois fatores estudados.

2.5 Validação de métodos analíticos

A validação analítica pode ser definida como um processo de verificação que investiga se requisitos preestabelecidos estão adequados para os objetivos propostos. Esse processo visa garantir rastreabilidade, comparabilidade e confiabilidade dos resultados por meio estudos experimentais e evidências documentadas^[73–75].

A validação de um método analítico novo ou adaptado de métodos conhecidos requer que os parâmetros desempenho analítico atendam exigências estabelecidas por órgãos normalizadores nacionais tais como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)^[73], Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)^[74], Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO)^[76] e/ou internacionais como EURACHEM^[75] e *Internacional Standard Organization* (ISO)^[77]. São conhecidos como parâmetros de desempenho analítico os testes de seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão, precisão e robustez.

2.5.1 Seletividade

A seletividade refere-se à capacidade de um método de medir exatamente as substâncias de interesse na presença de possíveis interferentes em matrizes complexas^[73,75]. Em cromatografia, um método seletivo é aquele em que os sinais analíticos de interesse não são confundidos com os sinais dos interferentes, ou seja, possuem tempos de retenção distintos^[78].

A verificação da seletividade pode ser feita de diversas formas, uma delas é fazer a comparação dos sinais analíticos obtidos a partir da análise da matriz de estudo livre da substância de interesse e da matriz adicionada de uma concentração conhecida do padrão dessa substância, sabendo que nenhum interferente deve eluir no mesmo tempo de retenção dos analitos. Outra maneira é comparar os espectros do picos obtidos pela amostra fortificada com os do padrão puro. Parâmetros cromatográficos como pureza de pico, e resolução são fatores a serem avaliados para corroborar a análise da seletividade e garantir que os sinais cromatográficos sejam atribuídos a apenas um componente^[73,76,78].

Quando a seletividade não é garantida, parâmetros como linearidade, recuperação e

precisão serão gravemente prejudicados^[76].

2.5.2 Linearidade

A linearidade se refere-se à capacidade do método em fornecer sinais analíticos diretamente proporcionais à concentração da substância de interesse dentro de um intervalo de aplicação, no caso da cromatografia, o sinal analítico utilizado é a área ou a altura dos picos cromatográficos^[76].

A relação matemática que traduz a correlação entre o sinal analítico e a concentração da espécie de estudo é expressa por uma equação de reta conhecida como curva analítica (**Equação 2.3**). Identificada a relação linear por meio do gráfico, os dados devem ser tratados estatisticamente de forma a determinar o coeficiente de correlação linear (r), coeficiente linear e coeficiente angular.

$$y = a + bx \quad (2.3)$$

Onde:

y : sinal analítico medido pelo instrumento;

x : concentração;

a : coeficiente linear (interseção com o eixo y , quando $x = 0$);

b : coeficiente angular (inclinação da curva, relacionado à sensibilidade do método).

Para a determinação da linearidade, cada órgão regulador indica o número de níveis de concentração a serem avaliados. A ANVISA recomenda a avaliação de no mínimo 5 níveis de concentração, a curva obtida deve apresentar coeficiente de correlação $r = 0,99$ como bom indicativo de linearidade^[73]. Conforme a EURACHEM, a avaliação da faixa linear compreende a análise de seis a quinze níveis e concentração. Como critério para aceitar a linearidade, é necessário avaliar se há a presença de valores incomuns (*outliers*) por meio da análise dos resíduos que devem estar dispostos de forma aleatória ao longo da linha de regressão^[75].

2.5.3 Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LOD, do inglês *limit of detection*) é entendido como a menor concentração de um determinado analito presente em uma amostra que pode ser detectado e identificado por um método de forma confiável^[79].

A estimativa do limite de detecção pode ser feita de forma simplificada considerando os parâmetros da curva analítica usando a **Equação 2.4**:

$$LOD = 3,3 \times \frac{s}{b} \quad (2.4)$$

Onde:

s: desvio padrão das medidas de menor concentração do analito na curva analítica;

b: coeficiente angular.

A EURAQUEM recomenda para realização do cálculo de LOD no mínimo 10 medidas do branco ou, no caso de dados da cromatografia, utiliza-se as repetições da menor concentração empregada no conjunto de calibração^[75].

O limite de quantificação (LOQ, do inglês *limit of quantification*), é definido como a menor concentração do analito presente em uma amostra que o método consegue determinar com repetibilidade e exatidão aceitáveis^[79].

Para estimar o limite de quantificação usando os parâmetros da curva analítica utiliza-se a **Equação 2.5** descrita a seguir:

$$LOD = 10 \times \frac{s}{b} \quad (2.5)$$

De acordo com o INMETRO a estimativa dos limites de detecção e de quantificação pelo método da curva analítica garante melhores resultados na determinação de níveis traço, como é o caso dos contaminantes emergentes^[76].

2.5.4 Exatidão

A exatidão é entendida como o grau de concordância obtida entre os valores medidos pelo método de estudo e um valor real ou valor de referência^[80,81]. Entre outras formas de avaliar a exatidão, pode-se citar os ensaios de recuperação realizados a partir da análise de amostras fortificadas com níveis de concentrações conhecidas de materiais de referência certificados^[76].

A exatidão do método deve ser determinada a partir da avaliação de no mínimo nove determinações, sendo pelo menos três níveis de concentração (baixa, média e alta do intervalo linear) com três réplicas de cada^[73]. A recuperação pode ser calculada a partir da **Equação 2.6**.

$$R (\%) = \frac{\text{quantidade obtida (conc. ou massa)}}{\text{quantidade adicionada}} \times 100 \quad (2.6)$$

Usualmente os critérios de aceitação para os valores de recuperação estão atrelados aos níveis de concentração dos analitos presentes nas amostras. Na **Tabela 2.2** estão os critérios de aceitação sugeridos pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC)^[82].

Tabela 2.2 – Critério de aceitação para recuperação sugeridos pela AOAC. Fonte: AOAC *Official Methods of Analysis*^[82].

| Analito (%) | Razão do analito | Unidade | Recuperação média (%) |
|-------------|------------------|--------------------------------|-----------------------|
| 100 | 1 | 100 % | |
| 10 | 10^{-1} | 10 % | 98-102 |
| 1 | 10^{-2} | 1 % | 97-103 |
| 0,1 | 10^{-3} | 0,1 % | 95-105 |
| 0,01 | 10^{-4} | 100 ppm (mg kg ⁻¹) | 90-107 |
| 0,001 | 10^{-5} | 10 ppm (mg kg ⁻¹) | |
| 0,0001 | 10^{-6} | 1 ppm (mg kg ⁻¹) | 80-110 |
| 0,00001 | 10^{-7} | 100 ppb (μg kg ⁻¹) | |
| 0,000001 | 10^{-8} | 10 ppb (μg kg ⁻¹) | 60-115 |
| 0,0000001 | 10^{-9} | 1 ppb (μg kg ⁻¹) | 40-120 |

Mesmo que se deseje maximizar os valores obtidos nos ensaios de recuperação visando obter um método mais sensível, não é necessário que esses valores sejam 100 %, basta garantir que a recuperação seja consistente, precisa e reproduutiva^[81].

2.5.5 Precisão

A precisão de um método está relacionada à concordância entre as medidas das replicatas, ou seja, ela é responsável por medir os erros aleatórios responsáveis pelas dispersões nas medidas de uma mesma amostra e pode ser estimada a partir do desvio padrão absoluto e pelo desvio padrão relativo (RSD), usualmente expresso na forma percentual como coeficiente de variação (CV) como mostrado na **Equação 2.7**. O coeficiente de variação não deve ultrapassar 5 % para que seja aceitável^[78,80,81].

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (2.7)$$

Onde:

s: desvio padrão;

\bar{x} : média aritmética de um conjunto de medidas.

A EURACHEM ainda indica outra forma de avaliar a precisão do método, considerando o desvio padrão e o teste t. Este permite que o analista decida se há diferença significativa entre os resultados de uma amostra com um nível de confiança especificado. A precisão (r) é calculada de acordo com a **Equação 2.8**.

$$r = \sqrt{2} \times t \times s \quad (2.8)$$

Onde $\sqrt{2}$ se refere à diferença entre duas medidas e t é o valor de Student apropriado para o número de graus de liberdade com 95 % de confiança.

Os ensaios de precisão visam garantir a confiabilidade dos resultados obtidos pelo método e são consideradas três formas de avaliação: repetibilidade (ou precisão intradia), precisão intermediária (ou precisão interdia) e reproduutibilidade.

A repetibilidade avalia a concordância entre os resultados obtidos por um mesmo analista, no mesmo instrumento de medida, no mesmo laboratório e em um mesmo dia.

Pode ser determinada realizando no mínimo 9 medições com soluções padrão em pelo menos 3 concentrações dentro do intervalo linear do método com 3 réplicas^[73,76]. A EURACHEM indica que as condições das medidas podem ser iguais as recomendadas pela ANVISA, mas com a realização de seis a quinze réplicas para um mesmo nível de concentração^[75].

A precisão intermediária considera o mesmo procedimento da repetibilidade, podendo ser realizada por outros analistas e/ou equipamentos diferentes, mas neste caso, avalia a concordância obtida em medidas realizadas em dias diferentes, a ANVISA sugere uma diferença de no mínimo dois dias.

Por fim, a reproduzibilidade estuda a concordância entre resultados obtidos em equipamentos e laboratórios diferentes.

CAPÍTULO

3

PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Reagentes e soluções

Os solventes acetonitrila e metanol empregados no preparo das soluções foram da marca J. T. Becker de grau HPLC. Hidróxido de amônio da marca Isofar com pureza de 24% e dodecil sulfato de sódio da marca neon com 90% de pureza. A água ultrapura utilizada no preparo das soluções, nas sínteses, nos procedimentos de lavagem e nas corridas cromatográficas foi obtida em um sistema Milli-Q da Milipore. Os reagentes a seguir foram todos adquiridos da Sigma-Aldrich:

- Estrona pureza \geq 99 %;
- 17β -estradiol pureza \geq 99 %;
- 17α -etinilestradiol pureza \geq 98 %;
- Estriol pureza \geq 97 %;
- Álcool etílico grau HPLC 99%;
- Cloreto de ferro(III) hexahidratado 98 - 102 %;
- Cloreto de ferro(II) tetrahidratado \geq 99 %;
- Tetraetoxissilano (TEOS) 98 %;
- Hexadeciltrimetilsilano (C16) \geq 85 %;
- Trietylvinilsilano (TVS) 97 %;
- Trimetiletilsilano (TMS) 97 %.

As soluções estoque dos padrões dos analitos foram preparadas individualmente em metanol, sendo a concentração de 480 mg L^{-1} para estrona (E1) e 500 mg L^{-1} para 17β -estradiol (E2), 17α -etinilestradiol (EE2) e estriol (E3) e armazenados em frasco âmbar com batoque em freezer a -20°C .

Para o conjunto de calibração foram preparadas onze amostras em triplicata autêntica com concentrações na faixa de 10 a $1.500 \mu\text{g L}^{-1}$ em água e acetonitrila na proporção 75:25% ($v\ v^{-1}$) a partir de duas soluções mistas nas concentrações de 1 ou 10 mg L^{-1} contendo os quatro estrogênios de interesse, como pode ser observado na **Tabela 3.1**.

Tabela 3.1 – Composição das soluções preparadas para construir a curva analítica.

| Ponto | Concentração $\mu\text{g L}^{-1}$ | Concentração do estoque mg L^{-1} |
|-------|-----------------------------------|--|
| 1 | 10 | 1 |
| 2 | 25 | 1 |
| 3 | 50 | 1 |
| 4 | 75 | 1 |
| 5 | 100 | 1 |
| 6 | 250 | 10 |
| 7 | 500 | 10 |
| 8 | 750 | 10 |
| 9 | 1.000 | 10 |
| 10 | 1.250 | 10 |
| 11 | 1.500 | 10 |

3.2 Análise cromatográfica

Utilizou-se um cromatógrafo Dionex da série Ultimate 3000 para o desenvolvimento deste trabalho. O instrumento é equipado com uma bomba quaternária. O injetor possui uma válvula de seis vias com alça de $100 \mu\text{L}$. A coluna usada foi uma AcclaimTM 120 de C18 (12 \AA , $4,6 \times 150 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$ de partícula) fabricado pela Dionex Technologies e um detector de arranjo de fotodiodos (DAD).

A eluição empregada nas corridas cromatográficas foi em gradiente linear com 1 ml min^{-1} de vazão e 30°C de temperatura, onde a fase móvel é constituída de acetonitrila (canal B) e água ultrapura (canal C). A **Figura 3.1** apresenta as condições do gradiente de composição da fase móvel que se inicia em 75 % de água e 25 % de acetonitrila.

Para injeção manual dos padrões e amostras foi utilizada uma seringa apropriada ($250 \mu\text{L}$), da marca HAMILTON.

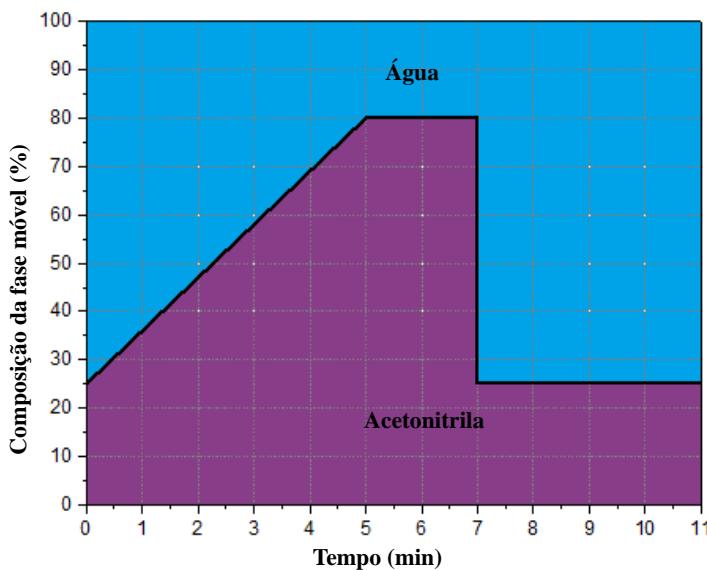


Figura 3.1 – Representação esquemática da composição do gradiente da fase móvel utilizada nas análises cromatográficas.

3.3 Síntese de nanopartículas

As nanopartículas (NP) magnéticas foram sintetizadas realizando adaptações nos procedimentos descritos nas referências [83,84] utilizando o método da coprecipitação química *one pot*. Inicialmente, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($0,425\text{ g}$, $1,57 \times 10^{-3}\text{ mol}$) e $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ($0,150\text{ g}$, $7,54 \times 10^{-4}\text{ mol}$) foram solubilizados em 10 mL de água ultrapura e 40 mL de álcool etílico. A solução foi aquecida até atingir $50\text{ }^\circ\text{C}$ sob agitação magnética vigorosa. Após atingir a temperatura, foi adicionado lentamente $0,800\text{ mL}$ de hidróxido de amônio com o auxílio de uma micropipeta, imediatamente é formado um sólido de cor escura que permanece em suspensão. O sistema foi retirado do aquecimento e continuou sob agitação à temperatura ambiente por duas horas.

Para realizar o revestimento das nanopartículas, logo após as duas horas de agitação, foram adicionados $0,500\text{ mL}$ ($2,23 \times 10^{-3}\text{ mol}$) de tetraetilortosilicato (TEOS). O sistema permaneceu em agitação por mais seis horas. Por fim, a funcionalização das nanopartículas foi efetuada a partir da adição de $0,420\text{ mL}$ ($9,17 \times 10^{-4}\text{ mol}$) de hexadeciltrimetiletilsilano (C16). Novamente o sistema foi mantido em agitação por mais seis horas.

O procedimento descrito acima deu origem à amostra nomeada de 0,5TEOS, a representação esquemática da síntese é apresentada na **Figura 3.2**.

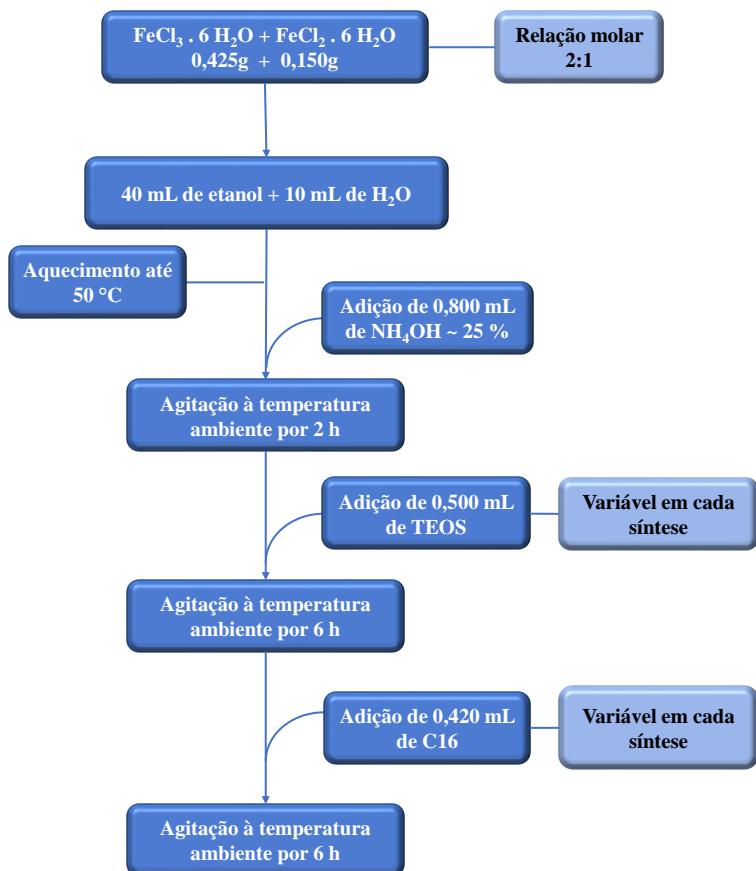


Figura 3.2 – Representação esquemática do processo de síntese das nanopartículas magnéticas.

Ao final dessas três etapas, o sólido foi separado com o auxílio de um magneto e lavado duas vezes com 40 mL de álcool etílico comercial, duas vezes com 40 mL de água ultrapura e duas vezes com 40 mL com álcool etílico P.A. e logo após foi deixado para secar à temperatura ambiente.

Foram sintetizadas oito amostras de nanopartículas diferentes da descrita. As quantidades de TEOS usadas para o revestimento e dos reagentes utilizados na funcionalização estão descritas na **Tabela 3.2**. As três últimas nanopartículas sintetizadas, presentes na tabela, dispuseram de uma etapa a mais para adição de um agente finalizador, seguida de seis horas de agitação, todas utilizaram a mesma quantidade dos cloretos de ferro para a formação do núcleo magnético.

Tabela 3.2 – Nanopartículas sintetizadas.

| Nanopartícula | TEOS | Funcionalização |
|--------------------|--------------------------------------|--|
| 25TEOS:1C16 | 0,50 mL ($2,23 \times 10^{-3}$ mol) | 0,420 mL de C16 ($9,17 \times 10^{-4}$ mol) |
| 50TEOS:1C16 | 1,00 mL ($4,47 \times 10^{-3}$ mol) | 0,420 mL de C16 |
| 75TEOS:1C16 | 1,50 mL ($6,70 \times 10^{-3}$ mol) | 0,420 mL de C16 |
| 50TEOS:2C16 | 1,00 mL | 0,840 mL de C16 ($1,83 \times 10^{-3}$ mol) |
| 50TEOS:1C16:1TVS | 1,00 mL | 0,420 mL de C16 e 0,165 mL de TVS ($1,04 \times 10^{-3}$ mol) |
| 60TEOS:06C16:12TVS | 1,00 mL | 0,280 mL de C16 ($6,11 \times 10^{-4}$ mol) e 0,220 mL de TVS ($1,39 \times 10^{-3}$ mol) |
| 50TEOS:1C16:05TMS | 1,00 mL | 0,420 mL de C16 e 0,072 mL de TMS ($4,58 \times 10^{-4}$ mol) |
| 50TEOS:1C16:1TMS | 1,00 mL | 0,420 mL de C16 e 0,143 mL de TMS ($9,17 \times 10^{-4}$ mol) |
| 50TEOS:1C16:2TMS | 1,00 mL | 0,420 mL de C16 e 0,286 mL de TMS ($1,83 \times 10^{-3}$ mol) |

3.4 Caracterização das nanopartículas

A caracterização dos materiais sintetizados foi realizada por diferentes técnicas, onde as condições de análise de cada uma serão descritas a seguir.

3.4.1 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

As amostras foram preparadas diluindo as nanopartículas em brometo de potássio (KBr) e compactadas em uma prensa hidráulica manual da Shimadzu utilizando a pressão de 60 kgf cm^{-2} para produzir pastilhas de 10 mm de diâmetro.

Para as análises foi utilizado um espectrofotômetro modelo IRTracer-100 FT-IR da Shimadzu, onde os espectros foram obtidos com 32 varreduras e com 4 cm^{-1} de resolução na faixa entre 400 e 4.000 cm^{-1} .

3.4.2 Espectrometria de fluorescência de raios X por dispersão em energia

Foram confeccionadas pastilhas de 10 mm de diâmetro, compostas por um suporte de ácido bórico onde foram depositadas as nanopartículas dispersas no mesmo ácido para facilitar a compactação. As pastilhas foram comprimidas utilizando uma prensa hidráulica manual da Shimadzu com pressão de 60 kgf cm^{-2} .

Uma varredura de energia de 0 a 40 keV foi realizada em um espectrômetro modelo EDX-8000 da Shimadzu em atmosfera de vácuo e 60 segundos de exposição por medida.

3.5 Extração em fase sólida magnética

De forma geral, a extração foi realizada da seguinte forma: uma solução de trabalho preparada com água ultrapura e os quatro estrogênios foi colocada em contato com uma determinada quantidade de nanopartículas e a mistura foi levada ao banho de ultrassom ou agitação magnética. Logo após, as nanopartículas foram separadas com o auxílio de um magneto ($\text{Nd}_2\text{Fe}_{14}\text{B}$, N50, $50,8 \times 50,8 \times 25,4 \text{ mm}$); 1 mL do sobrenadante foi coletado para posteriores análises e o restante descartado. O solvente usado para a dessorção foi então adicionado e a mistura foi novamente levada ao banho de ultrassom ou agitação magnética por um determinado tempo. Novamente, as nanopartículas foram separadas com o auxílio

do ímã e o eluato foi coletado e filtrado para posterior análise no HPLC-DAD, como se pode observar na representação esquemática da **Figura 3.3**.

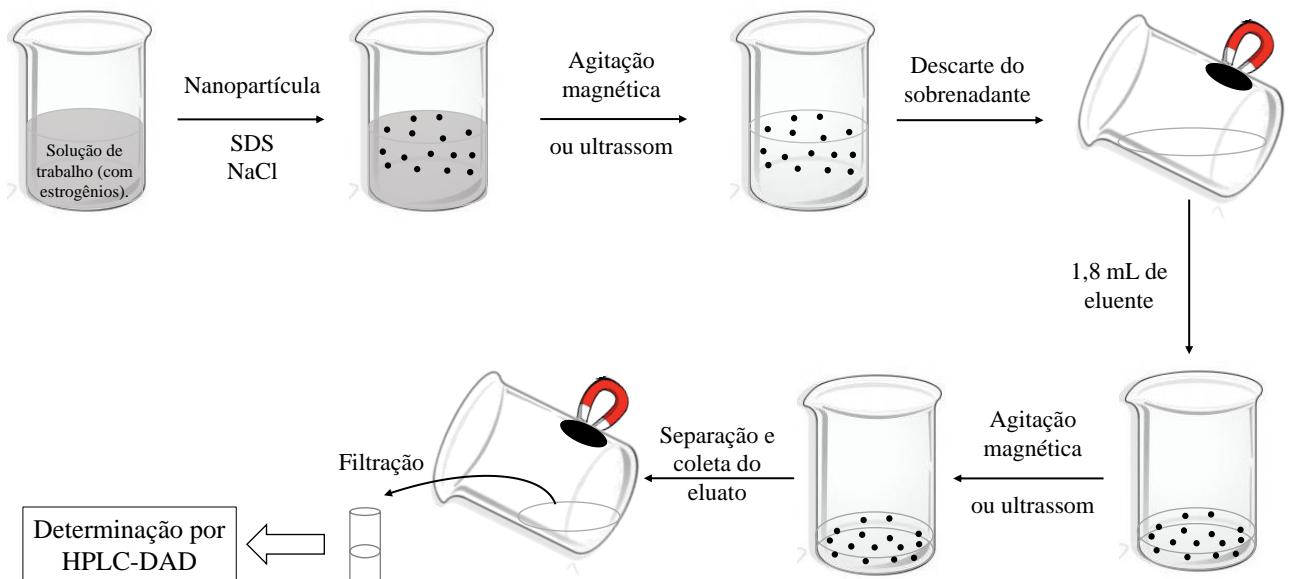


Figura 3.3 – Representação esquemática do processo de extração. Fonte: adaptado de Li et al.^[85].

3.5.1 Teste de dispersão

Inicialmente foram realizados testes de dispersão das primeiras três amostras de nanopartículas (25TEOS:1C16, 50TEOS:1C16 e 75TEOS:1C16) para entender seu comportamento frente às substâncias de interesse. Sabendo que todas as nanopartículas são bastante hidrofóbicas, o primeiro teste consistiu em melhorar a superfície de contato entre o material e amostra aquosa, para tanto, foram preparadas três misturas com volume de 5 mL contendo água e acetonitrila nas proporções de 10, 20 e 30 % respectivamente. A essas misturas foram adicionadas pequenas quantidades da nanopartícula mais hidrofóbica (75TEOS:1C16), pois se ela se dispersar bem no meio aquoso, as demais apresentarão comportamento semelhante.

Em seguida, o segundo teste consistiu em realizar uma extração com cada uma das nanopartículas sintetizadas. Pra tanto, foi utilizada uma solução estrogênica com $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de concentração em água:acetonitrila na proporção de 90:10 % (vv^{-1}). Três alíquotas de 25 mL dessa solução foram transferidas para tubos Falcon e em cada tubo foi adicionado

10 mg da amostra. Os tubos foram levados ao banho de ultrassom por 5 minutos. Após esse período, foi coletado 1 mL de solução de cada um dos tubos, filtrados com filtro seringa e levados para fazer as medidas em triplicata no cromatógrafo.

3.5.2 Análise de sobrenadante

Durante a etapa de otimização do processo de extração foram coletadas alíquotas das soluções de trabalho após a etapa de extração e separação das nanopartículas. Essas amostras foram filtradas e posteriormente levadas para análise por HPLC-DAD sob as mesmas condições de medida das demais amostras.

3.5.3 Planejamento e otimização de experimentos

Com o intuito de conhecer o comportamento das nanopartículas e assim determinar a melhor condição para a realização das extrações, foram realizados planejamentos de experimentos cujos resultados foram tratados no programa STATISTICA versão 10 e objetivos serão descritos a seguir.

O primeiro *design* de experimentos possuiu o maior número de fatores. Uma vez que o comportamento das partículas eram desconhecidos, decidiu-se avaliar sete variáveis que poderiam influenciar diretamente na eficiência da extração. Como o número de variáveis era grande, optou-se pela realização de um planejamento fatorial fracionado, visto que um fatorial completo resultaria em muitos ensaios que produziriam respostas com pouca significância estatística, portanto a fração escolhida foi: 2^{7-3} . Os fatores e seus respectivos níveis estudados podem ser vistos na **Tabela 3.3** e as condições fixas dos ensaios são as seguintes:

- Volume de amostra: 25 mL;
- Concentração da amostra: 50 mg L^{-1} ;
- Assistida por: banho de ultrassom;
- Solvente para eluição: metanol;
- Volume de solvente de eluição: 1,8 mL;

- Tempo de extração: 10 minutos;
- Tempo de eluição: 10 minutos.

Tabela 3.3 – Fatores estudados no planejamento fatorial fracionado 2^{7-3} .

| Fatores | -1 | +1 |
|-----------------------------|------|--------------------------|
| Solvante | Água | Água com 10 % de metanol |
| Massa SDS ($mg\ mL^{-1}$) | 0,50 | 1,50 |
| Tempo (min) | 10 | 20 |
| Temperatura ($^{\circ}C$) | 40 | 50 |
| Massa de NaCl (g) | 3,0 | 5,0 |
| Massa de NP (mg) | 5,0 | 10,0 |
| Tipo de NP (mL de TEOS) | 0,5 | 1,0 |

O experimento presente na **Tabela 3.4** foi realizado com foco em escolher as melhores condições no processo de eluição.

Tabela 3.4 – Fatores estudados no primeiro planejamento fatorial completo 2^2 .

| Fatores | -1 | +1 |
|--------------------------|--------------|------------------------|
| Solvante para eluição | Acetonitrila | Água:metanol (50:50 %) |
| Tempo de dessorção (min) | 5 | 10 |

Para avaliar se a condição escolhida no planejamento anterior é a melhor, foi realizado um novo experimento comparando a condição escolhida anteriormente com uma nova, os fatores estudados estão dispostos na **Tabela 3.5**.

Tabela 3.5 – Fatores estudados no segundo planejamento fatorial completo 2^2 .

| Fatores | -1 | +1 |
|--------------------------|------------------------|------------------------|
| Solvante para eluição | Água:metanol (50:50 %) | Água:metanol (25:75 %) |
| Tempo de dessorção (min) | 5 | 10 |

Por fim, foi feito mais uma comparação nas condições de eluição, onde os fatores comparados estão dispostos na **Tabela 3.6**.

Tabela 3.6 – Fatores estudados no terceiro planejamento fatorial completo 2².

| Fatores | -1 | +1 |
|--------------------------|---------|------------------------|
| Solvante para eluição | Metanol | Água:metanol (25:75 %) |
| Tempo de dessorção (min) | 5 | 10 |

O último planejamento realizado teve foco em simplificar a etapa de extração, os resultados obtidos nessa avaliação pode viabilizar a mudança do procedimento escolhido inicialmente e garantir melhores condições nas medidas dos ensaios. Os fatores estudados nesse planejamento estão apresentados na **Tabela 3.7**.

Tabela 3.7 – Fatores estudados no planejamento fatorial completo 2³.

| Fatores | -1 | +1 |
|--|-------------|-------------|
| Tipo de NP | 50TEOS:1C16 | 50TEOS:2C16 |
| Solvante para dispersão das nanopartículas | Metanol | Etanol |
| Massa SDS (mg mL ⁻¹) | 0 | 0,25 |

3.6 Validação do método HPLC-DAD

A validação do método foi realizada seguindo os parâmetros de qualidade analítica descritos no **Capítulo 2** na **Seção 2.5**.

3.6.1 Seletividade

A seletividade foi avaliada pela comparação de três cromatogramas:

- Solução de trabalho mista dos padrões estrogênicos com a mesma concentração de todos os analitos;
- Amostra de água fortificada com estrogênios;
- Amostras de água sem fortificação.

3.6.2 Linearidade e faixa de concentração

A linearidade do método foi avaliada através do método de padronização externa baseado na correlação do sinal analítico com os n níveis de concentração dos analitos. Neste caso, o sinal medido no instrumento é a área dos picos cromatográficos, sendo utilizada a área média de pelo menos três replicatas para cada nível de concentração. A ANVISA^[73] recomenda um coeficiente de correlação linear de 0,99 para o ajuste ideal dos dados.

As concentrações das soluções contendo os estrogênios para obtenção das curvas analíticas foram de 10, 25, 75, 100, 250, 500, 750, 1.000, 1.250 e 1.500 $\mu\text{g L}^{-1}$.

3.6.3 Limite de detecção e de quantificação

Os limites de detecção e de quantificação foram estimados a partir da menor concentração da faixa linear ($10 \mu\text{g L}^{-1}$). Foram realizados 21 ensaios para o cálculo do desvio padrão da resposta obtida no instrumento e a estimativa foi realizada seguindo a recomendação discutida na **Subseção 2.5.3**.

3.6.4 Exatidão

A exatidão do método desenvolvido foi avaliada a partir da realização do ensaio de recuperação como descrito na **Subseção 2.5.4**. As amostras de água foram fortificadas diluindo uma solução mista de trabalho gerando três níveis de concentração, 75, 250 e $750 \mu\text{g L}^{-1}$ para todos os estrogênios. Cada amostra foi analisada em triplicata.

3.6.5 Precisão

A avaliação da precisão foi realizada por meio do teste de repetibilidade em quatro níveis de concentração diferentes a fim de estimar o coeficiente de variação (CV). Para tanto, foram executadas sete determinações nas seguintes condições:

- Sete determinações em um nível baixo contendo quatro hormônios ($25 \mu\text{g L}^{-1}$).
- Sete determinações no segundo nível com uma mistura de quatro estrogênios ($75 \mu\text{g L}^{-1}$).

- Sete repetições do nível 3 contendo quatro estrogênios ($250 \mu\text{g L}^{-1}$).
- Sete repetições do nível mais alto com uma mistura de quatro hormônios ($750 \mu\text{g L}^{-1}$).

Todas as determinações foram efetuadas no mesmo instrumento, pelo mesmo analista e em um intervalo de tempo pequeno. A precisão intermediária foi executada com as mesmas sete determinações nos quatro níveis de concentração distintos em quatro semanas diferentes.

CAPÍTULO

4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização das nanopartículas

4.1.1 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

Os espectros de FT-IR das nanopartículas sintetizadas são apresentados na **Figura 4.1**. As bandas encontradas na região abaixo de 900 cm^{-1} são normalmente associadas a ligações do tipo metal-oxigênio ($\text{M}-\text{O}$), sendo assim, a banda observada em aproximadamente 630 cm^{-1} pode ser atribuída à vibração da ligação $\text{Fe}-\text{O}$ da magnetita, outras observadas em aproximadamente 578 , 800 e 950 cm^{-1} estão relacionadas ao estiramento simétrico de $\text{Si}-\text{O}-\text{Fe}$, $\text{Si}-\text{O}-\text{Si}$ e assimétrico $\text{Si}-\text{O}$ respectivamente. A banda larga encontrada na região de 1090 cm^{-1} também é proveniente do estiramento assimétrico da ligação $\text{Si}-\text{O}$, confirmando a presença do TEOS no sólido^[53,58,86,87].

Bandas encontradas entre 1398 e 1635 cm^{-1} estão relacionadas ao estiramento da ligação $\text{C}-\text{H}$ e à deformação angular $\text{HO}-\text{H}$ proveniente da umidade presente nas amostras. As bandas observadas entre 2339 e 2374 cm^{-1} são atribuídas aos grupos funcionais $-\text{CH}$, $-\text{CH}_2$ e $-\text{CH}_3$, adicionalmente, as bandas centradas em 2852 e 2926 cm^{-1} são atribuídas à vibração simétrica de $-\text{CH}_2$ e assimétrica de $-\text{CH}_3$ provenientes da funcionalização realizada no material com C16, TVS e do *end capping* realizado com TMS^[53,58,86,87].

Por fim, destaca-se ainda a presença de uma banda na região de 3400 cm^{-1} referente ao modo vibracional de estiramento de íons hidroxila e moléculas de água, presentes na superfície dos materiais^[53,58,86,87].

Mediante a observação das bandas presentes nos espectros foi possível destacar algumas tendências dos materiais sintetizados. As amostras das nanopartículas 25TEOS:1C16, 50TEOS:1C16 e 75TEOS:1C16 apresentaram bandas de estiramento assimétrico da ligação $\text{Si}-\text{O}$ com intensidades crescentes concordando com o aumento na proporção de TEOS utilizada na síntese. A amostra 50TEOS:2C16 apresenta bandas atribuídas à vibração simétrica de $-\text{CH}_2$ e assimétrica de $-\text{CH}_3$ em 2852 e 2926 cm^{-1} com o dobro da intensidade em comparação com a amostra de 50TEOS:1C16 indicando a possibilidade de maior funcionalização e consequente obtenção de um material com caráter hidrofóbico. As demais

nanopartículas foram sintetizadas com o objetivo de diminuir a disponibilidade de grupos silanóis de superfície, sendo assim, foi possível observar uma redução na intensidade da banda referente ao estiramento de íons hidroxila na região de 3400 cm^{-1} , indicando a obtenção de um material com as características desejadas. Em decorrência da síntese de materiais com grupos silanóis pouco disponíveis, também se obtém nanopartículas com características hidrofóbicas.

Sendo assim, é importante destacar que nanopartículas estudadas foram sintetizadas a partir uma modificação no procedimento original, onde todas as etapas são feitas sequencialmente e sem isolar o produto de cada uma delas, com isso foi possível desenvolver um método de síntese simples, rápido e de menor custo, uma vez que a demanda de reagentes na produção é menor.

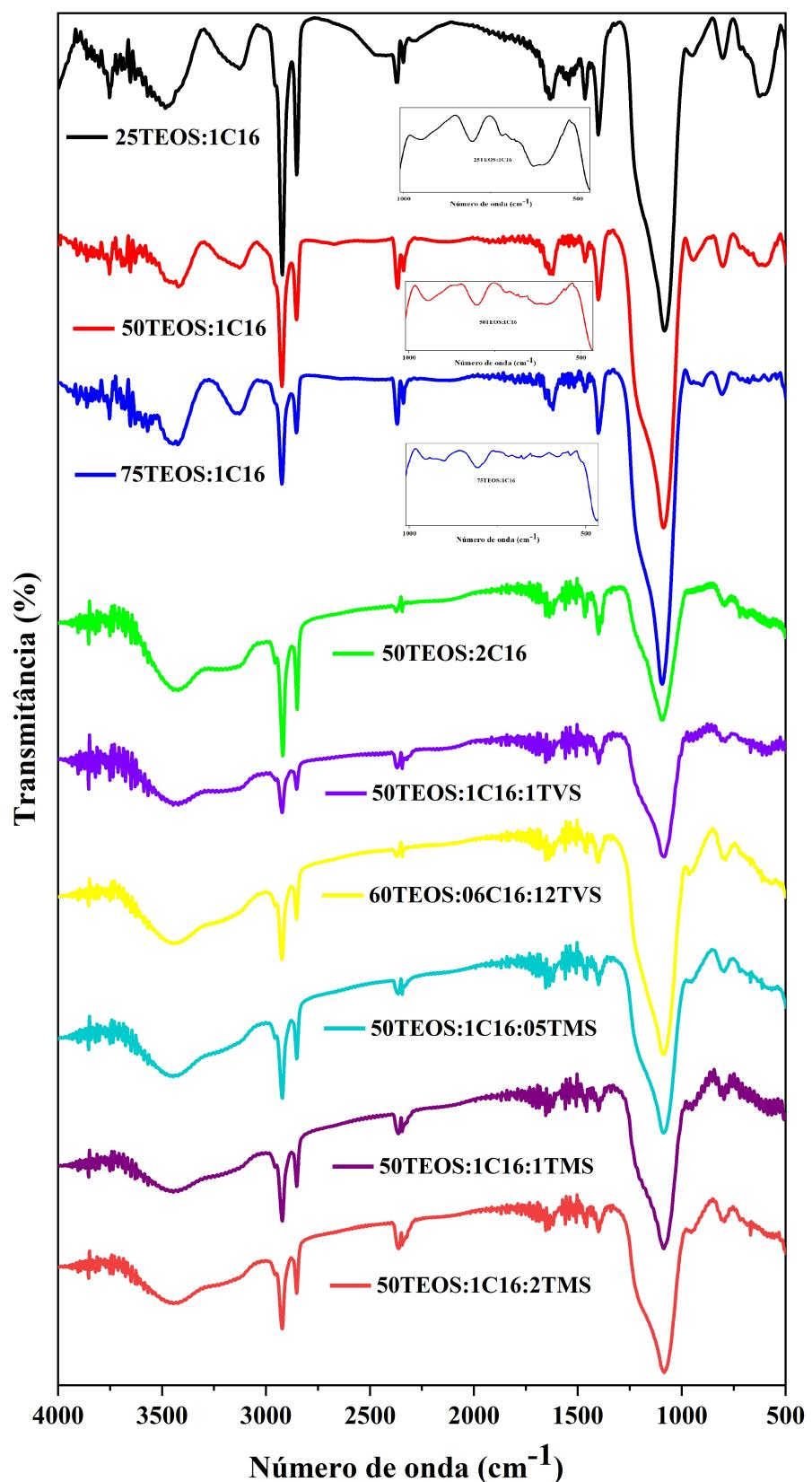


Figura 4.1 – Espectros de FT-IR das nanopartículas sintetizadas.

4.1.2 Espectrometria de raios X por dispersão de energia

Os resultados obtidos na análise elementar das nanopartículas estão apresentados na **Tabela 4.1**, com eles confirma-se a presença de ferro e silício identificados nos gráficos de infravermelho. Destaca-se ainda que a banda referente à vibração da ligação Fe–O de alguns espectros aparecem com menor intensidade no infravermelho, o que pode ser explicado pela proporção menor de ferro frente aos demais componentes do material que, em geral, diminui a medida que se aumenta a proporção de recobrimento e funcionalização.

Além dos componentes majoritários também estão presentes os óxidos de enxofre e de manganês que são provenientes de possíveis contaminações presentes nos reagentes utilizados na síntese das nanopartículas.

Tabela 4.1 – Análise elementar por fluroscência de raios X das nanopartículas sintetizadas.

| | Si | Fe | S | Mn |
|-------------------|------------------------|----|---|----|
| | % (m m ⁻¹) | | | |
| 25TEOS:1C16 | 48 | 48 | 4 | <1 |
| 50TEOS:1C16 | 62 | 35 | 4 | <1 |
| 75TEOS:1C16 | 75 | 22 | 3 | <1 |
| 50TEOS:2C16 | 68 | 26 | 6 | <1 |
| 50TEOS:1C16:1TVS | 68 | 28 | 4 | <1 |
| 50TEOS:1C16:2TVS | 72 | 24 | 3 | <1 |
| 50TEOS:1C16:05TMS | 64 | 32 | 5 | <1 |
| 50TEOS:1C16:1TMS | 58 | 36 | 5 | <1 |
| 50TEOS:1C16:2TMS | 62 | 32 | 6 | <1 |

4.2 Otimização do processo de extração

4.2.1 Extração assistida por ultrassom

De acordo com as observações feitas nos primeiros testes de dispersão e de extração apresentadas no **Apêndice A**, decidiu-se partir para os planejamentos de experimentos como forma de conhecer o comportamento dos materiais sintetizados estudando diversos fatores que podem influenciar no processo simultaneamente e assim garantir a melhor eficiência de extração possível. O primeiro *design* de experimentos foi desenvolvido de acordo com os parâmetros descritos na **Seção 3.5** cujos fatores estudados foram apresentados na **Tabela 3.3**.

A **Tabela 4.2** traz a matriz de respostas obtidas para cada um dos analitos no planejamento factorial fracionado 2^{7-3} . Aqui a resposta avaliada não foi mais o percentual de extração, mas sim o percentual de recuperação, ou seja, a quantidade que foi possível retirar das nanopartículas após a extração.

Tabela 4.2 – Matriz de resposta para os quatro estrogênios no planejamento fatorial fracionado 2^{7-3} .

| Ensaio | Solvente | SDS (mg mL ⁻¹) | Tempo (min) | Temperatura (°C) | NaCl (g) | Massa NP (mg) | Tipo NP | E3 | E2 | EE2 | E1 |
|--------|---------------|----------------------------|-------------|------------------|----------|---------------|-------------|------|------|------|------|
| | | | | | | | | % | | | |
| 1 | Água | 0,50 | 10 | 40 | 3 | 5 | 25TEOS:1C16 | 2,9 | 15,3 | 17,1 | 20,3 |
| 2 | Água:10%MetOH | 0,50 | 10 | 40 | 5 | 5 | 50TEOS:1C16 | 1,4 | 7,8 | 9,5 | 13,7 |
| 3 | Água | 1,50 | 10 | 40 | 5 | 10 | 25TEOS:1C16 | 6,6 | 14,8 | 12,1 | 23,9 |
| 4 | Água:10%MetOH | 1,50 | 10 | 40 | 3 | 10 | 50TEOS:1C16 | 4,6 | 8,4 | 11,7 | 15,1 |
| 5 | Água | 0,50 | 20 | 40 | 5 | 10 | 50TEOS:1C16 | 7,1 | 54,6 | 59,2 | 68,7 |
| 6 | Água:10%MetOH | 0,50 | 20 | 40 | 3 | 10 | 25TEOS:1C16 | 7,7 | 38,4 | 14,4 | 24,1 |
| 7 | Água | 1,50 | 20 | 40 | 3 | 5 | 50TEOS:1C16 | 12,7 | 32,8 | 33,9 | 34,4 |
| 8 | Água:10%MetOH | 1,50 | 20 | 40 | 5 | 5 | 25TEOS:1C16 | 6,1 | 18,4 | 13,0 | 20,0 |
| 9 | Água | 0,50 | 10 | 50 | 3 | 10 | 50TEOS:1C16 | 11,2 | 58,2 | 52,6 | 51,9 |
| 10 | Água:10%MetOH | 0,50 | 10 | 50 | 5 | 10 | 25TEOS:1C16 | 7,7 | 18,2 | 16,6 | 17,4 |
| 11 | Água | 1,50 | 10 | 50 | 5 | 5 | 50TEOS:1C16 | 4,1 | 61,9 | 14,9 | 18,5 |
| 12 | Água:10%MetOH | 1,50 | 10 | 50 | 3 | 5 | 25TEOS:1C16 | 5,9 | 12,4 | 3,9 | 9,1 |
| 13 | Água | 0,50 | 20 | 50 | 5 | 5 | 25TEOS:1C16 | 7,4 | 29,3 | 40,7 | 44,3 |
| 14 | Água:10%MetOH | 0,50 | 20 | 50 | 3 | 5 | 50TEOS:1C16 | 2,6 | 10,2 | 11,2 | 10,7 |
| 15 | Água | 1,50 | 20 | 50 | 3 | 10 | 25TEOS:1C16 | 34,5 | 55,3 | 68,7 | 55,3 |
| 16 | Água:10%MetOH | 1,50 | 20 | 50 | 5 | 10 | 50TEOS:1C16 | 8,9 | 22,1 | 18,7 | 20,5 |

A partir das respostas, foi possível calcular os efeitos para cada fator e suas interações. Como o experimento não foi realizado em duplicata, não é possível afirmar quais fatores são estatisticamente significativos, mas apontar indícios de maior influencia sobre os ensaios.

Considerando-se o objetivo de obtenção das melhores condições experimentais de extração para todos os analitos, é possível que algumas decisões sejam distintas para uma das substâncias de estudo.

O gráfico de Pareto dos efeitos para cada um dos hormônios estudados estão apresentados na **Figura 4.2**. De forma geral, é possível perceber que os fatores principais: solvente, tempo e massa de nanopartícula apresentam a maior influência para três dos analitos. Para E2 existem duas interações entre solvente e outros fatores que se mostram mais importantes que os fatores citados anteriormente, porém, como estes não apresentam grande importância para os demais analitos optamos por retirá-los da matriz de planejamento e recalcular os resultados como se houvessemos realizado um planejamento fatorial 2^3 completo e com duplicata.

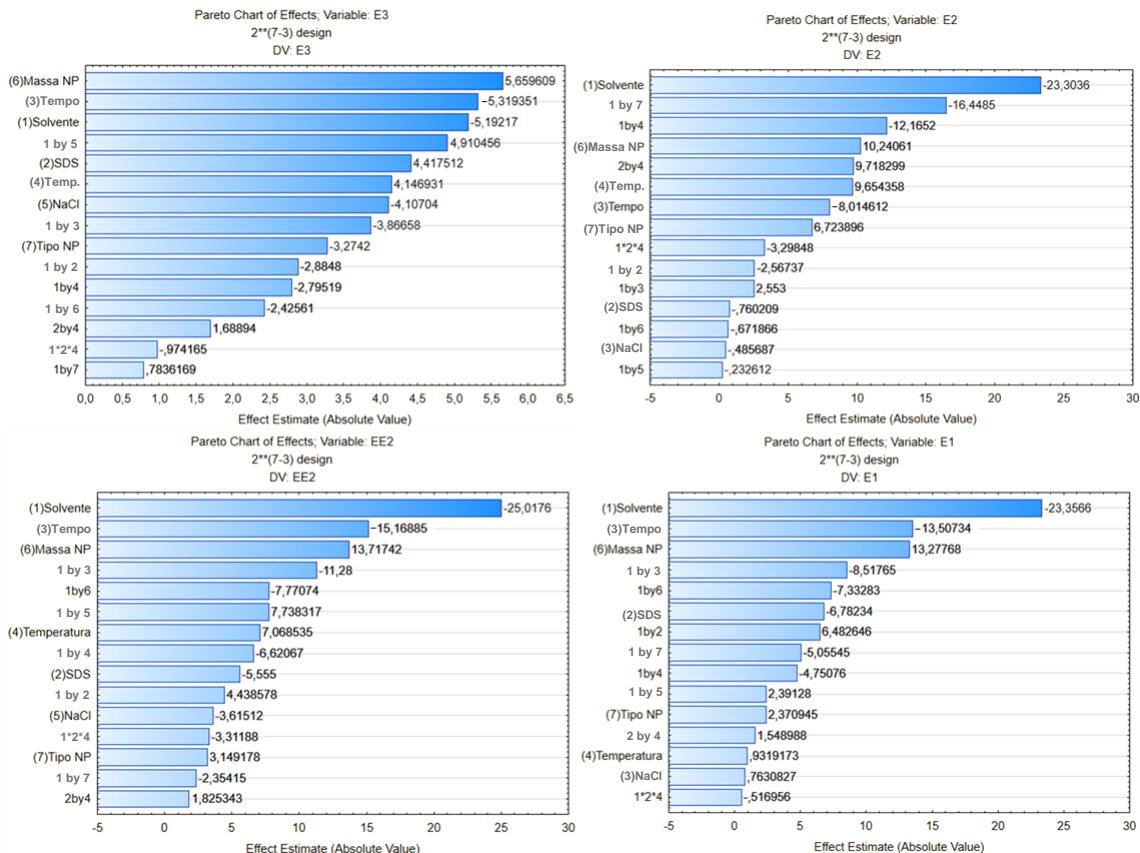


Figura 4.2 – Gráfico de Pareto dos efeitos para os quatro estrogênios no planejamento fatorial fracionado 2^{7-3}_{IV} .

A nova matriz de planejamento com suas respectivas respostas estão apresentadas na **Tabela 4.3**.

Tabela 4.3 – Matriz de resposta para os quatro estrogênios no planejamento fatorial completo 2^3 recalculado.

| Ensaio | Bloco | Solvante | Tempo (min) | Massa NP (mg) | % | | | |
|--------|-------|---------------|-------------|---------------|------|------|------|------|
| | | | | | E3 | E2 | EE2 | E1 |
| 1 | 1 | Água | 10 | 5 | 2,9 | 15,3 | 17,1 | 20,3 |
| 2 | 1 | Água:10%MetOH | 10 | 5 | 1,4 | 7,8 | 9,5 | 13,7 |
| 3 | 1 | Água | 20 | 5 | 12,7 | 32,8 | 33,9 | 34,4 |
| 4 | 1 | Água:10%MetOH | 20 | 5 | 6,1 | 18,4 | 13,0 | 20,0 |
| 5 | 1 | Água | 10 | 10 | 6,6 | 14,8 | 12,1 | 23,9 |
| 6 | 1 | Água:10%MetOH | 10 | 10 | 4,6 | 8,4 | 11,7 | 15,1 |
| 7 | 1 | Água | 20 | 10 | 7,1 | 54,6 | 59,2 | 68,7 |
| 8 | 1 | Água:10%MetOH | 20 | 10 | 7,7 | 38,4 | 14,4 | 24,1 |
| 9 | 2 | Água | 10 | 5 | 4,1 | 61,9 | 14,9 | 18,5 |
| 10 | 2 | Água:10%MetOH | 10 | 5 | 5,9 | 12,4 | 3,9 | 9,1 |
| 11 | 2 | Água | 20 | 5 | 7,4 | 29,3 | 40,7 | 44,3 |
| 12 | 2 | Água:10%MetOH | 20 | 5 | 2,6 | 10,2 | 11,2 | 10,7 |
| 13 | 2 | Água | 10 | 10 | 11,2 | 58,2 | 52,6 | 51,9 |
| 14 | 2 | Água:10%MetOH | 10 | 10 | 7,7 | 18,2 | 16,6 | 17,4 |
| 15 | 2 | Água | 20 | 10 | 34,5 | 55,3 | 68,7 | 55,3 |
| 16 | 2 | Água:10%MetOH | 20 | 10 | 8,9 | 22,1 | 18,7 | 20,5 |

Novamente, foram gerados os gráficos de Pareto (**Figura 4.3**) a partir do cálculo dos efeitos para cada um dos analitos e avaliando os gráficos, podemos destacar o seguinte:

- Nenhum dos fatores estudados foram significativos para garantir uma boa recuperação do estriol, portanto, foi assumido que as condições adotadas para os demais analitos também servirão para ele;
- Apenas o solvente em que a amostra foi preparada mostrou-se estatisticamente significativo para o 17β -estradiol;
- Para os demais analitos, os três fatores estudados foram considerados estatisticamente significativos.

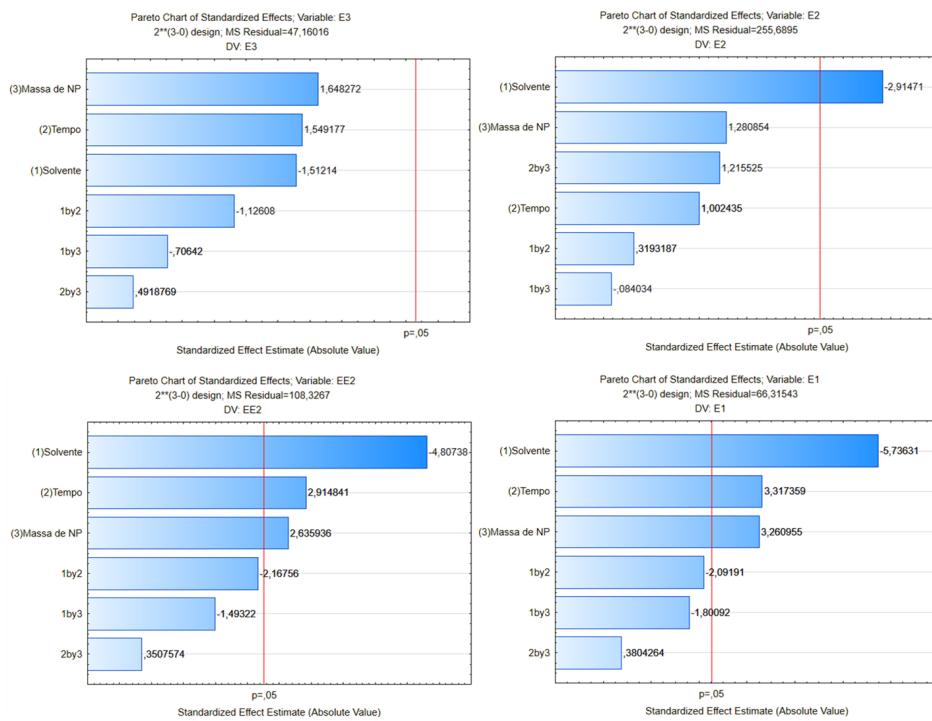


Figura 4.3 – Gráficos de Pareto dos efeitos para os quatro estrogênios no planejamento factorial completo 2^3 recalculado.

Dante dessas observações, foi possível fixar os níveis em que os fatores estudados fornecerão os maiores percentuais de recuperação. Para interpretar os resultados dos gráficos de Pareto, é necessário compreender que se uma barra apresenta um valor positivo considera-se que há ganho de resposta quando há a troca do nível inferior pelo nível superior de um determinado fator e o contrário quando uma barra possui um valor negativo.

Começando pelos fatores estatisticamente significativos, o solvente para o preparo das amostras que apresentou o melhor resultado para todos os analitos foi a água pura, sem adição de solvente orgânico. Uma possível explicação para esse comportamento é que foi utilizado o dodecil sulfato de sódio (SDS) para promover a dispersão das nanopartículas na amostra, dispensando o emprego do solvente metanol. O tempo em que as nanopartículas ficaram em contato com as amostras e garantiu melhor resultado foi o de 10 minutos. Por fim, a massa de nanopartícula utilizada, que resultou na obtenção de maiores percentuais de recuperação foi de 10 mg.

Os demais fatores que não apresentaram significância para nenhum dos analitos foram fixados da seguinte forma:

- Fator 2 - SDS: apresentou melhores resultados utilizando a massa de 0,5 mg ml^{-1} exceto para o estriol, mas como dito anteriormente, foram escolhidos os níveis que se mostraram mais vantajosos para a maioria dos analitos;
- Fator 4 - Temperatura: para todos os estrogênios os melhores resultados obtidos foram com a temperatura de 40 °C, foi observado que ao esquentar a amostra havia desprendimento de vapores ao abrir os frascos podendo levar a perdas, além disso, notou-se a formação de produtos de degradação nos cromatogramas, portanto, as extrações foram realizadas em temperatura ambiente, uma vez que esse fator não é significativo para nenhum dos analitos;
- Fator 5 - NaCl: o cloreto de sódio empregado para promover o efeito *salting out** obteve melhores resultados utilizando a menor quantidade de massa: 3 g, exceto para a estrona, mas como o efeito não foi significativo e optou-se por retira-lo do experimento visto que a presença do sal nos ensaios podem prejudicar a coluna cromatográfica;
- Fator 7 - Tipo de nanopartícula: as amostras de nanopartículas empregadas no experimento foram as que obtiveram o melhor e o pior resultado no primeiro teste, este experimento confirmou o que havia acontecido anteriormente, a melhor amostra de nanopartícula a ser usada nas extrações é a 50TEOS:1C16, exceto para estriol.

Em resumo ao que foi discutido acima, a **Tabela 4.4** mostra os níveis de cada fator fixados para os estudos subsequentes.

*Promove o aumento da força iônica do meio, e como consequência, ocorre a diminuição da solubilidade de moléculas orgânicas em meio aquoso levando-as a migrarem para o meio orgânico [88].

Tabela 4.4 – Resultado dos níveis fixados no planejamento fatorial fracionado 2^{7-3}_{IV} .

| Fatores | Níveis fixados |
|----------------------------------|----------------|
| Solvente | Água |
| Massa SDS (mg mL ⁻¹) | 0,5 |
| Tempo (min) | 10 |
| Temperatura (°C) | Ambiente |
| Massa de NP (mg) | 10 |
| Tipo de NP | 50TEOS:1C16 |

Em seguida, os estudos foram direcionados a melhorar as condições de eluição dos analitos após a extração. Foram realizados dois planejamentos 2^2 nos quais as condições de extração foram mantidas fixas de acordo com o resultado obtido no planejamento fatorial fracionado e as condições variáveis mostradas nas **Tabela 3.4** e **Tabela 3.5**.

A matriz de respostas (**Tabela 4.5**) foi gerada a partir dos resultados obtidos pelo planejamento que compara acetonitrila e uma mistura de água e metanol na proporção de 50 % (v v⁻¹) como eluentes e o tempo de eluição. Os resultados obtidos para o 17β -estradiol não serão apresentados para esse experimento, uma vez que a presença de um sinal interferente em um dos ensaios comprometeu as respostas deste analito.

Tabela 4.5 – Matriz de resposta para os analitos no planejamento fatorial 2^2 .

| Ensaio | Solvente | Tempo (min) | % | | |
|--------|---|-------------|------|------|------|
| | | | E3 | EE2 | E1 |
| 1 | ACN | 5 | 0,62 | 22,9 | 34,4 |
| 2 | Água/ MetOH (50:50 %, v v ⁻¹) | 5 | 6,16 | 44,8 | 43,5 |
| 3 | ACN | 10 | 0,51 | 13,0 | 27,5 |
| 4 | Água/ MetOH (50:50 %, v v ⁻¹) | 10 | 7,07 | 46,6 | 45,6 |

Com o auxílio dos gráficos de Pareto (**Figura 4.4**) foi possível observar que, para todos os analitos estudados, o solvente que apresentou melhor desempenho na eluição foi a mistura de água e metanol.

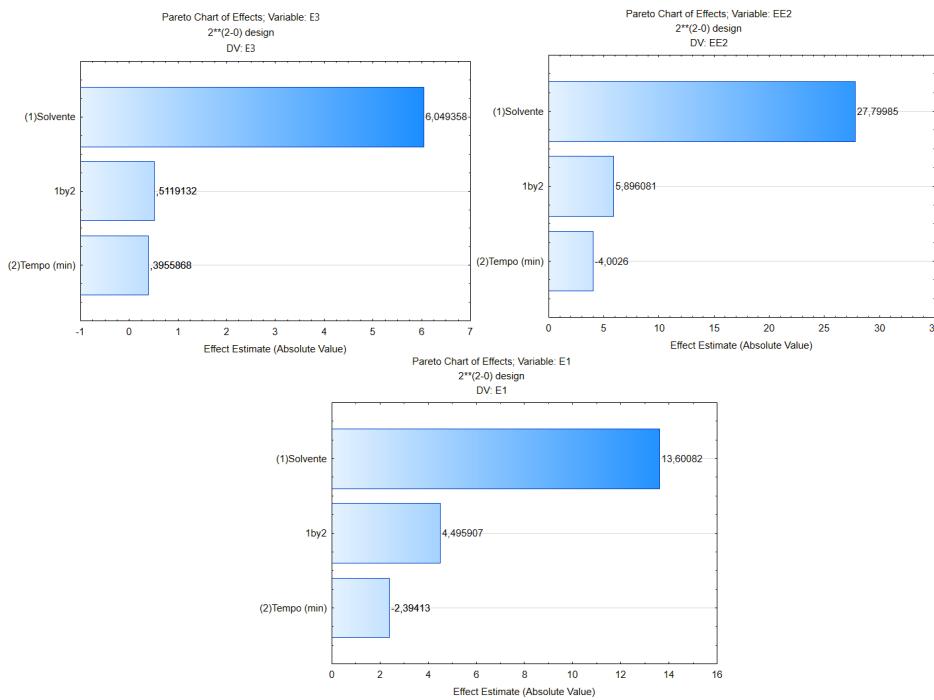


Figura 4.4 – Gráficos de Pareto dos efeitos para os estrogênios no planejamento fatorial 2².

A interação entre tipo de solvente e tempo de eluição foi o segundo efeito mais importante, por este motivo não foi possível interpretar o efeito do tempo separadamente. Para tanto, foi necessário avaliar o gráfico de médias para a interação dos efeitos (**Figura 4.5**).

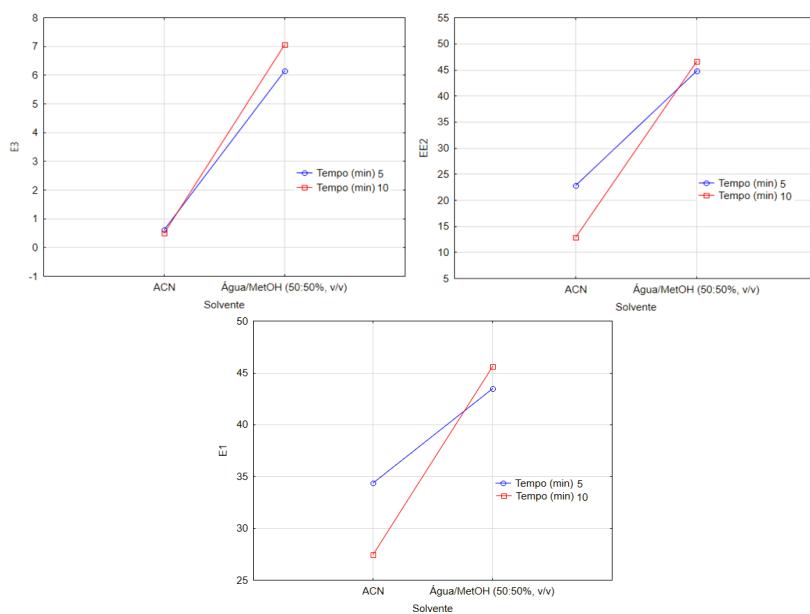


Figura 4.5 – Gráficos de médias para interação dos efeitos entre os fatores solvente e tempo.

Como é possível observar, para os três analitos estudados o melhor desempenho na etapa de eluição foi obtido no ensaio em que os dois fatores (solvente e tempo) estão no

nível superior, ou seja, a mistura de água e metanol na proporção de 50 % (v v⁻¹) como eluente e dez minutos de eluição.

Devido aos percentuais de recuperação relativamente baixos, a partir deste experimento foram analisadas também alíquotas de sobrenadante coletadas após a realização das extrações a fim de investigar o potencial de extração das nanopartículas sintetizadas. Estes estudos permitiram avaliar a repetibilidade das extrações, além do percentual dos analitos que foram efetivamente retirados das soluções de trabalho.

Avaliando as quantidades dos estrogênios presentes no sobrenadante (**Tabela 4.6**) percebe-se que os percentuais de extração são superiores a 70 %, exceto para estriol sempre com menores percentuais tanto para a extração quanto na recuperação. Este fato pode indicar pouca afinidade do hormônio com a nanopartícula, sabendo que a funcionalização confere ao material um caráter apolar e que o estriol, dentre os estrogênios estudados, é o que possui maior caráter polar devido ao maior número de grupos hidroxila presentes em sua estrutura. Além disso, destaca-se que possivelmente a extração não está sendo reproduzível, uma vez que as condições empregadas nesta etapa foram as mesmas para todos os ensaios e os percentuais de estrogênios presentes no sobrenadante são diferentes, fenômeno que possivelmente está relacionado à dificuldade de manter a intensidade da radiação ultra-sônica igual para todos os ensaios^[89] tendo em vista que a intensidade da radiação é diferente em cada ponto do banho de ultrassom.

Tabela 4.6 – Percentual dos analitos presentes nas soluções de trabalho após a extração.

| Ensaio | Percentual presente no sobrenadante | | |
|--------|-------------------------------------|------|------|
| | E3 | EE2 | E1 |
| | % | | |
| 1 | 62,5 | 4,5 | 27,9 |
| 2 | 54,3 | 10,5 | 10,4 |
| 3 | 81,4 | 15,3 | 28,1 |
| 4 | 61,1 | 9,1 | 12,1 |

Destaca-se ainda que ao somar a quantidade dos analitos que foram eluídos aos que permaneceram na solução de trabalho após a extração (**Tabela 4.7**) não é possível recompor o valor de 100 %, fato que pode indicar a presença de interações mais fortes entre

a superfície da nanopartícula e os hormônios.

Tabela 4.7 – Somatório dos percentuais de recuperação e sobrenadante dos analitos.

| Ensaio | Percentual total dos analitos (recuperado + sobrenadante) | | |
|--------|--|------|------|
| | E3 | EE2 | E1 |
| | % | | |
| 1 | 63,2 | 27,4 | 62,3 |
| 2 | 60,4 | 55,3 | 53,9 |
| 3 | 82,0 | 28,2 | 55,6 |
| 4 | 68,2 | 55,7 | 57,7 |

Uma vez que os analitos extraídos da não foram completamente eluidos nos ensaios anteriores, foi realizado um segundo planejamento modificando o solvente utilizado na eluição com a finalidade de melhorar essa etapa do processo. Também foram utilizadas como condições fixas na extração as apresentadas na **Tabela 4.4** e os fatores variáveis a serem estudados foram apresentados na **Tabela 3.5**. Na **Tabela 4.11** estão dispostos os resultados obtidos no planejamento.

Tabela 4.8 – Matriz de resposta para os hormônios no segundo planejamento fatorial completo 2^2 que avaliou a eluição dos analitos.

| Ensaio | Solvente | Tempo (min) | E3 E2 EE2 E1 | | | |
|--------|---|-------------|--------------|-------|-------|-------|
| | | | % | | | |
| 1 | Água/MetOH (50:50%, v v ⁻¹) | 5 | 3,98 | 17,68 | 21,15 | 25,09 |
| 2 | Água/MetOH (25:75%, v v ⁻¹) | 5 | 3,76 | 18,09 | 27,78 | 29,82 |
| 3 | Água/MetOH (50:50%, v v ⁻¹) | 10 | 4,39 | 15,52 | 18,07 | 22,40 |
| 4 | Água/MetOH (25:75%, v v ⁻¹) | 10 | 5,97 | 34,47 | 44,71 | 46,30 |

Novamente, para ajudar na interpretação dos dados, foram gerados os gráficos de Pareto (**Figura 4.6**) para cada um dos estrogênios. O comportamento de todos os hormônios foi semelhantes neste experimento, exceto para o estriol que apresentou maior influência do tempo, obtendo melhor resultado de recuperação com 10 minutos de dessorção. Os

demais analitos sofrem maior influência do solvente, garantindo maior eficiência na eluição com a mistura de água/metanol 25:75 % ($v\ v^{-1}$), uma vez que a concentração maior de metanol garante a presença de grupos hidroxila capazes de disputar os estrogênios com a superfície das nanopartículas que possuem grupos silanóis^[90], que possivelmente estão interagindo de forma mais forte com os analitos.

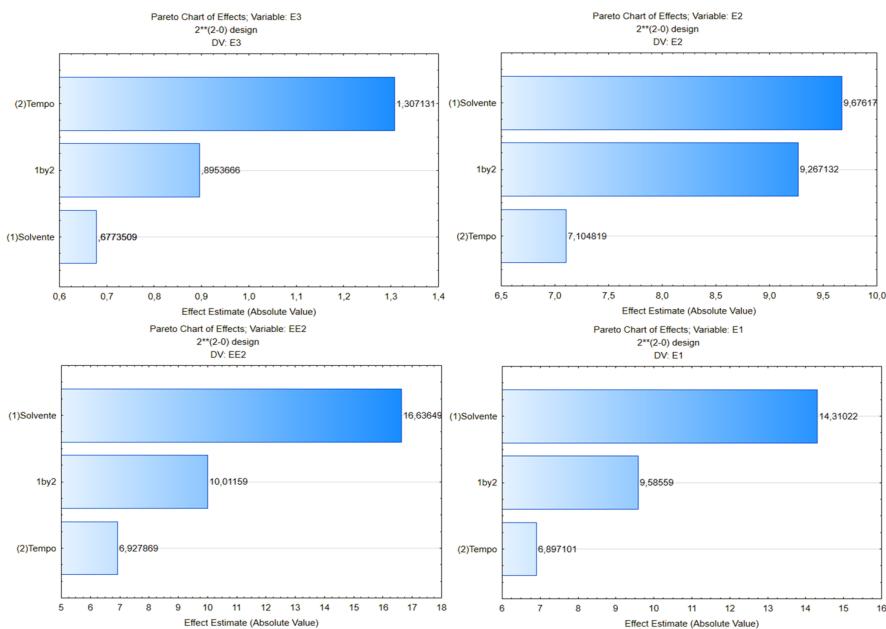


Figura 4.6 – Gráficos de Pareto dos efeitos para os estrogênios no segundo planejamento factorial completo 2^2 .

Como o segundo efeito mais importante para os resultados obtidos foi o de interação dos dois fatores, para determinar o melhor nível a ser utilizado de cada um dos fatores, foi necessário avaliar os gráficos de médias (**Figura 4.7**). Avaliando as interações dos fatores apresentadas nos gráficos de médias para todos os hormônios, é possível afirmar que as condições que garantem melhor eficiência no processo de dessorção é a utilização da mistura de água/metanol 25:75 % ($v\ v^{-1}$) e 10 minutos de eluição.

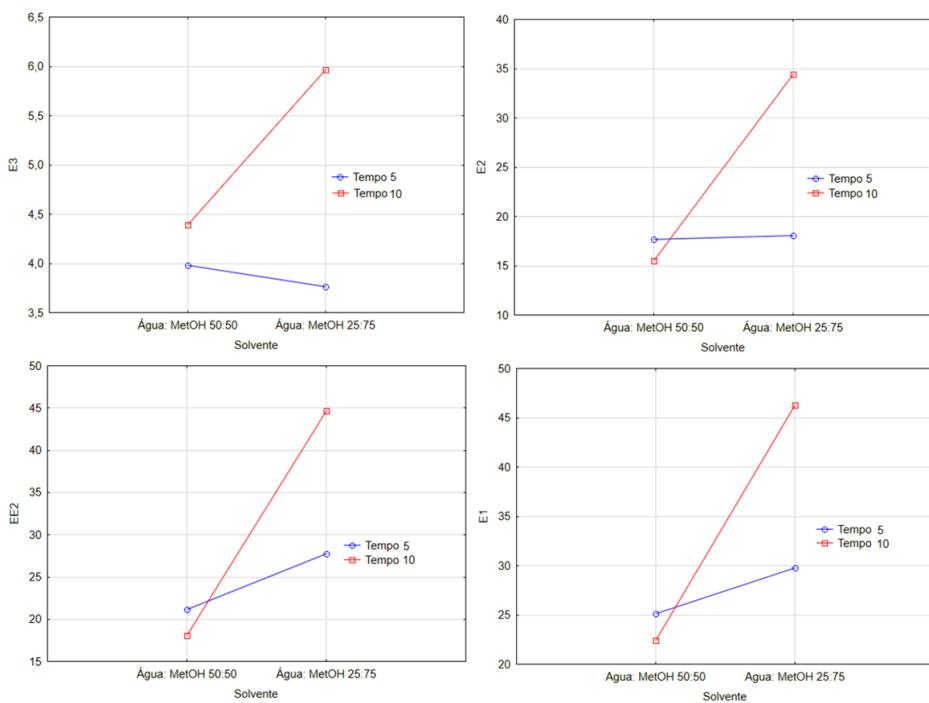


Figura 4.7 – Gráficos de médias para interação dos efeitos entre os fatores solvente e tempo para os estrogênios.

Comparando os percentuais de sobrenadante presente nos ensaios deste planejamento (**Tabela 4.9**) com os obtidos no anterior é possível destacar uma redução na eficiência da extração, visto que as quantidades dos analitos presentes na solução de trabalho são maiores do que as quantidades encontradas nos ensaios anteriores. Destaca-se ainda que as condições da extração foram as mesmas nos dois planejamentos, o que reforça a observação feita anteriormente de que o processo de extração não foi reproduzível.

Tabela 4.9 – Percentual de estrogênios presentes nas soluções de trabalho após a extração.

| Ensaio | Percentual presente no sobrenadante | | | |
|--------|-------------------------------------|------|------|------|
| | E3 | E2 | EE2 | E1 |
| | | | | % |
| 1 | 80,7 | 6,56 | 12,3 | 30,7 |
| 2 | 85,8 | 20,9 | 23,0 | 36,9 |
| 3 | 79,4 | 12,2 | 17,7 | 25,3 |
| 4 | 80,8 | 57,9 | 14,7 | 17,2 |

Novamente, ao analisar a soma dos percentuais de recuperação e remanescente na solução de trabalho, **Tabela 4.10**, percebe-se que uma quantidade considerável das substâncias de estudo permaneceram aderidas na superfície das nanopartículas, em concordância com as observações feitas na discussão do planejamento anterior.

Tabela 4.10 – Soma percentual dos valores de recuperação e sobrenadante dos analitos após o processo de extração.

| Ensaio | Percentual total dos analitos (recuperado + sobrenadante) | | | |
|--------|--|------|------|------|
| | E3 | E2 | EE2 | E1 |
| | % | | | |
| 1 | 84,7 | 24,2 | 33,5 | 55,8 |
| 2 | 89,5 | 39,1 | 50,8 | 66,8 |
| 3 | 83,8 | 27,7 | 35,8 | 47,7 |
| 4 | 86,7 | 92,4 | 59,4 | 63,5 |

Interpretando os resultados, observou-se que a condição de eluição que garante a melhor eficiência na etapa de eluição dos analitos é a utilização da mistura de água/metanol 25:75 % ($v\ v^{-1}$) como solvente e tempo de dez minutos.

Durante os testes foi observado que o procedimento assistido por ultrassom prejudica a eficiência da propriedade magnética do material uma vez que após o processo de extração torna-se difícil a separação das nanopartículas com o auxílio do imã, além disso, o processo não apresenta resultados reproduutíveis, mesmo mantendo as condições de extração fixas.

Como forma de aprimorar o processo, foi proposto o estudo da utilização da agitação magnética para avaliar se a extração terá respostas estáveis, e ainda, apresentará melhores resultados de recuperação.

4.2.2 Extração assistida por agitação magnética

Iniciando o estudo da extração assistida por agitação magnética, foi realizado um novo planejamento de experimentos com foco em melhorar o processo de eluição. Para

tanto, foi desenvolvido o planejamento descrito na **Tabela 3.6** novamente utilizando as condições de extração apresentadas na **Tabela 4.4**. Os resultados de recuperação obtidos estão dispostos na matriz de respostas presente na **Tabela 4.11**.

Tabela 4.11 – Matriz de resposta para os analitos no terceiro planejamento fatorial 2².

| Ensaio | Solvente | Tempo (min) | % | | | |
|--------|-----------------------------|-------------|-----|------|------|------|
| | | | E3 | E2 | EE2 | E1 |
| 1 | Metanol | 5 | 7,0 | 36,0 | 52,4 | 53,6 |
| 2 | Água:metanol (25:75 %, v/v) | 5 | 5,4 | 31,2 | 46,1 | 49,0 |
| 3 | Metanol | 10 | 6,8 | 36,3 | 50,8 | 53,9 |
| 4 | Água:metanol (25:75 %, v/v) | 10 | 7,4 | 39,1 | 52,9 | 58,3 |

A primeira observação a ser feita é que mesmo que as nanopartículas sofram uma pequena adesão à barra magnética usada na agitação, em comparação com os percentuais de recuperação obtidos nas extrações realizadas com ultrassom, a recuperação obtida nas extração assistida por agitação magnética evidenciou uma melhoria considerável, representando um aumento de 100 % em alguns ensaios. Destaca-se ainda que o processo de separação das nanopartículas com o auxílio do ímã tornou-se mais eficiente quando a extração é assistida por agitação magnética, corrigindo o problema encontrado com a utilização do ultrassom, a perda de resposta magnética, reduzindo o tempo de separação de 15 para 1 minuto em média, resultado que contribui para a redução significativa do tempo total de preparo das amostras.

Novamente foram gerados os gráficos de Pareto (**Figura 4.8**) considerando os dados de recuperação obtidos a partir desses ensaios.

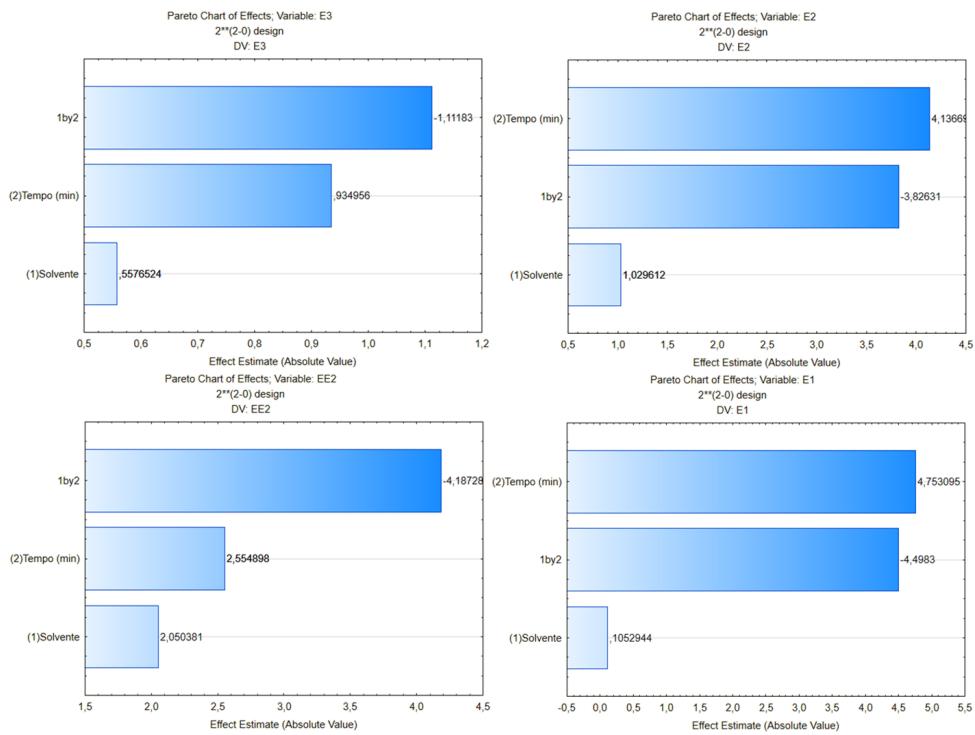


Figura 4.8 – Gráficos de Pareto dos efeitos para os estrogênios no terceiro planejamento factorial 2².

Avaliando os hormônios 17 β -estradiol e estrona, o efeito do tempo de eluição exerceu maior influência no processo, garantindo melhor resultado quando a eluição foi realizada com dez minutos. Para os demais estrogênios esse fator foi avaliado em conjunto com o efeito do solvente, uma vez que o efeito de interação dos dois fatores mostrou maior influência no processo frente aos demais. A avaliação da interação desses efeitos foi feita mediante a interpretação dos gráficos de médias de cada um dos estrogênios, apresentados na **Figura 4.9**.

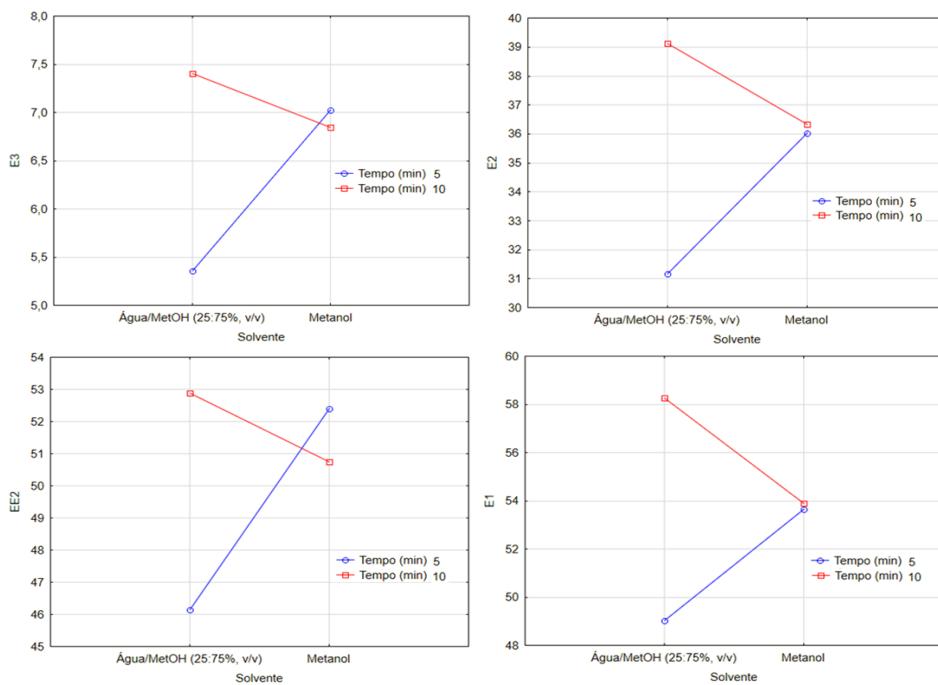


Figura 4.9 – Gráficos de médias para interação dos efeitos entre os fatores solvente e tempo.

De acordo com as respostas obtidas nos ensaios, a melhor combinação de fatores é a manutenção da misturas de solventes água/metanol 25:75 % ($v\text{v}^{-1}$) para a eluição e o tempo de dez minutos para todos os analitos, confirmando as afirmações feitas anteriormente com base nos gráficos de Pareto.

Ao analisar os percentuais dos analitos ainda presentes no sobrenadante (**Tabela 4.12**) após a extração assistida por agitação magnética, percebe-se que as quantidades remanescentes dos analitos na solução de trabalho diminuíram em média pela metade exceto para E3 que reduziu em média 2 %, ou seja, a extração se mostrou mais eficiente.

Destaca-se ainda que o processo tornou-se reproduzível, tendo em vista que todos os ensaios foram realizados sob as mesmas condições de extração e as quantidades dos analitos ainda presentes na solução de trabalho tornaram-se mais estáveis entre os ensaios.

Tabela 4.12 – Percentual de hormônios presentes nas soluções de trabalho após o processo de extração.

| Ensaio | Percentual presente no sobrenadante | | | |
|--------|-------------------------------------|------|------|------|
| | E3 | E2 | EE2 | E1 |
| | % | | | |
| 1 | 78,9 | 3,4 | 9,1 | 15,1 |
| 2 | 81,6 | 3,5 | 8,4 | 16,4 |
| 3 | 79,5 | 11,0 | 12,0 | 16,4 |
| 4 | 76,4 | 3,0 | 7,6 | 13,8 |

Adicionalmente, serão apresentados na **Tabela 4.12** os dados percentuais recuperados somados aos remanescentes na solução de trabalho e novamente é possível afirmar que parte dos analitos extraídos permaneceram aderidos à superfície das nanopartículas, visto que estes valores não atingem 100%.

Em comparação com os dados apresentados na **Tabela 4.10**, o somatório dos percentuais de recuperação e sobrenadante do presente experimento são maiores(**Tabela 4.13**), uma vez que o processo de eluição se tornou mais eficiente.

Tabela 4.13 – Soma dos percentuais de recuperação e remanescente nas soluções de trabalho após o processo de extração.

| Ensaio | Percentual total dos analitos (recuperado + sobrenadante) | | | |
|--------|--|------|------|------|
| | E3 | E2 | EE2 | E1 |
| | % | | | |
| 1 | 85,9 | 39,4 | 61,5 | 68,7 |
| 2 | 87,0 | 34,7 | 54,5 | 65,4 |
| 3 | 86,3 | 47,4 | 62,8 | 70,3 |
| 4 | 83,8 | 42,1 | 60,5 | 72,1 |

Diante dos resultados obtidos neste experimento, as condições descritas na **Tabela 4.14**

serão mantidas fixas para os demais testes.

Tabela 4.14 – Fatores escolhidos para o processo de extração e eluição

| Fatores da extração | Níveis fixados |
|----------------------------------|---|
| Massa SDS (mg mL ⁻¹) | 0,5 |
| Tempo (min) | 10 |
| Temperatura (°C) | Ambiente |
| Massa de NP (mg) | 10 |
| Tipo de NP | 50TEOS:1C16 |
| Fatores da eluição | Níveis fixados |
| Solvente | Água e metanol 25:75 % (v v ⁻¹) |
| Tempo (min) | 10 |

*Todo o procedimento foi realizado sob agitação magnética.

A amostra de nanopartícula que obteve os melhores resultados até aqui possivelmente possui uma superfície de recobrimento rica em grupos silanóis que podem estar sofrendo interações fortes com parte dos estrogênios extraídos da solução de trabalho impedindo sua completa eluição e consequente recuperação. Visando melhorar esse resultado, foi proposta a síntese de uma nova nanopartícula com o dobro de agente funcionalizante, a fim de modificar o ambiente químico de interação com os hormônios.

4.2.2.1 Avaliação da nanopartícula 50TEOS:2C16

O teste da nanopartícula 50TEOS:2C16 foi realizado empregando as condições de extração e eluição apresentadas na **Tabela 4.14**. Os percentuais de recuperação e das quantidades ainda presentes na solução de trabalho após a extração estão apresentados na **Tabela 4.15**.

Tabela 4.15 – Resultados percentuais obtidos no teste da nanopartícula 50TEOS:2C16.

| | E3 | E2 | EE2 | E1 |
|--------------|------|------|------|------|
| | % | | | |
| Recuperação | 1,43 | 11,2 | 14,2 | 18,3 |
| Remanescente | 87,6 | 51,8 | 67,3 | 63,5 |
| Total | 89,0 | 62,9 | 81,5 | 81,7 |

Comparando a recuperação obtida utilizando a nanopartícula 50TEOS:2C16 com a recuperação dos ensaios anteriores, realizados com as mesmas condições exceto pela utilização da nanopartícula 50TEOS:1C16, é possível perceber que houve uma redução média de cerca de três vezes, entretanto, para o estriol a redução foi ainda maior, aproximadamente cinco vezes.

Adicionalmente, ao observar a quantidade de hormônios ainda presentes na solução de trabalho após a extração também fica evidente a redução na capacidade das nanopartículas de capturar as substâncias, podendo chegar até vinte vezes de diminuição.

Considerando que a nanopartícula usada possui o dobro de funcionalização das demais, a causa da diminuição da capacidade de extração pode estar relacionada a impedimento estérico desempenhado por grupos C16 sobre grupos silanóis, além disso, se as interações entre os grupos silanóis presentes na superfície do recobrimento e os analitos forem determinantes para garantir uma melhor eficiência do processo, é natural que a redução ocorra, tendo em vista que estes grupos agora não estariam tão acessíveis.

Assim como nos demais ensaios, ao somar os valores de recuperação e a quantidade remanescente na solução de trabalho, destaca-se que parte dos analitos também sofreram interações fortes com a nova nanopartícula, mas em escala menor.

Ainda buscando melhorar os resultados de extração/recuperação e entender melhor o comportamento da nova nanopartícula foi realizado um novo design de experimentos cujos fatores estudados foram apresentados na **Tabela 3.7**. Neste experimento foi feita uma pequena modificação no procedimento de extração, para avaliar a influencia de uma dispersão prévia das nanopartículas em um solvente orgânico para posterior inserção na solução de trabalho.

A **Tabela 4.16** apresenta os dados de recuperação dos analitos para cada um dos

ensaios. É importante destacar que os ensaios deste planejamento obtiveram percentuais de recuperação melhores que os últimos testes.

Tabela 4.16 – Matriz de resposta para os quatro estrogênios no planejamento fatorial completo 2^3 .

| Ensaio | Tipo de NP | Solvente para dispersão | SDS (mg mL ⁻¹) | % E3 E2 EE2 E1 | | | |
|--------|-------------|-------------------------|----------------------------|----------------|------|------|------|
| | | | | % E3 E2 EE2 E1 | | | |
| 1 | 50TEOS:1C16 | Metanol | 0 | 15,3 | 52,6 | 56,6 | 51,1 |
| 2 | 50TEOS:2C16 | Metanol | 0 | 5,4 | 32,9 | 36,8 | 29,9 |
| 3 | 50TEOS:1C16 | Etanol | 0 | 8,8 | 50,7 | 52,9 | 42,5 |
| 4 | 50TEOS:2C16 | Etanol | 0 | 3,3 | 18,5 | 20,5 | 16,7 |
| 5 | 50TEOS:1C16 | Metanol | 0,5 | 2,7 | 3,4 | 28,9 | 27,5 |
| 6 | 50TEOS:2C16 | Metanol | 0,5 | 1,1 | 10,1 | 12,9 | 10,2 |
| 7 | 50TEOS:1C16 | Etanol | 0,5 | 2,2 | 20,4 | 27,0 | 20,0 |
| 8 | 50TEOS:2C16 | Etanol | 0,5 | 1,1 | 13,6 | 9,5 | 15,8 |

A partir do gráfico de Pareto (**Figura 4.10**) é possível afirmar que para todos os analitos os fatores mais importantes são o tipo de nanopartícula e a quantidade de SDS usadas. A utilização da nanopartícula 50TEOS:2C16 apresenta uma menor capacidade de recuperação frente a 50TEOS:1C16, sendo esta a que atingiu os melhores resultados de recuperação deste design de experimentos e de ensaios realizados anteriormente.

Ao avaliar os efeitos para o SDS, fica evidente que a presença de um solvente para dispersar as nanopartículas antes de colocá-las em contato com a solução de trabalho dispensa a utilização do surfactante de forma que para todos os analitos, o melhor percentual de recuperação foi obtido quando não foi utilizado SDS nos ensaios. A substituição do SDS por um solvente orgânico no processo de extração é bastante positiva tendo em vista a preservação da coluna cromatográfica, pois todas as medidas dos ensaios realizados com o emprego do surfactante geram cromatogramas com muitos picos que não correspondem aos analitos, o que não ocorre com ensaios os realizados empregando solventes orgânicos para dispersar as nanopartículas.

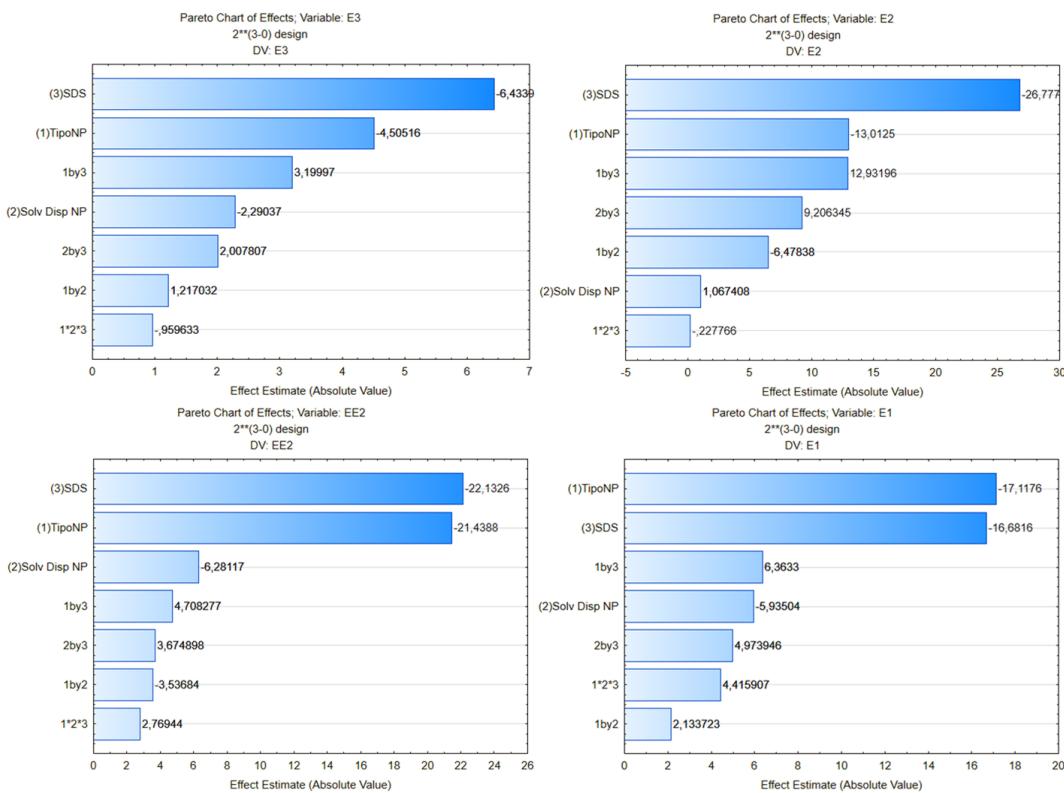


Figura 4.10 – Gráfico de Pareto dos efeitos para os estrogênios no planejamento fatorial completo 2³.

O efeito para o tipo de solvente utilizado na dispersão apresenta menor importância, mas a utilização do metanol se mostrou mais eficiente, entretanto, para avaliar o efeito desse fator para o 17 β -estradiol é necessário analisar as interações entre os efeitos pelo gráfico de médias apresentado na **Figura 4.11**.

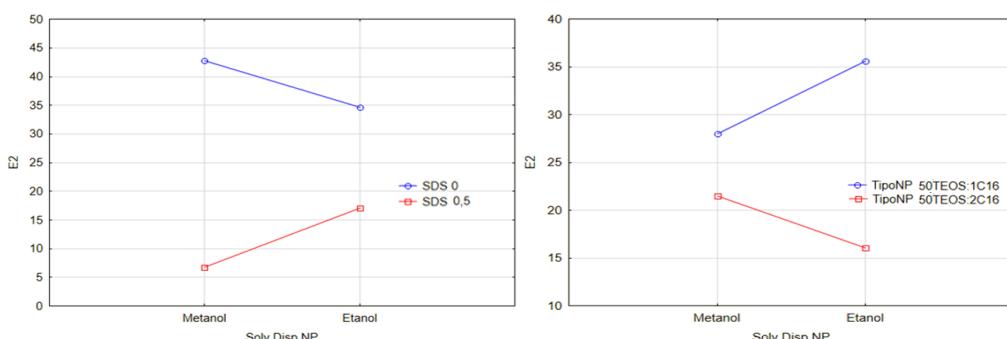


Figura 4.11 – Gráfico de médias para interação dos efeitos para o 17 β -estradiol.

A interação do tipo de solvente de dispersão com o SDS e com o tipo de nanopartícula apresentam comportamentos opostos, ou seja, quando interage com o SDS a melhor resposta é obtida empregando o metanol e ao interagir com o tipo de nanopartícula o

melhor desempenho é obtido com a utilização do etanol. Considerando que a interação que possui efeito de maior relevância é com o SDS, entende-se que a utilização do metanol é a que garante melhor resposta.

Para os demais analitos, os efeitos de interação não apresentam maior relevância do que os efeitos dos fatores principais envolvidos, por isso não serão avaliados.

Considerando os resultados obtidos neste planejamento, os fatores escolhidos para o procedimento de extração/eluição para os testes subsequentes estão os listados na **Tabela 4.17**:

Tabela 4.17 – Fatores fixados para o processo de extração

| Fatores da extração | Níveis fixados |
|------------------------------------|---|
| Metanol para dispersão das NP (mL) | 1 |
| Tempo (min) | 10 |
| Temperatura (°C) | Ambiente |
| Massa de NP (mg) | 10 |
| Tipo de NP | 50TEOS:1C16 |
| Fatores da eluição | Níveis fixados |
| Solvente | Água e metanol 25:75 % (v v ⁻¹) |
| Tempo (min) | 10 |

*Todo o procedimento foi realizado sob agitação magnética.

As quatro amostras de nanopartículas estudadas até aqui apresentam interações fortes com os analitos que os impede de serem completamente eluidos. Essas interações foram atribuídas à presença de grupos silanóis na superfície do recobrimento do material. Em busca de confirmar essa hipótese foi proposto um teste de extração utilizando nanopartículas recobertas apenas com sílica, sem funcionalização.

4.2.2.2 Avaliação da nanopartícula sem funcionalização

Os ensaios foram realizados seguindo três procedimentos de extração distintos: o primeiro com o procedimento descrito na **Tabela 4.14**, o segundo e o terceiro usaram 1 mL

de metanol e etanol respectivamente para dispersão prévia das nanopartículas e posterior incorporação à solução de trabalho. Os resultados obtidos nestes testes estão apresentados na **Tabela 4.18**.

Tabela 4.18 – Percentuais de recuperação obtidos utilizando as nanopartículas sem funcionalização.

| Recuperação | E3 | E2 | EE2 | E1 |
|-----------------------------|-----|-----|-----|-----|
| | % | | | |
| Condição anterior (com SDS) | 0,8 | 0,2 | 0,9 | 0,3 |
| Metanol para dispersão | 0,4 | 0,3 | 0,8 | 0,3 |
| Etanol para dispersão | 0,5 | 0,2 | 0,9 | 0,3 |

Avaliando os percentuais de recuperação obtidos nos três ensaios é evidente que os valores são muito baixos, dessa forma, duas hipóteses são levantadas: a primeira é que a nanopartícula não extraiu os analitos da solução de trabalho e por isso a recuperação foi muito pequena, a segunda é que se houve uma boa extração, mas a finidade com os analitos é tão forte que praticamente não houve dessorção. Para complementar as observações e confirmar uma das hipóteses, os percentuais dos estrogênios ainda presentes na solução de trabalho após a extração estão apresentados na **Tabela 4.19**.

Tabela 4.19 – Percentuais de hormônios presentes no sobrenadante da extração realizada com nanopartículas sem funcionalização.

| Sobrenadante | E3 | E2 | EE2 | E1 |
|-----------------------------|------|-----|-----|------|
| | % | | | |
| Condição anterior (com SDS) | 27,6 | 0,8 | 0,8 | 7,4 |
| Metanol para dispersão | 25,7 | 3,1 | 4,1 | 13,2 |
| Etanol para dispersão | 15,1 | 3,8 | 6,1 | 13,3 |

De acordo com os percentuais presentes na solução de trabalho após a extração, a segunda hipótese levantada foi confirmada, tendo em vista que as quantidades presentes no sobrenadante são tão baixas quanto as encontradas nos demais ensaios.

Como consequência da comprovação da forte afinidade observada entre a superfície das nanopartículas e os analitos, novamente tornou-se necessário fazer modificações na síntese do material.

4.2.2.3 Avaliação das nanopartículas 50TEOS: 1C16: 1TVS e 60TEOS: 06C16: 12TVS

Buscando ajustar a interação entre analitos e a superfície do recobrimento, foram sintetizadas duas novas nanopartículas com proporções diferentes de dois ligantes na etapa de funcionalização. As nanopartículas sintetizadas foram 50TEOS:1C16:1TVS e 60TEOS:06C16:12TVS como descrito na **Tabela 3.2**.

Os testes das novas nanopartículas sintetizadas foram realizados de acordo com o que foi descrito na **Tabela 4.17** e os percentuais de recuperação obtidos nestes ensaios estão dispostos na **Tabela 4.20**.

Tabela 4.20 – Percentuais de recuperação obtidos no teste de extração com as nanopartículas 50TEOS:1C16:1TVS e 60TEOS:06C16:12TVS

| Recuperação | E3 | E2 | EE2 | E1 |
|--------------------|------|------|------|------|
| | % | | | |
| 50TEOS:1C16:1TVS | 20,0 | 46,7 | 44,8 | 37,2 |
| 60TEOS:06C16:12TVS | 14,7 | 30,7 | 35,6 | 27,0 |

As novas nanopartículas sintetizadas não obtiveram resultados melhores que as demais testadas, exceto para o estriol. A mistura de funcionalizantes pode ter criado uma estrutura com espaços entre os ligantes deixando os grupos silanóis presentes na superfície do material mais disponíveis, assim, o estriol que possui mais grupos hidroxila que os demais analitos, apresenta maior afinidade com as novas nanopartículas.

Como a estrutura dos analitos é formada majoritariamente de carbono e hidrogênio fica evidente que a quantidade de C16 como funcionalizante é determinante na eficiência de recuperação dos analitos, ou seja, a medida que diminui a proporção de C16 adicionada ao material, diminui também os percentuais de recuperação.

A análise do sobrenadante (**Tabela 4.21**) é importante para complementar as observações acerca da afinidade com os analitos e capacidade de extração.

Tabela 4.21 – Percentuais de estrogênios presentes na solução de trabalho dos testes com as nanopartículas 50TEOS:1C16:1TVS e 60TEOS:06C16:12TVS

| Sobrenadante | E3 | E2 | EE2 | E1 |
|---------------------|-----------|-----------|------------|-----------|
| | % | | | |
| 50TEOS:1C16:1TVS | 29,5 | 14,7 | 12,0 | 14,0 |
| 60TEOS:06C16:12TVS | 38,2 | 16,5 | 13,0 | 16,6 |

Em concordância com a observação feita anteriormente, quando a quantidade de C16 utilizada na etapa de funcionalização das nanopartículas diminui, também é reduzida a eficiência na extração dos analitos, uma vez que a nanopartícula 60TEOS:06C16:12TVS retirou uma menor quantidade dos analitos da solução de trabalho.

Como as duas novas nanopartículas sintetizadas também não apresentaram melhoria nos resultados das extrações, foram sintetizadas mais três nanopartículas com quantidades crescentes de um agente finalizador que tem a função de blindar os grupos silanóis residuais.

4.2.2.4 Avaliação das nanopartículas 50TEOS: 1C16: 05TMS, 50TEOS: 1C16: 1TMS e 50TEOS:1C16:2TMS

Os últimos testes foram realizados utilizando as nanopartículas 50TEOS:1C16:05TMS, 50TEOS:1C16:1TMS e 50TEOS:1C16:2TMS que possuem proporções crescentes do agente finalizador trimetiletoxissilano responsável pela blindagem dos grupos silanóis residuais. Os resultados de recuperação obtidos nestes testes são apresentados na **Tabela 4.22**.

Tabela 4.22 – Percentuais de recuperação obtidos no teste de extração com as nanopartículas 50TEOS:1C16:05TMS, 50TEOS:1C16:1TMS e 50TEOS:1C16:2TMS.

| Recuperação | E3 | E2 | EE2 | E1 |
|-------------------|------|------|------|------|
| | % | | | |
| 50TEOS:1C16:05TMS | 25,8 | 31,2 | 40,9 | 32,4 |
| 50TEOS:1C16:1TMS | 25,4 | 30,9 | 42,1 | 32,8 |
| 50TEOS:1C16:2TMS | 23,1 | 21,7 | 35,8 | 28,9 |

Os percentuais de recuperação obtidos nos ensaios testes das novas nanopartículas foram menores que os encontrados em ensaios anteriores exceto para o estriol, ainda assim é possível afirmar que a capacidade de recuperação diminuiu com o aumento da quantidade de TMS na estrutura das nanopartículas.

Para discutir sobre a eficiência da extração é necessário avaliar os resultados do sobrenadante. Os percentuais de estrogênios que permaneceram na solução de trabalho estão apresentados na **Tabela 4.23**.

Tabela 4.23 – Percentual estrogênico remanescente após os ensaios com as nanopartículas 50TEOS:1C16:05TMS, 50TEOS:1C16:1TMS e 50TEOS:1C16:2TMS.

| Sobrenadante | E3 | E2 | EE2 | E1 |
|-------------------|------|------|------|------|
| | % | | | |
| 50TEOS:1C16:05TMS | 71,5 | 25,2 | 21,3 | 26,4 |
| 50TEOS:1C16:1TMS | 74,6 | 35,2 | 42,7 | 31,7 |
| 50TEOS:1C16:2TMS | 76,9 | 28,7 | 45,6 | 31,0 |

Ao observar os dados do sobrenadante é possível perceber que a eficiência da extração de, forma geral, também diminui com o aumento do agente finalizador. Outro ponto a ser destacado é que todo o estriol extraído foi recuperado, não havendo interação irreversível com a nanopartícula. Tendo em vista que o estriol é o estrogênio com maior caráter polar que os demais estudados, possivelmente a blindagem dos grupos silanóis residuais reduziu drasticamente a forte afinidade que o analito apresentava pela nanopartícula. O mesmo deve ter acontecido para os demais hormônios, uma vez que a eficiência da extração

diminuiu bastante em comparação com a utilização de outras nanopartículas.

Por fim, destaca-se que a **Tabela 4.17** apresenta as melhores condições para a realização do processo de extração. Essa condição foi utilizada posteriormente na realização do teste de recuperação para avaliar a exatidão do método desenvolvido. Os parâmetros de desempenho analítico avaliados e seus resultados serão discutidos a seguir.

4.3 Validação analítica

A validação analítica adotada seguiu os parâmetros analíticos descritos na **Seção 2.5**. A presente seção apresentará os resultados da validação do método HPLC-DAD para os quatro estrogênios.

4.3.1 Seletividade

Informações sobre a seletividade da técnica empregada podem ser obtidas a partir dos cromatogramas apresentados na **Figura 4.12**.

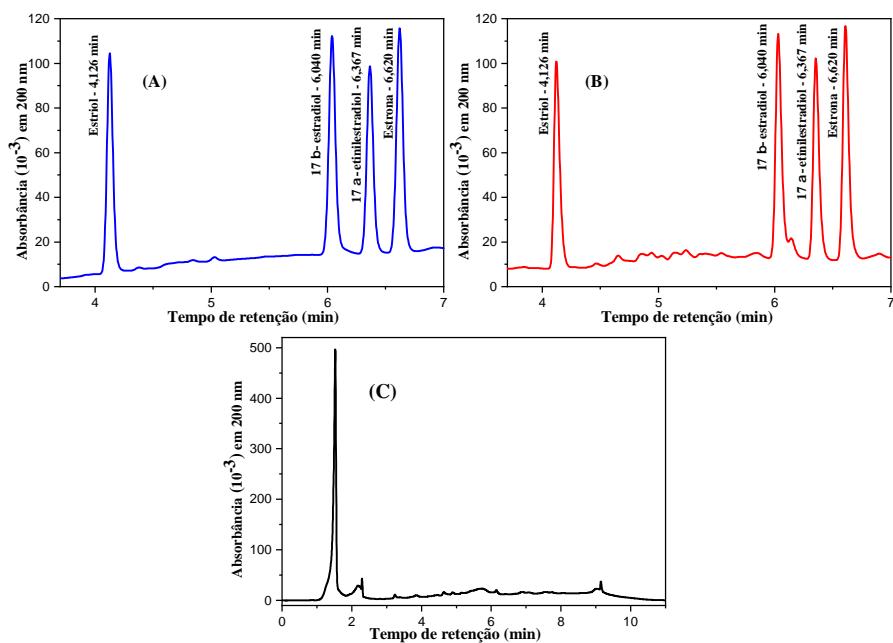


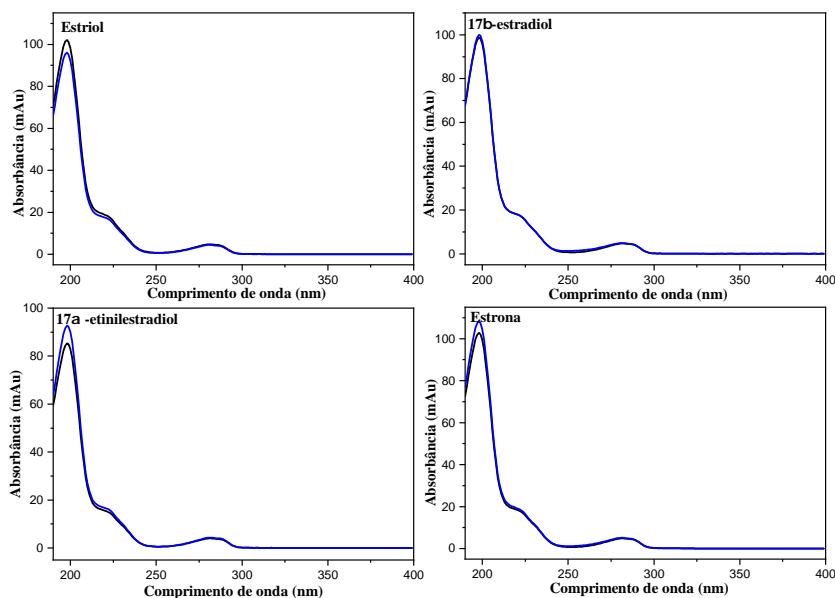
Figura 4.12 – Cromatogramas de: (A) mistura padrão dos quatro estrogênios com concentração de $500 \mu\text{g L}^{-1}$, (B) de uma amostra de água coletada na torneira do laboratório e fortificada com $500 \mu\text{g L}^{-1}$ dos quatro estrogênios, (C) amostra de água coletada na torneira do laboratório sem fortificação. Todos os cromatogramas foram registrados por HPLC-DAD.

Observando os cromatogramas da **Figura 4.12** e os tempos de retenção, pode-se dizer que não há evidências de substâncias interferentes junto aos picos dos quatro estrogênios. Dessa forma, é possível afirmar que a técnica possui elevada seletividade, que pode ser comprovada com a análise dos espectros de absorção molecular UV-Vis (**Figura 4.13**) medidos entre 190 e 400 nm para cada estrogênio numa corrida cromatográfica. Pode-se destacar que há uma grande semelhança entre as bandas de absorção dos espectros da solução padrão (linha preta) e da amostra fortificada (linha azul), aliado a isso, destacam-se os valores de pureza de pico e de resolução que podem ser conferidos na **Tabela 4.24**. Além disso, não há a presença de bandas de absorção interferentes.

Sabendo que a resolução é um parâmetro cromatográfico que traduz a capacidade da coluna de separar os analitos, o valor ideal deste parâmetro para realizar medidas quantitativas com segurança é $\geq 1,5^{[91]}$. Todos os valores de resolução obtidos no método desenvolvido são maiores do que o mínimo recomendado.

Tabela 4.24 – Valores de pureza de pico e resolução para os quatro estrogênios.

| Analito | Pureza de pico (%) | Resolução |
|-----------------------------|--------------------|-----------|
| Estriol | 100 | 21,7 |
| 17β -estradiol | 100 | 3,5 |
| 17α -etinilestradiol | 99,9 | 2,8 |
| Estrona | 100 | 3,8 |

**Figura 4.13** – Espectros de absorção molecular UV-Vis de: (1) Estriol; (2) 17β -estradiol; (3) 17α -etinilestradiol e (4) Estrona em preto o padrão de $500 \mu\text{g L}^{-1}$ e em azul amostra testemunha fortificada também com $500 \mu\text{g L}^{-1}$.

A semelhança entre os espectros de absorção dos analitos pode ser explicada pela similaridade na estrutura química dos hormônios, uma vez que todos os compostos orgânicos absorvem radiação eletromagnética por possuírem elétrons de valência que podem ser excitados. A banda de maior intensidade, em aproximadamente 200 nm, pode ser associada à transições eletrônicas realizadas por elétrons de ligações sigma por demandarem maior energia numa transição. A banda de menor intensidade, em aproximadamente 280 nm, pode estar associada a centros cromóforos do anel aromático, de modo que as duplas ligações conjugadas são responsáveis por diminuir o confinamento dos elétrons e a consequente diminuição da energia necessária para promover uma transição eletrônica^[38].

4.3.2 Linearidade

Os cromatogramas apresentados na **Figura 4.14** referem-se às corridas cromatográficas realizadas pelo método HPLC-DAD para a construção da curva analítica.

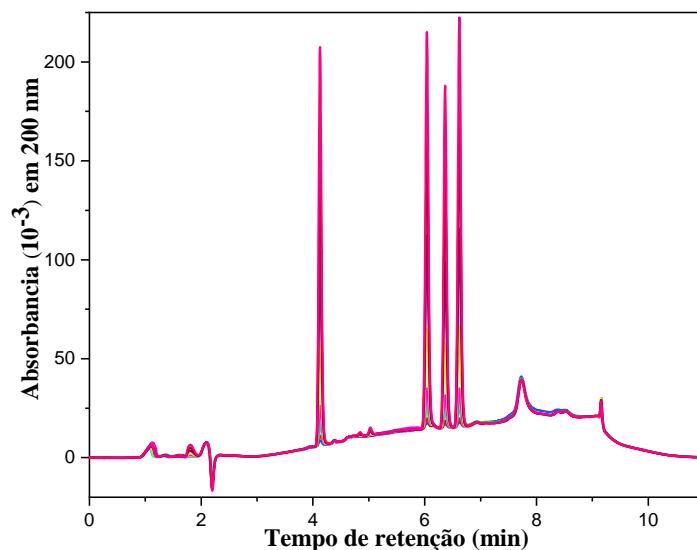


Figura 4.14 – Cromatogramas das soluções padrão analíticas dos estrogênios em concentrações crescentes utilizados na construção das curvas analíticas.

O estudo da faixa linear foi realizado nas concentrações entre 10 a 1.500 $\mu\text{g L}^{-1}$. Entretanto, nos pontos de concentração mais alta (1.250 e 1.500 $\mu\text{g L}^{-1}$) para os quatro estrogênios foi observada a perda de linearidade indicando a Lei de Lambert-Beer não é mais obedecida^[?] (Figura 4.15).

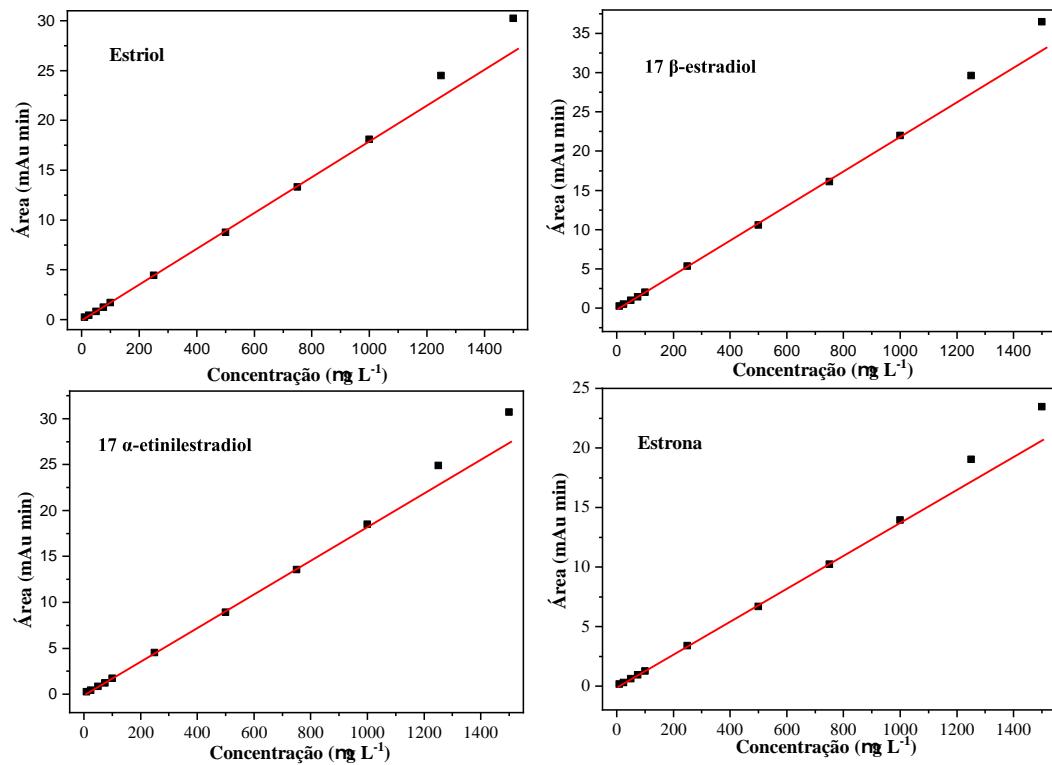


Figura 4.15 – Faixa de concentração estudada para a construção das curvas analíticas.

Dessa forma, foram obtidas curvas analíticas para os quatro estrogênios a partir de modelos de calibração univariada (**Figura 4.16**), relacionando-se o sinal analítico de cada analito, área de cada picos cromatográfico, com sua respectiva concentração.

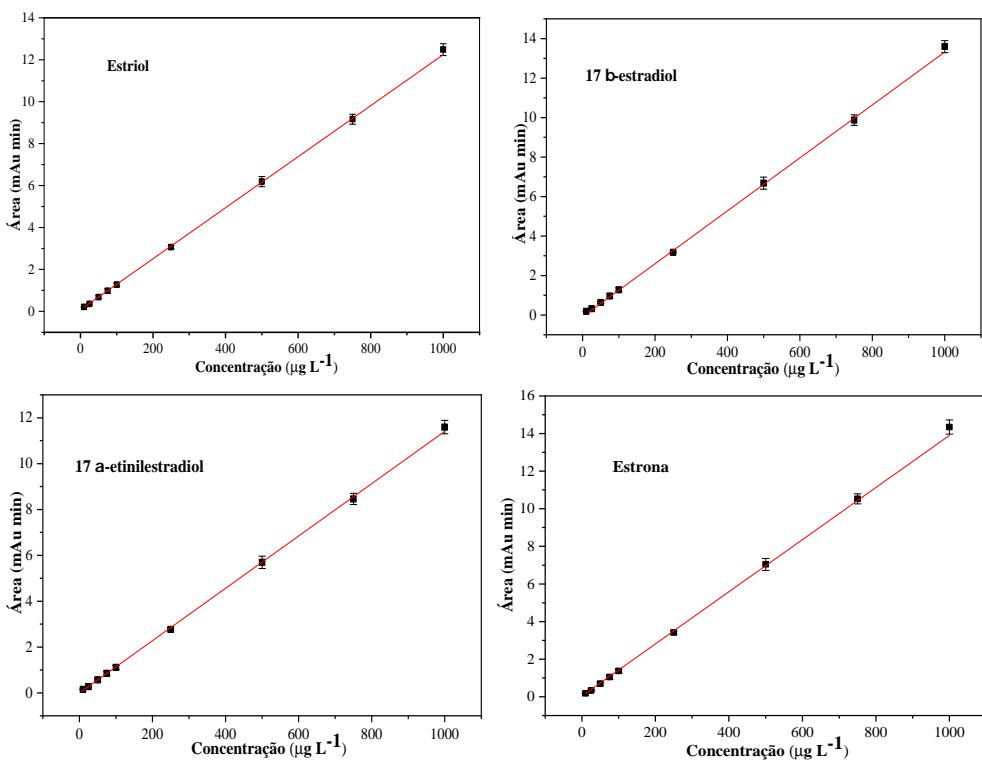


Figura 4.16 – Curvas analíticas dos estrogênios na faixa de concentração de 21,97 a 1.000 $\mu\text{g L}^{-1}$ para estriol, 11,07 a 1.000 $\mu\text{g L}^{-1}$ para 17 β -estradiol, 6,93 a 1.000 $\mu\text{g L}^{-1}$ para 17 α - etinilestradiol e 7,27 a 1.000 $\mu\text{g L}^{-1}$ para estrona.

Os modelos de calibração foram obtidos por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, com medidas realizadas em triplicata autêntica para cada nível de concentração como descrito na **Seção 3.1**. As equações das retas, a faixa linear e os coeficientes de correlação linear serão apresentados na **Tabela 4.25**.

Tabela 4.25 – Equações das retas, faixa linear dinâmica e coeficientes de correlação linear das curvas analíticas dos quatro estrogênios.

| Analito | Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$) | Equação | r | Número de pontos |
|------------------------------|---------------------------------------|------------------------|--------|------------------|
| Estriol | 21,97 a 1.000 | $y = 0,0123x + 0,0427$ | 0,9994 | 9 |
| 17 β -estradiol | 11,07 a 1.000 | $y = 0,0135x - 0,0562$ | 0,9992 | 9 |
| 17 α -etinilestradiol | 6,93 a 1.000 | $y = 0,0115x - 0,0291$ | 0,9992 | 9 |
| Estrona | 7,27 a 1.000 | $y = 0,0143x - 0,0416$ | 0,9993 | 9 |

A ANVISA recomenda que o valores do coeficiente de correlação (r) das curvas analíticas não sejam menores que 0,99, portanto a linearidade dos modelos desenvolvidos é

considerada satisfatória uma vez que está em concordância com essa recomendação^[73].

A análise dos resíduos confirmou o resultado satisfatório obtido pela observação do coeficiente de correlação. Os gráficos de resíduos apresentados para cada um dos estrogênicos na **Figura 4.17** comprovam a inexistência de pontos anômalos, além disso, não há a ocorrência de resíduos maiores que -0,5 ou menores que 0,5. Outro ponto a ser comentado é que nenhum dos gráficos apresenta tendência que evidencie falta de ajuste nos modelos.

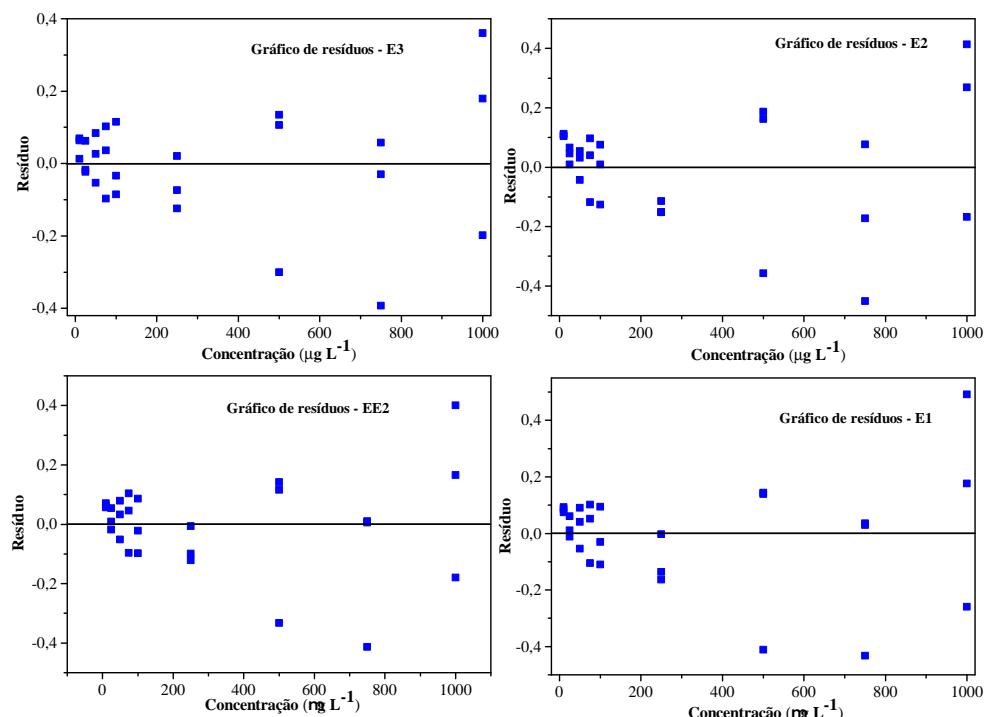


Figura 4.17 – Gráficos dos resíduos das curvas analíticas dos estrogênios.

Para complementar a validação dos modelos de calibração, foi realizado o teste de análise de variância (ANOVA) onde os resultados serão apresentados na **Tabela 4.26**.

Tabela 4.26 – Dados obtidos pela aplicação do teste de análise da variância (ANOVA).

| Analito | Regressão (MQ_R/MQ_r) | Falta de ajuste ($\text{MQ}_{faj}/\text{MQ}_{ep}$) |
|------------------------------|---|--|
| Estriol | 20.057,18 | 0,7324 |
| 17 β -estradiol | 15.879,16 | 1,5215 |
| 17 α -etinilestradiol | 15.953,54 | 0,8574 |
| Estrona | 17.850,97 | 0,6838 |

Para avaliar as significâncias da regressão linear (MQ_R/MQ_r) e da falta de ajuste

(MQ_{faj}/MQ_{ep}) expostas, foram utilizados respectivamente os valores de $F_{tabelado} = F_{1,25}$ (ponto de distribuição F para 1 e 25 graus de liberdade ao nível de confiança de 95%) igual a 4,242 e $F_{tabelado} = F_{7,18}$ (ponto de distribuição F para 7 e 18 graus de liberdade ao nível de confiança de 95%) igual a 2,577. Comparando os valores de $F_{calculado}$ com $F_{tabelado}$, pode-se afirmar que a regressão possui relevância estatística uma vez que os valores calculados são muito maiores que o valor tabelado. Da mesma forma, os valores de $F_{calculado}$ da falta de ajuste são menores que o valor de $F_{tabelado}$, indicando que não há evidencia de falta de ajuste nos modelos propostos. Sendo assim, é possível afirmar com 95% de confiança que os modelos utilizados são lineares para todos os analitos.

4.3.3 Sensibilidade

Os valores de limite de detecção e de quantificação apresentados na **Tabela 4.27** foram calculados considerando os parâmetros do modelo proposto, de acordo com a **Equação 2.4** e **Equação 2.5** descritas na **Subseção 2.5.3**.

Tabela 4.27 – Limites de detecção e de quantificação obtidos para os estrogênios pelo método HPLC-DAD.

| Analito | LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$) | LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$) | Desvio padrão |
|------------------------------|------------------------------|------------------------------|---------------|
| Estriol | 7,2490 | 21,9666 | 0,0272 |
| 17 β -estradiol | 3,6521 | 11,0671 | 0,0148 |
| 17 α -etinilestradiol | 2,2884 | 6,9344 | 0,0080 |
| Estrona | 2,4001 | 7,2730 | 0,0103 |

Considerando que o detector de arranjo de diodos empregado no desenvolvimento desse trabalho naturalmente possui uma sensibilidade menor que detectores mais sensíveis como os de fluorescência e de massas, pode-se afirmar que os LOD e LOQ calculados para o método desenvolvido são satisfatórios, uma vez que estes valores se aproximam da magnitude de nanogramas por litro, unidade normalmente obtida para os limites de detecção e de quantificação das demais técnicas citadas^[39,42,92].

4.3.4 Exatidão

A avaliação da exatidão do método foi avaliada a partir do teste de recuperação como descrito na **Subseção 2.5.4**. Os resultados de recuperação obtidos estão apresentados na **Tabela 4.28**.

Tabela 4.28 – Valores de recuperação (%) obtido na avaliação da exatidão do método desenvolvido nos quatro níveis de concentração.

| Analito | Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$) | Recuperação (%) |
|------------------------------|---------------------------------------|-----------------|
| Estriol | 75 | <LOD |
| | 250 | 15,5 |
| | 750 | 9,7 |
| 17β -estradiol | 75 | 16,3 |
| | 250 | 25,0 |
| | 750 | 33,6 |
| 17α -etinilestradiol | 75 | 53,4 |
| | 250 | 55,9 |
| | 750 | 56,6 |
| Estrona | 75 | 28,5 |
| | 250 | 39,2 |
| | 750 | 43,8 |

Avaliando os valores de apresentados **Tabela 4.28** percebe-se que para os quatro estrogênios o percentual de recuperação nos três níveis de fortificação ficaram no intervalo de 9,7 e 56,6 %, estando abaixo dos percentuais recomendados pelos guias de validação que indicam como aceitáveis valores entre 70 - 120 %^[76,78].

A obtenção de recuperações elevadas é desejável para garantir um método mais sensível, entretanto, técnicas de extração não exaustivas podem apresentar baixos percentuais de recuperação como consequência da complexidade da matriz estudada, força iônica do meio, entre outras. Esse problema pode ser contornado implementando a metodologia de adição de padrão mediante a garantia de que os ensaios são reproduutíveis^[81,93,94].

4.3.5 Precisão

A precisão do método HPLC-DAD foi avaliada a partir dos resultados de repetibilidade expressos em coeficientes de variação obtidos utilizando a **Equação 2.7** em quatro níveis de concentração diferentes. Na **Tabela 4.29** estão os dados referentes à repetibilidade intradia e na **Tabela 4.30** estão dispostos os dados de precisão intermediária (interdia).

Tabela 4.29 – Coeficiente de variação obtidos na avaliação da precisão (repetibilidade intradia) do método HPLC-DAD para os estrogênios, em quatro níveis de concentração.

| Analito | Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$) | CV (%) |
|------------------------------|---------------------------------------|--------|
| Estriol | 25 | 1,71 |
| | 75 | 0,99 |
| | 250 | 4,03 |
| | 750 | 2,10 |
| 17β -estradiol | 25 | 1,19 |
| | 75 | 1,98 |
| | 250 | 2,99 |
| | 750 | 2,17 |
| 17α -etinilestradiol | 25 | 4,26 |
| | 75 | 1,81 |
| | 250 | 3,01 |
| | 750 | 1,94 |
| Estrona | 25 | 3,38 |
| | 75 | 1,81 |
| | 250 | 3,47 |
| | 750 | 2,08 |

Tabela 4.30 – Coeficiente de variação obtidos na avaliação da precisão intermediária do método HPLC-DAD para os estrogênios, em quatro níveis de concentração.

| Analito | Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$) | CV (%) sem 1 | CV (%) sem 2 | CV (%) sem 3 | CV (%) sem 4 |
|-----------------------------|---------------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Estriol | 25 | 1,71 | 2,51 | 2,77 | 4,22 |
| | 75 | 0,99 | 2,31 | 1,17 | 1,03 |
| | 250 | 4,03 | 1,72 | 1,51 | 2,13 |
| | 750 | 2,10 | 2,23 | 2,48 | 3,54 |
| 17β -estradiol | 25 | 1,19 | 2,59 | 2,38 | 3,59 |
| | 75 | 1,98 | 1,43 | 1,29 | 1,63 |
| | 250 | 2,99 | 1,71 | 2,25 | 1,54 |
| | 750 | 2,17 | 2,24 | 2,64 | 1,79 |
| 17α -etinilestradiol | 25 | 4,26 | 2,14 | 3,79 | 4,43 |
| | 75 | 1,81 | 1,92 | 1,61 | 1,96 |
| | 250 | 3,01 | 1,46 | 1,46 | 1,49 |
| | 750 | 1,94 | 2,02 | 2,44 | 1,85 |
| Estrona | 25 | 3,38 | 3,96 | 4,32 | 4,34 |
| | 75 | 1,81 | 4,31 | 2,06 | 4,06 |
| | 250 | 3,47 | 0,79 | 1,50 | 1,64 |
| | 750 | 2,08 | 2,22 | 2,70 | 1,86 |

É possível afirmar que os resultados obtidos estão em concordância com as recomendações da ANVISA^[73], uma vez que os valores de CV não devem ser superiores a 5% tanto para a repetibilidade (intradia) quanto para a precisão intermediária.

Também é possível examinar a precisão do método comparando os resultados obtidos utilizando a **Equação 2.8** indicada pelo guia de validação da EURACHEM^[75], descrita na **Subseção 2.5.5**, aos valores de teste t para diferentes graus de liberdade. Neste trabalho, para avaliar a repetibilidade, o valor tabelado de 7 repetições, ou seja, 6 graus de liberdade é de 2,44. Para a precisão intermediária, o número de graus de liberdade é 3, uma vez que foram realizadas medidas em quatro semanas consecutivas, o valor de $t_{tabelado}$ é 3,18. A **Tabela 4.31** apresenta os resultados referentes à precisão que serão comparados com os valores de t de Student com 95% de confiança.

Tabela 4.31 – Valores de precisão intradia e precisão intermediária (interdia) obtidos a partir do teste t de Student para as quatro semanas de estudo com 95% de confiança.

| | Concentração (mg L ⁻¹) | r interdia | r semana 1 | Desvio padrão semana 1 | r semana 2 | Desvio padrão semana 2 | r semana 3 | Desvio padrão semana 3 | r semana 4 | Desvio padrão semana 4 |
|-----|---------------------------------------|---------------|---------------|---------------------------|---------------|---------------------------|---------------|---------------------------|---------------|---------------------------|
| E3 | 25 | 0,05 | 0,02 | 0,01 | 0,04 | 0,01 | 0,03 | 0,01 | 0,05 | 0,01 |
| | 75 | 0,07 | 0,04 | 0,01 | 0,08 | 0,02 | 0,04 | 0,01 | 0,04 | 0,01 |
| | 250 | 0,38 | 0,52 | 0,15 | 0,21 | 0,06 | 0,18 | 0,05 | 0,26 | 0,08 |
| | 750 | 1,31 | 0,92 | 0,27 | 0,82 | 0,24 | 0,94 | 0,27 | 1,34 | 0,39 |
| E2 | 25 | 0,04 | 0,02 | 0,00 | 0,03 | 0,01 | 0,03 | 0,01 | 0,06 | 0,02 |
| | 75 | 0,07 | 0,07 | 0,02 | 0,05 | 0,01 | 0,04 | 0,01 | 0,06 | 0,02 |
| | 250 | 0,30 | 0,33 | 0,10 | 0,18 | 0,05 | 0,24 | 0,07 | 0,17 | 0,05 |
| | 750 | 0,97 | 0,80 | 0,23 | 0,72 | 0,21 | 0,87 | 0,25 | 0,60 | 0,18 |
| EE2 | 25 | 0,05 | 0,05 | 0,01 | 0,02 | 0,01 | 0,04 | 0,01 | 0,04 | 0,01 |
| | 75 | 0,07 | 0,06 | 0,02 | 0,05 | 0,01 | 0,05 | 0,01 | 0,06 | 0,02 |
| | 250 | 0,24 | 0,31 | 0,09 | 0,13 | 0,04 | 0,14 | 0,04 | 0,15 | 0,04 |
| | 750 | 0,82 | 0,66 | 0,19 | 0,55 | 0,16 | 0,75 | 0,22 | 0,57 | 0,16 |
| E1 | 25 | 0,06 | 0,04 | 0,01 | 0,03 | 0,01 | 0,05 | 0,01 | 0,04 | 0,01 |
| | 75 | 0,14 | 0,06 | 0,02 | 0,17 | 0,05 | 0,07 | 0,02 | 0,12 | 0,04 |
| | 250 | 0,27 | 0,41 | 0,12 | 0,08 | 0,02 | 0,17 | 0,05 | 0,18 | 0,05 |
| | 750 | 1,01 | 0,81 | 0,23 | 0,70 | 0,20 | 0,95 | 0,27 | 0,65 | 0,19 |

Percebe-se que os valores de $t_{calculado}$ para as repetições diárias são inferiores ao valor de $t_{tabelado}$, de 2,44. Para a precisão interdia, também foram obtidos valores de $t_{calculado}$ menores que o $t_{tabelado}$ de 3,18. Em concordância com o resultado mostrado anteriormente, pode-se afirmar que o método desenvolvido por HPLC-DAD é considerado preciso, visto que os analitos estudados apresentaram comportamentos que satisfazem as especificações para os testes de repetibilidade e precisão intermediária.

CAPÍTULO

5

CONCLUSÕES

As adaptações realizadas no processo de síntese das nanopartículas, foram bem sucedidas e garantiram um procedimento de síntese simples, sem a necessidade de isolar os produtos de cada etapa e em consequência disso, exigiu um menor tempo médio de execução.

A caracterização inicial dos materiais sintetizados confirmam a obtenção dos compostos desejados mediante a presença de bandas características das nanopartículas, que são bastante conhecidas e bem definidas pela literatura.

A utilização de métodos quimiométricos na otimização do processo de extração e pre-concentração dos analitos foi de suma importância para avaliar simultaneamente diferentes fatores que influenciam no comportamento das nanopartículas, permitindo escolher as melhores condições para realizar o processo de extração:

- Extração: utilização de 1 mL de metanol para dispersão prévia da nanopartícula 50TEOS:1C16 e 10 minutos de contato sob agitação magnética.
- Eluição: utilização de 1,8 mL da mistura de água:metanol 25:75 % v v⁻¹ por dez minutos.

A validação analítica do método desenvolvido para a determinação dos estrogênios mostrou-se adequada de acordo com os resultados obtidos na avaliação dos parâmetros de desempenho analíticos:

- Seletividade: não apresentou evidências de picos interferentes junto aos picos dos analitos.
- Linearidade: apresentou faixa linear para todos os analitos nas concentrações de 10 a 1.000 $\mu\text{g L}^{-1}$.
- Sensibilidade: apresentou LOD de 2,4 a 7,2 $\mu\text{g L}^{-1}$ e LOQ de 6,9 a 21,9 $\mu\text{g L}^{-1}$.
- Exatidão: percentuais de recuperação de 9,7 a 56,6 %.
- Precisão: os resultados de repetibilidade intradia apresentaram coeficientes de variação menores que 4,43 % e valores de $t_{calculado}$ menores que t_{crtico} de 2,44. Para a precisão intermediária os valores de $t_{calculado}$ menores que t_{crtico} de 3,18.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] GASTON, L.; LAPWORTH, D. J.; STUART, M.; ARNSCHEIDT, J. Prioritization approaches for substances of emerging concern in groundwater: a critical review. *Environmental Science & Technology*, v. 53, n. 11, p. 6107–6122, 2019. 2, 3
- [2] TIEDEKEN, E. J.; TAHAR, A.; MCHUGH, B.; ROWAN, N. J. Monitoring, sources, receptors, and control measures for three european union watch list substances of emerging concern in receiving waters—a 20 year systematic review. *Science of the Total Environment*, v. 574, p. 1140–1163, 2017. 2
- [3] DE ÁGUAS E SANEAMENTO BÁSICO, A. N. Água no mundo. Disponível em <https://www.ana.gov.br/panorama-das-aguas/agua-no-mundo>, 2020. Acesso em 05 de agosto de 2020. 2
- [4] DA REPÚBLICA CASA CIVIL, P. Política nacional de recursos hídricos. Disponível em <https://legislacao.presidencia.gov.br/atos/?tipo=LEI&numero=9433&ano=1997&ato=a12ATVU90MJpWTbaf>, 1997. Acesso em 05 de agosto de 2020. 2
- [5] AMBIENTE-CONAMA, C. N. D. M. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Disponível em <http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>, 2005. Acesso em 05 de agosto de 2020. 2
- [6] AMBIENTE-CONAMA, C. N. D. M. Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011. Dis-

- ponível em <http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646>, 2011. Acesso em 05 de agosto de 2020. 2
- [7] AMBIENTE-CONAMA, C. N. D. M. Resolução no 396, de 7 de abril de 2008. Disponível em <http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=562>, 2008. acesso em 05 de agosto de 2020. 2
- [8] DA SAÚDE, M. Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011. Disponível em http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html, 2011. Acesso em 06 de agosto de 2020. 3
- [9] DE ALMEIDA, L. C.; JORGE, T. B. F.; PINTO, R.; DA CRUZ CANEVARI, G. Cianobactérias e cianotoxinas fatores de risco para o abastecimento de água. *ANAISSIMPAC*, v. 7, n. 1, 2017. 3
- [10] USEPA. Contaminant candidate list (CCL) and regulatory determination. Disponível em <https://www.epa.gov/ccl/contaminant-candidate-list-1-ccl-1>, 2020. Acesso em 06 de agosto de 2020. 3
- [11] MONTAGNER, C. C.; VIDAL, C.; ACAYABA, R. D. Contaminantes emergentes em matrizes aquáticas do brasil: cenário atual e aspectos analíticos, ecotoxicológicos e regulatórios. *Química Nova*, v. 40, n. 9, p. 1094–1110, 2017. 5, 8
- [12] GAVRILESCU, M.; DEMNEROVÁ, K.; AAMAND, J.; AGATHOS, S.; FAVA, F. Emerging pollutants in the environment: present and future challenges in biomonitoring, ecological risks and bioremediation. *New Biotechnology*, v. 32, n. 1, p. 147–156, 2015. 5
- [13] ASSOCIATION, W. Q. Contaminants of emerging concern. Disponível em <https://www.wqa.org/whats-in-your-water/emerging-contaminants>, 2020. Acesso em 06 de agosto de 2020. 5
- [14] BARBOSA, M. O.; MOREIRA, N. F.; RIBEIRO, A. R.; PEREIRA, M. F.; SILVA, A. M. Occurrence and removal of organic micropollutants: an overview of the watch list of EU decision 2015/495. *Water Research*, v. 94, p. 257–279, 2016. , 5
- [15] CRISP, T. M.; CLEGG, E. D.; COOPER, R. L.; ANDERSON, D. G.; BAETCKE, K.; HOFFMANN, J. L.; MORROW, M. S.; RODIER, D. J.; SCHAEFFER, J. E.;

- TOUART, L. W. et al. Special report on environmental endocrine disruption: An effects assessment and analysis. *Washington DC: US Environmental Protection Agency*, 1997. 6
- [16] BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e conseqüências. *Química Nova*, v. 30, n. 3, p. 651–666, 2007. 6
- [17] LINTELMANN, J.; KATAYAMA, A.; KURIHARA, N.; SHORE, L.; WENZEL, A. Endocrine disruptors in the environment (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, Boca Raton, v. 75, n. 5, p. 631–681, 2003. 6, 7, 9, 10
- [18] GHISELLI, G.; JARDIM, W. F. et al. Interferentes endócrinos no ambiente. *Química Nova*, 2007. , 6, 7
- [19] MOREIRA, E. D. T. Desenvolvimento e validação de metodologias SPE/HPLC para determinação de estrógenos e fitoestrógenos em águas superficiais. , 6
- [20] EUROPEIA, C. Community strategy for endocrine disrupter—a range of substances suspected of interfering with hormone systems of humans and wildlife. *Communication from the Commission to the Council and the European Parliament*, 1999. 7
- [21] DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, A. N. Bisfenol a. <http://portal.anvisa.gov.br/alimentos/embalagens/bisfenol-a>, 2020. Acessada em 08 de agosto de 2020. 7
- [22] SILVA, L. L. D. Avaliação de interferentes endócrinos e marcadores de atividade antrópica nos corpos d’água da área de instalação do Reator Multipropósito Brasileiro - RMB. 7
- [23] MARTINI, G. D. A. Investigação da atividade estrogênica e de interferentes endócrinos em águas superficiais do estado de São Paulo. 7
- [24] DODDS, E. C.; LAWSON, W. Synthetic strogenic agents without the phenanthrene nucleus. *Nature*, London, v. 137, n. 3476, p. 996–996, 1936. 7
- [25] CARSON, R. *Primavera silenciosa*. 1^a. ed. São Paulo: Gaia, 1962. 7

- [26] SUMPTER, J. P.; JOHNSON, A. C. Lessons from endocrine disruption and their application to other issues concerning trace organics in the aquatic environment. *Environmental science & technology*, v. 39, n. 12, p. 4321–4332, 2005. 7
- [27] CDC. Des update: Consumers. Disponível em <https://www.cdc.gov/des/consumers/index.html>, 2020. Acesso em 16 de agosto de 2020. 8
- [28] EUROPE, P. A. N. Pan europe impact assessment of the endocrine disrupting pesticides. Disponível em <https://www.pan-europe.info/resources/reports?page=2>, 2015. Acesso em 09 de agosto de 2020. 8
- [29] DOBBS, R. W.; MALHOTRA, N. R.; GREENWALD, D. T.; WANG, A. Y.; PRINS, G. S.; ABERN, M. R. Estrogens and prostate cancer. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, v. 22, n. 2, p. 185–194, 2019. 8
- [30] CORSINI, E.; RUFFO, F.; RACCHI, M. Steroid hormones, endocrine disrupting compounds and immunotoxicology. *Current Opinion in Toxicology*, v. 10, p. 69–73, 2018. 8
- [31] SONG, X.; WEN, Y.; WANG, Y.; ADEEL, M.; YANG, Y. Environmental risk assessment of the emerging edcs contaminants from rural soil and aqueous sources: analytical and modelling approaches. *Chemosphere*, v. 198, p. 546–555, 2018.
- [32] ADEEL, M.; SONG, X.; WANG, Y.; FRANCIS, D.; YANG, Y. Environmental impact of estrogens on human, animal and plant life a critical review. *Environment International*, v. 99, p. 107–119, 2017. , 8, 10
- [33] SUZUKI, K.; HIRAI, H.; MURATA, H.; NISHIDA, T. Removal of estrogenic activities of 17β -estradiol and ethinylestradiol by ligninolytic enzymes from white rot fungi. *Water Research*, v. 37, n. 8, p. 1972–1975, 2003. 10
- [34] LANÇAS, F. M. et al. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: finalmente “compatíveis”. *Scientia Chromatographica*, v. 1, n. 2, p. 35–61, 2009. 10, 11

- [35] LANÇAS, F. M. et al. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: finalmente “compatíveis” ii. a escolha do analisador de massas. *Scientia chromatographica*, v. 1, n. 5, p. 27–46, 2013. 10, 11
- [36] COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L. *Introdução a métodos cromatográficos*. 7^a. ed. Campinas, SP: Editora da Unicamp, 1997. 11
- [37] HARRIS, D. C. *Explorando a química analítica*. 4^a. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2016. 11
- [38] SKOOG, D. A., N. T. A. H. F. J. *Princípios de análise instrumental*. 6^a. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009. 11, 68
- [39] HUANG, B.; LI, X.; SUN, W.; REN, D.; LI, X.; LI, X.; LIU, Y.; LI, Q.; PAN, X. Occurrence, removal, and fate of progestogens, androgens, estrogens, and phenols in six sewage treatment plants around dianchi lake in china. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 21, n. 22, p. 12898–12908, 2014. 11, 73
- [40] CHAVES, K. S. Determinação dos desreguladores endócrinos bisfenol-a, β -estradiol, 17α -etinilestradiol e estrona no Rio Paraíba do Sul. 12
- [41] OTOMO, J. I. Contribuição antrópica na qualidade das águas da represa do Guarapiranga. Um estudo sobre interferentes endócrinos. 12
- [42] DA SILVA PROCÓPIO, A. M.; CAIS, T. A.; DA SILVA, W. F.; KONDO, M. M.; SILVA, F. S.; DE ANDRADE, S. J. Removal of the 17α -ethinylestradiol hormone (ee2) by biosorbent (arachis hypogaea) in aqueous solutions: Validation of analytical methodology and adsorption study. *Ciência e Natura*, v. 42, p. 11, 2020. 12, 73
- [43] CHEN, Q.; SHI, J.; WU, W.; LIU, X.; ZHANG, H. A new pretreatment and improved method for determination of selected estrogens in high matrix solid sewage samples by liquid chromatography mass spectrometry. *Microchemical Journal*, v. 104, p. 49–55, 2012. 12
- [44] SOCAS-RODRÍGUEZ, B.; ASENSIO-RAMOS, M.; HERNÁNDEZ-BORGES, J.; HERRERA-HERRERA, A. V.; RODRÍGUEZ-DELGADO, M. Á. Chromatographic analysis of natural and synthetic estrogens in milk and dairy products. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 44, p. 58–77, 2013. 12

- [45] MOREDA PIÑEIRO, J.; MOREDA PIÑEIRO, A. Recent advances in combining microextraction techniques for sample pre-treatment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 71, p. 265–274, 2015. 12
- [46] LIMA, D. L.; SILVA, C. P.; SCHNEIDER, R. J.; OTERO, M.; ESTEVES, V. I. Application of dispersive liquid–liquid microextraction for estrogens quantification by enzyme-linked immunosorbent assay. *Talanta*, v. 125, p. 102–106, 2014. 12
- [47] GONZÁLEZ-CURBELO, M.; SOCAS-RODRÍGUEZ, B.; HERRERA-HERRERA, A.; GONZÁLEZ-SÁLAMO, J.; HERNÁNDEZ-BORGES, J.; RODRÍGUEZ-DELGADO, M. Evolution and applications of the quechers method. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 71, p. 169–185, 2015. 13
- [48] PŁOTKA-WASYLKĘ, J.; SZCZEPAŃSKA, N.; DE LA GUARDIA, M.; NAMIEŚNIK, J. Modern trends in solid phase extraction: new sorbent media. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 77, p. 23–43, 2016. 13
- [49] CAPRIOTTI, A. L.; CAVALIERE, C.; FOGLIA, P.; SAMPERI, R.; STAMPACHI-ACCHIERE, S.; VENTURA, S.; LAGANÀ, A. Recent advances and developments in matrix solid-phase dispersion. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 71, p. 186–193, 2015. 13
- [50] SOCAS-RODRÍGUEZ, B.; HERNÁNDEZ-BORGES, J.; SALAZAR, P.; MARTÍN, M.; RODRÍGUEZ-DELGADO, M. Á. Core–shell polydopamine magnetic nanoparticles as sorbent in micro-dispersive solid-phase extraction for the determination of estrogenic compounds in water samples prior to high-performance liquid chromatography–mass spectrometry analysis. *Journal of Chromatography A*, Amsterdam, v. 1397, p. 1–10, 2015. 13
- [51] SARNO, M.; PONTICORVO, E.; CIRILLO, C.; CIAMBELLI, P. Magnetic nanoparticles for pahs solid phase extraction. *CHEMICAL ENGINEERING*, v. 47, 2016. 13
- [52] ZHANG, S.; NIU, H.; CAI, Y.; SHI, Y. Barium alginate caged fe₃o₄@ c18 magnetic nanoparticles for the pre-concentration of polycyclic aromatic hydrocarbons and phthalate esters from environmental water samples. *Analytica Chimica Acta*, v. 665, n. 2, p. 167–175, 2010. 13

- [53] MUNONDE, T. S.; MAXAKATO, N. W.; NOMNGONGO, P. N. Preparation of magnetic fe₃o₄ nanocomposites modified with mno₂, al₂o₃, au and their application for preconcentration of arsenic in river water samples. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, v. 6, n. 2, p. 1673–1681, 2018. 13, 36
- [54] SHEN, H.-Y.; ZHU, Y.; WEN, X.-E.; ZHUANG, Y.-M. Preparation of fe 3 o 4-c18 nano-magnetic composite materials and their cleanup properties for organophosphorous pesticides. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 387, n. 6, p. 2227–2237, 2007. 13
- [55] STANICKI, D.; VANDER ELST, L.; MULLER, R. N.; LAURENT, S. Synthesis and processing of magnetic nanoparticles. *Current Opinion in Chemical Engineering*, v. 8, p. 7–14, 2015. 13
- [56] ZHAO, X.; ZHAO, H.; CHEN, Z.; LAN, M. Ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles for magnetic resonance imaging contrast agent. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, v. 14, n. 1, p. 210–220, 2014. 13
- [57] MOHAMMED, L.; GOMAA, H. G.; RAGAB, D.; ZHU, J. Magnetic nanoparticles for environmental and biomedical applications: A review. *Particuology*, v. 30, p. 1–14, 2017. 13
- [58] BINELLAS, C. S.; STALIKAS, C. D. Magnetic octadecyl-based matrix solid-phase dispersion coupled with gas chromatography with mass spectrometry in a proof-of-concept determination of multi-class pesticide residues in carrots. *Journal of Separation Science*, v. 38, n. 20, p. 3575–3581, 2015. 13, 36
- [59] HEDAYATNASAB, Z.; ABNISA, F.; DAUD, W. M. A. W. Review on magnetic nanoparticles for magnetic nanofluid hyperthermia application. *Materials & Design*, v. 123, p. 174–196, 2017. 13
- [60] MATHURIYA, A. S.; YADAV, K.; KAUSHIK, B. Magnetotactic bacteria: Performances and challenges. *Geomicrobiology Journal*, v. 32, n. 9, p. 780–788, 2015. 13
- [61] VALVERDE-TERCEDOR, C.; MONTALBÁN-LÓPEZ, M.; PEREZ-GONZALEZ, T.; SANCHEZ-QUESADA, M.; PROZOROV, T.; PINEDA-MOLINA, E.;

- FERNANDEZ-VIVAS, M.; RODRIGUEZ-NAVARRO, A.; TRUBITSYN, D.; BAZYLINSKI, D. A. et al. Size control of in vitro synthesized magnetite crystals by the mamic protein of magnetococcus marinus strain mc-1. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 99, n. 12, p. 5109–5121, 2015. 13
- [62] LEE, S.; JUNG, S. H.; KANG, D. J.; LEE, J. Fabrication of a nano-scale pattern with various functional materials using electrohydrodynamic lithography and functionalization. *RSC Advances*, v. 6, n. 7, p. 5944–5948, 2016. 13
- [63] FONDELL, M.; JOHANSSON, F.; GORGOI, M.; VON FIEANDT, L.; BOMAN, M.; LINDBLAD, A. Phase control of iron oxides grown in nano-scale structures on FTO and Si (100): Hematite, maghemite and magnetite. *Vacuum*, Zhenkog, v. 117, p. 85–90, 2015. 13
- [64] SATO, J.; KOBAYASHI, M.; KATO, H.; MIYAZAKI, T.; KAKIHANA, M. Hydrothermal synthesis of magnetite particles with uncommon crystal facets. *Journal of Asian Ceramic Societies*, v. 2, n. 3, p. 258–262, 2014. 13
- [65] ZHANG, X.; HUA, Z.; DENG, Y.; YANG, S. Low-temperature sol–gel autocombustion synthesis and magnetic properties of magnetite. *IEEE Transactions on Magnetics*, New York, v. 51, n. 11, p. 1–4, 2015. 13
- [66] FRANCISQUINI, E.; SCHOENMAKER, J.; SOUZA, J. A. Nanopartículas magnéticas e suas aplicações. *Química Supramolecular e Nanotecnologia*, p. 269, 2014. 13
- [67] MARTINEZ, G. A. L. Síntese de nanopartículas magnéticas com elevada magnetização de saturação e estabilidade química, 2013. 13
- [68] BAGHERI, S.; JULKAPLI, N. M. Modified iron oxide nanomaterials: Functionalization and application. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, Amsterdam, v. 416, p. 117–133, 2016. 14
- [69] NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. *Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*. 4^a. ed. Porto Alegre: Bookman, 2010. 14

- [70] PEREIRA, F. M. V.; PEREIRA-FILHO, E. R. Aplicação de programa computacional livre em planejamento de experimentos: um tutorial. *Química Nova*, v. 41, n. 9, p. 1061–1071, 2018. , 14, 15
- [71] NOVAES, C.; YAMAKI, R.; PAULA, V. D.; NASCIMENTO JR, B.; BARRETO, J.; VALASQUES, G.; BEZERRA, M. Otimização de métodos analíticos usando metodologia de superfícies de resposta-parte i: variáveis de processo. *Revista Virtual Química*, v. 9, n. 3, p. 1284–1215, 2017. 15
- [72] CUNICO, M.; CUNICO, M.; MIGUEL, O.; ZAWADZKI, S.; PERALTA-ZAMORA, P.; VOLPATO, N. Planejamento fatorial: Uma ferramenta estatística valiosa para a definição de parâmetros experimentais empregados na pesquisa científica. *Visão Acadêmica*, v. 9, n. 1, 2008. 15
- [73] ANVISA. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, 2003. 16, 17, 19, 21, 33, 72, 76
- [74] MAPA. Guia de validação e controle de qualidade analítica: fármacos em produtos para alimentação e medicamentos veterinários/ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. 16
- [75] EURACHEM. The fitness for purpose of analytical methods: a laboratory guide to method validation and related topics. 16, 17, 18, 21, 76
- [76] INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, Q. E. T. Orientação sobre validação de métodos analíticos, doq-cgcre-008. Disponível em http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_05.pdf. Acesso em 01 de agosto de 2020. 16, 17, 18, 19, 21, 74
- [77] STANDARD, B. et al. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. Disponível em <https://www.iso.org/publication/PUB100424.html>, 2006. Acesso em 01 de agosto de 2020. 16
- [78] RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004. 16, 20, 74

- [79] KRUVE, A.; REBANE, R.; KIPPER, K.; OLDEKOP, M.-L.; EVARD, H.; HERODES, K.; RAVIO, P.; LEITO, I. Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part I. *Analytica Chimica Acta*, v. 870, p. 29–44, 2015. 18
- [80] KRUVE, A.; REBANE, R.; KIPPER, K.; OLDEKOP, M.-L.; EVARD, H.; HERODES, K.; RAVIO, P.; LEITO, I. Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part II. *Analytica Chimica Acta*, v. 870, p. 8–28, 2015. 19, 20
- [81] CASSIANO, N. M.; BARREIRO, J. C.; MARTINS, L. R. R.; OLIVEIRA, R. V.; CASS, Q. B. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. *Química Nova*, v. 32, n. 4, p. 1021–1030, 2009. 19, 20, 74
- [82] LATIMER, G. W. Guidelines for standard method performance requirements (appendix f), off. Disponível em http://www.eoma.aoac.org/app_f.pdf, 2016. Acesso em 01 de agosto de 2020. , 19
- [83] FANG, J.; WANG, H.; XUE, Y.; WANG, X.; LIN, T. Magnet-induced temporary superhydrophobic coatings from one-pot synthesized hydrophobic magnetic nanoparticles. *ACS Applied Materials & Interfaces*, v. 2, n. 5, p. 1449–1455, 2010. 25
- [84] WANG, S.; LIU, Q.; ZHANG, Y.; WANG, S.; LI, Y.; YANG, Q.; SONG, Y. Preparation of a multifunctional material with superhydrophobicity, superparamagnetism, mechanical stability and acids–bases resistance by electrospinning. *Applied Surface Science*, v. 279, p. 150–158, 2013. 25
- [85] LI, Q.; LAM, M. H.; WU, R. S.; JIANG, B. Rapid magnetic-mediated solid-phase extraction and pre-concentration of selected endocrine disrupting chemicals in natural waters by poly (divinylbenzene-co-methacrylic acid) coated fe₃o₄ core-shell magnetite microspheres for their liquid chromatography–tandem mass spectrometry determination. *Journal of Chromatography A*, Amsterdam, v. 1217, n. 8, p. 1219–1226, 2010. , 29
- [86] LOGITA, H. H.; TADESSE, A.; KEBEDE, T. Synthesis, characterization and photocatalytic activity of mno₂/al₂o₃/fe₂o₃ nanocomposite for degradation of malachite

green. *African Journal of Pure and Applied Chemistry*, v. 9, n. 11, p. 211–222, 2015.
36

- [87] AHANGARAN, F.; HASSANZADEH, A.; NOURI, S. Surface modification of fe₃o₄@sio₂ microsphere by silane coupling agent. *International Nano Letters*, v. 3, n. 1, p. 23, 2013. 36
- [88] BORGES, K. B.; FIGUEIREDO, E. C. D.; QUEIROZ, M. E. C. *Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos*. 1^a. ed. 45
- [89] KRUG, F. J.; ROCHA, F. R. P. *Métodos de preparo de amostras para análise elementar*. 2^a. ed. 48
- [90] SONMEZ, M.; GEORGESCU, M.; ALEXANDRESCU, L.; GURAU, D.; FICAI, A.; FICAI, D.; ANDRONESCU, E. Synthesis and applications of fe₃o₄/sio₂ core-shell materials. *Current Pharmaceutical Design*, v. 21, n. 37, p. 5324–5335, 2015. 50
- [91] HOLLER, F. J., S. D. A. C. S. R. *Fundamentos de química analítica*. 9^a. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2014. 67
- [92] SOCAS-RODRÍGUEZ, B.; HERNÁNDEZ-BORGES, J.; HERRERA-HERRERA, A. V.; RODRÍGUEZ-DELGADO, M. Á. Multiresidue analysis of oestrogenic compounds in cow, goat, sheep and human milk using core-shell polydopamine coated magnetic nanoparticles as extraction sorbent in micro-dispersive solid-phase extraction followed by ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 410, n. 7, p. 2031–2042, 2018. 73
- [93] RUBIO-BELLIDO, M.; MORILLO, E.; VILLAVERDE, J. Assessment of soil diuron bioavailability to plants and microorganisms through non-exhaustive chemical extractions of the herbicide. *Geoderma*, v. 312, p. 130–138, 2018. 74
- [94] NOGUEIRA, J. M. F. Stir-bar sorptive extraction: 15 years making sample preparation more environment-friendly. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 71, p. 214–223, 2015. 74

APÊNDICE

A

TESTES DE DISPERSÃO E EXTRAÇÕES
INICIAIS

O primeiro teste descrito na **Subseção 3.5.1** foi realizado para melhorar a dispersão do material em meio aquoso, sua avaliação foi feita visualmente. A nanopartícula se mostrou igualmente dispersa nas três diferentes misturas, sendo assim, optou-se pela escolha da mistura contendo apenas 10 % de acetonitrila para prosseguir com os testes.

Em seguida foi realizado um ensaio simples de extração, cujo procedimento empregado também está na **Subseção 3.5.1**. Na **Tabela A.1** estão presentes os valores dos percentuais de extração obtidos. A nanopartícula 50TEOS:1C16 apresentou melhores percentuais de extração frente às demais nanopartículas testadas exceto para o estriol.

Destaca-se que a proporção de solvente escolhida para o preparo da solução se mostrou ineficiente em dispersar uma massa maior de nanopartículas, levando à formação de aglomerados que certamente impactou na redução da capacidade de extração. Ficou evidente a necessidade da utilização de uma substância que ajude a promover a dispersão material tendo em vista que o emprego da técnica de ultrassom associada à adição de acetonitrila nas soluções de trabalho não foram suficientes para aumentar a superfície de contato entre as nanopartículas e a amostra. Além disso, o material possui afinidade com o material plástico do tubo, o que dificultou a separação dele por meio da aproximação de um imã.

Tabela A.1 – Percentual de extração para cada um dos estrogênios com as diferentes nanopartículas .

| Nanopartícula | E3 | E2 | EE2 | E1 |
|---------------|------------|------|------|------|
| | % extraído | | | |
| 25TEOS:1C16 | 9,4 | 24,4 | 34,6 | 22,1 |
| 50TEOS:1C16 | 11,7 | 28,3 | 39,2 | 27,2 |
| 75TEOS:1C16 | 15,2 | 27,8 | 39,9 | 25,5 |

Como a proporção de água e acetonitrila usada para o preparo da amostra se mostrou pouco eficiente para promover a dispersão de uma massa maior de nanopartículas no meio, optou-se por testar outros dois solventes, metanol e etanol, em três proporções diferentes: 10, 20 e 30%. A nanopartícula escolhida foi a 25TEOS:1C16 que obteve os piores resultados no teste anterior, tendo em vista que se ela tiver uma boa eficiência na extração, as demais possivelmente também terão. O tubo Falcon utilizado foi substituído por frascos de reação de vidro, as demais condições de extração foram mantidas: usou-se

25 mL de amostra, 10 mg de nanopartícula e 5 minutos no banho de ultrassom.

A **Tabela A.2** apresenta os resultados dos percentuais de extração para os experimentos descritos anteriormente. Os valores apresentam, em quase todos os casos, uma tendência de redução na eficiência de extração a medida que a proporção de solvente orgânico aumenta. Sendo assim, os melhores percentuais de extração foram obtidos utilizando a proporção de 10% dos solventes orgânicos, mas entre os dois solventes, o que obteve melhor resultado foi o metanol, portanto a proporção de 10% de metanol foi escolhida para prosseguir os testes.

Tabela A.2 – Percentual de extração em amostra preparada com diferentes proporções de solventes orgânico.

| Experimento | E3 | E2 | EE2 | E1 |
|----------------|------------|------|------|------|
| | % extraído | | | |
| Etanol | | | | |
| 10% | 5,1 | 38,4 | 44,5 | 20,7 |
| 20% | 2,5 | 10,5 | 22,0 | 14,4 |
| 30% | 2,7 | 14,9 | 17,2 | 14,0 |
| Metanol | | | | |
| 10% | 6,9 | 49,0 | 54,9 | 30,5 |
| 20% | 1,5 | 18,4 | 17,1 | 16,5 |
| 30% | 6,8 | 16,1 | 11,0 | 14,1 |