

Universidade Federal de Ouro Preto

Instituto de Ciências Exatas e Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Química
PPGQUIM

Dissertação

**Otimização e Validação do Método para
Análise de Microcontaminantes de
Preocupação Emergente por
Cromatografia Gasosa Acoplada à
Espectrometria de Massas Utilizando
Derivatização Online**

Alexandre Cristiano Vicente Campos

Ouro Preto
2018





MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ALEXANDRE CRISTIANO VICENTE CAMPOS

**OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA ANÁLISE DE
MICROCONTAMINANTES DE PREOCUPAÇÃO EMERGENTE POR
CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS
UTILIZANDO DERIVATIZAÇÃO *ONLINE***

Ouro Preto

2018



**OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA ANÁLISE DE
MICROCONTAMINANTES DE PREOCUPAÇÃO EMERGENTE POR
CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS
UTILIZANDO DERIVATIZAÇÃO *ONLINE***

Autor: Alexandre Cristiano Vicente Campos

Orientador: Prof. Dr. Robson José de Cássia Franco

Afonso

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

Área de concentração:

Química Analítica

Ouro Preto/MG

Setembro de 2018

C150o

Campos, Alexandre Cristiano Vicente.

Otimização e validação do método para análise de microcontaminantes de preocupação emergente por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas utilizando derivatização online [manuscrito] / Alexandre Cristiano Vicente Campos. - 2018.

89f.: il.: color; grafs; tabs.

Orientador: Prof. Dr. Robson José de Cássia Franco Afonso.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Departamento de Química. Programa de Pós-Graduação em Química.

Área de Concentração: Química Analítica.

1. Contaminantes emergentes na água. 2. Derivatização. 3. Cromatografia a gás. 4. Espectrometria de massa. I. Afonso, Robson José de Cássia Franco. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU: 543.544

Catálogo: www.sisbin.ufop.br



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Ouro Preto
Instituto de Ciências Exatas e Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Química



“Otimização e Validação do Método para Análise de Microcontaminantes de Preocupação Emergente por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas Utilizando Derivatização *Online*”

Autor: Alexandre Cristiano Vicente Campos

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada em 12 de setembro de
2018, pela comissão examinadora composta pelos membros:

Prof.^a Dr.^a Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz
UFV

Prof.^a Dr.^a Roberta Eliane Santos Froes-Silva
UFOP

Prof. Dr. Robson José de Cássia Franco Afonso
UFOP

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado forças e não me deixar perder as esperanças nos momentos mais cruciais. Também agradeço a Nossa Senhora Aparecida, a qual eu sou devoto e tenho muita fé;

Aos meus pais, por me darem todo apoio, carinho e dedicação. Por me ensinarem coisas básicas, porém, escassas hoje em dia como ter respeito, educação e gentileza. Agradeço também aos meus irmãos por me apoiarem em todas as minhas batalhas;

A minha namorada Lorena, que foi de fundamental importância, principalmente nos momentos mais difíceis, sempre com uma palavra de carinho, me encorajando e dando apoio incondicional, além de compreensão a situação. Embora não estivesse presente a maior parte do tempo, saiba que você sempre esteve comigo no meu coração e em meus pensamentos durante toda a caminhada. Te amo!

Aos meus colegas de trabalho da UFV – *Campus* Florestal: Emerson, Giselle, Fernanda e Sídian por se disporem a cobrir minha ausência enquanto eu cursava mestrado na UFOP, mesmo que para isso significasse o desdobramento deles para atender a demanda. Meus mais sinceros agradecimentos.

Aos amigos do Laboratório de Caracterização Molecular e Espectrometria de Massas André Barros, Bianca Souza, Amanda Quaresma, Camila Ferreira, Daniel Rodrigues, Joane Miari, Rhuanna Médice, Rafael Silva, Paulo Bernardo, Célia Machado, Rafaela Queiroz, Rafaela Paiva. Muito obrigado pela companhia, pelas contribuições, amizade e por propiciarem um ambiente descontraído. À Ananda Sanson por todo auxílio e dedicação. Ao Lucas Vassale pela disposição nas coletas das amostras e apoio. Sintam-se abraçados por mim!

Ao meu orientador, prof. Robson José de Cássia Franco Afonso, pelos ensinamentos, tanto dentro quanto fora da sala de aula e contribuir para meu crescimento pessoal e profissional. Pelo empenho em manter o laboratório funcionando em tempos tão obscuros. Muito obrigado!

Aos meus amigos por compreenderem a minha ausência em vários momentos importantes, e mesmo assim sempre estarem do meu lado;

Aos professores da UFOP pelos ensinamentos e minha formação;

Aos técnicos e demais profissionais da UFOP, em especial ao Adriano, sempre solícito.

À UFOP e UFV.

Muito obrigado a todos!

“A paz vem de dentro de você mesmo. Não a procure à sua volta.”

Buda

RESUMO

Nas últimas décadas uma classe de contaminantes tem despertado interesse na comunidade científica, os microcontaminantes de preocupação emergente, em função dos seus possíveis efeitos adversos a humanos e ao meio ambiente. Dentro desse grupo, se destacam fármacos, antibióticos, produtos de higiene pessoal e desreguladores endócrinos. Como a remoção destes compostos em estações de tratamento de esgotos é geralmente ineficaz, eles chegam a corpos receptores, trazendo consequências à biota e aos seres humanos. Dentre os efeitos reportados, se destacam a preocupação com o aumento da resistência bacteriana, desregulação endócrina, distúrbios motores em animais aquáticos, dentre outros. Baseado nessas constatações, o presente trabalho envolve a validação e otimização, pelo planejamento de experimentos por superfície de respostas, do método de derivatização *online*, para determinação de 12 microcontaminantes de preocupação emergente por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas. Foram avaliados 5 fármacos (ibuprofeno, diclofenaco, naproxeno, paracetamol e genfibrozila), compostos fenólicos, hormônios naturais e sintéticos de comprovada atividade estrogênica (4-nonilfenol, 4-octilfenol e bisfenol A, estrona, estradiol, etinilestradiol e estriol). No pré-tratamento da amostra foi utilizada extração em fase sólida (SPE), utilizando cartuchos Strata X e Strata SAX cujas recuperações variaram entre 70,8 a 109,3%. A otimização do método de derivatização *online* utilizou BSTFA e piridina. Os parâmetros investigados na otimização por superfície de respostas foram temperatura do injetor; pressão e volume de reagente derivatizante obtendo-se como condição ótima de análise 326,4 °C de temperatura do injetor, 140 kPa de pressão do injetor e 1 µL de reagente derivatizante. Os limites de detecção e quantificação do método analítico variaram entre 0,8 a 20,6 ng.L⁻¹ e 2,6 a 68,5 ng.L⁻¹, respectivamente. O procedimento validado foi utilizado para analisar amostras de esgoto obtidas no Centro de Pesquisa e Treinamento em Saneamento UFMG/COPASA – CePTS, localizado na Estação de Tratamento de Esgoto Arrudas, em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. Nas amostras foram encontrados apenas bisfenol A (22,5 ng.L⁻¹) e 4-octilfenol (13,0 ng.L⁻¹).

Palavras-chave: Microcontaminantes de preocupação emergente (MPE), derivatização *online*, cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS).

ABSTRACT

In recent decades a class of contaminants has attracted interest in the scientific community, microcontaminants of emerging concern, due to their possible adverse effects on humans and the environment. Within this group, there are drugs, antibiotics, personal care products and endocrine disrupters. As the removal of these compounds at sewage treatment plants is generally ineffective, they reach recipient bodies, bringing consequences to biota and humans. Among the reported effects, it is highlighted the concern with the increase of bacterial resistance, endocrine disruption, motor disorders in aquatic animals, among others. Based on these findings, the present work involves the method validation and optimization, by the response surface experimental design, to online derivatization, for the determination of 12 microcontaminants of emerging concern by gas chromatography coupled to mass spectrometry. Five drugs (ibuprofen, diclofenac, naproxen, paracetamol and genfibrozil), phenolic compounds, natural and synthetic hormones of proven estrogenic activity (4-nonylphenol, 4-octylphenol and bisphenol A, estrone, estradiol, ethinyl estradiol and estriol) were evaluated. In the pre-treatment of the sample solid phase extraction (SPE) was used, using Strata X and Strata SAX cartridges whose recoveries ranged from 70.8 to 109.3%. The optimization of the online derivatization method used BSTFA and pyridine. The parameters investigated in the response surface experimental design were (i) injector temperature; (2) injector pressure and (3) volume of derivatizing reagent. The optimal analysis condition obtained were 326.4 °C of injector temperature, 140 kPa of injector pressure and 1 µL of derivatizing reagent. The limits of detection and quantification of the analytical method ranged from 0.8 to 20.6 ng.L⁻¹ and 2.6 to 68.5 ng.L⁻¹, respectively. The validated procedure was used to analyze sewage samples obtained at the UFMG / COPASA - CePTS Sanitation Research and Training Center, located at the Sewage Treatment Plant of Arrudas, in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Only bisphenol A (22.5 ng.L⁻¹) and 4-octylphenol (13.0 ng.L⁻¹) were found in the samples.

Keywords: Microcontaminants of emerging concern (MPE), online derivatization, gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC / MS).

LISTA DE FIGURAS

Figura 2. 1: Esquema das possíveis rotas de entrada e transporte dos microcontaminantes no meio ambiente.	19
Figura 2. 2: Esquema de um GC-MS.	29
Figura 2. 3: Etapas envolvidas na SPE: condicionamento do sorvente, adição da amostra, remoção dos interferentes e eluição do analito	31
Figura 2. 4: Estrutura química do BSTFA.	32
Figura 2. 5: Reação BSTFA com paracetamol.	34
Figura 2. 6: Representação do mecanismo geral da sililação.	34
Figura 2. 7: Efeito do tempo de purga nas áreas dos picos na derivatização de diferentes compostos obtidos por Wu.	37
Figura 2. 8: Cromatogramas de BPA derivatizados por sililação <i>off-line</i> (vermelho), <i>online</i> convencional (azul) e <i>online</i> SIS.	39
Figura 4. 1: Procedimento adotado de extração em fase sólida.	51
Figura 4. 2: Montagem do aparato para secar as amostras com fluxo de N ₂	52
Figura 4. 3: GCMS-QP2010 plus (Shimadzu®).	53
Figura 4. 4: Esquema de seringa com BSTFA e amostra.	55
Figura 5. 1: Diagramas de pareto dos analitos com as variáveis investigadas na triagem.	60
Figura 5. 2: Diagramas de pareto dos analitos com as variáveis investigadas na triagem (continuação).	61
Figura 5. 3: Analitos que apresentaram as melhores condições experimentais.	65
Figura 5. 4: Superfície de resposta gerada para o Ibuprofeno.	66
Figura 5. 5: Superfície de resposta gerada para o 4-octilfenol.	67
Figura 5. 6: Superfície de resposta gerada para o 4-nonilfenol.	68
Figura 5. 7: Superfície de resposta gerada para a Genfibrozila.	69
Figura 5. 8: Superfície de resposta gerada para o Naproxeno.	70
Figura 5. 9: Superfície de resposta gerada para o Bisfenol A.	71
Figura 5. 10: Superfície de resposta gerada para a Estrona.	72
Figura 5. 11: Superfície de resposta gerada para o Estradiol.	73
Figura 5. 12: Superfície de resposta gerada para o Etinilestradiol.	74
Figura 5. 13: Superfície de resposta gerada para o Estriol.	75
Figura 5. 14: Superfície de resposta gerada para o 4-nonilfenol deuterado.	76
Figura 5. 15: Mecanismo de reação de sililação.	77
Figura 5. 16: Cromatograma dos íons monitorados do ibuprofeno.	80
Figura 5. 17: Cromatograma dos íons monitorados do 4-octilfenol.	80
Figura 5. 18: Cromatograma dos íons monitorados do 4-nonilfenol.	81
Figura 5. 19: Cromatograma dos íons monitorados da genfibrozila.	81
Figura 5. 20: Cromatograma dos íons monitorados do naproxeno.	81
Figura 5. 21: Cromatograma dos íons monitorados do bisfenol A.	82
Figura 5. 22: Cromatograma dos íons monitorados do estradiol.	82
Figura 5. 23: Curva analítica do Ibuprofeno.	86
Figura 5. 24: Curva analítica do 4-octilfenol.	86
Figura 5. 25: Curva analítica do 4-nonilfenol.	86
Figura 5. 26: Curva analítica da Genfibrozila.	87

Figura 5. 27: Curva analítica do Naproxeno	87
Figura 5. 28: Curva analítica do Bisfenol A	88
Figura 5. 29: Curva analítica do Estradiol.	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades físico-químicas dos compostos analisados.	25
Tabela 2. Levantamento na literatura sobre técnicas de derivatização <i>online</i>	40
Tabela 3. Condições do GC/MS.	53
Tabela 4. Relação dos compostos e seus respectivos tempos de retenção, íons selecionados para a quantificação e identificação	54
Tabela 5. Planejamento fatorial fracionário 2^{3-1} para testes de derivatização.	56
Tabela 6. Valores dos efeitos e do parâmetro p ($\alpha = 0,05$) para cada variável estudada no planejamento fatorial fracionário 2^{3-1} com triplicata no ponto central. Os valores em vermelho são os que se mostraram significativos de acordo com o valor de p ($p < 0,05$).	57
Tabela 7. Superfície de resposta com 2 fatores contínuos.	62
Tabela 8. Valores de regressões e valor de p dos modelos obtidos	64
Tabela 9: Valores do coeficiente de variação (CV) de três replicatas em três níveis de concentração de microcontaminantes	83
Tabela 10. Faixa de trabalho de cada analito, média da razão da área do microcontaminante pela área do padrão interno e coeficiente de variação.....	85
Tabela 11. Limites de detecção e quantificação do equipamento e do método.	89
Tabela 12 – Fatores de correção nos efeitos de matriz.	91
Tabela 13. Índices de recuperação e coeficientes de variação dos microcontaminantes investigados.....	92
Tabela 14 – Concentrações (ng.L^{-1}) das médias, mínimos e máximos dos analitos monitorados.....	93
Tabela A. 1. Tabela de análise de variância para o planejamento CCD executado no estudo da otimização das condições operacionais da derivatização online para determinação de ibuprofeno em esgoto doméstico, no nível de significância de 0,05.....	100
Tabela A. 2. Tabela de análise de variância para o planejamento CCD executado no estudo da otimização das condições operacionais da derivatização online para determinação de 4-octilfenol em esgoto doméstico, no nível de significância de 0,05.....	100
Tabela A. 3. Tabela de análise de variância para o planejamento CCD executado no estudo da otimização das condições operacionais da derivatização online para determinação de 4-nonilfenol em esgoto doméstico, no nível de significância de 0,05.....	100
Tabela A. 4. Tabela de análise de variância para o planejamento CCD executado no estudo da otimização das condições operacionais da derivatização online para determinação de genfibrozila em esgoto doméstico, no nível de significância de 0,05.	101
Tabela A. 5. Tabela A1. Tabela de análise de variância para o planejamento CCD executado no estudo da otimização das condições operacionais da derivatização online para determinação de naproxeno em esgoto doméstico, no nível de significância de 0,05.	101

Tabela A. 6. Tabela de análise de variância para o planejamento CCD executado no estudo da otimização das condições operacionais da derivatização online para determinação de bisfenol A em esgoto doméstico, no nível de significância de 0,05.	101
Tabela A. 7. Tabela de análise de variância para o planejamento CCD executado no estudo da otimização das condições operacionais da derivatização online para determinação de estrona em esgoto doméstico, no nível de significância de 0,05.	102
Tabela A. 8. Tabela de análise de variância para o planejamento CCD executado no estudo da otimização das condições operacionais da derivatização online para determinação de estradiol em esgoto doméstico, no nível de significância de 0,05.....	102
Tabela A. 9. Tabela de análise de variância para o planejamento CCD executado no estudo da otimização das condições operacionais da derivatização online para determinação de etinilestradiol em esgoto doméstico, no nível de significância de 0,05.	102
Tabela A. 10. Tabela de análise de variância para o planejamento CCD executado no estudo da otimização das condições operacionais da derivatização online para determinação de estriol em esgoto doméstico, no nível de significância de 0,05.	103
Tabela A. 11. Tabela de análise de variância para o planejamento CCD executado no estudo da otimização das condições operacionais da derivatização online para determinação de 4-nonilfenol deuterado em esgoto doméstico, no nível de significância de 0,05.....	103

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
Justificativa.....	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1. Microcontaminantes de Preocupação Emergente	18
2.1.1. Fármacos	19
2.1.1.1. Anti-inflamatórios	20
2.1.1.2. Reguladores lipídicos.....	20
2.1.2. Desreguladores endócrinos.....	21
2.2. Propriedades físico-químicas das substâncias investigadas	22
2.2.1. Coeficiente de partição octanol/água (k_{ow}).....	22
2.2.2. pKa.....	22
2.2.3. Ponto de Ebulição.....	23
2.2.4. Estrutura química	23
2.2.5. Massa molar	24
2.3. Cromatografia	28
2.3.1. Cromatografia Gasosa (GC)	28
2.3.1.1. Detectores Cromatografia Gasosa	28
2.4. Preparo de amostra.....	30
2.4.1. Extração em fase sólida – SPE	30
2.5. Derivatização.....	31
2.5.1. Sililação.....	32
2.5.2. Derivatização <i>Online</i>	34
2.5.2.1. Temperatura do injetor.....	35
2.5.2.2. Tempo de purga	36
2.5.2.3. Quantidade de reagente derivatizante	37
2.6. Planejamento fatorial.....	42
2.7. Validação do procedimento analítico	43
3. OBJETIVOS.....	48
3.1. Objetivos gerais.....	48
3.2. Objetivos específicos.....	48
4. MATERIAIS E MÉTODOS	49
4.1. Reagentes e vidrarias:	49
4.2. Preparo das soluções padrão	50

4.3.	Análise em amostras de esgoto	50
4.3.1.	Amostragem e pré-tratamento	50
4.3.2.	Preparo e armazenamento dos extratos.....	52
4.1.	Condições Cromatográficas e de Detecção.....	52
4.2.	Derivatização <i>Online</i>	55
4.3.	Planejamento das variáveis.....	55
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	57
5.1.	Triagem.....	57
5.1.1.	Temperatura.....	58
5.1.2.	Pressão	58
5.1.3.	Volume	58
5.2.	Superfície de resposta.....	62
5.2.1.	Uma substituição por TMS	76
5.2.2.	Duas substituições por TMS	78
5.2.3.	Três substituições por TMS	79
5.3.	Validação do método	79
5.3.1.	Seletividade	79
5.3.2.	Precisão	82
5.3.3.	Curva Analítica e linearidade.....	83
5.3.4.	Limites de detecção e quantificação	89
5.3.5.	Efeito matriz	90
5.3.6.	Exatidão do método	91
5.3.6.1.	Resultados das amostras de esgoto	93
6.	CONCLUSÃO	94
7.	TRABALHOS FUTUROS.....	95
8.	REFERÊNCIAS	96
9.	Apêndice.....	100

1. INTRODUÇÃO

Os microcontaminantes de preocupação emergente (MPE), dentre os quais se enquadram os fármacos, produtos de higiene pessoal e perturbadores endócrinos vêm ganhando destaque a partir de meados da década de 1970. Esses contaminantes foram detectados em matrizes ambientais, sendo que em alguns casos foram comprovados seus efeitos adversos^{1, 2}. Estas substâncias podem causar efeitos na biota do meio aquático, bem como distúrbios em animais de maior porte como jacarés e seres humanos. Sua presença em água potável, apesar de controverso, pode causar distúrbios à saúde humana, mesmo em concentrações muito baixas³.

O avanço dos trabalhos na determinação dos MPEs deve-se ao desenvolvimento de técnicas analíticas, que permitiram detectar a presença destes microcontaminantes em baixas concentrações, em níveis traço ($\mu\text{g.L}^{-1}$ e ng.L^{-1}). Estes compostos chegam às redes de esgoto, dentre outros motivos, por atividades industriais, pelos descartes inadequados de fármacos vencidos, pela excreção destes produtos não metabolizados ou como conjugados através das fezes e urina, até serem conduzidos as estações de tratamento de esgoto (ETEs)^(1, 4).

Estudos indicam baixa remoção dos MPEs nos sistemas de tratamentos de esgotos, normalmente, realizado por tratamentos biológicos. Como alguns destes compostos são recalcitrantes, os mesmos apresentam baixas remoções pelas tecnologias de tratamento usuais. Devido a essa inadequação dos sistemas de tratamento ou à falta de tratamento de esgotos ou efluentes, muitos MPEs estão presentes em águas superficiais. Embora existam tratamentos avançados para remoção destes compostos (e.g. ultrafiltração, ozonização, oxidação avançada ou osmose), estes são raramente utilizados, por causa de seus custos elevados⁽⁵⁻⁷⁾.

O monitoramento da presença de MPEs no meio ambiente se faz necessário, seja por meio da utilização de métodos analíticos e técnicas de instrumentação, como cromatografia líquida e/ou gasosa acoplada à espectrometria de massas. A confiabilidade de um método analítico é garantida, fundamentalmente, por meio de sua validação, assegurando assim sua aplicabilidade e alcance nas operações de rotinas laboratoriais. Esse é um processo contínuo que se inicia no planejamento da

estratégia analítica até seu desenvolvimento e transferência ^(8, 9). Contudo, apesar destas técnicas propiciarem a detecção destes MPEs, alguns insumos tornam o processo oneroso, com altos custos de alguns reagentes. Além disto, as técnicas utilizadas no preparo de amostras para análise são prolongadas e demandam cuidados especiais, exigindo assim, um bom planejamento para o uso racional destes recursos.

Embora existam aproximadamente 800 compostos químicos, entre conhecidos ou suspeitos de serem capazes de interferir no sistema endócrino (hormônios receptores, na síntese de hormônios ou na sua conversão), apenas uma pequena fração têm sido investigada em ensaios laboratoriais¹⁰.

Este trabalho visa desenvolver e validar um método analítico para a determinação simultânea de MPEs, por meio de análises feitas por Cromatografia Gasosa acoplada à espectrometria de massas. Busca-se inovar na otimização do método na etapa de derivatização dos compostos, onde são avaliados e otimizados os parâmetros que influenciam o desempenho da derivatização *online*, ou seja, são avaliados os efeitos causados pela temperatura do injetor, tempo de purga e volume de reagente derivatizante. Estas etapas serão realizadas por triagem em planejamentos fatoriais seguidos de superfície de resposta. O procedimento após validação será aplicado a amostras de esgotos, provenientes da estação de tratamento de esgotos experimental da ETE – Arrudas, localizada no município de Belo Horizonte/MG.

Justificativa

A proposta deste trabalho consiste no desenvolvimento e validação de procedimento analítico para a determinação simultânea de fármacos e substâncias desreguladoras do sistema endócrino, pela otimização da técnica de derivatização *online*. O método desenvolvido e validado será aplicado a amostras de esgoto bruto submetidas a diferentes formas de tratamento aeróbico e anaeróbico. A importância do desenvolvimento desta metodologia deve-se a redução de custos na determinação de MPEs no meio ambiente, ampliando a capacidade de monitorar e atenuar a suas presenças no meio ambiente, desta forma, minimizar os vários

efeitos relatados na literatura destas substâncias, como alteração no sistema endócrino, feminilização de peixes, anfíbios e répteis, dentre outros.

Devido às condições analíticas da técnica de GC/MS, em vários casos, há a necessidade de derivatização dos analitos. Este processo utiliza reagentes derivatizantes, que conduzem a um aumento da volatilidade das substâncias derivatizadas. Entretanto, normalmente estes reagentes possuem custo elevado. Nesse sentido, técnicas que busquem uma redução de custo nessas análises têm sido investigadas. Entre elas, uma que tem se destacado na literatura é a derivatização no injetor (*online*). A derivatização *online* possui várias vantagens em relação ao método de derivatização convencional. Dentre elas pode-se citar como principal vantagem a redução da quantidade de reagente derivatizante necessária. Além disso, essa técnica diminui o tempo no preparo das amostras para análise com reduções de até 20% no tempo de análise; maior precisão devido à utilização do injetor automático na etapa de mistura entre derivatizante e amostra. Outra importante vantagem é a derivatização somente do volume injetado de amostra (de 1 a 3 μL), assim, não destruindo todo extrato, como ocorre em procedimentos convencionais. Desta forma, permite resguardar contra provas para futuras re-análises.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Microcontaminantes de Preocupação Emergente

Os Microcontaminantes de preocupação emergente têm despertado um sinal de alerta na comunidade científica, principalmente a partir da década de 1970. Segundo Geissen¹¹ e colaboradores, eles são definidos como “*produtos químicos sintéticos ou de ocorrência natural que não são comumente monitorados no meio ambiente, mas que podem entrar no meio ambiente e causar efeitos adversos em sistemas ecológicos e/ou na saúde de humanos*”.

Embora vários destes MPEs tenham despertado interesse, o primeiro trabalho nesse sentido foi em 2002, com o estudo de Kolpin¹² e colaboradores, que investigaram a ocorrência de 95 compostos orgânicos, em recursos hídricos. Os estudos se deram entre 1999 e 2000 em 30 estados norte americanos. A partir deste trabalho houve um crescimento expressivo nesta área, com 4952 citações deste artigo científico (Elsevier®, 2018) até o momento. Como estes microcontaminantes estavam presentes em 80% dos pontos amostrados, sendo encontrados 82 dos 95 compostos investigados, gerou-se um debate mundial acerca do tema. Principalmente em função de muitos deles não possuírem valores seguros aceitáveis ou previstos em legislações.

A presença dos MPEs no meio ambiente é atribuída principalmente à descarga de efluentes de ETEs. Estas estações utilizam normalmente processos secundários convencionais (lodo ativado e filtros de gotejamento). Contudo, estes sistemas não foram projetados para remover MPEs, o que pode resultar na disposição destes em corpos de águas superficiais, contaminando rios e lagos².

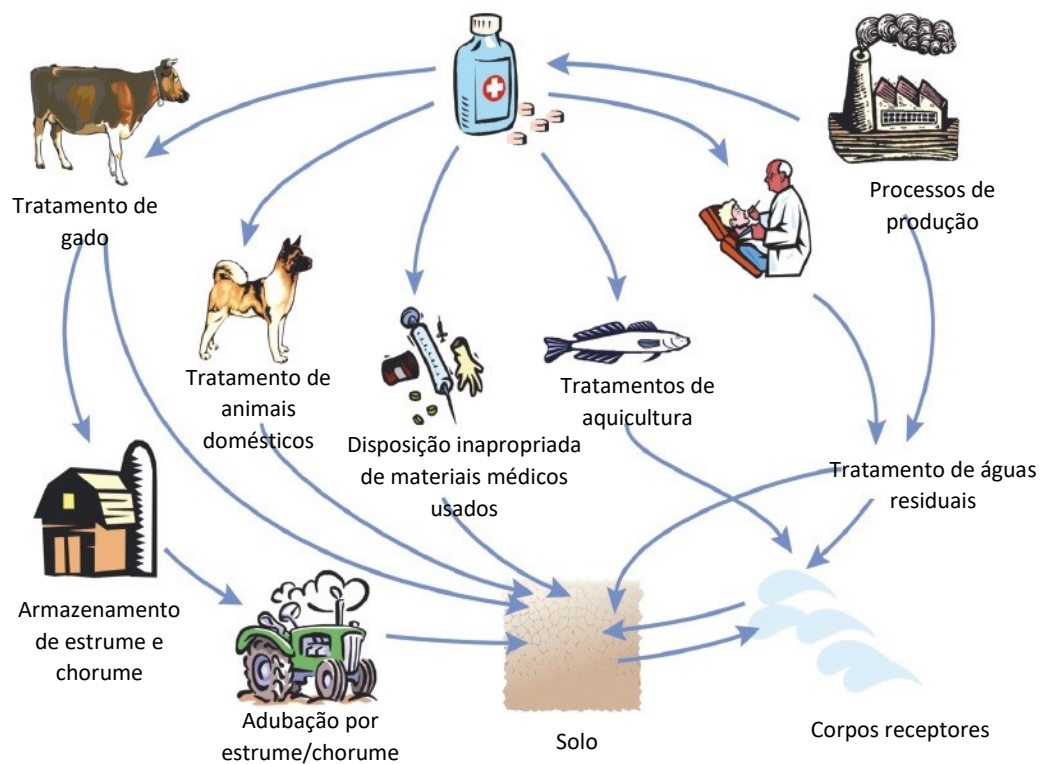
Para a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (*United States Environmental Protection Agency* - U.S. EPA), dentre os microcontaminantes de preocupação emergentes enquadram-se na classe de desreguladores endócrinos as seguintes classes de substâncias:

- alquilfenóis;
- retardadores de chama;
- hormônios naturais e sintéticos;

- produtos de higiene pessoal;
- produtos farmacêuticos;
- esteroides e resíduos humanos e produtos farmacêuticos descartados¹³.

O lançamento destes produtos no meio ambiente é preocupante, principalmente em função de sua disponibilidade e consumo. Na Figura 2.1 estão esquematizadas as possíveis rotas de entrada dos microcontaminantes e transporte no meio ambiente.

Figura 2. 1: Esquema das possíveis rotas de entrada e transporte dos microcontaminantes no meio ambiente.



. Fonte: Adaptado de BOXALL et. al¹⁴.

2.1.1. Fármacos

Os produtos farmacêuticos, mais conhecidos como medicamentos ou drogas, são componentes fundamentais da medicina moderna e tradicional. É essencial que esses produtos sejam seguros, eficazes e de boa qualidade, além de serem prescritos e utilizados de forma racional¹⁵.

Estima-se que, anualmente, o consumo mundial de produtos farmacêuticos seja de aproximadamente 15 g per capita/ano, sendo que em países industrializados esta quantidade esteja entre 50 a 150 g¹⁶. Além disso, como os fármacos são desenvolvidos para possuírem propriedades químicas persistentes para atender a sua função terapêutica e que 50 a 90% da dosagem destes fármacos são excretadas em sua forma inalterada, a presença desses compostos no meio ambiente torna-se significativa¹⁷. Os fármacos são subdivididos em várias classes, dentre as quais se encontram os anti-inflamatórios e reguladores lipídicos. Alguns destes são avaliados neste estudo.

2.1.1.1. Anti-inflamatórios

Os anti-inflamatórios são comercializados em larga escala. Estima-se que cerca de 33 milhões de pessoas consomem diariamente anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs), o que os tornam as drogas mais utilizadas em todo o mundo¹⁸.

Os anti-inflamatórios podem ser divididos em 2 classes: não esteroidais e esteroidais. Por serem mais consumidos, apenas os anti-inflamatórios não esteroidais foram estudados.

Os AINEs são constituídos de anéis aromáticos, em sua maioria, acompanhados das funções ácidos carboxílicos e ácidos enólicos. Eles podem ser ministrados isoladamente ou em combinação com outras classes de drogas, aliviando sintomas de várias indicações clínicas, incluindo vários estados de dor e uma série de distúrbios musculoesqueléticos^(19, 20). Os anti-inflamatórios escolhidos para estudo foram o ibuprofeno, o naproxeno, o diclofenaco e o paracetamol.

2.1.1.2. Reguladores lipídicos

Os reguladores lipídicos são substâncias que diminuem os teores de colesterol total e triglicerídeos, indicados para tratamento de doenças coronárias e infarto do miocárdio. Sua principal classe é composta pelos fibratos²¹.

Os fibratos são absorvidos pelo trato gastrointestinal, glucuronidados pelo fígado e eliminados pelos rins. O pico de concentração máxima dos fibratos pode variar

entre 2 e 8 h, a meia vida de eliminação entre 2 e 80 h, de acordo com as doses terapêuticas ministradas, dos diferentes tipos de fibratos²². Entre essa classe encontram-se a genfibrozila, a qual foi escolhida para o estudo realizado, principalmente, por haver evidências que sua presença pode inibir a produção de testosterona, por meio de testes realizados em células *Leydig* de ratos *in vitro*. Além disso, 70% deste regulador lipídico é excretado pela urina na forma de metabólitos, como glicuronídeos conjugados²³.

2.1.2. Desreguladores endócrinos

Segundo Nogueira³ os desreguladores endócrinos (DE) são: *“substâncias que afetam o sistema endócrino dos animais, alterando o desenvolvimento e/ou a reprodução dos organismos, não sendo, no entanto, gerados ou produzidos por esses mesmos organismos”*. Além disso, Bergman¹⁰ e colaboradores acrescentam que *“um potencial perturbador endócrino é uma substância ou mistura exógena que possui propriedades que podem ser expressas para levar a perturbações endócrinas em um organismo intacto, ou sua progênie, ou (sub) populações”*. Os esteroides compõem parte de um complexo de hormônios e enzimas que interagem à manutenção da vida. Estão presentes em quase todas as formas de vida, sendo produzidos pelos próprios organismos. Porém, alguns esteroides são produzidos sinteticamente para fins terapêuticos.

Os problemas relacionados a esses compostos podem afetar o sistema endócrino desregulando ou alterando suas funções, interferindo na síntese, secreção, ação ou eliminação dos hormônios dos organismos, estimulando outra resposta hormonal^{24, 25}. Além disso, existem fármacos que afetam o sistema endócrino intencionalmente, como o caso de pílulas contraceptivas, que anulam ou reduzem certos estímulos em partes do organismo que possuem maior sensibilidade¹⁴.

A literatura relata efeitos no meio ambiente pelos desreguladores endócrinos, como diminuição na eclosão de ovos de pássaros, peixes e tartarugas; feminilização de peixes de sexo masculino; problemas no sistema de reprodução de peixes, répteis, aves e mamíferos, estando relacionados ao contato dessas espécies de

animais. Em alguns casos os efeitos podem conduzir a redução da população. Nos seres humanos esses efeitos incluem diminuição da quantidade de esperma, elevação na incidência de câncer de mama, de testículo e de próstata e a endometriose²⁶⁻²⁹.

2.2. Propriedades físico-químicas das substâncias investigadas

Em trabalhos com microcontaminantes de preocupação emergente é interessante conhecer suas propriedades físico-químicas, para que seja possível o uso de técnicas analíticas que proporcionem a extração e concentração destes analitos para a identificação e quantificação destes. Abaixo estão algumas das propriedades investigadas:

2.2.1. Coeficiente de partição octanol/água (K_{ow})

O coeficiente de partição octanol/água (K_{ow}), é um importante parâmetro físico-químico que estabelece o grau de lipofilicidade ou hidrofobicidade de um soluto. Com o K_{ow} é possível prever se um microcontaminante estará predominantemente na fase aquosa ou na matéria orgânica (lodos no caso de amostras provenientes de esgotos) de acordo com o valor de seu coeficiente.

Dessa forma, se o K_{ow} for $<2,5$ a espécie é considerada como baixo potencial de sorção e maior afinidade com meio aquoso, entre 2,5 e 4,0 é considerada com médio potencial de sorção afinidade intermediária entre a fase orgânica e aquosa, por fim, $>4,0$ a espécie possui alto potencial de sorção e maior afinidade pela fase orgânica³⁰.

2.2.2. pKa

O pKa é $-\log$ da constante ácida Ka. Ele representa o ponto em que uma espécie ácida dissociada está em equilíbrio com sua forma conjugada. Pelo fato da adsorção por interações eletrostáticas ser dependente do pH do meio e do caráter ácido/básico da molécula, a estimativa é feita nesse caso para diferentes valores de pH do meio¹.

Ka e pKa tem como principal função prever tanto a acidez como a basicidade. O Ka e a acidez são diretamente proporcionais, assim, quanto maior o valor de Ka, maior será a força do ácido. Por sua vez, o pKa é inversamente proporcional a acidez, logo, quanto maior o pKa mais fraco será o ácido. Quantitativamente, um pKa com valor menor que 1 será considerado um ácido muito forte, já valores de pKa entre 1 e 5 será um ácido forte, por último, pKa entre 5 e 15 será considerado um ácido fraco, valores superiores a 15 o pKa será de um ácido muito fraco³¹. Conhecendo o pH do meio é possível prever se a espécie estará predominantemente na forma protonada ($pK_a > pH$) ou desprotonada ($pK_a < pH$).

O pKa é importante na definição das condições utilizadas em processo de extração de compostos orgânicos em meios aquosos pois, o ajuste do pH da solução aquosa pode alterar os equilíbrios de partição, por exemplo.

2.2.3. Ponto de Ebulição

O ponto de ebulição é uma propriedade física relacionada à temperatura na qual uma dada substância tem sua pressão de vapor igualada à pressão atmosférica, passando então para o estado de gás³².

Na cromatografia gasosa essa informação é de grande valia, pois, as análises são feitas em moléculas no estado gasoso. Vários compostos tem sua temperatura de ebulição superior a temperatura de trabalho do equipamento, dessa forma, se faz necessário a utilização de técnicas que reduzem o PE destas substâncias³³. Essas técnicas serão melhor discutidas no item 2.5 em diante.

2.2.4. Estrutura química

A estrutura química dos compostos, ou fórmula estrutural, é a representação espacial das moléculas. Entre as fórmulas estruturais mais conhecidas destacam-se a condensada, linear, fórmula eletrônica ou de Lewis e fórmula de Couper³⁴. A disposição delas é importante para prever, entre outras funções, sua polaridade, sítios reacionais, interações inter/intra moleculares, além de possibilitar a identificação dos compostos.

2.2.5. Massa molar

A massa molar é uma informação de grande relevância na química. Por se usar um detector que analisa os compostos em função de sua relação massa/carga (m/z) deve-se conhecer as propriedades com grande exatidão (até 5 casas decimais) para melhor resolução e separação. As propriedades deste tipo de detector serão discutidas a partir do item 2.3. A tabela 1 apresenta as propriedades físico-químicas dos compostos estudados neste trabalho.

Tabela 1. Propriedades físico-químicas dos compostos analisados.

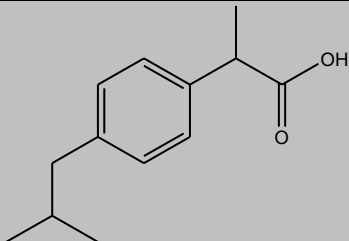
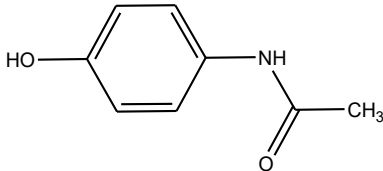
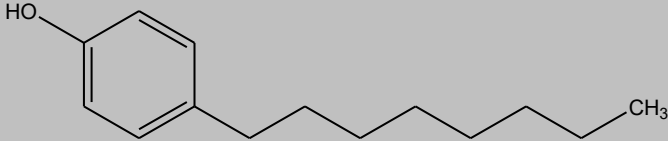
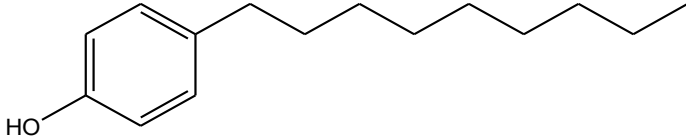
Nome	Sigla	Estrutura química	M. M. (g/mol)	pka	P. E.	Log K _{ow}
Ibuprofeno	IBU		206,28082	4,91 – 5,20	319,64 °C	3,97
Paracetamol	PCT		151,16256	9,38	387,83 °C	0,46
4-octilfenol	4OF		206,32388	10,38	314,57 °C	5,50
4-nonilfenol	4NF		220,35046	10,70	330,64 °C	5,76

Tabela 1 – Propriedades físico-químicas dos compostos analisados (continuação).

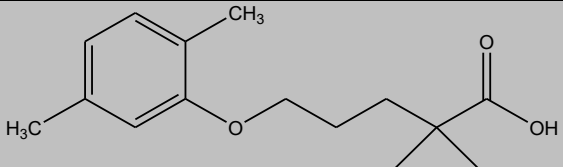
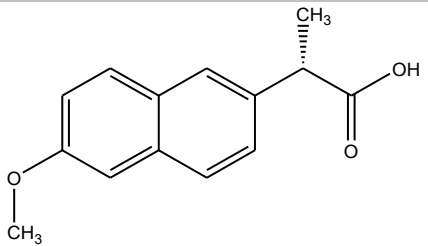
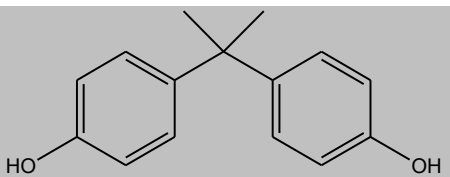
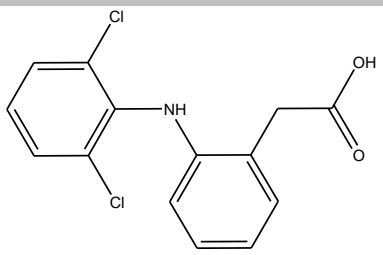
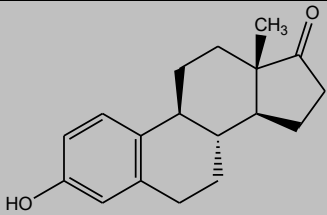
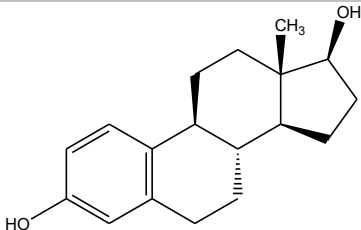
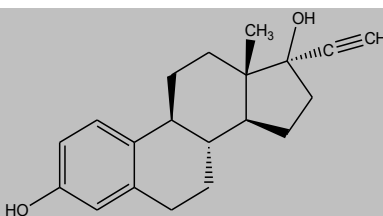
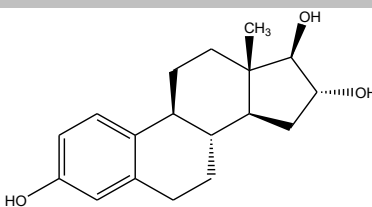
Nome	Sigla	Estrutura química	M. M. (g/mol)	pka	P. E.	Log K _{ow}
Genfibrozila	GEN		250,33338	4,50	394,73 °C	4,77
Naproxeno	NPX		230,25916	4,15	403,89 °C	3,18
Bisfenol A	BPA		228,28634	10,20	400,84 °C	3,32
Diclofenaco	DCF		296,147	4,15	411,97 °C	4,51

Tabela 1. Propriedades físico-químicas dos compostos analisados (continuação).

Nome	Sigla	Estrutura química	M. M. (g/mol)	pka	P. E.	Log K _{ow}
Estrona	E1		270,36608	10,77	445,17 °C	3,13
Estradiol	E2		272,38196	10,20	445,92 °C	4,01
Etinilestradiol	EE2		296,40336	10,40	457,22	4,12
Estriol	E3		288,38136	10,21	445,92	2,45

2.3. Cromatografia

A cromatografia é uma técnica que ganhou destaque nos últimos anos, principalmente pela sua aplicação nas mais variadas áreas do conhecimento humano. É uma poderosa técnica de separação físico-química, e que possui mais de 50 anos de aplicação. Skoog³⁵ a define como “*um grupo diversificado e importante de métodos que permitem a separação, identificação e determinação de componentes muito semelhantes de misturas complexas*”. Na análise de MPEs, a cromatografia é imprescindível para a separação dos analitos de interesse em matrizes complexas.

2.3.1. Cromatografia Gasosa (GC)

No uso da cromatografia gasosa a separação baseia-se na diferente distribuição das substâncias da amostra entre uma fase estacionária (sólida ou um filme que se comporta como líquido) e uma fase móvel (gasosa); por meio de um sistema de injeção, a amostra é introduzida em uma coluna contendo a fase estacionária³⁶.

Está técnica se aplica na separação de compostos voláteis ou volatilizáveis, ou seja, os analitos a serem separados devem apresentar uma razoável pressão de vapor à temperatura de separação. O fluxo do gás de arraste é responsável pela eluição da amostra, normalmente Ar, He, N₂ ou H₂. A fase móvel (gás de arraste) não interage com os analitos, conduzindo-os pelo interior da coluna até o detector³⁷.

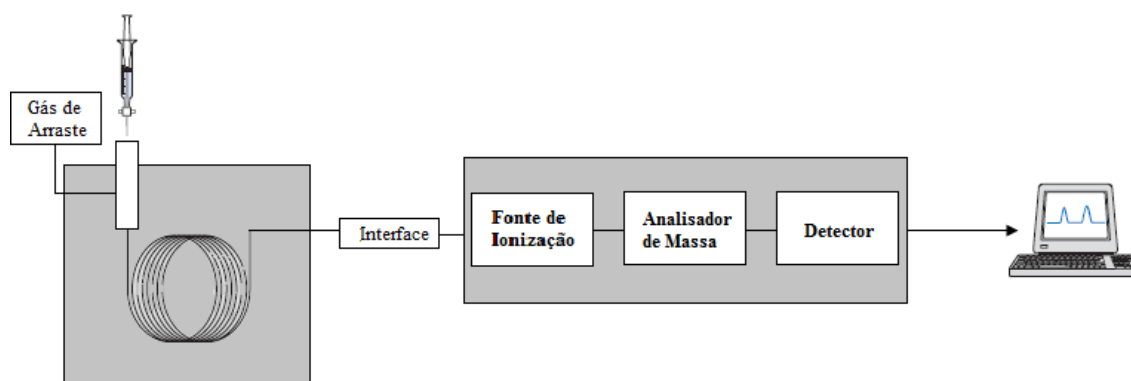
2.3.1.1. Detectores Cromatografia Gasosa

Os detectores são responsáveis pelo registro e medição dos analitos separados pela coluna cromatográfica. Existem vários detectores disponíveis em GC, como detector por ionização em chama (*flame ionization detector* - FID), detector de captura de elétrons (*electron capture detector* - ECD) que é largamente empregado em análises ambientais, por ser seletivo a compostos halogenados (presentes em vários agrotóxicos), termoiônicos, condutividade térmica, espectrômetro de massas (MS), entre outros³⁵.

O GC/MS tem em seus componentes, após a interface com o cromatógrafo, uma fonte de ionização (onde os íons são formados); um analisador de massas, capaz de separar os íons na fase vapor pelas suas respectivas razões massa/carga; um sistema de detecção e interpretação de dados, figura 2.2.

A fonte de ionização mais comum para o GC/MS é a ionização por elétrons (*electron ionization* – EI). Ela consiste em um filamento aquecido que emite elétrons de alta energia. Estes últimos são acelerados em direção a um ânodo e interagem com as moléculas, na fase gasosa, da amostra analisada e introduzida na fonte. Esta técnica de ionização, pela sua alta energia, a partir de um radical cátion M^+ , pode produzir vários íons fragmentos, com abundâncias características devido as suas diferentes estabilidades e propriedades físico-químicas. Em seguida os íons gerados seguem para o analisador de massas, selecionando os íons de acordo com seus valores de razão massa/carga (m/z). Os íons separados são então detectados e um espectro de massas, contendo a intensidade do sinal gerado pelo íon *versus* m/z é produzido pelo sistema de dados ^(35, 38).

Figura 2. 2: Esquema de um GC-MS.



Fonte: Ferreira³⁹, 2011.

Pelo fato de a cromatografia em fase gasosa ser aplicada apenas a compostos que apresentam certa volatilidade, alguns analitos que fazem interações de hidrogênio ou tem um ponto de ebulição elevados precisam ser derivatizados, ou aumentada a temperatura de trabalho (limitada a 400 °C), para que passem para a fase gasosa. Contudo, a técnica de GC apresenta um manuseio relativamente simples, alto poder de resolução e é uma interessante opção para análise de MPEs. O uso de GC/MS tem sido abordado preferencialmente para a análise simultânea de

esteroides estrogênicos sintéticos e naturais, devido à sua superior capacidade de separação e identificação em relação a outras técnicas como LC/MS, por exemplo⁴⁰. Inclusive é o método utilizado pela agência de proteção ambiental americana (EPA, método 1698)⁴¹ para determinação de esteroides e hormônios em água, solos, sedimentos e bio-sólidos.

2.4. Preparo de amostra

As amostras ambientais, em função da variedade de compostos interferentes, naturalmente, necessitam de um pré-tratamento. Esse procedimento permite isolar os analitos que se pretende analisar, assim como concentrá-los. Existem várias técnicas de pré-tratamento, a escolha da técnica pode ser atribuída às propriedades físico-químicas dos analitos a serem investigados.

Entre as técnicas de extração mais utilizadas, destacam-se extração líquido-líquido (*liquid-liquid extraction* – LLE) e extração em fase sólida (*solid phase-extract* – SPE). Embora LLE tenha sido bastante utilizada como técnica extratora na análise de hormônios, ela apresenta como principal desvantagem o risco associado à saúde e ao meio ambiente, devido aos elevados volumes de solventes utilizados, como o cloreto de metileno. Assim, a SPE vem substituindo a LLE quanto à escolha do método para a preparação da amostra, para análises de hormônios e substâncias desreguladores endócrinas em geral⁴².

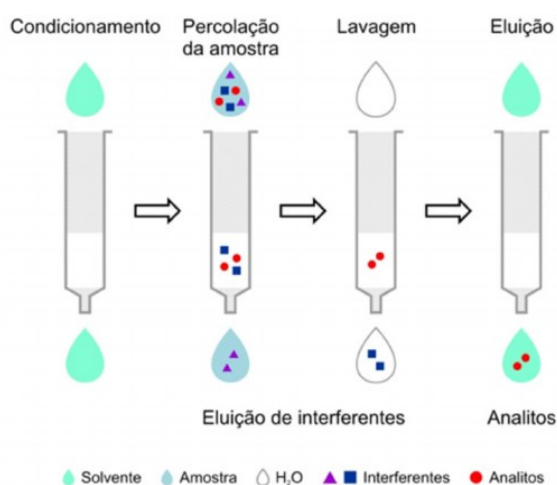
2.4.1. Extração em fase sólida – SPE

O uso de técnicas analíticas como cromatografia oferecem excelentes resultados, porém, para atingir concentrações ainda menores (ng.L^{-1}) é necessário concentrar as amostras. SPE atende bem esse quesito, bem como isola analitos de interferentes presentes em matrizes complexas.

Na SPE são envolvidas quatro etapas: condicionamento do cartucho para ativação do sorvente; percolação da amostra na fase sólida e eluição dos interferentes; lavagem para eliminação dos interferentes (*clean up*) e; eluição dos analitos⁴³, conforme figura 2.3.

A imobilização física ou adsorção de certos compostos orgânicos ocorre na superfície de um sólido inorgânico ou orgânico. Pode ser necessário o ajuste do pH, afim de manter a polaridade adequada, visando garantir que os analitos sejam retidos na fase sólida. O emprego de um eluente adequado também se faz necessário para garantir a eliminação de interferentes⁴⁴. Neste trabalho foram utilizados cartuchos Strata SAX[®] (500 mg) e o Strata X[®] (500 mg).

Figura 2. 3: Etapas envolvidas na SPE: condicionamento do sorvente, adição da amostra, remoção dos interferentes e eluição do analito



Fonte: Caldas⁴³, S.S. et al. 2011.

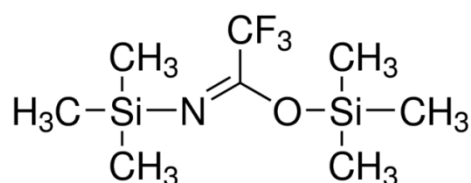
2.5. Derivatização

Como discutido anteriormente, para a análise de alguns compostos utilizando GC faz-se necessário a redução de sua temperatura de ebulição e para isso a derivatização é essencial. A derivatização é definida por Schummer⁴⁵ como “*um processo químico para modificar compostos para gerar novos produtos com melhores propriedades cromatográficas*”. A técnica aumenta significativamente a volatilidade, estabilidade térmica e detectabilidade do analito ao se analisar por cromatografia gasosa.

As principais técnicas de derivatização utilizadas em GC são acilação, alquilação e siliilação, sendo esta última a mais utilizada, em função do menor tempo de reação e maior simplicidade e versatilidade⁴⁶.

A derivatização, que reduz a polaridade das moléculas, tem sido empregada em várias análises por GC, e essas reações têm como principais classes de derivatização a esterificação com os métodos de trifluoreto de boro (BF₃)/metanol, diazometano, ácido/metanol, métodos derivatização por sililação pelos reagentes bis-trimetilsililacetamida (BSA) e N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) (figura 2.4), hexametildisilazano (HMDS) e trimetilclorosilano (TMCS)⁴⁷. Quanto à escolha do reagente derivatizante, neste trabalho foi utilizado BSTFA com 1% de TMCS, pois apresenta excelentes resultados para substituição de hidrogênios ativos presentes em ácidos carboxílicos, álcoois, fenóis, amidas e aminas, além de maior eficiência. Somado a isto, o reagente e seus subprodutos apresentam alta volatilidade, não interferindo na separação cromatográfica.

Figura 2. 4: Estrutura química do BSTFA.



Fonte: autoria própria.

Schummer⁴⁵ e colaboradores fizeram testes com N-(t-butildimetilsilil)-N-metiltrifluoroacetamida (MTBSTFA) e BSTFA, que estão entre os reagentes de derivatização preferenciais para sililação em seis grupos diferentes de produtos químicos polares para obter informações sobre a utilidade em termos de sensibilidade e especificidade de ambos os reagentes, sendo o MTBSTFA o derivatizante que apresentou melhor padrão de fragmentação em função da maior estabilidade.

2.5.1. Sililação

A reação de sililação é a técnica mais utilizada para derivatização, visto que é mais simples, rápida e eficiente. Seu mecanismo é do tipo substituição nucleofílica de segunda ordem (S_N2), em etapa única. A derivatização de grupos funcionais distintos utilizando agente sililante acompanha a seguinte ordem de reatividade: álcoois > fenóis > ácidos carboxílicos > aminas > amidas⁴⁸.

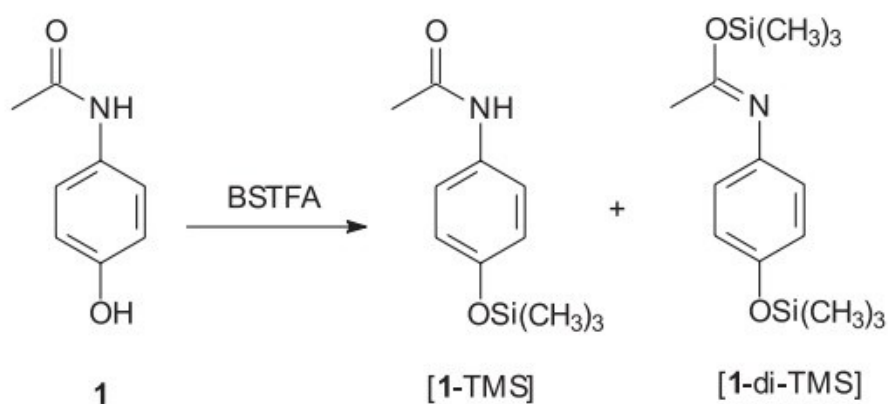
Contudo, apesar das vantagens da derivatização, para a ressuspensão das amostras, é importante a escolha de um solvente orgânico adequado, pois deve-se observar algumas características, afim de obter melhor eficiência na reação de sililação. Assim, um solvente orgânico adequado deve apresentar elevada capacidade de solubilizar os produtos derivatizados e ser aprótico (sem átomos de hidrogênio ativo)⁴⁹. Além disso, o meio reacional deve estar em condições anidras durante a derivatização, pois, em meios que apresentem umidade elevada, sua eficiência poderá ser comprometida em virtude de hidrogênios ativos presentes na molécula de água⁵⁰.

O TMCS é utilizado como catalisador na reação, como demonstrado por Ding & Chiang⁵¹. Eles investigaram vários procedimentos de derivatização em hormônios utilizando BSTFA e N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA). Os reagentes foram acrescidos de 0%; 1%; 5% e 10% de TMCS. Após triagem, foi indicada a utilização de BSTFA com 1% de TMCS, pois, eram formadas as mesmas quantidades de produtos substituídos por grupos trimetilsilil (TMS) que os outros derivatizantes com 5% e 10% de catalisador. Os testes realizados nos hormônios estrona, estradiol, testosterona, dietilbestrol e 2-hidroxiestradiol apresentam melhoras na sensibilidade e seletividade.

Embora a derivatização reduza a temperatura de ebulição dos compostos passíveis de substituição e melhore tanto a sensibilidade quanto a seletividade, ressalta-se que o uso de grupos silil TMS leva a um aumento do peso molecular dos analitos. Isso pode gerar um problema em casos de moléculas que apresentem vários hidrogênios ativos (polifuncionais) e uma elevada massa molecular, pois os tempos de retenção podem ser aumentados drasticamente em função da interação dos grupos TMS com a fase estacionária da coluna cromatográfica. Desse modo, o analito pode não ser eluído da coluna do GC, mesmo em sua temperatura máxima de trabalho⁴⁶.

A figura 2.5 representa a reação de BSTFA com paracetamol, onde pode ser visto que o grupo substituinte TMS pode formar produtos mono e dissustituídos.

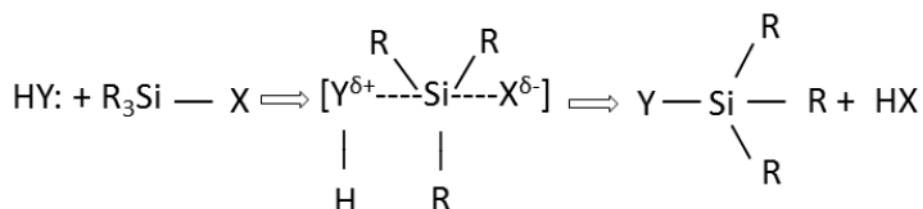
Figura 2. 5: Reação BSTFA com paracetamol.



Fonte: Dalmázio⁵² e colaboradores.

A figura 2.6 apresenta o mecanismo geral da reação de sililação.

Figura 2. 6: Representação do mecanismo geral da sililação



Fonte: Blau⁵³ & Halket, 1993.

O processo de derivatização pode ser tanto *off-line*, método convencional, quanto *online*, que será discutido abaixo.

2.5.2. Derivatização Online

A derivatização *online*, também conhecida por *on-column* ou *injection port derivatization*, é uma importante técnica de derivatização na qual a reação ocorre no interior do injetor do GC. Suas principais vantagens são menor tempo na etapa de análise, redução da quantidade de reagente derivatizante utilizada, padronização dos volumes injetados, reduzindo assim erros embutidos a esse processo quanto

comparado com o método convencional. Além disso, a técnica permite a derivatização apenas do volume de amostra a ser injetado, permitindo com que o restante da amostra possa ser utilizada novamente, caso seja necessário. Esta também pode estar sujeita à automatização.

Na derivatização *online*, por meio de reação de sililação, é injetado BSTFA + 1% TMCS, usualmente em volumes de 3 a 5 vezes maior que a quantidade de amostra introduzida no injetor, após um período de 4 a 5 segundos. Contudo, essa abordagem não é compatível com moléculas que possuam grupos impedidos, devido ao curto tempo de contato durante a reação de sililação. Neste caso, é indicado o uso de derivatização pelo método convencional *off-line* (50-100 °C, durante 15-30 minutos)⁴⁶.

O primeiro trabalho realizado com derivatização *online* empregando análises quantitativas foi efetuado por Rasmussen⁵⁴ em 1976. Esse trabalho consistia em determinar concentrações de padrões de morfina para avaliar a reprodutibilidade do método por GC/MS. O uso dessa técnica, desde então vem se destacando e sendo empregada em outras classes de substâncias. O trabalho do autor utilizou concentrações muito altas (1 g.L⁻¹) para confirmar a reprodutibilidade, mas como em análises de traços são investigadas quantidades muito pequenas de analitos (na ordem de 10⁻⁹g.L⁻¹) é importante pré-concentrar as amostras, além de usar detectores capazes de responder a sinais dessa ordem.

Existem alguns fatores a serem observados, tendo em vista que podem influenciar a derivatização *online*, entre eles a temperatura do injetor, tempo de purga e quantidade de reagente derivatizante, que seguem abaixo.

2.5.2.1. Temperatura do injetor

A temperatura do injetor é um fator primordial na derivatização *online*, o qual apresenta forte relação na condução da reação, podendo acelerar sua velocidade para alguns analitos. Normalmente, para que a reação seja eficiente, a temperatura empregada do injetor deve estar entre 250 e 300 °C, para que ela seja rápida e completa⁵⁰. Embora a temperatura seja um fator importante, deve-se evitar temperaturas muito elevadas, pois podem ocorrer reações não desejadas ou mesmo

a decomposição térmica de algum analito derivatizado, causando redução do sinal analítico⁵⁵.

Marsol-Vall⁵⁶ e colaboradores, analisando ácidos graxos, álcoois graxos, esteróis e terpenos em sucos de frutas comerciais, avaliaram, entre outras variáveis, a temperatura, onde estabeleceram uma faixa de temperatura de 200 °C a 300 °C para os esteróis e terpenos, com incrementos a cada 20 °C. Foi observado que a melhor temperatura de trabalho era de 260 a 280 °C, o qual foi adotada 280 °C, pois ao ser testada, em triplicata, esta temperatura apresentou as maiores respostas dos analitos.

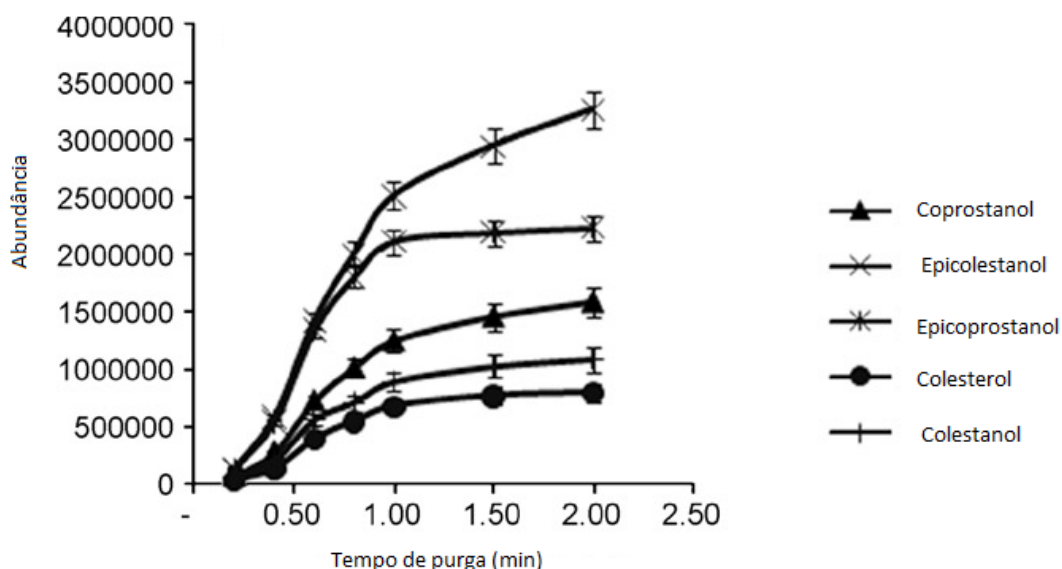
Assim como Marsol-Vall, Wu⁴⁹ et al. em seus estudos sobre seleção da temperatura do injetor, também usaram valores variando de 200 °C a 300 °C, porém, em esteróis fecais. A temperatura de 300 °C foi a que apresentou melhores resultados de abundância destes analitos, pois temperaturas maiores podem acelerar a eficiência da sililação.

2.5.2.2. Tempo de purga

O tempo de purga está diretamente ligado à sensibilidade. De certa forma, na otimização deste parâmetro, é necessário harmonizar a relação entre sensibilidade e separação, feita pela coluna cromatográfica. Contudo, ao se estender este tempo de residência no injetor, é possível que haja um alargamento no pico dos cromatogramas, causando uma resolução pobre^(35, 50). Alguns trabalhos, reportados abaixo, apresentam dados referentes aos tempos de purga e suas respectivas otimizações.

Wu⁴⁹ et al. em seu estudo sobre o efeito no tempo de purga, notaram que em seus testes, no período de 0,2 a 1,0 minuto, em modo *splitless*, que as repostas aumentavam de forma acentuada ao passo que o tempo aumentava, seguidos por uma ligeira inclinação no intervalo de 1,0 a 2,0 minutos. Os pesquisadores optaram por utilizar no trabalho o tempo de purga de 1,5 min. A figura 2.7 apresenta os resultados dos esteróis estudados.

Figura 2. 7: Efeito do tempo de purga nas áreas dos picos na derivatização de diferentes compostos obtidos por Wu.



Fonte: Wu⁴⁹ et, al

Marsol-Vall⁵⁶ e colaboradores avaliaram também tempos de purga, em uma faixa de 0,1; 0,25; 0,5; 1,0 e 2,0 minutos, no qual o intervalo de 1 a 2 minutos apresentou melhor desempenho. Assim, foi escolhido o valor de 1 minuto, uma vez que tempos de purga mais elevados podem aumentar o risco de acumular analitos no *liner*, fazendo-se necessária a sua limpeza, além de superestimar os valores de recuperação.

2.5.2.3. Quantidade de reagente derivatizante

Outro importante fator a ser considerado na derivatização *online* é a quantidade de reagente derivatizante, pois em proporções insuficientes, levaria a uma baixa eficiência de derivatização, ou alta razão entre analitos não derivatizados e derivatizados⁵⁰.

Apesar da quantidade de derivatizante conduzir o andamento da reação, em excesso, pode comprometer a eficiência na separação dos analitos. Assim, Toledano⁵⁷ et. al. em seus estudos, variaram volumes reagente sililante entre 2 a 100 µL, no qual estabeleceram que o melhor volume de reagente para derivatizar

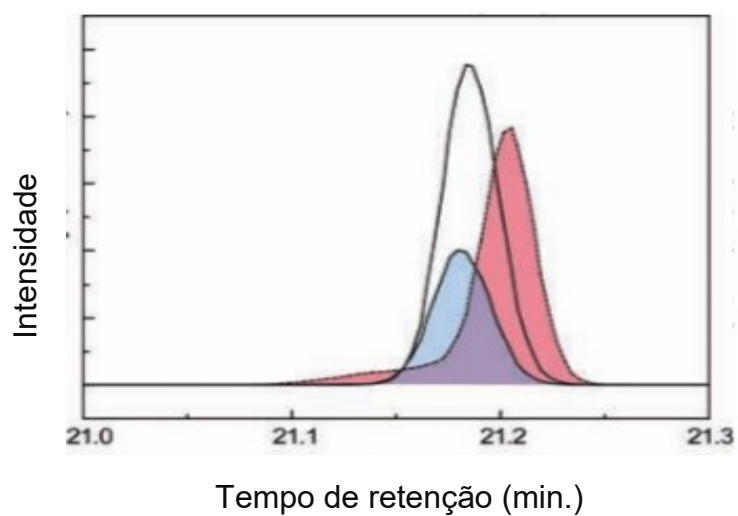
esteróis seria de 10 µL, sendo esse volume vertido em um *vial*, agitado juntamente com a amostra e, em seguida, injetado no GC, derivatização *off-line*.

Já Marsol-Vall⁵⁸ et. al. avaliando polifenóis em amostras de frutas, encontraram a melhor relação amostra/reagente derivatizante em proporções de 2:1 e 2:3 µL, apresentando valores semelhantes, com áreas de picos com contagens totais de cerca 2,5 milhões. Os testes de variância (ANOVA) foram realizados por *software* com 95% de confiança. Corroborando com estes valores, Basheer⁵⁹ & Lee encontraram como melhor volume 2 µL de BSTFA para injeção de 1 µL de amostras, para alquilfenóis em amostras de água potável. Os pesquisadores observaram que em volumes superiores a 2 µL os analitos sofriam uma significativa redução na resolução dos picos e precisão durante as análises.

A redução do volume de reagente derivatizante é um dos objetos de estudo neste trabalho, assim, para esse trabalho serão testados os volumes de 1,0 a 3,0 µL de reagente derivatizante, neste caso, o BSTFA.

Outra técnica de derivatização *online* é apresentada por Cho⁶⁰, intitulada *stacking with in-column* (SIS). Esta técnica consiste na intercalação entre as amostras com o reagente derivatizante. Os resultados mostraram cromatogramas melhores em relação às técnicas convencionais de derivatização, o analito utilizado para análise foi o bisfenol A e BSTFA para reação de derivatização, figura 2.8.

Figura 2. 8: Cromatogramas de BPA derivatizados por sililação *off-line* (vermelho), *online* convencional (azul) e *online* SIS.



Fonte: Adaptado de Cho, 2012.

Na tabela 2 pode ser visto vários trabalhos usando derivatização on-line, com alguns dos analitos determinados neste estudo, no qual também foram observados os critérios cromatográficos, tipos de matriz, preparo de amostras, dentre outros.

Analitos	Matriz	Preparação da amostra	Reagente derivatizante	Volume de derivatizante (µL)	Solvente	Tipo de derivatização	Recuperação (%)	LD e LQ (ng/L)	Modo de injeção	Referência
4NP; 4OP e BPA	Águas subter-râneas	SPME	BSTFA	1,0	Diclorom etano	No injetor	98,7 4NP; 105,0 4OP; 104,9	LD: 100 4NP; 100 4OP; 10 BPA	Splitless	Helaleh et al., 2001 ⁶¹
Polifenóis e polifenóis glicosilizados	Frutas	SPE	MSTFA	1 – 3	Piridina	No injetor – PTVI	49 – 92	LD: 0,006 – 0,240; LQ: 0,02 – 0,8	Splitless	Marsol-Vall et al., 2016 ⁵⁸
Alquilfenóis, clorofenóis e BPA	Água do mar	LPME	BSTFA	1 – 3 (2)	Tolueno	No injetor	75 – 116	LD: 5 – 15; LQ: 12 – 26	Splitless	Basheer & Lee, 2004 ⁵⁹
Esteróis fecais	Águas superficiais	SPE	BSTFA + 1% TMCS	10 – 200 (50)	Cloreto de metileno	No injetor – LVI	88,5 – 97,0	1,3 – 15,0	Splitless	Wu et al., 2009 ⁴⁹
TCS e MTCS	Esgoto	SPE	MTBSTFA	1 – 4 (1)	Diclorom etano	No injetor	80 – 95	LD: 04 – 1,0; LQ: 1,0 – 3,0	-	Cheng et al., 2011 ⁶²
E1, EE2, BPA, TCS e EHS	Água de rio	DLLME	BSTFA + piridina (1:1)	0,5	Acetato de etila	No injetor	85,8 – 101,9	LD: 7 – 138; LQ: 24 – 464	Splitless	Pérez et al., 2016 ⁶³
PAHs hidroxilizados	Urina	DLLME	BSTFA	0,5 – 3,0 (2,0)	Tricloroe tileno	No injetor – PTVI	87 – 95	LD: 1 – 9; LQ: 3 – 29	Splitless	Gupta, et al., 2015 ⁶⁴
DEs	Água de rio	DLLME	BSTFA + 1% TMCS	0,5 – 3,0 (2,0)	Diclorom etano	No injetor – PTVI	82 – 98	LD: 2 – 230; LQ: 9 – 770	Splitless	Mudiam et al., 2014 ⁶⁵

Tabela 2. Levantamento na literatura sobre técnicas de derivatização *online*.

Legenda da tabela 2:

LPME: micro-extração em fase líquida.

DLLME: micro-extração por dispersão líquido-líquido.

SPME: micro-extração em fase sólida

TCS: triclosan

MTCS: Metiltriclosan

EHS: 2-etil-hexilsalicilato

EPA: hidrocarbonetos poli aromáticos

PTVI: programmed temperature vaporization injection –
injeção por temperatura de vaporização programada

LVI: large volume injection – injeção em grande volume

2.6. Planejamento fatorial

Como é de conhecimento geral, para a execução de um projeto, uma etapa muito importante é o planejamento dos experimentos. Esta etapa consiste em conhecer as variáveis que se deseja investigar. O uso de planejamentos fatoriais, sejam eles completos ou fracionários, são de grande valia, pois são checadas as possíveis interações nas respostas obtidas, que estão relacionadas à influência das variáveis de interesse no estudo. Ademais, no planejamento fatorial completo, a combinação de k fatores, sendo investigado em dois níveis, o planejamento fatorial será constituído de 2^k experimentos. Os níveis representam os valores dos fatores (ou classes, em fatores qualitativos). Em níveis dos fatores quantitativos (*i.e.* temperatura, pH, volume, pressão, etc.) são atribuídos sinais – (menos) para níveis inferiores e + (mais) para os níveis superiores. Contudo, o que de fato é importante são as relações sinal dado e efeito obtido, não sendo uma regra definida a nomeação dos sinais ⁶⁶.

Por outro lado, um planejamento fatorial completo pode gerar uma grande quantidade de ensaios, principalmente em ordens mais elevadas (2^k , onde $k > 4$) e, tendo em vista que nem todos os efeitos apresentados são significativos, a realização de todos estes ensaios pode ser irrelevante. Deste modo, é possível utilizar uma quantidade menor de experimentos no modo fracionado para se obter informações sobre efeitos de maior importância, e comumente, chegando as mesmas conclusões que se utilizasse um planejamento fatorial completo ⁶⁶. Portanto, a utilização de planejamentos fatoriais fracionários se faz necessária, pois como já citado, são mais econômicos, além de possibilitarem a realização de dezenas de fatores simultaneamente ⁶⁷.

Tendo em vista que, em vários casos, para se ter uma boa estimativa da precisão dos erros experimentais, é interessante a inclusão de um experimento no centro do planejamento. Este consiste em empregar um valor médio entre os níveis mínimos e máximos das variáveis investigadas. Ele é conhecido como experimento no ponto central (nível zero). Assim, é possível determinar a significância dos efeitos ou coeficientes nos planejamentos de triagem (completos ou fracionários) e também, em metodologias de superfície de resposta. Além disso, a chance de perder a relação não linear entre os intervalos ser reduzida, sendo possível estimar um modelo satisfatório e verificar se existe ausência ajuste ⁶⁶.

Após a execução da triagem, fatores significativos são escolhidos e então aplicados à metodologia de otimização, a exemplo, dos de superfícies de respostas. O uso dessa metodologia têm duas finalidades principais. A primeira é para otimização, onde se encontram as condições que resultam em um máximo ou mínimo de resposta, de acordo com o interesse da investigação. Com a otimização pode-se, por exemplo, melhorar o rendimento de uma síntese ou resolução cromatográfica. A segunda finalidade é obter um modelo quantitativo detalhado, permitindo a previsão matemática de como uma resposta pode se relacionar com valores de vários fatores. A superfície de resposta tem como base a construção de modelos matemáticos, que utilizam funções polinomiais lineares ou quadráticas, que descrevem o sistema estudado, assim como, possibilitam percorrer o sistema até a sua otimização. Os principais planejamentos utilizados são Composto Central “CCD - *Central Composite Design*” e *Doehlert*, em função de melhor se ajustar a modelos quadráticos^{66, 68}.

Pela importância destas informações já apresentadas, será realizado um planejamento fatorial fracionado que predirá a influência das variáveis relacionadas à derivatização *online*. Uma vez estabelecidas as influências das variáveis estudadas, a estas serão aplicados a metodologia de superfície de respostas para encontrar as melhores condições (otimização) da derivatização *online*. O planejamento com as variáveis investigadas estão detalhados na metodologia deste trabalho.

2.7. Validação do procedimento analítico

A necessidade de obter dados analíticos confiáveis é imprescindível na tomada de decisões, pois, dados não confiáveis podem gerar medidas ineficazes, uso equivocado de recursos naturais e prejuízos financeiros. Para garantir a confiabilidade de um método analítico, é fundamental sua validação, assegurando a aplicabilidade e alcance nas operações de rotinas laboratoriais, sendo um processo contínuo, que se inicia do planejamento da estratégia analítica até seu desenvolvimento e transferência^(8, 9).

A validação de um método demonstra que o procedimento é adequado para seus objetivos propostos, no que diz respeito a sua rastreabilidade, confiabilidade e

comparabilidade. Devido à importância da validação de um método, existem vários órgãos responsáveis por desenvolver protocolos, nacionais como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO), e internacionais como a *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) e *International Standard Organization* (ISO), para credenciamento dos laboratórios⁶⁹.

Quanto à validação de métodos analíticos existem dois tipos específicos: a validação no laboratório, na qual a validação é executada dentro de um laboratório; e a validação completa, sendo esta realizada de forma interlaboratorial. Neste trabalho foi adotada a validação do tipo no laboratório, seguindo as orientações do guia *Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis* da IUPAC^(8, 70). Os parâmetros definidos para a validação do método são descritos abaixo:

- Aplicabilidade

Fornece informações como identificação dos analitos do método, os limites da faixa de concentração e qual tipo de matriz. Deve descrever também quais equipamentos, reagentes e processos foram utilizados, bem como quaisquer cuidados relacionados ao método.

- Seletividade

É o grau em que um método consegue quantificar os analitos a serem analisados, com precisão, em meio a interferentes. Ao se utilizar o espectrômetro de massas como detector, a seletividade é garantida.

- Curva analítica e linearidade

Com exceção de erros grosseiros na elaboração de materiais de calibração, erros de calibração são, geralmente, um componente menor do orçamento total da incerteza do método. No entanto, existem algumas características de calibração que são úteis para o início da validação do método, porque eles afetam a estratégia para o melhor desenvolvimento do procedimento, entre elas, se a função é linear, se passa pela origem, se sofre modificação pela matriz do material de ensaio.

A linearidade está relacionada a produção de sinais/resultados que sejam diretamente proporcionais as concentrações dos analitos, dentro de uma faixa de

concentração estabelecida. O coeficiente de determinação (R^2) pode ser utilizado a fim de se averiguar o ajuste dos dados. Contudo, ressalta-se que além do R^2 deve-se avaliar se os dados são homocedásticos (homogeneidade das variáveis). Uma forma de fazer isto é por meio de coeficiente de variação das medições realizadas.

Na construção de uma curva analítica deverão ser observados os seguintes critérios:

- ✓ Seis ou mais níveis de calibração;
- ✓ Os níveis de calibração devem estar uniformemente espaçados na faixa de concentração;
- ✓ A faixa de concentração deve ser de 0 a 150% ou de 50 a 150% do valor de concentração esperado em amostras reais;
- ✓ Os níveis de calibração devem ser analisados em, no mínimo, duplicatas e preferencialmente em triplicatas ou mais números de repetição.
- Efeito matriz

Uma maneira de se avaliar o efeito matriz é, usualmente, por adição de analitos, também conhecida por adição de padrão. Este método consiste na adição de um padrão na matriz da amostra e, a adição do mesmo em solvente. Pela diferença entre as respostas dos padrões presentes na matriz, com os padrões que foram adicionados no solvente, se estabelece o quanto a matriz interfere nos sinais obtidos.

- Exatidão

A exatidão é um importante parâmetro, pois estabelece se o método tem a capacidade de quantificar a concentração real da amostra. Existem três maneiras para realização do teste de exatidão:

- i. A primeira se dá pela análise de materiais de referência certificados. Estes materiais são amostras analisadas por laboratórios distintos e estabelece-se seu valor (média entre os laboratórios) e seu respectivo erro (desvio padrão). A resposta obtida pelo método analítico é comparada com os valores de referências intitulados no material;
- ii. A segunda forma de se determinar a exatidão é por uso de um método de referência, naturalmente já validado. As amostras analisadas pelo

método a ser validado são submetidas ao método de referência, de forma que os resultados sejam comparados entre os dois métodos;

- iii. Por fim, quando não há um material de referência certificado, tampouco um método de referência validado, é indicado o uso da técnica de recuperação para determinar a exatidão, também conhecida por “adição e recuperação”. Esta consiste na adição de uma quantidade conhecida de analito na amostra, que após análise deverá apresentar valor próximo ao adicionado. Contudo, salienta-se que em amostras em que apresentam matrizes mais complexas, podem ser aceitos valores de recuperação na faixa de 50 a 120%, com precisão de até $\pm 15\%$ ⁸.

- Precisão

A precisão é a proximidade dos resultados obtidos com os de testes independentes obtidos nas condições estipuladas. Geralmente, é especificado em termos de desvio padrão ou desenvolvimento padrão relativo.

- Limite de detecção e limite de quantificação

Essas figuras de mérito são extremamente importantes, pois indicam a limitação do equipamento quanto a leitura das concentrações em amostras/padrões. Em relação ao limite de detecção do equipamento (LD), este é definido como a menor concentração do analito que pode ser diferenciada do branco. Já o limite de quantificação do equipamento (LQ) estabelece a menor concentração possível de ser determinada, dentro de limites aceitáveis de exatidão e precisão.

Existem 3 maneiras distintas de se calcular os LD e LQ, método visual, método baseado em parâmetros da curva analítica e método da relação sinal/ruído. Como o método da relação sinal/ruído é usualmente utilizado, a validação destes parâmetros será realizada por esse método. Ele consiste na comparação entre a relação sinal/ruído em um padrão de menor concentração da curva analítica. O LD dado pela relação sinal/ruído de 3:1 ou 2:1, já o LQ esta relação é de 10:1. Contudo, ressalta-se que esse método somente pode ser aplicado em procedimentos analíticos que apresentem a relação sinal/ruído na linha de base⁸.

Quanto aos limites de detecção e quantificação do método, LDM e LQM, respectivamente, são definidos a partir do fator de concentração. Além disso, deve considerar a recuperação, LD e LQ do equipamento e o efeito de matriz.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais

- Otimizar a técnica de derivatização online e validar o método para determinar simultaneamente 12 microcontaminantes de preocupação emergente em amostras de esgoto bruto e tratado por GC/MS;

3.2. Objetivos específicos

- Realizar um planejamento fatorial fracionário para avaliar as influências da temperatura do injetor, pressão no injetor/início da coluna e volume de reagente derivatizante na derivatização *online*.
- Utilizar as respostas com maior significância dos experimentos para otimizar o processo de derivatização *online* com uso do modelo de superfície de respostas.
- Após otimização da derivatização *online*, validar o método de determinação de microcontaminantes de preocupação emergente nos termos do guia da IUPAC, 2002.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Reagentes e vidrarias:

- Padrões: 4-nonilfenol, 4-octilfenol, bisfenol A, diclofenaco, estradiol, etinilestradiol, estriol, estrona, genfibrozila, ibuprofeno, naproxeno e paracetamol, todos da Sigma[®] ou Fluka[®] em grau P.A. (para análise).
- Padrão interno utilizado: 4-nonilfenol deuterado (4-n-nonylphenol-2,3,5,6-d₄, OD) CDN isotopes[®].

Reagentes (grau HPLC): metanol (J. T. Backer[®]), bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida com 1% de trimetilclorosilano (BSTFA: 1% TMCS, Sigma[®]), piridina (Merck[®]).

- Frascos de vidro âmbar de 22 mL e 1.000 mL com tampa e batoque em teflon.
- Sistema para filtração à vácuo (funil de vidro, base suporte em vidro esmerilhado, conexão para vácuo, grampo em alumínio e erlenmeyer (2000 mL)), Phox[®];
- Filtros de membrana de celulose (25 µm e 8 µm), Unifil[®];
- Filtros de fibra de vidro (1,2 µm), Sartorius[®];
- Micropipetas de volumes variados (5,000 µL, 1,000 µL, 200,0 µL e 20,00 µL) (Eppendorf[®]);
- pHmetro digital (TECNAL[®]);
- Coluna cromatográfica RTX-5MS, dimensões de 30 m × 0,25 mm × 0,25 µm, faixa de temperatura operacional de -60 a 330 °C;
- Cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas – GC/MS-Shimadzu QP2010S – Plus (Shimadzu[®]), equipado com amostrador automático; controle eletrônico de fluxo e injetor do tipo *split/splitless*.
- *Softwares* utilizados: *Minitab 17[®]* e *Software Statistica Version 10[®]* para análise de dados, planejamentos e superfície de resposta; *Chem Draw Ultra 8.0[®]* para representação gráfica das moléculas e; *GC/MS Solutions - Shimadzu* para aquisição dos cromatogramas.

4.2. Preparo das soluções padrão

Para realizar as análises e curvas de calibração analítica foram preparadas soluções dos padrões de microcontaminantes em metanol, sendo a concentração da solução estoque de 1000 mg.L^{-1} e, a partir desta, foram realizadas diluições para soluções de trabalho.

No preparo da curva analítica foram utilizados 12 analitos, com 7 pontos nos seguintes níveis de concentração: 5; 10; 20; 50; 75; 100 e 150 µg.L^{-1} .

O padrão interno deuterado de 4-nonilfenol, preparado com piridina, em concentração de 150 µg.L^{-1} , sendo utilizado para ressuspender os extratos de amostras, os quais foram, na sequência, derivatizados e analisados por GC/MS. A piridina foi escolhida como solvente da reação por causa de sua eficiência na solubilização de compostos para as reações de silição, além da estabilidade que ela atribui aos derivatizados que são formados. Ela também evita a conversão de EE2 em E1 devido à perda do grupo etinil presente no hormônio sintético⁷¹.

4.3. Análise em amostras de esgoto

4.3.1. Amostragem e pré-tratamento

As amostras foram coletadas no Centro de Pesquisa e Treinamento em Saneamento UFMG/COPASA – CePTS, localizado na Estação de Tratamento de Esgoto Arrudas, em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

Para as análises dos microcontaminantes foram filtrados 200 mL de cada amostra coletada. Para filtração utilizou-se fibra de vidro ($0,7 \text{ µm}$) com 47 mm de diâmetro, para remover materiais particulados. Foram adicionados 10 mL de metanol a cada 1 litro de amostra filtrada, a fim de evitar a degradação microbiológica dos analitos de interesse e armazenadas na geladeira até o momento da extração.

No procedimento de extração dos compostos de interesse, a extração dos fármacos e DEs foi realizada seguindo a metodologia de extração em fase sólida adaptada do Método 1694 da EPA (2007)⁷². Usualmente é a técnica recomendada para extração, inclusive utilizada pela maioria dos trabalhos consultados na literatura^(49, 58, 62).

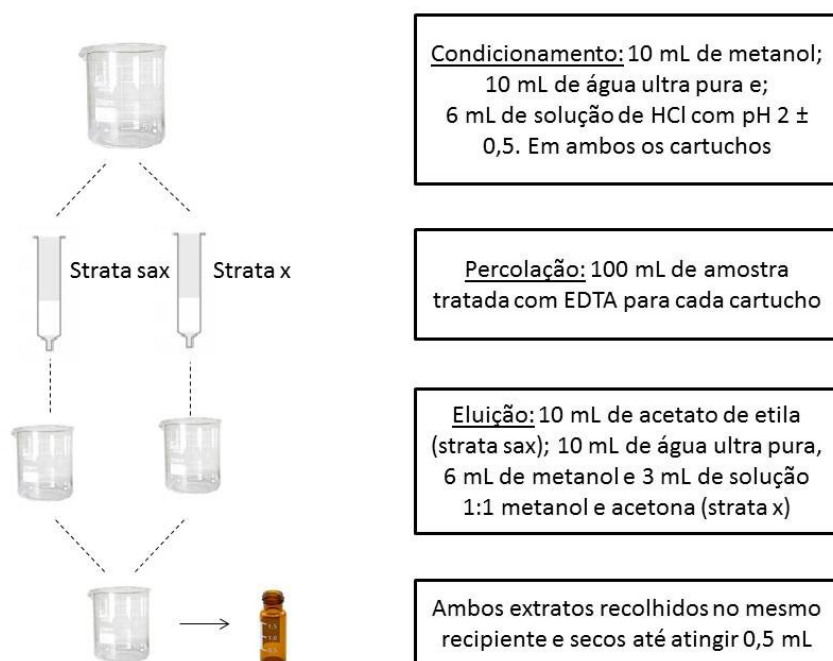
Para *clean-up* das amostras, foram utilizados dois cartuchos específicos, o Strata SAX[®] (500 mg) e o Strata X[®] (500 mg), ambos da marca Phenomenex. No processo de extração em fase sólida, o pH dos 200 mL de efluente filtrado foi ajustado para $2,0 \pm 0,5$ com HCl e acrescentados 50 mg de EDTA, que tem como finalidade acidificar as amostras e complexar metais pesados que podem ser potenciais interferentes nas análises, respectivamente. Após esta etapa, foram colocadas as amostras em repouso por duas horas.

Os cartuchos utilizados foram previamente condicionados com 10 mL de metanol, 10 mL de água ultra pura e 6 mL de água ultra pura acidificada com HCl (pH 2,0) nesta ordem.

Após o condicionamento, foram vertidos 100 mL de amostra para cada cartucho e filtrados a um fluxo de 5 mL/min em ambos. Essa etapa é para percolação dos analitos de interesse no material adsorvente dos cartuchos.

Os cartuchos Strata SAX foram eluídos com 10 mL de acetato de etila. Já os cartuchos Strata X, foram eluídos com 10 mL de metanol e 6 mL de uma mistura metanol e acetona (1:1), conforme figura 4.1. Os extratos foram secos sob fluxo de nitrogênio gasoso e, posteriormente, ressuspensos com 0,4 mL de uma mistura de ácido fórmico e metanol (1:3).

Figura 4. 1: Procedimento adotado de extração em fase sólida.



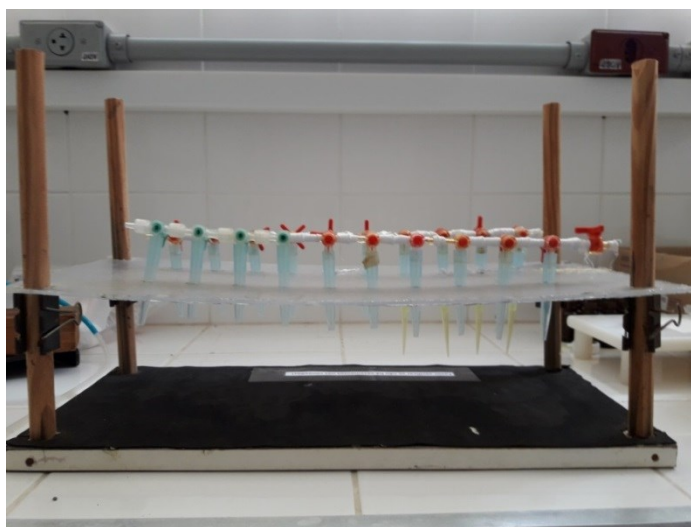
Fonte: Autoria própria.

A amostragem e pré-tratamento das amostras contidas nesse item foram realizados nos laboratórios da UFMG, do programa em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos (SMARH).

4.3.2. Preparo e armazenamento dos extratos

Os extratos de amostras foram ressuspensos com metanol e, após serem homogeneizados, foram retiradas 2 alíquotas, uma de 100 μL de amostra e outra de 70 μL de amostra acrescida de 30 μL de padrão (*spike*) de 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ contendo todos analitos. O *spike* permite verificar o efeito de matriz pela diferença entre o sinal da amostra com a amostra + *spike*. Estes *vials* foram secos com N_2 (figura 4.2) e seus extratos armazenados em *freezer* a temperatura de $-26\text{ }^\circ\text{C}$ até que os testes fossem realizados.

Figura 4. 2: Montagem do aparato para secar as amostras com fluxo de N_2 .



Fonte: Autoria própria.

4.1. Condições Cromatográficas e de Detecção

Os microcontaminantes foram analisados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS) utilizando o equipamento GCMS-QP2010 plus, (Shimadzu®), figura 4.3.

Figura 4. 3: GCMS-QP2010 plus (Shimadzu®).



Fonte: Autoria própria.

As condições cromatográficas seguiram as sugestões do método 1698 da U. S. EPA⁴¹ para GC/MS, com algumas adaptações. Os parâmetros podem ser vistos na tabela 4. O parâmetro temperatura do injetor foi avaliado no trabalho, variando de 260 a 300 °C, diferente do que foi proposto pelo método 1698, não foi seguida a temperatura do mesmo, neste caso 280 °C.

O *liner* utilizado nas análises foi do tipo *Solid Phase Micro Extraction* (SPME), pois tem um diâmetro interno menor, com característica mais restritiva, possibilitando dessa forma, maior contato entre padrão/amostra com reagente derivatizante. As injeções foram efetuadas no modo pré-corrida. Essa configuração faz com que o injetor eleve a temperatura até a qual foi programada, com base nas faixas de temperatura estabelecidas no planejamento fatorial, e somente após atingir a temperatura programada inicia-se a corrida normalmente.

Tabela 3. Condições do GC/MS.

Parâmetros	Condições Utilizadas
Temperatura do injetor	260 a 300 °C
Temperatura da interface	280 °C
Tipo de injetor	Split/splitless
Modo de injeção	Splitless
Fonte de ionização	280 °C

O forno da coluna seguiu as condições de rampa de aquecimento de tal modo que os analitos em estudo tivessem uma boa separação cromatográfica, assim, iniciou-se a programação com uma temperatura de 50 °C por 1 minuto, depois foi elevada a temperatura em 25 °C/min. até atingir 100 °C, após essa faixa, a coluna foi aquecida a uma taxa de 15 °C/min. até 300 °C, por fim, foi mantida a temperatura em 300 °C por 5 minutos. Essas configurações foram utilizadas em conformidade com Thurman⁴² et al. do capítulo – *Injection Port Derivatization for GC/MS-MS: Analysis of Hormones in Water*.

Os analitos foram identificados e quantificados em função de suas razões m/z, sendo escolhidos os íons de maior intensidade para quantificação e os outros íons para identificação (tabela 5). Portanto, foi utilizada a varredura por monitoramento de íon seletivo, em inglês *Selected ion monitoring*, (SIM).

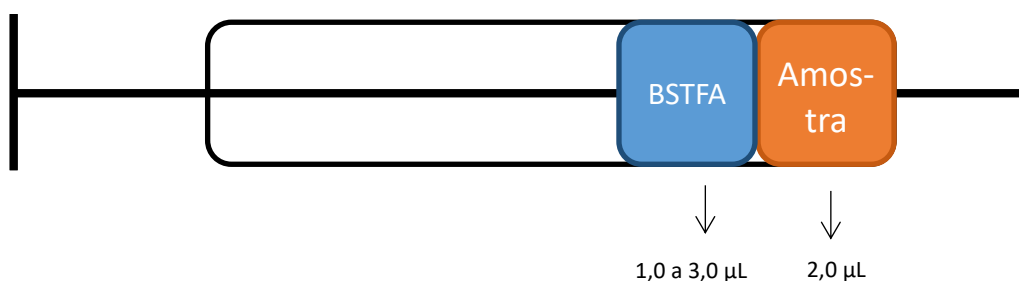
Tabela 4. Relação dos compostos e seus respectivos tempos de retenção, íons selecionados para a quantificação e identificação .

Analitos	Tempo de retenção	Relação m/z para quantificação	Relação m/z para identificação
IBU	9,284	160	263; 234; 117
PCT	9,375	206	280; 116; 295
4OF	10,724	179	180; 278
4NF	11,412	179	292; 277; 149
GEN	11,515	201	194; 122; 185
NPX	12,541	185	287; 243; 302
BPA	13,308	357	372; 207; 359
DCF	13,883	214	242; 367; 277
E1	15,741	342	257; 218; 244
E2	15,940	416	285; 326; 342
EE2	16,528	425	300; 285; 440
E3	17,002	504	311; 345; 386
4NF (deuterado)	11,401	183	296; 299; 185

4.2. Derivatização Online

Os extratos de amostras para derivatização foram ressuspensos com 100 μL de solução de 150 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de padrão interno, neste caso o 4-nonilfenol deuterado. As injeções foram realizadas manualmente com seringa de 10 μL . As injeções foram efetuadas em volumes variados de BSTFA/amostra como apresentado no planejamento experimental (item 4.4), a figura 4.4 esquematiza o processo. Foi injetado um valor fixo de 2 μL da amostra, seguida por reagente derivatizante, tipo sanduíche. A quantidade testada de reagente derivatizante foi de 1,0 a 3,0 μL .

Figura 4. 4: Esquema de seringa com BSTFA e amostra.



Fonte: Autoria própria.

4.3. Planejamento das variáveis

Para realização da derivatização *online* foi executado um planejamento fatorial fracionário 2^{3-1} com ponto central (pc), possibilitando uma triagem com as influências de seus efeitos.

As variáveis investigadas foram:

- Faixa de temperatura do injetor (x_1) com níveis inferior de 80 a 260 $^{\circ}\text{C}$ (aumento de 40 $^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ por 4 minutos); superior de 80 a 300 $^{\circ}\text{C}$ (aumento de 40 $^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ por 5 minutos) e ponto central de 80 a 280 $^{\circ}\text{C}$ (aumento de 40 $^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ por 4,5 min.) (média);
- Pressão do injetor (x_2) com níveis inferior de 20 kPa; superior de 140 kPa e ponto central de 80 kPa (média) e;
- Volume de derivatizante (x_3) com níveis inferior de 1,0 μL , superior de 3,0 μL e ponto central de 2,0 μL (média). Os dados estão dispostos na tabela 3.

Essas variáveis foram escolhidas de acordo com a literatura, a qual apontou estas como apresentando os principais efeitos nas respostas nas otimizações, alguns autores ^(59, 62, 64, 65) utilizaram o volumes de 3 e 4 µL de reagente derivatizante, no entanto, em nenhum caso foi obtido um valor ótimo com esses volumes. Além disso, como se pretende reduzir o volume de reagente a ser utilizado, será interessante o uso de volumes menores.

A concentração dos padrões utilizados no planejamento fatorial foram de 100 µg.L⁻¹. O volume de padrão/amostra injetado foi de 2µL.

Tabela 5. Planejamento fatorial fracionário 2³⁻¹ para testes de derivatização.

Fatores codificados				Fatores originais		
Ensaio	x ₁	x ₂	x ₃	Faixa de Temperatura do injetor (°C)	Pressão (kPa)	Volume de derivatizante (µL)
1	-1	-1	1	80 – 260	20,0	3
2	1	-1	-1	80 – 300	20,0	1
3	-1	1	-1	80 – 260	140,0	1
4	1	1	1	80 – 300	140,0	3
Pc1	0	0	0	50 – 280	80,0	2
Pc2	0	0	0	50 – 280	80,0	2
Pc3	0	0	0	50 – 280	80,0	2

Após essa etapa, e tratamento dos dados, foi efetuada uma superfície de resposta do tipo CCD. O procedimento de derivatização *online* foi baseado em Marsol-Vall⁵⁸ que utilizou injeção tipo sanduíche.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Triagem

No processo de triagem foram avaliadas as influências dos efeitos temperatura, pressão e volume de derivatizante, de acordo com planejamento fatorial fracionado 2^{3-1} proposto. A triagem possibilitou ver quais fatores poderiam ser eliminados e quais deveriam ser investigados com maior profundidade.

A princípio quando foi realizado o levantamento na literatura, a mesma relata que o tempo de purga é um fator relevante, entretanto, ao se realizar os experimentos, foi observado que tanto a temperatura quanto o tempo de purga estão atrelados, pois ao se elevar a temperatura a uma determinada faixa terá um intervalo de tempo em que o analito estará confinado no interior do injetor, portanto, essas duas variáveis são inerentes, logo, tomou-se pressão do injetor/início da coluna como nova variável em vez de tempo de purga. Os fatores investigados estão descritos na tabela 6, a seguir:

Tabela 6. Valores dos efeitos e do parâmetro p ($\alpha = 0,05$) para cada variável estudada no planejamento fatorial fracionário 2^{3-1} com triplicata no ponto central. Os valores em vermelho são os que se mostraram significativos de acordo com o valor de p ($p < 0,05$).

Nome	Temperatura	p (0,05)	Pressão	p (0,05)	Volume	p (0,05)
IBU	16508	0,043	9482	0,115	12208	0,075
PCT*	-	-	-	-	-	-
4OF	81268	0,011	31906	0,067	15704	0,212
4NF	82571	0,020	36841	0,092	10458	0,475
GEN	26651	0,138	3783	0,766	28051	0,127
NPX	63117	0,010	19686	0,087	81955	0,006
BPA	146728	0,003	81167	0,009	82491	0,009
DCF*	-	-	-	-	-	-
E1	10794	0,065	-562	0,864	9751	0,078
E2	19423	0,012	9454	0,047	10375	0,039
EE2	390,5	0,153	1328,5	0,017	-5,5	0,978
E3	5862	0,007	3112	0,026	1703	0,079
4NF D	131875	0,014	66866	0,050	16435	0,403

*: não detectado

A análise dos resultados para os fatores obtidos do planejamento são apresentados a seguir:

5.1.1. Temperatura

Na etapa de triagem observou-se que o efeito temperatura foi estatisticamente significativo para a maioria dos analitos (exceto para genfibrozila, estrona e etinilestradiol). Os analitos paracetamol e diclofenaco não derivatizaram, possivelmente o tempo de contato não foi suficiente para que a substituição por grupos TMS ocorresse.

Como a temperatura foi o fator mais significativo na intensidade do sinal (área), concedeu-se a ela o título de efeito principal. Assim, na elaboração da superfície de resposta, foi atribuída a temperatura uma faixa maior de níveis para maiores informações. Os resultados dos fatores temperatura, pressão e volume de derivatizante se encontram na tabela 6.

5.1.2. Pressão

A pressão, assim como a temperatura, também foi estatisticamente significativa, porém, menos expressiva e somente a metade dos analitos investigados (bisfenol A, estradiol, etinilestradiol, estriol e 4-nonilfenol deuterado) sofreram sua influência.

Como a reação de derivatização pode ocorrer em fase líquida, com o aumento da pressão se espera que tanto o solvente quanto o reagente derivatizante estejam na fase líquida por mais tempo, possibilitando maior efetividade na substituição por meio da silição.

5.1.3. Volume

O volume de derivatizante, terceiro fator investigado, foi significativo apenas para estradiol, bisfenol A e naproxeno. Como a principal finalidade de uma triagem é identificar fatores significativos e eliminar as variáveis que são menos significativas,

o volume de derivatizante foi descartado. Além disso, para que se possa ter uma redução de BSTFA, manteve-se o menor volume utilizado na triagem, neste caso, 1 μL .

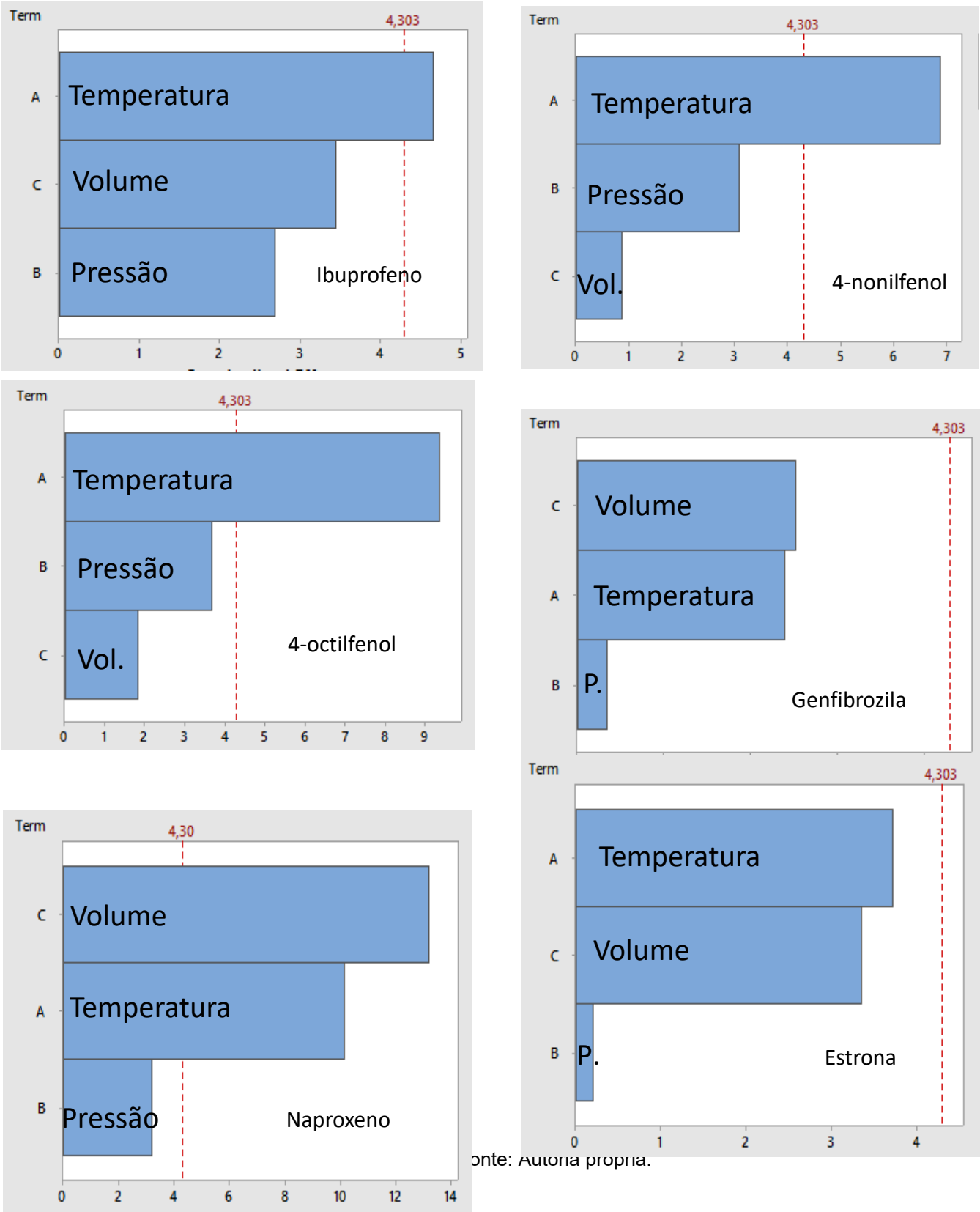
Ao se comparar o valor obtido de 1 μL deste estudo com os encontrados na literatura consultada, esse volume corrobora com os obtidos por Helaleh⁶¹ et al. e Cheng⁶² e colaboradores. Já em relação aos demais autores^{58, 59, 64, 65}, dispostos na tabela 2, o valor encontrado foi menor o que resulta em uma redução expressiva na quantidade de reagente derivatizante, pois, em relação ao método convencional, onde se utiliza nas melhores condições de otimização até 50 μL , o resultado se mostrou 50 vezes menor, o que torna o método mais econômico.

Na realização do método de superfície de resposta foram utilizadas as variáveis temperatura e pressão em relação a área dos picos cromatográficos como resposta. Os trabalhos reportados na literatura encontrada, não fizeram a otimização a partir da triagem seguido de superfície de resposta. Em relação aos volumes de reagente derivatizante, os pesquisadores apenas alternaram os volumes e observaram a melhor resposta, sem a geração de um modelo.

Entre os analitos que não foram detectados pelo método estão paracetamol e diclofenaco, que por suas características, sofreram interferências ao se tentar derivatizar no interior do injetor. O diclofenaco possui um hidrogênio ligado a nitrogênio com impedimento estérico, assim, como é um nucleófilo com certo impedimento, ao se aproximar à molécula de BSTFA a reação não ocorre de forma efetiva. Além disso, como o tempo de contato entre nucleófilo e substrato é curto no interior do injetor (de no máximo 5,5 min.), não há substituição satisfatória no método de derivatização *online*. O paracetamol, assim como o diclofenaco, também é uma molécula com mais de um hidrogênio ativo, porém, menos impedido. Era esperado que sua derivatização ocorresse sem maiores problemas, entretanto, não foi observado sinais da formação da espécie substituída. Nas figuras 5.1 e 5.2 são apresentados os gráficos de pareto dos analitos investigados.

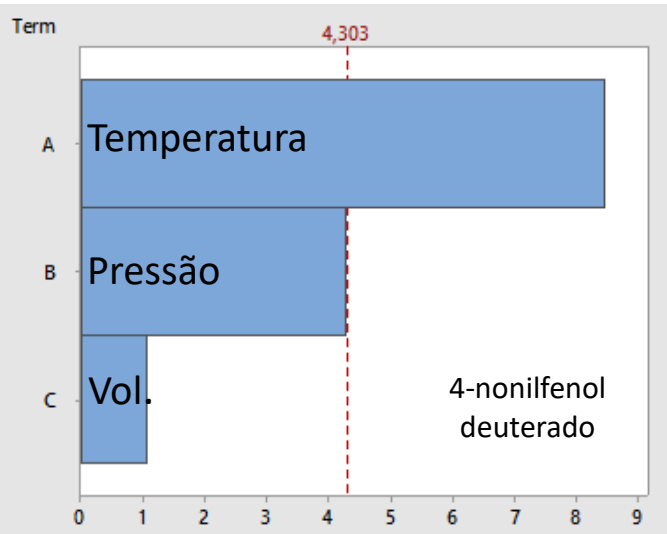
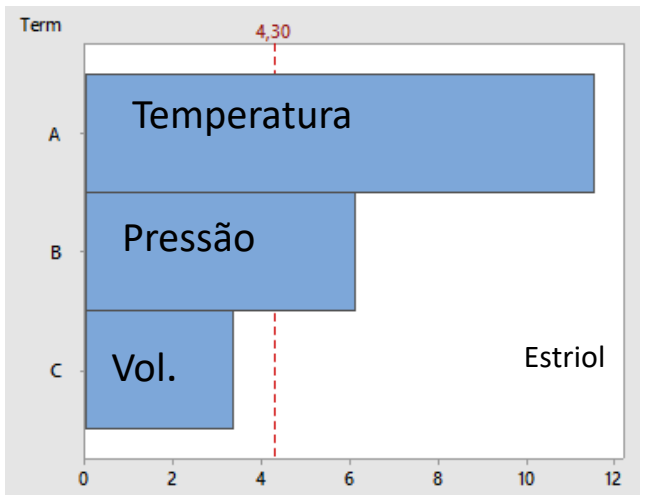
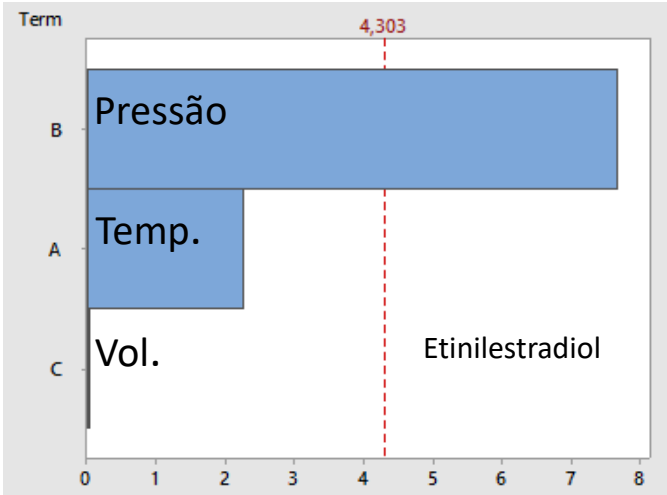
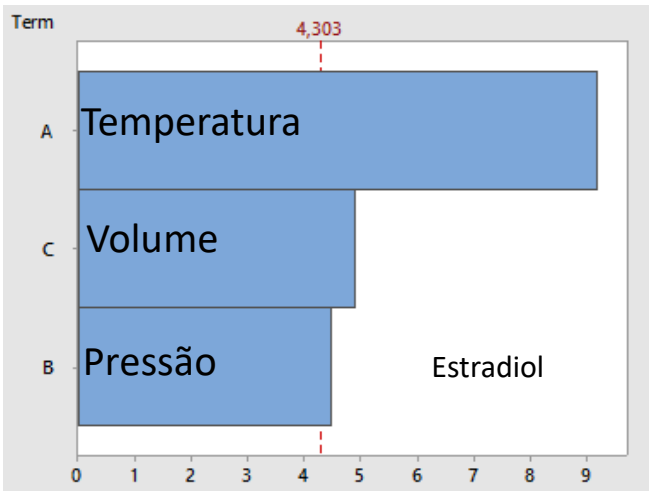
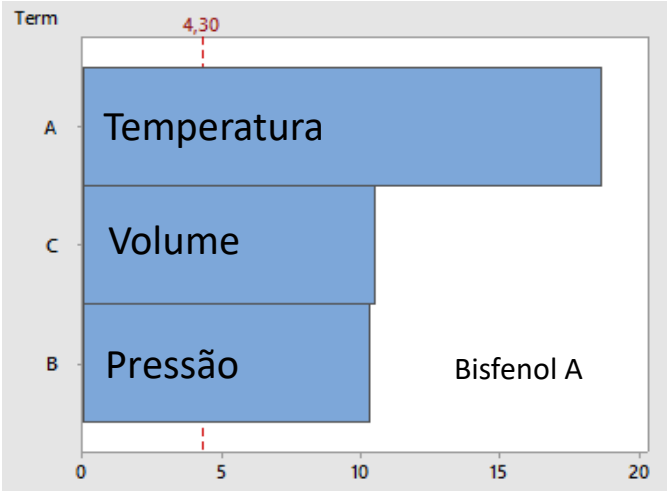
Em posse dessas informações, foram realizadas superfícies de resposta para descobrir as condições ótimas de derivatização.

Figura 5. 1: Diagramas de pareto dos analitos com as variáveis investigadas na triagem.



Fonte: Autoria própria.

Figura 5. 2: Diagramas de pareto dos analitos com as variáveis investigadas na triagem (continuação).



Fonte: Autoria própria.

5.2. Superfície de resposta

O método de superfície de resposta foi utilizado para encontrar as condições ótimas para a derivatização *online*. Para isso, utilizou-se a triagem, que permitiu averiguar, por meio dos dados obtidos que dentre os fatores analisados, a temperatura e pressão foram os mais relevantes.

Os valores de temperatura foram elevados de 260 até 315 °C. A escolha do limite superior da temperatura se deu por dois motivos, em primeiro, por causa da coluna capilar utilizada (RTX-5MS) possuir temperatura operacional de -60 a 330 °C. Em segundo, o uso de temperaturas muito altas pode ocasionar a decomposição térmica de alguns analitos, impossibilitando a sua detecção. Já a pressão teve como faixa de trabalho 80 a 140 kPa, esta foi elevada para observar se poderia melhorar as áreas obtidas, pois com seu aumento tanto o solvente quanto derivatizante estariam por mais tempo em fase líquida e, conseqüentemente, com maior contato.

A superfície de resposta foi gerada com 2 fatores, obtendo 13 experimentos, sendo 4 pontos fatoriais, 4 pontos axiais e 5 pontos centrais. Abaixo está disposta a tabela 7, que apresenta os parâmetros usados na superfície de resposta.

Tabela 7. Superfície de resposta com 2 fatores contínuos.

Ordem	Fator codificado x_1	Fator codificado x_2	Temperatura do injetor (°C – x_1)	Pressão (kPa – x_2)
1	-1	-1	260,0	80,0
2	1	-1	315,0	80,0
3	-1	1	260,0	140,0
4	1	1	315,0	140,0
5	-1,41	0	248,6	110,0
6	1,41	0	326,4	110,0
7	0	-1,41	287,5	67,6
8	0	1,41	287,5	152,4
9	0	0	287,5	110,0
10	0	0	287,5	110,0
11	0	0	287,5	110,0
12	0	0	287,5	110,0
13	0	0	287,5	110,0

Após a realização do experimento, foram geradas superfícies de resposta para otimizar a derivatização. Os modelos quadráticos foram obtidos por CCD e os

resultados analisados por ANOVA, com 95% de confiança. O ajuste dos modelos a partir dos dados obtidos pode ser avaliado em função da razão da média do quadrado da regressão (MQ_{reg}) pela média do quadrado do resíduo (MQ_{res}), equação 1. Dessa forma, o valor é comparado usando a distribuição de *Fisher* (teste F). Assim, o valor será estatisticamente significativo para essa relação se F calculado for maior que o valor tabelado para F^{73} .

$$\frac{MQ_{reg}}{MQ_{res}} \approx F_{v_{reg}, v_{res}} \quad (1)$$

Sendo v_{reg} e v_{res} os graus de liberdade de regressão e resíduo, respectivamente. Outra forma de avaliar a significância é utilizar a relação entre a média do quadrado da falta de ajuste (MQ_{fda}) pela média do quadrado do erro puro (MQ_{ep}), equação 2. Também é aplicado o teste F para avaliar sua significância. Mas neste caso para que o modelo se apresente satisfatório, o valor de F calculado deve ser menor que F tabelado^{73, 74}.

$$\frac{MQ_{fda}}{MQ_{ep}} \approx F_{v_{fda}, v_{ep}} \quad (2)$$

Sendo v_{fda} e v_{ep} os graus de liberdade de falta de ajuste e erro puro, respectivamente. Logo, para um modelo adequado os dados devem atender as duas condições acima apresentadas. Na tabela 8 se encontram os valores de p para as regressões e também a análise quanto à falta de ajuste dos modelos gerados, as tabelas com os resultados da anova estão dispostas no apêndice.

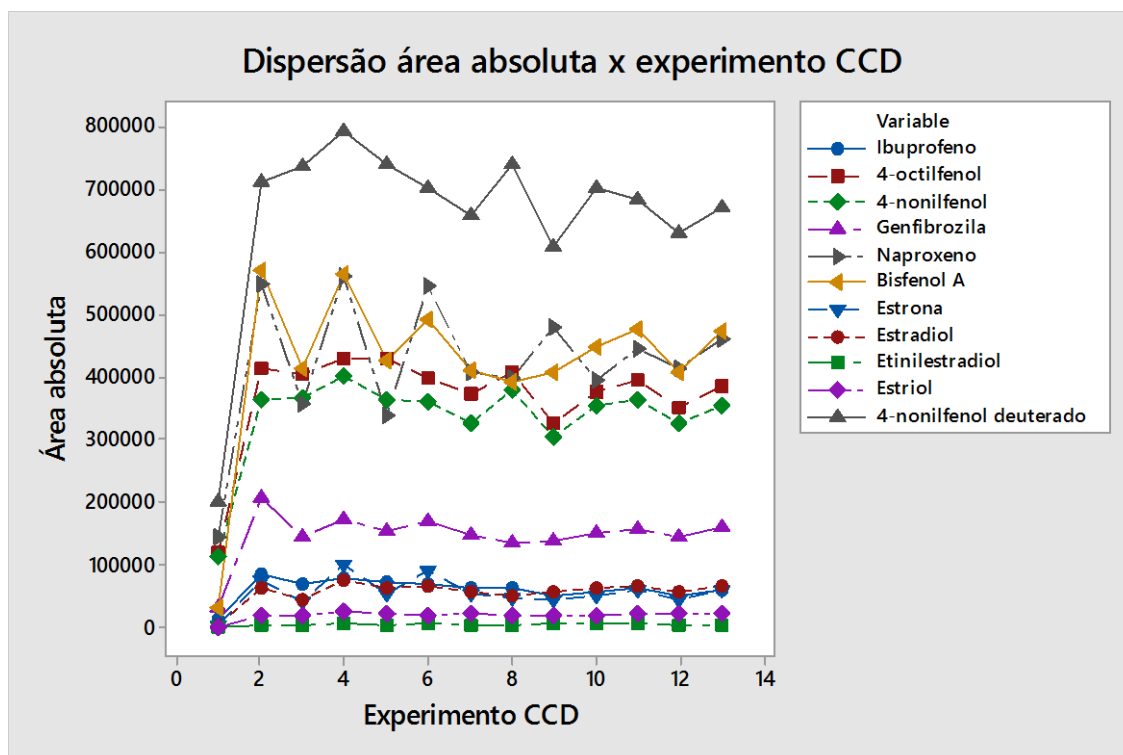
Tabela 8. Valores de regressões e valor de p dos modelos obtidos

Nome	Valor p - regressão	Valor p – falta de ajuste	Equação do modelo de regressão	R ²
IBU	0,5190	0,3661	$y = 1041564 - 6118x_{i1} - 1815x_{i2} + 10,08 x_{i1}^2 + 3,78 x_{i2}^2 + 3,14 x_{i1}.x_{i2}$	0,3969
PCT	-	-	-	-
4OF	0,3605	0,5654	$y = 2866322 - 15448x_{i1} - 4618x_{i2} + 24,5x_{i1}^2 + 7,28x_{i2}^2 + 11,1x_{i1}.x_{i2}$	0,4825
4NF	0,4856	0,2601	$y = 2206728 - 10043x_{i1} - 7482x_{i2} + 13,0x_{i1}^2 + 5,7x_{i2}^2 + 22,7 x_{i1}.x_{i2}$	0,4144
GEN	0,3089	-	$y = 1407542 - 8020 x_{i1} - 2045x_{i2} + 13,33x_{i1}^2 - 0,11x_{i2}^2 + 5,6x_{i1}.x_{i2}$	0,5127
NPX	0,0132	0,0630	$y = -3350888 + 12716x_{i1} + 24033x_{i2} - 3,3x_{i1}^2 - 25,6x_{i2}^2 - 60,8x_{i1}.x_{i2}$	0,8281
BPA	0,4444	0,2983	$y = 1766408 - 9837x_{i1} - 1444x_{i2} + 16,4x_{i1}^2 - 18,1x_{i2}^2 + 17,5x_{i1}.x_{i2}$	0,4363
DCF	-	-	-	-
E1	0,0053	0,4334	$y = 1473480 - 8892 x_{i1} - 3972x_{i2} + 13,74x_{i1}^2 - 0,50x_{i2}^2 + 14,09x_{i1}.x_{i2}$	0,8697
E2	0,1696	0,6841	$y = 65375 + 105x_{i1} - 703x_{i2} - 1,33x_{i1}^2 - 7,00x_{i2}^2 + 7,67x_{i1}.x_{i2}$	0,6085
EE2	0,4110	0,1943	$y = -42662 + 229x_{i1} + 222x_{i2} - 0,400x_{i1}^2 - 1,131x_{i2}^2 + 0,122x_{i1}.x_{i2}$	0,4543
E3	0,7134	0,1950	$y = -47959 + 474x_{i1} - 6x_{i2} - 1,04x_{i1}^2 - 1,60x_{i2}^2 + 1,24x_{i1}.x_{i2}$	0,2949
4NF D	0,2137	0,5544	$y = 4770424 - 24279x_{i1} - 11268x_{i2} + 36,7x_{i1}^2 + 18,5x_{i2}^2 + 27,7x_{i1}.x_{i2}$	0,5750

Após análise foi observado que apenas naproxeno e estrona apresentavam modelamento quadrático CCD que se ajustaram, valores de $p < 0,05$. Os modelos de superfície de resposta podem ser baseados em considerações teóricas ou empíricas. Quando um modelo teórico não pode ser especificado em uma investigação experimental (o caso usual), modelos polinomiais são frequentemente usados para aproximar a superfície de resposta⁷⁵.

Os valores de R^2 não foram satisfatórios, além da falta de ajuste dos modelos quadráticos. Dessa forma, não havendo possibilidade de prever as melhores condições operacionais por meio dos modelos, foram escolhidos os melhores resultados de áreas gerados no experimento. Então, por meio de dispersão (figura 5.3.) foram estabelecidas as melhores condições de trabalho. Entenda-se como melhores condições como a maior quantidade de analitos com áreas mais elevadas por experimento (eixo das abscissas).

Figura 5. 3: Analitos que apresentaram as melhores condições experimentais.

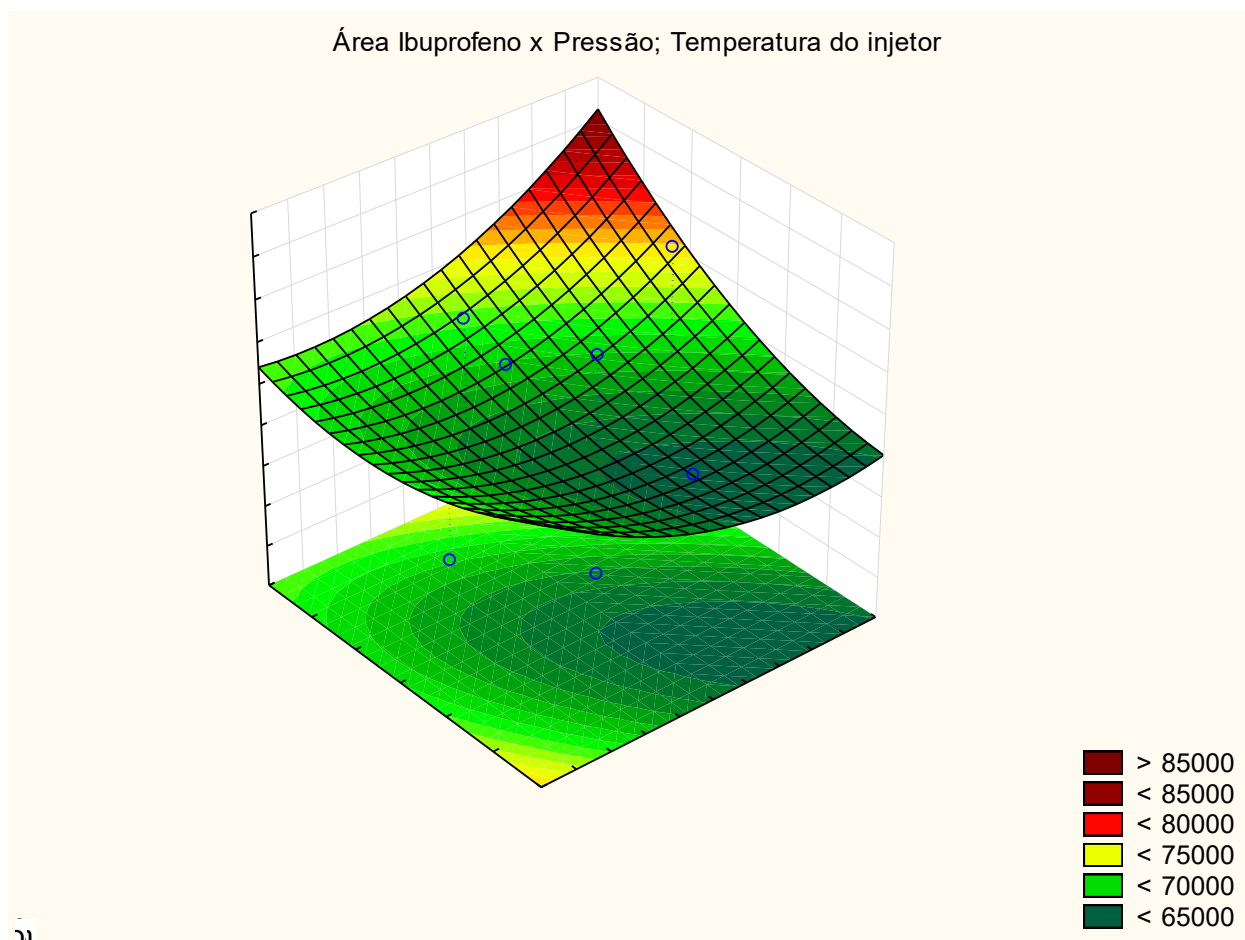


Fonte: Software Minitab 17®.

As condições do experimento que apresentaram maiores áreas dos analitos foram a 2ª (80 kPa e 315 °C) e 4ª (140 kPa e 315 °C), sendo esta última a que possuía melhores respostas, no caso, sete (seis analitos mais o padrão interno 4NFD).

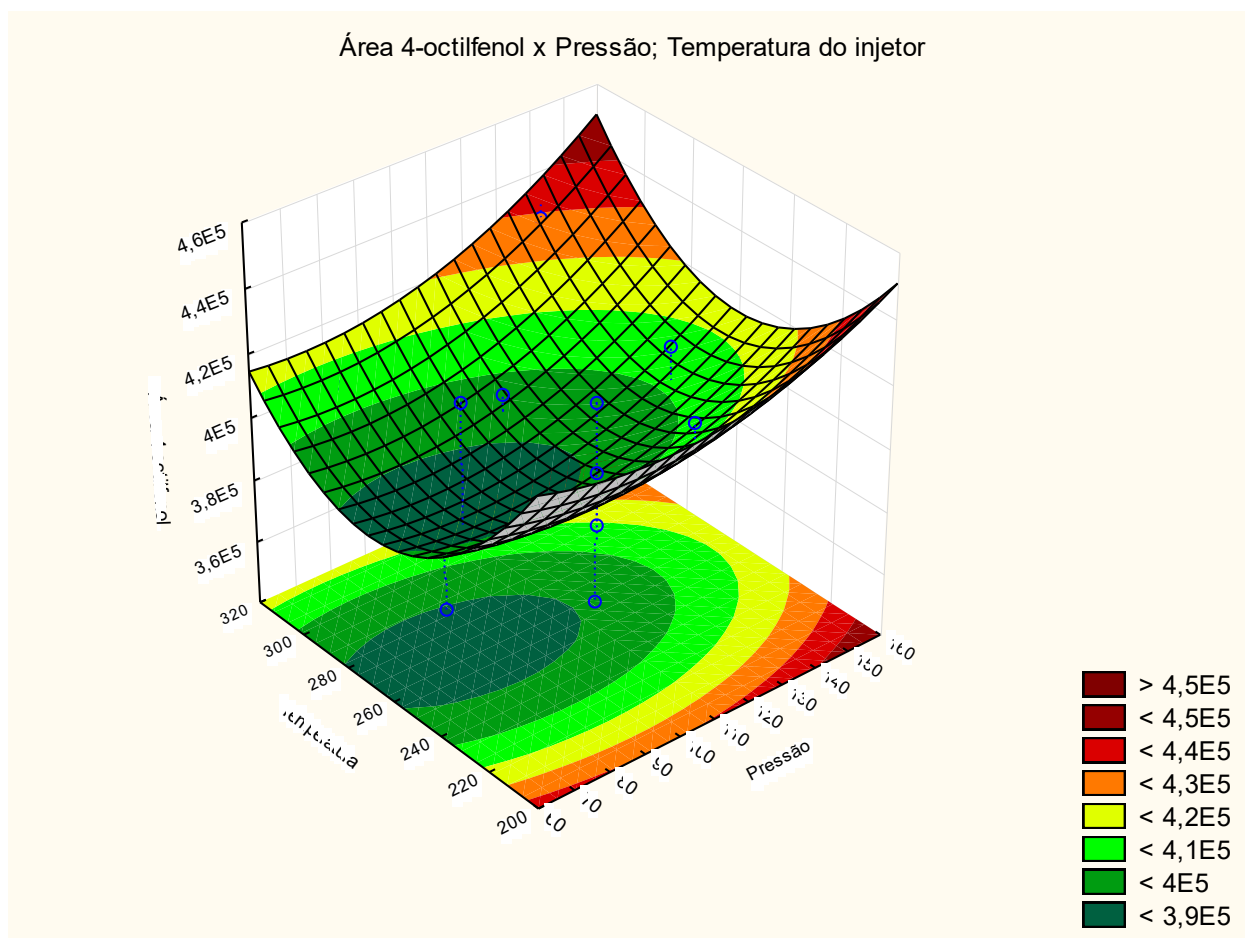
A temperatura foi o fator determinante na otimização, assim, pelo fato de a 4ª condição apresentar melhores condições, foi estabelecido como ponto ótimo na investigação da superfície de resposta. Deste modo, as curvas analíticas e demais etapas de validação foram executadas seguindo essas condições. As superfícies de resposta geradas para cada analito se encontram abaixo (figuras 5.4 a 5.14).

Figura 5. 4: Superfície de resposta gerada para o Ibuprofeno.



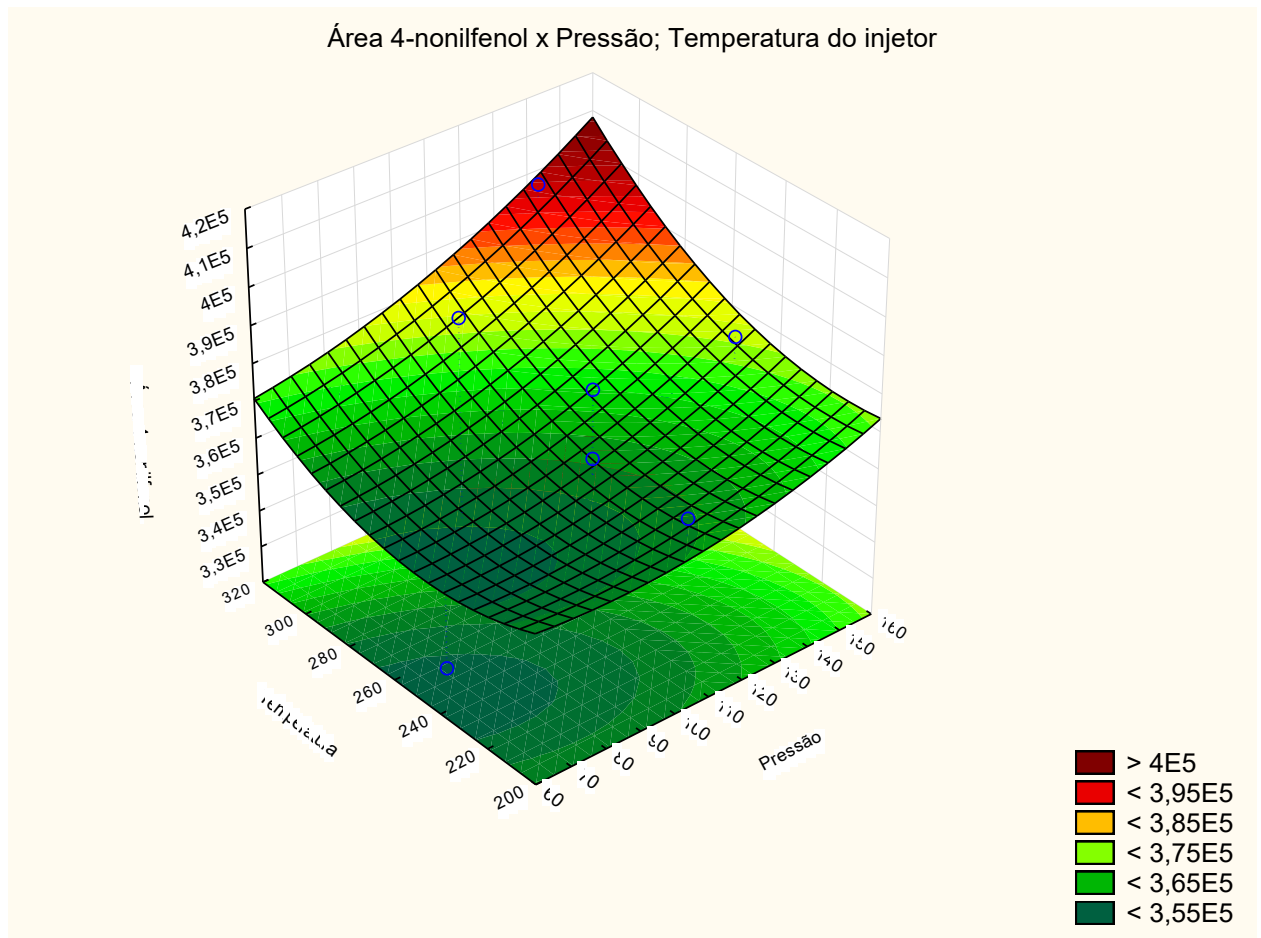
Fonte: *Software Statistica Version 10®*.

Figura 5. 5: Superfície de resposta gerada para o 4-octilfenol.



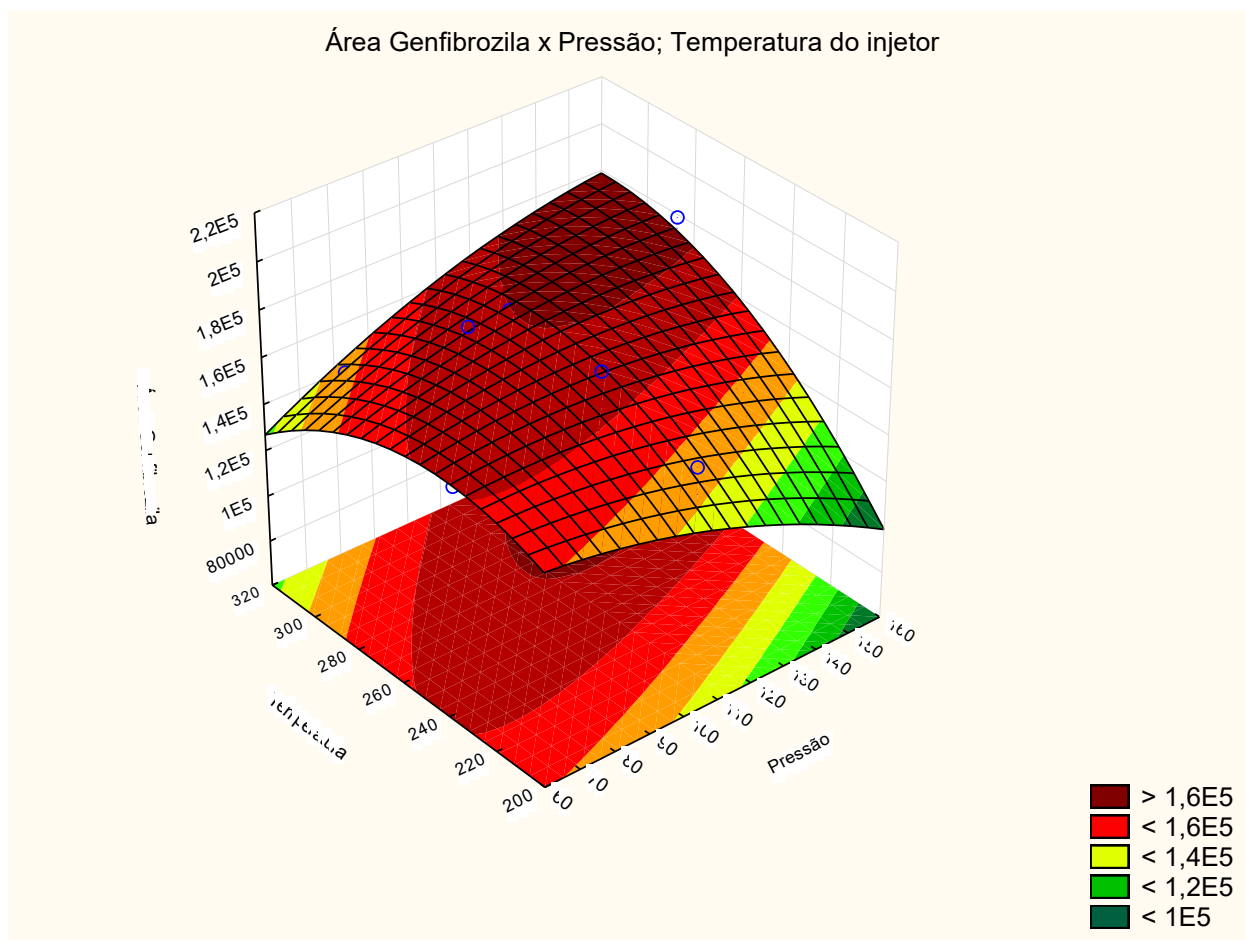
Fonte: Software Statistica Version 10®.

Figura 5. 6: Superfície de resposta gerada para o 4-nonilfenol.



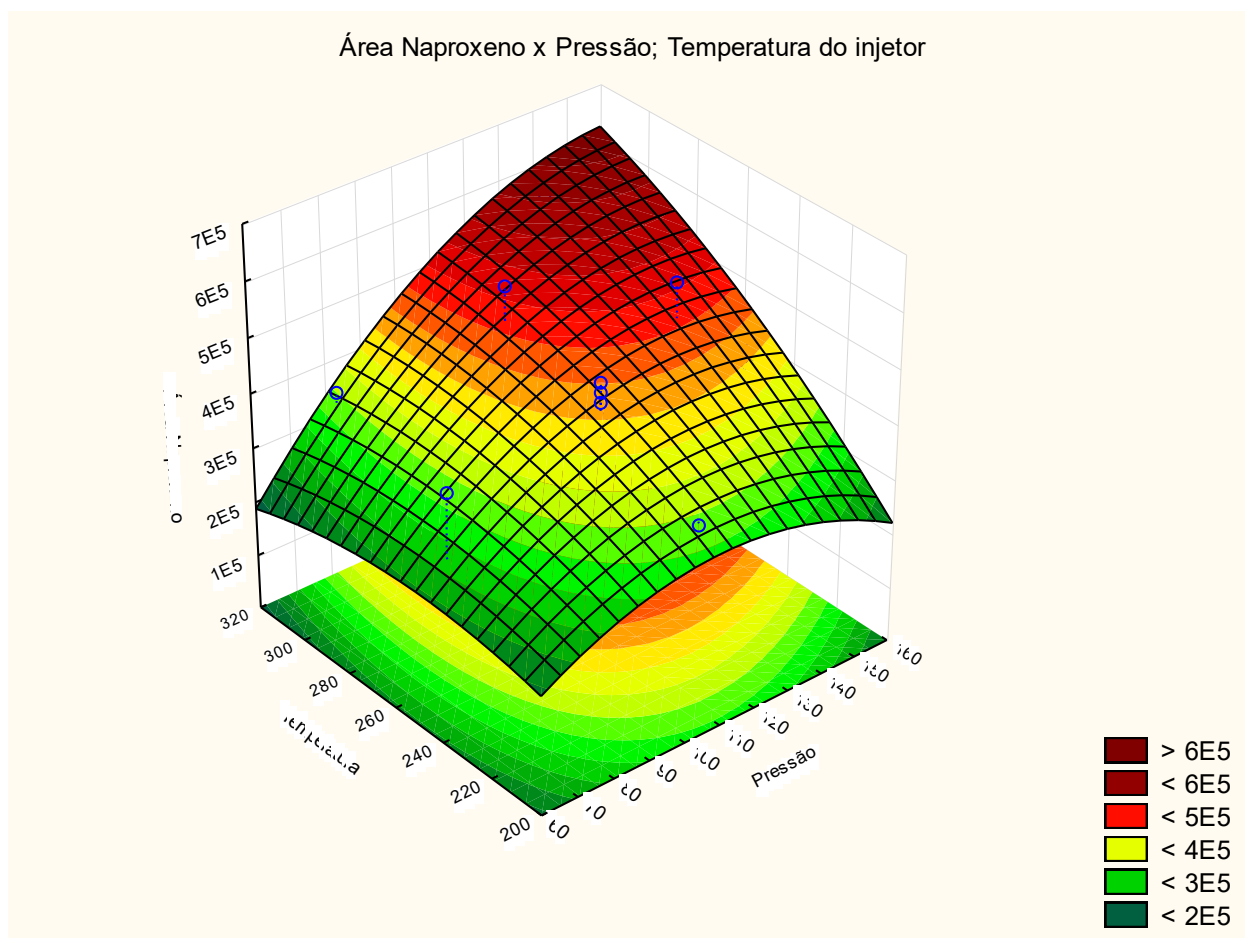
Fonte: Software Statistica Version 10®.

Figura 5. 7: Superfície de resposta gerada para a Genfibrozila.



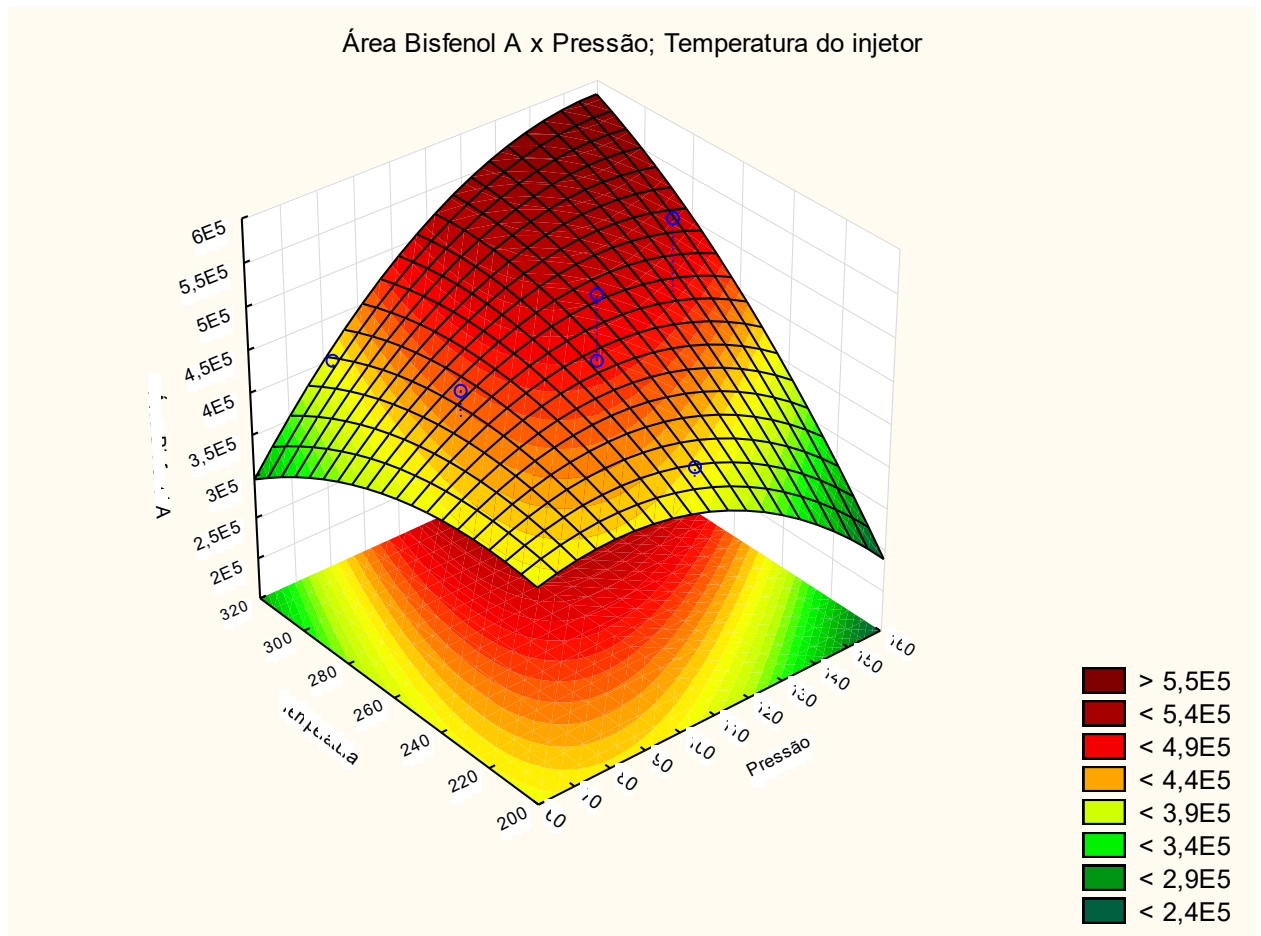
Fonte: Software Statistica Version 10®.

Figura 5. 8: Superfície de resposta gerada para o Naproxeno.



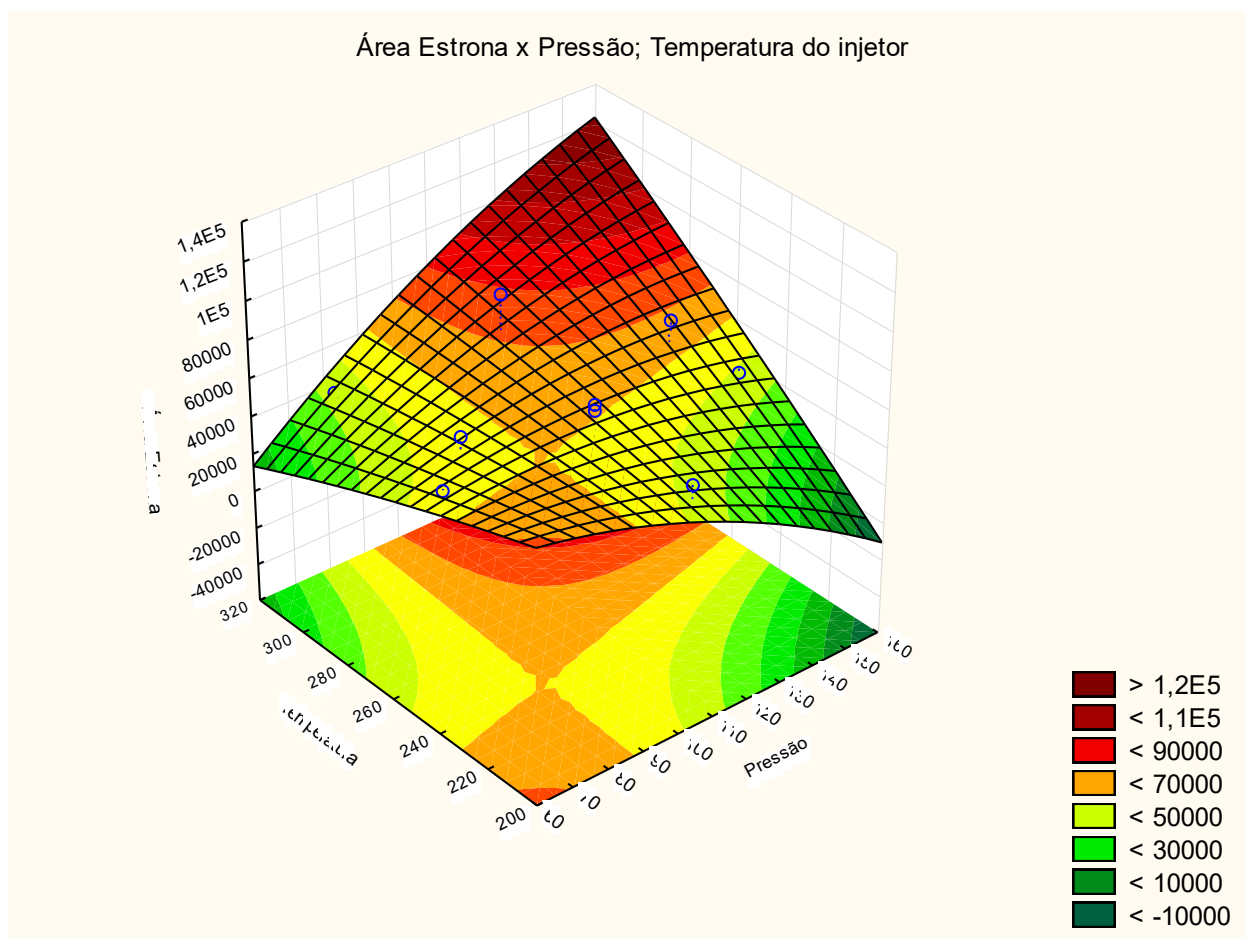
Fonte: Software Statistica Version 10®.

Figura 5. 9: Superfície de resposta gerada para o Bisfenol A.



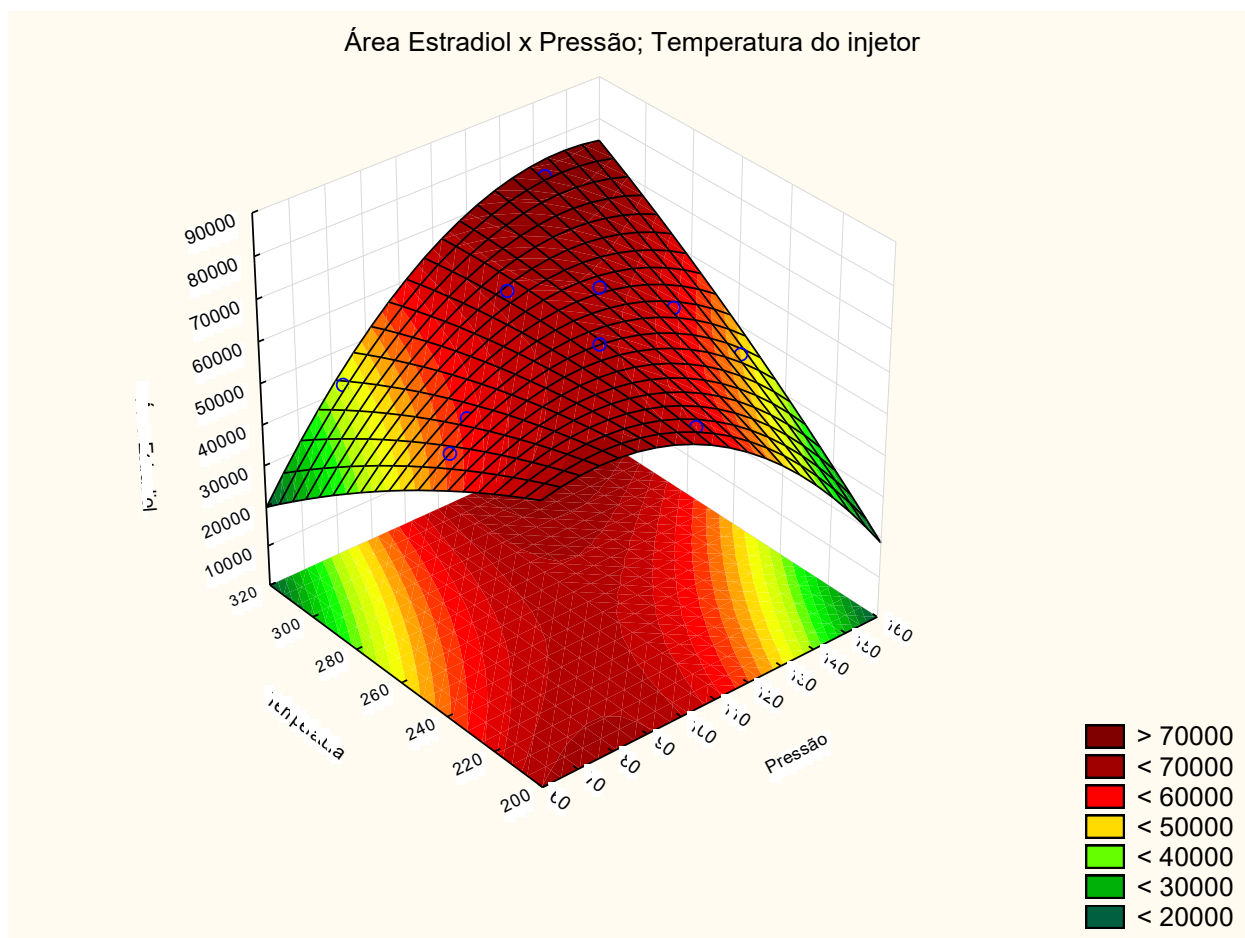
Fonte: *Software Statistica Version 10®*.

Figura 5. 10: Superfície de resposta gerada para a Estrona.



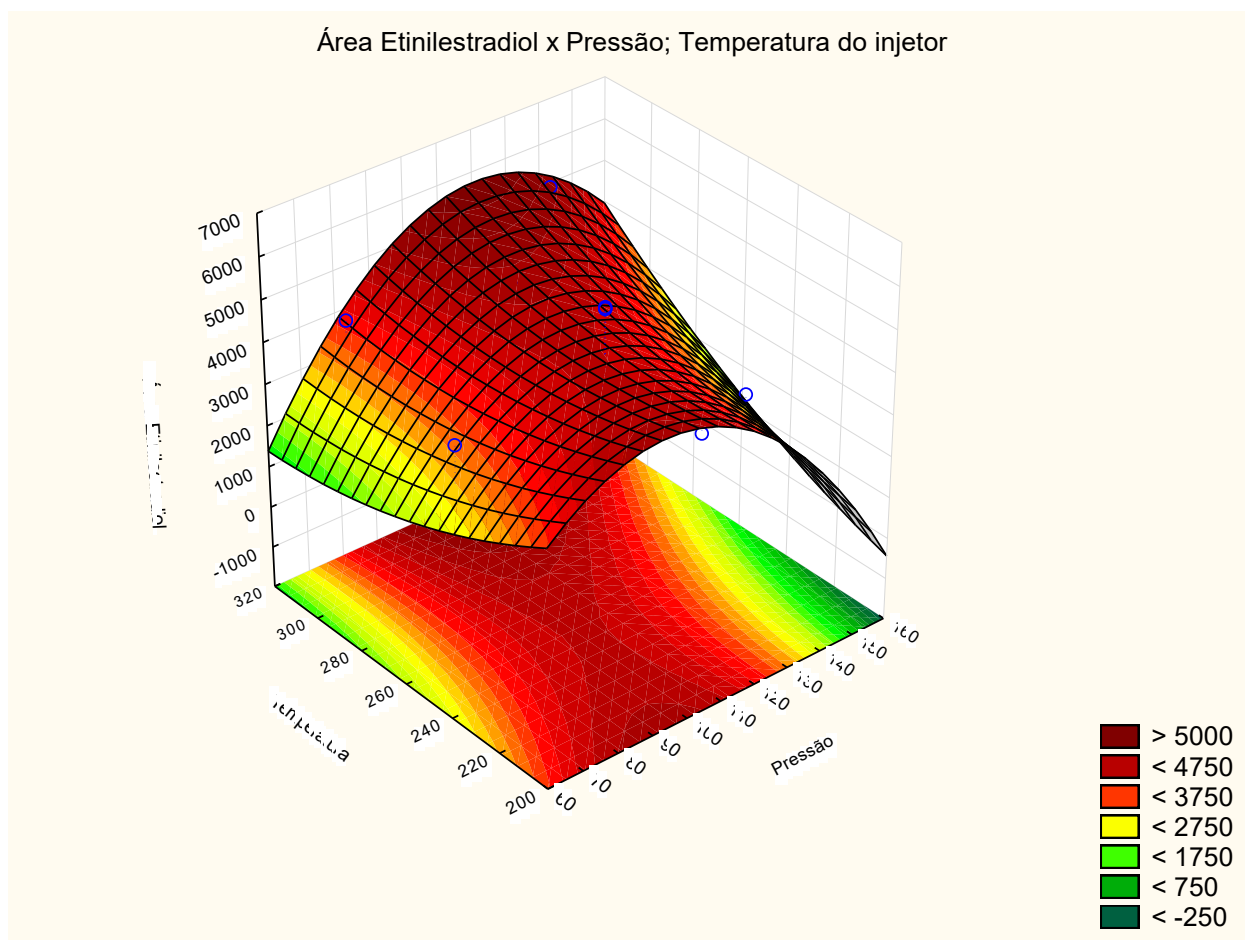
Fonte: Software Statistica Version 10®.

Figura 5. 11: Superfície de resposta gerada para o Estradiol.



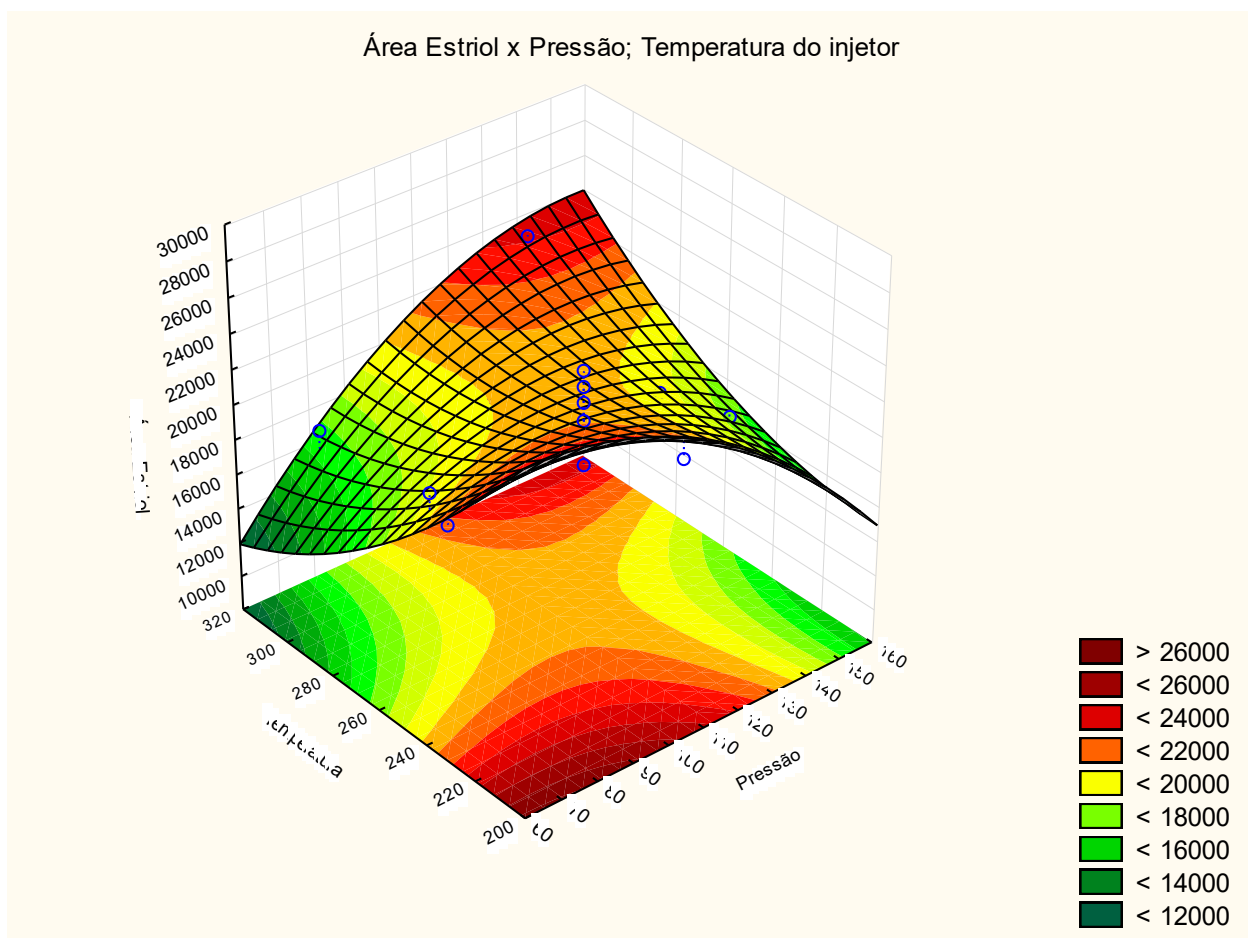
Fonte: Software Statistica Version 10[®].

Figura 5. 12: Superfície de resposta gerada para o Etinilestradiol.



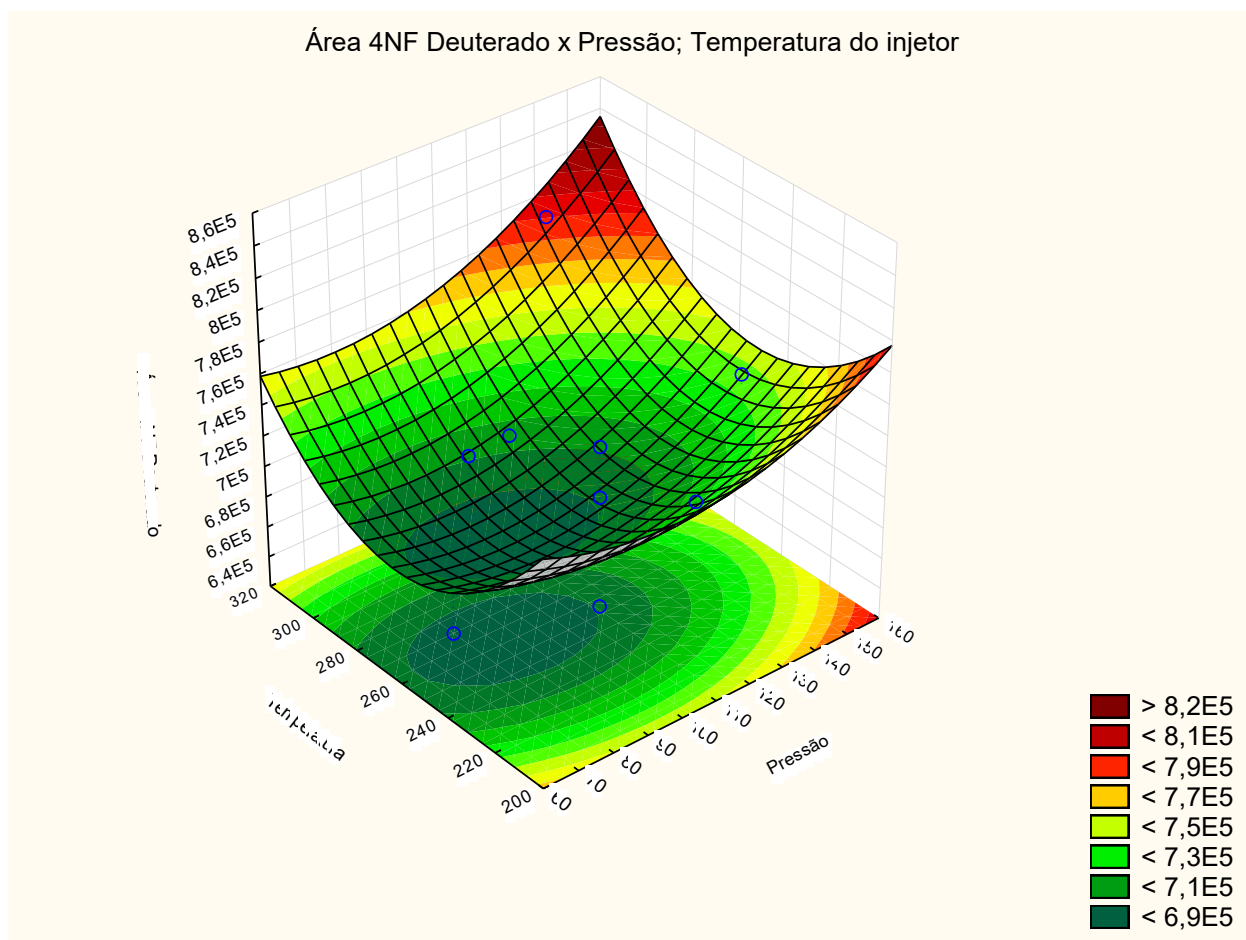
Fonte: Software Statistica Version 10®.

Figura 5. 13: Superfície de resposta gerada para o Estriol.



Fonte: Software Statistica Version 10[®].

Figura 5. 14: Superfície de resposta gerada para o 4-nonilfenol deuterado.



Para que o comportamento dos analitos fosse compreendido de forma mais clara, os mesmos foram organizados de acordo com a quantidade de substituições por grupos TMS, visando avaliar os padrões nas superfícies.

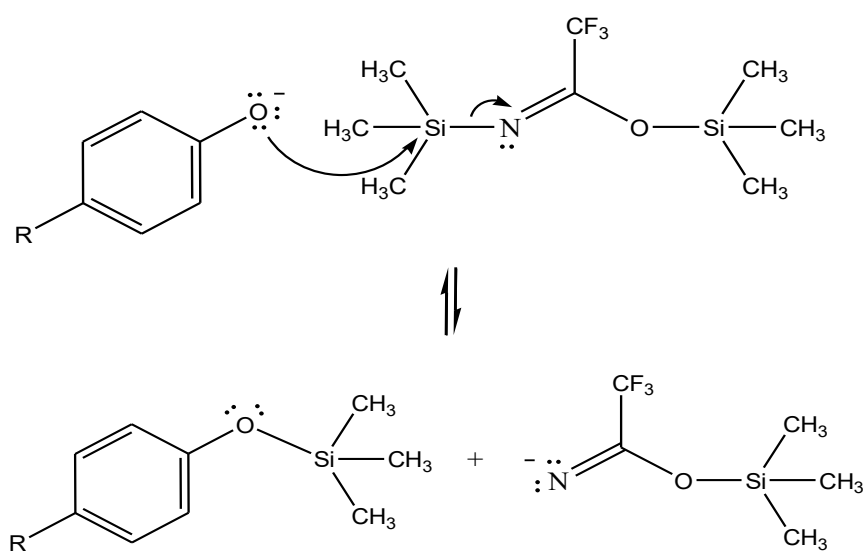
5.2.1. Uma substituição por TMS

Dos analitos investigados, cinco deles apresentam apenas um hidrogênio ativo para substituição, são eles IBU, 4OF, 4NF, GEN, NPX e E1. As superfícies destes contaminantes seguiram um padrão em que a concavidade ficou voltada para cima. Este tipo de função apresenta dois ou mais pontos de máximo.

Vários autores acreditam que a reação de sililação é reversível. Ela envolve um mecanismo de substituição nucleofílica bimolecular⁷⁶. Em relação aos máximos, os mesmos se apresentam em função do deslocamento do equilíbrio químico, em estado gasoso o aumento da pressão favorece a formação dos produtos que gerem um menor volume. Assim, o equilíbrio se deslocará no sentido da formação do analito substituído com TMS em condições de maior temperatura e pressão. Entretanto, foi observado que em condições de baixa pressão também formava-se um máximo, com área ligeiramente menor que as condições que apresentam máxima pressão e temperatura de trabalho. Na região intermediária entre essas duas condições formou-se um mínimo, indicando uma menor conversão do analito substituído, uma vez que a reação pode ser reversível.

Os analitos investigados que são mono-substituídos, 4OF e 4NF o hidrogênio ativo está ligado à função fenol. Esta possui a segunda maior reatividade entre as séries de funções passíveis de derivatização, o que justifica estes compostos em sua maioria, apresentarem as maiores áreas. Como a afinidade da sililação em álcoois é diretamente proporcional à acidez destes compostos ($\text{CH}_3\text{OH} > \text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} > \text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$)⁷⁶, isto explica o motivo do 4OF apresentar áreas levemente superiores ao 4NF. O mecanismo da reação está representado na figura 5.15.

Figura 5. 15: Mecanismo de reação de sililação.



R: radicais nonil ou octil

Fonte: Software Chemdraw Ultra 8.0®.

IBU, GEN e NPX o hidrogênio ativo está ligado à função ácido carboxílico (COOH). Essa função tem por característica ser menos reativa em relação às funções álcoois e fenóis. Essa menor afinidade pode ser devido ao impedimento estérico, dificultando a aproximação do substrato (BSTFA). A acidez destes compostos também está diretamente relacionada com a afinidade com o derivatizante. Compostos mais ácidos doam seu hidrogênio com maior facilidade, além destas espécies desprotonadas possuírem maior reatividade.

Salienta-se, no entanto, que apenas as superfícies do NPX e E1 apresentaram ajuste no seu modelo, desta forma, as demais superfícies apresentam um comportamento que sugere uma tendência, não podendo ser utilizadas para prever com precisão as condições ótimas para o comportamento na sililação dos analitos.

5.2.2. Duas substituições por TMS

Os compostos que possuem dois hidrogênios ativos são E2, EE2 e BPA. Em relação aos analitos mono-substituídos, eles apresentaram área levemente inferior. Como eles foram monitorados na forma di-substituída, possivelmente no interior do injetor houve tanto a formação de derivatizados com um e dois grupos TMS. As substituições incompletas e instabilidade de alguns analitos derivatizados pode causar perda no sinal analítico. Os modelos destes analitos também não apresentaram ajuste.

São 3 pontos a serem considerados nas superfícies dos analitos di-substituídos. Como inicialmente a função é crescente, ao se fornecer energia para o sistema (aumento da temperatura) a taxa de compostos com dois grupos TMS aumenta. Os analitos mono-substituídos possuem maior tempo de retenção em relação aos di-substituídos, pois são mais polares devido a presença de um hidrogênio ativo. Assim, não são registrados seus respectivos sinais analíticos. Com a elevação da temperatura os sinais analíticos destes compostos aumentam ao se converterem em espécies di-substituídas. Em seguida, o máximo destes compostos é atingido (parte mais alta da superfície), ponto este onde são encontrados majoritariamente analitos di-substituídos. Contudo, ao se continuar elevando a

temperatura inicia-se uma etapa decrescente da função. Nesse ponto diminui-se a quantidade de espécies di-substituídas, provavelmente devido à decomposição térmica destes analitos, além da possibilidade de ocorrerem reações paralelas. Dessa forma os analitos apresentarão um sinal analítico menor no detector.

Quanto aos hormônios, EE2 foi o que apresentou a menor área absoluta. Um ponto interessante é que quando o mesmo é derivatizado em presença de E1, ele pode ser convertido em estrona, causando uma redução significativa em sua área e superestimação da estrona, como observado por Shareef⁷⁷ e colaboradores. Esses autores estimaram que até 42% de EE2 foi convertido em E1 ao se derivatizar com BSTFA. Além disso, os autores consideram que o processo pode ocorrer tanto na etapa de derivatização quanto durante a separação cromatográfica.

5.2.3. Três substituições por TMS

O único composto que apresenta a forma tri-substituída é o estriol. Sua curva tem um comportamento similar aos compostos que sofrem duas substituições. Deve-se salientar que pelo fato de E3 sofrer mais substituições, sua área absoluta é menor que a maioria dos analitos, exceto a do EE2, já discutida anteriormente.

O método proposto, após otimização, foi submetido ao processo de validação nas condições ótimas obtidas, que são 140 kPa de pressão e 315 °C de temperatura do injetor. As figuras de mérito avaliadas na validação estão no item subsequente.

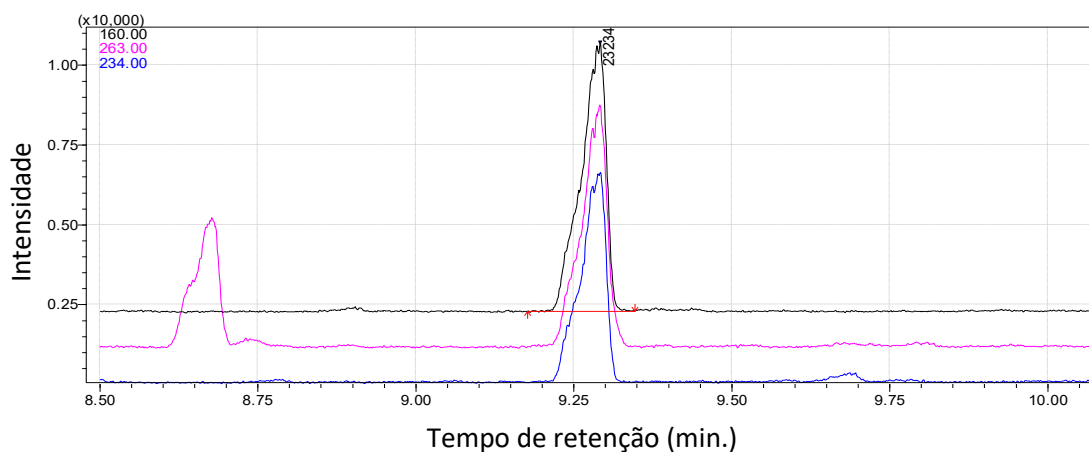
5.3. Validação do método

5.3.1. Seletividade

A técnica de cromatografia gasosa em si já é seletiva, somado a isso, foi utilizado um espectrômetro de massas como detector com analisador do tipo quadrupolo, que é outra técnica com alta seletividade. Desse modo a seletividade do método foi garantida com o uso dessas duas técnicas combinadas. Nas figuras 5.16 e 5.22 são representados alguns cromatogramas dos analitos investigados, que relacionam os

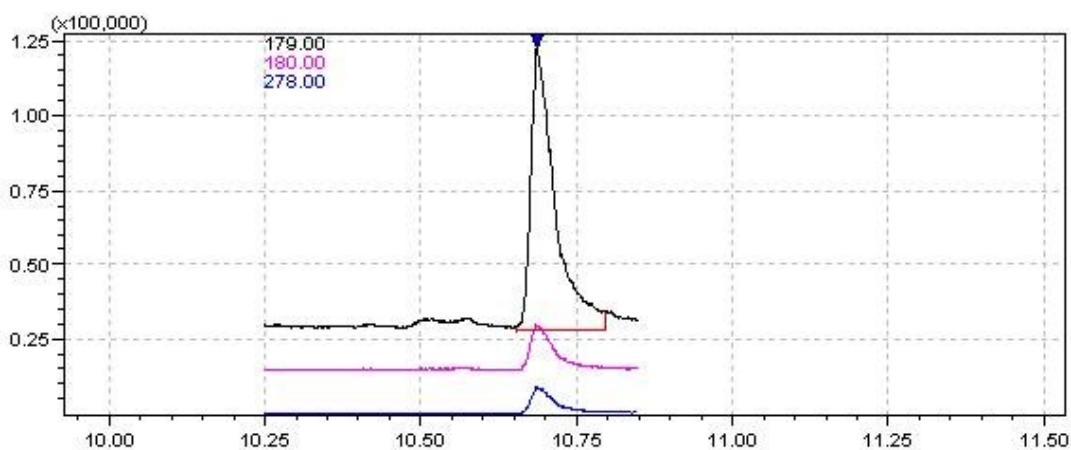
íons monitorados com seus respectivos tempos de retenção. Pode-se observar que tanto os íons de quantificação (em preto) quanto os de identificação (demais cores) apresentando mesmo tempo de retenção, permitindo uma confirmação satisfatória.

Figura 5. 16: Cromatograma dos íons monitorados do ibuprofeno.



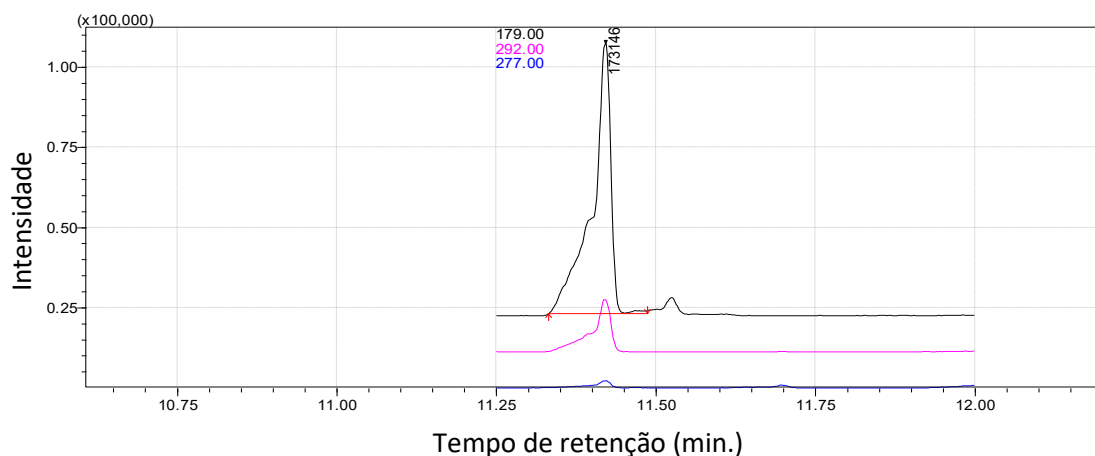
Fonte: Software GC/MS Solutions - Shimadzu®.

Figura 5. 17: Cromatograma dos íons monitorados do 4-octilfenol.



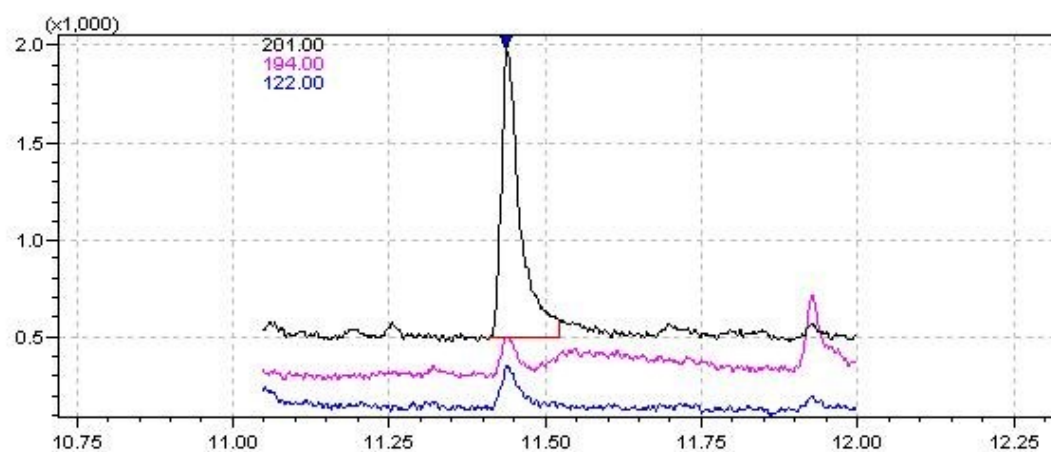
Fonte: Software GC/MS Solutions - Shimadzu®.

Figura 5. 18: Cromatograma dos íons monitorados do 4-nonilfenol.



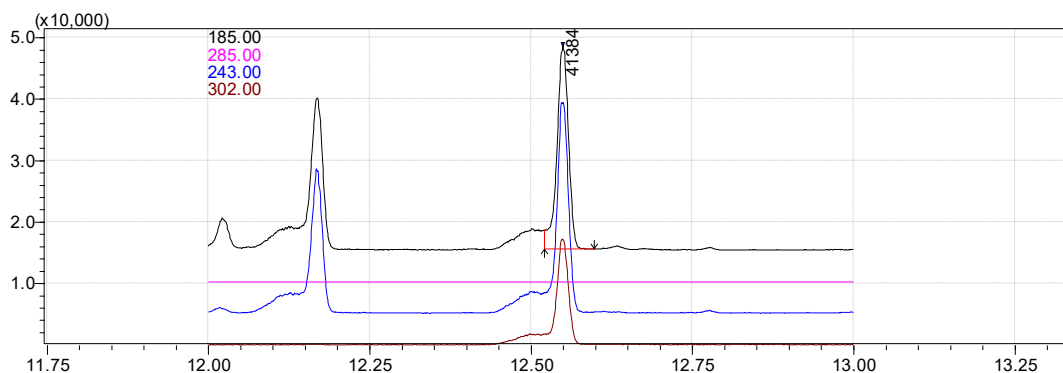
Fonte: Software GC/MS Solutions - Shimadzu®.

Figura 5. 19: Cromatograma dos íons monitorados da genfibrozila.



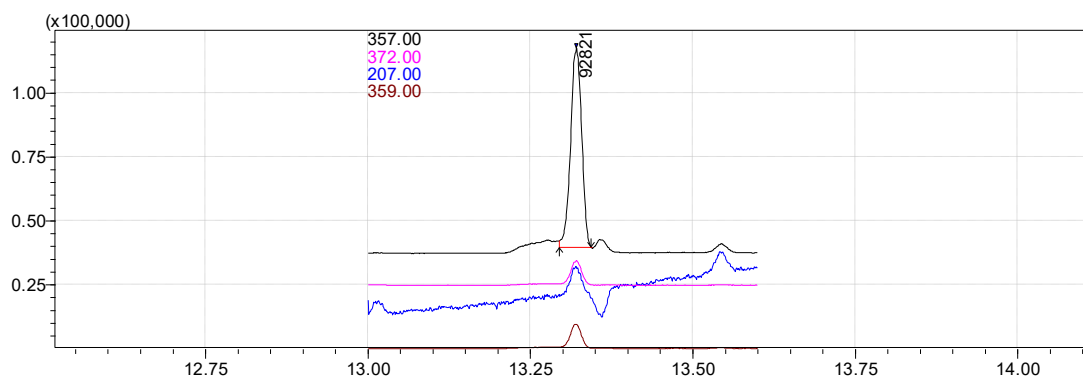
Fonte: Software GC/MS Solutions - Shimadzu®.

Figura 5. 20: Cromatograma dos íons monitorados do naproxeno.



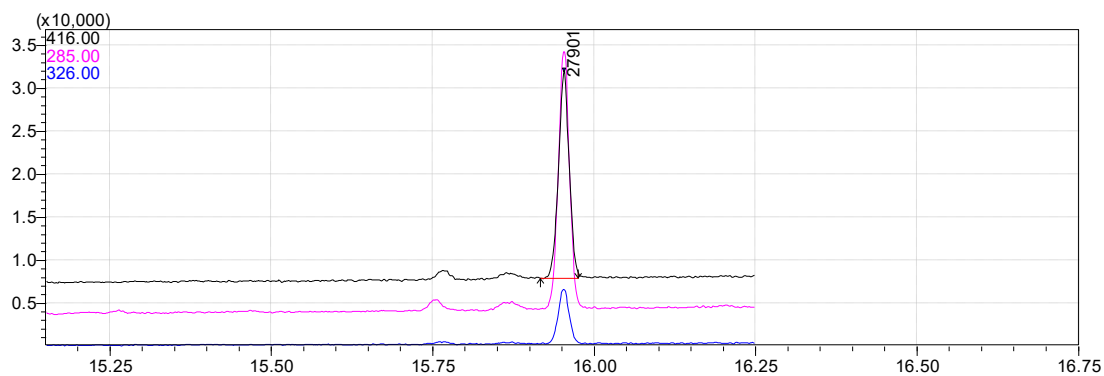
Fonte: Software GC/MS Solutions - Shimadzu®.

Figura 5. 21: Cromatograma dos íons monitorados do bisfenol A.



Fonte: Software GC/MS Solutions - Shimadzu®.

Figura 5. 22: Cromatograma dos íons monitorados do estradiol.



Fonte: Software GC/MS Solutions - Shimadzu®.

5.3.2. Precisão

Na avaliação da precisão do método foi calculado o coeficiente de variação, por meio de triplicatas das soluções padrões de microcontaminantes em três níveis de concentração. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 9.

Tabela 9: Valores do coeficiente de variação (CV) de três replicatas em três níveis de concentração de microcontaminantes

Analitos	Concentração ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Área/Área padrão interno (média)	CV (%)
Ibuprofeno	5	0,0041	5,7
	75	0,0447	3,9
	150	0,1152	2,6
4-octilfenol	5	0,0360	8,2
	75	0,5376	3,9
	150	1,1190	0,9
4-nonilfenol	5	0,0374	7,5
	75	0,5122	0,5
	150	1,0483	1,1
Genfibrozila	5	0,0122	6,9
	75	0,1706	5,7
	150	0,3151	3,4
Naproxeno	5	0,0087	6,6
	75	0,1509	5,1
	150	0,3106	4,3
Bisfenol A	5	0,0344	1,5
	75	0,2810	4,4
	150	0,5192	3,7
Estradiol	10	0,0018	7,6
	75	0,0235	6,3
	150	0,0480	7,4

Os analitos apresentaram valores de CV entre 0,5 e 8,2 e, apesar de alguns valores elevados, atendem aos níveis testados. Segundo o critério de precisão do INMETRO⁷⁸, esse valor deve ser menor que 20% para a análise de substâncias em níveis traço.

5.3.3. Curva Analítica e linearidade

As curvas analíticas obtidas a partir dos padrões foram construídas em triplicata, com concentrações na faixa de 5 a 150 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Em relação às curvas o valor do coeficiente de determinação (R^2) foi satisfatório, em virtude do menor valor encontrado ter sido 0,962 (tabela 10). Além desse parâmetro, também foram

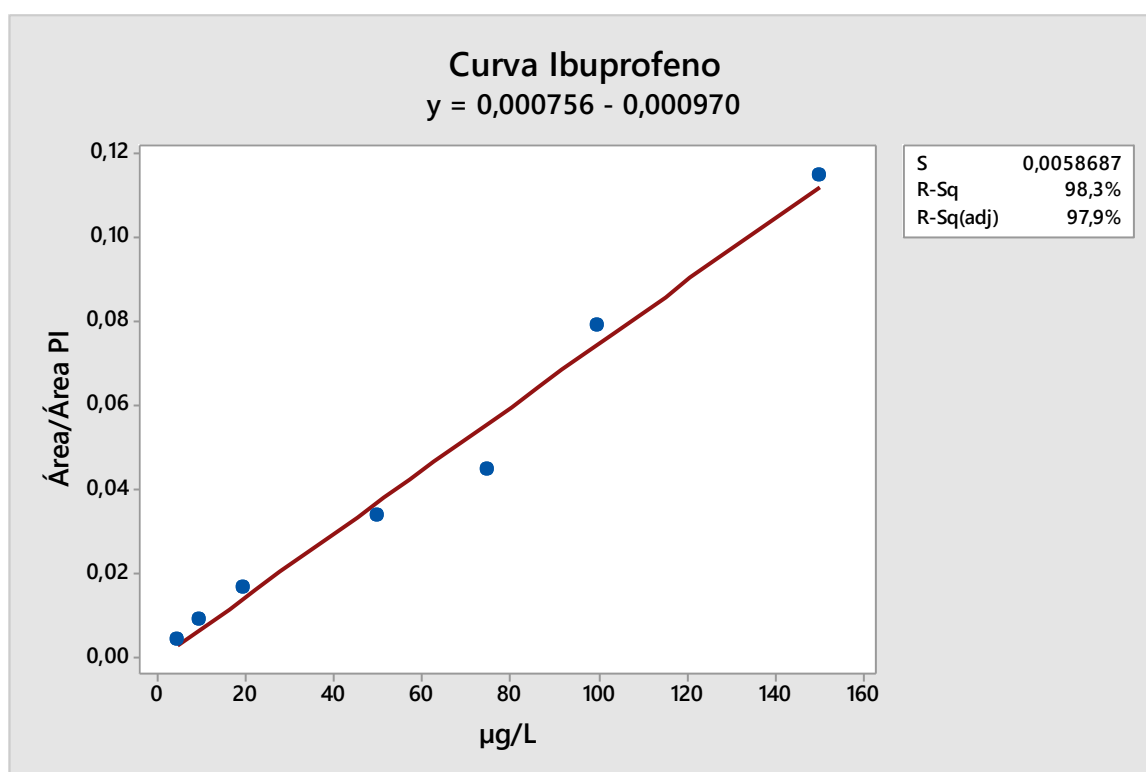
avaliados os coeficientes de variação dos padrões em cada nível da curva analítica, que apresentaram valores aceitáveis, variando de 0,2 a 8,2. Para o INMETRO⁷⁸, os critérios de linearidade exigem valores superiores a 0,90. Das curvas obtidas, apenas o estradiol não apresentou valor de área na concentração de 5 $\mu\text{g.L}^{-1}$, começando sua curva analítica em 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$. As curvas analíticas estão apresentadas nas figuras 5.23 a 5.29.

Tabela 10. Faixa de trabalho de cada analito, média da razão da área do microcontaminante pela área do padrão interno e coeficiente de variação

Área/Área padrão interno (média)	5	CV (%)	10	CV (%)	20	CV (%)	50	CV (%)	75	CV (%)	100 µg.L ⁻¹	CV (%)	150 µg.L ⁻¹	CV (%)	
	µg.L ⁻¹		µg.L ⁻¹		µg.L ⁻¹		µg.L ⁻¹		µg.L ⁻¹						
	IBU	0,0041	5,7	0,0900	5,3	0,0168	3,1	0,0341	6,4	0,0447	3,9	0,0793	1,6	0,1152	2,6
	4OF	0,0360	8,2	0,0659	1,4	0,1567	3,5	0,3979	3,4	0,5376	3,9	0,8115	3,3	1,119	0,9
	4NF	0,0373	7,5	0,0733	2,1	0,1495	0,2	0,364	0,7	0,5122	0,5	0,8011	2,7	1,0483	1,1
	GEN	0,0122	6,9	0,0349	5,1	0,0709	3,5	0,1237	4,4	0,1706	5,7	0,2236	3,7	0,3151	3,4
	NPX	0,0094	4,3	0,0148	3,7	0,0317	1,2	0,0780	6,7	0,1529	7,8	0,1928	5,0	0,3278	5,9
	BPA	0,0344	1,5	0,0547	1,0	0,0948	7,4	0,2064	1,1	0,281	4,4	0,4008	6,2	0,5192	3,7
	E2	-*	-*	0,0018	7,6	0,0035	4,9	0,0129	7,8	0,0235	6,3	0,0404	1,7	0,0498	1,0

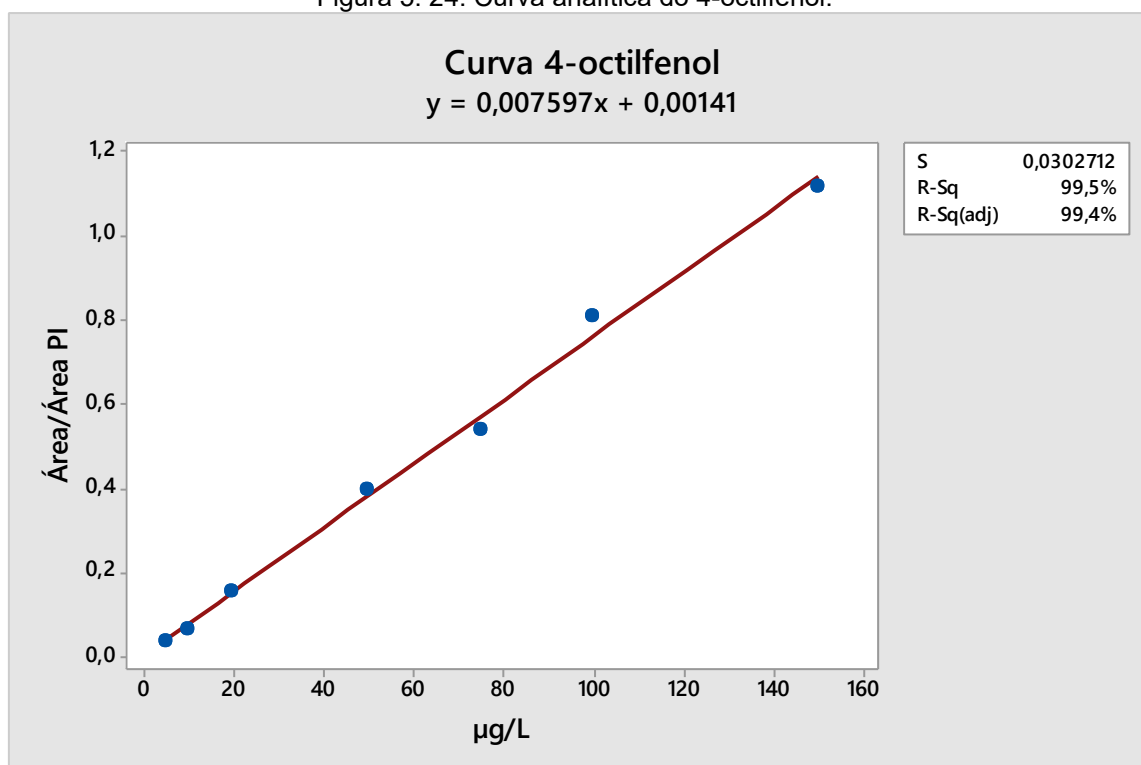
* Não foi possível detectar nesse valor de concentração.

Figura 5. 23: Curva analítica do Ibuprofeno.



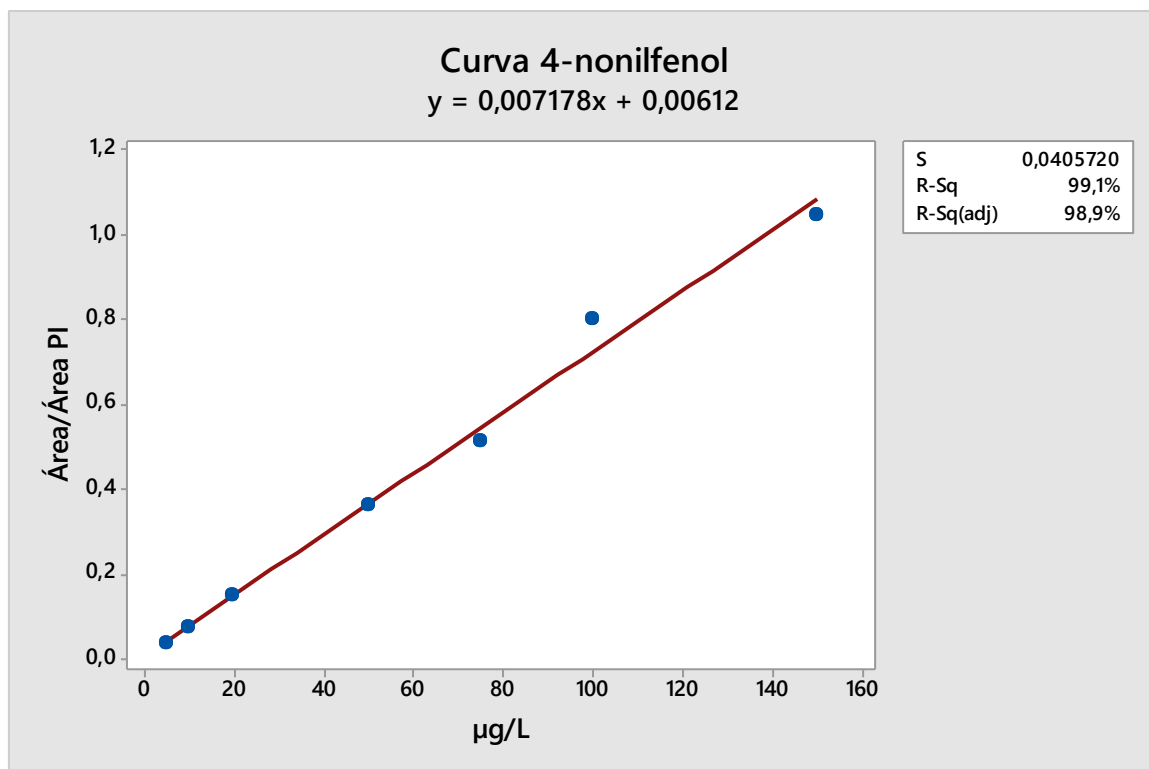
Fonte: Software Minitab 17[®].

Figura 5. 24: Curva analítica do 4-octilfenol.



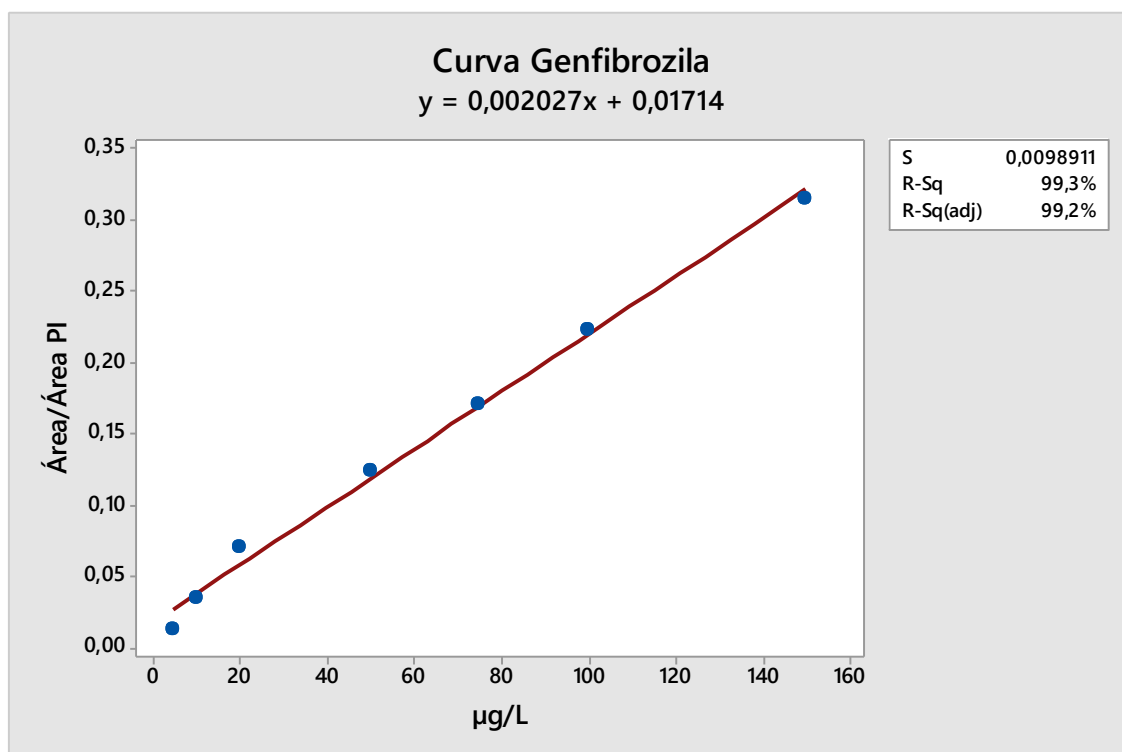
Fonte: Software Minitab 17[®].

Figura 5. 25: Curva analítica do 4-nonilfenol



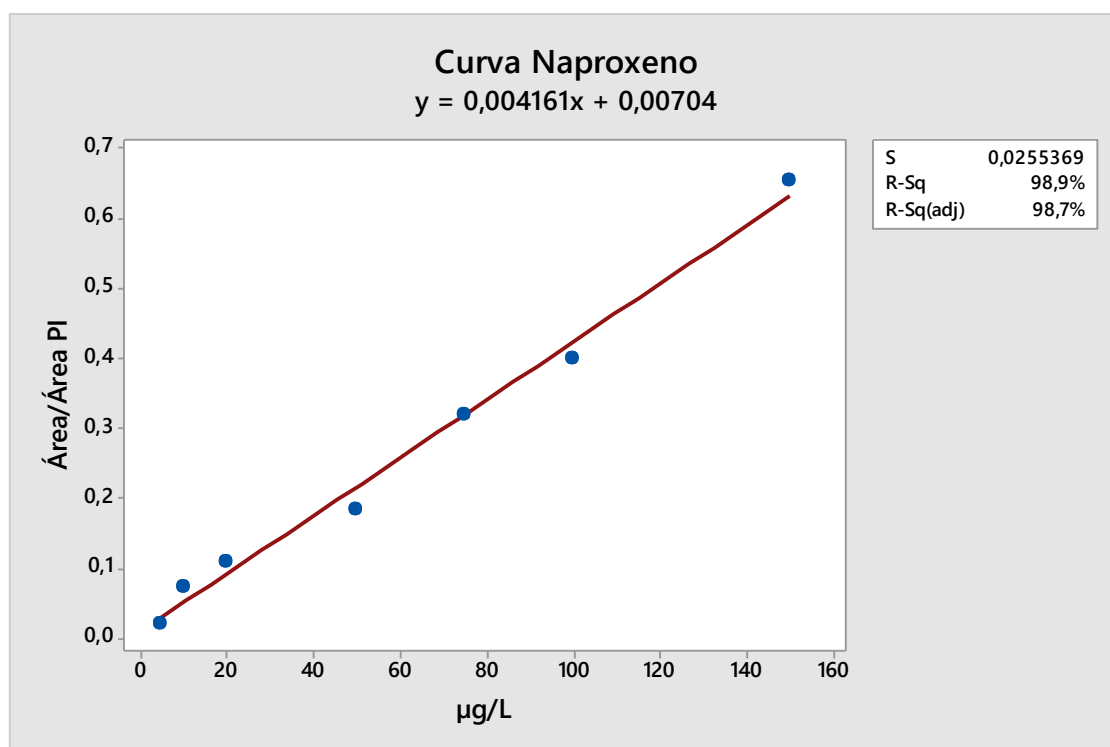
Fonte: Software Minitab 17[®].

Figura 5. 26: Curva analítica da Genfibrozila



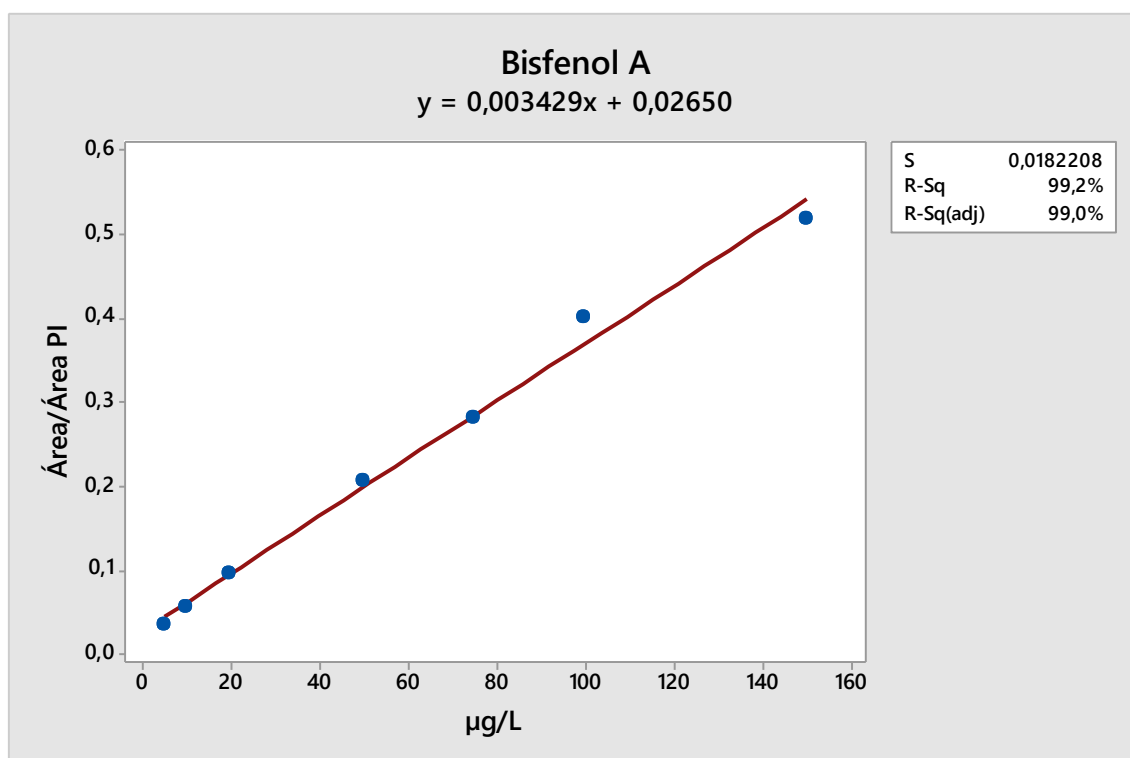
Fonte: Software Minitab 17[®].

Figura 5. 27: Curva analítica do Naproxeno



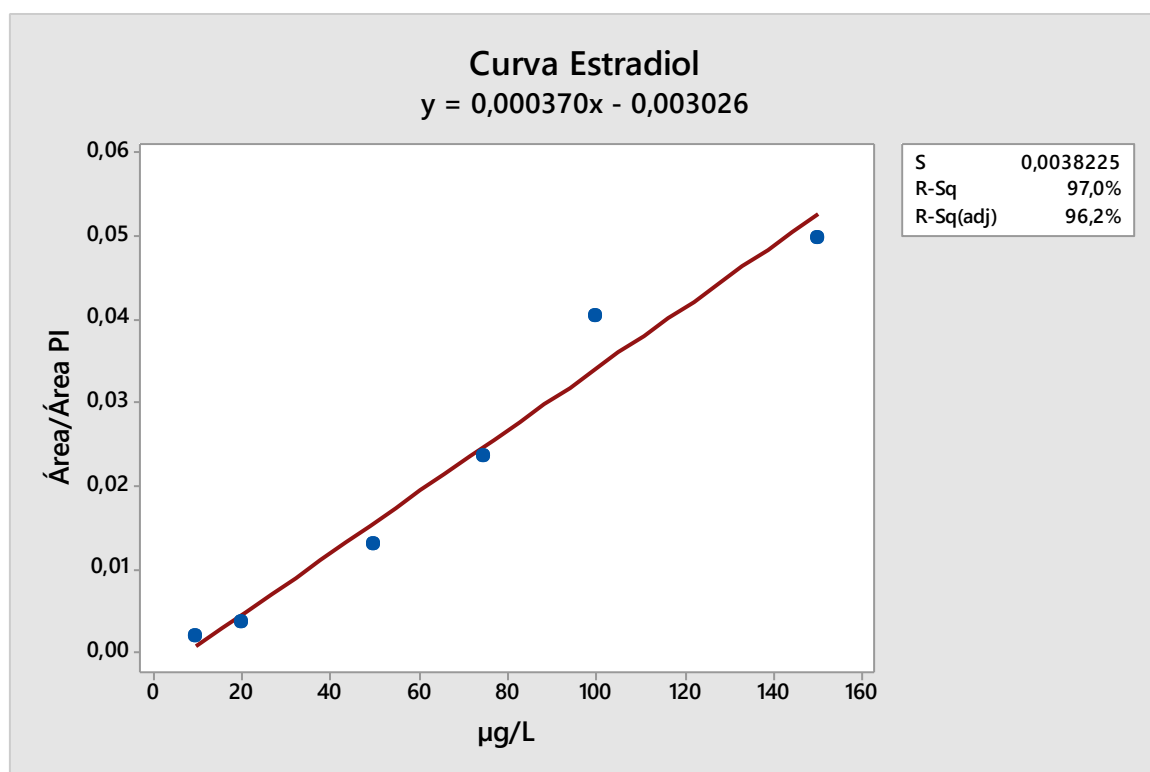
Fonte: Software Minitab 17[®].

Figura 5. 28: Curva analítica do Bisfenol A



Fonte: Software Minitab 17[®].

Figura 5. 29: Curva analítica do Estradiol.



Fonte: Software Minitab 17®.

5.3.4. Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação (tabela 11) estão com valores próximos aos encontrados na literatura^(49, 59, 61-65). Apenas Marsol-Vall⁵⁸, apresentou valores muito inferiores aos encontrados neste trabalho, esses limites mais baixos são devido ao uso de um detector do tipo triplo-quadrupolo MS/MS, o que aumenta significativamente a sensibilidade do equipamento.

Tabela 11. Limites de detecção e quantificação do equipamento e do método.

Analitos	LD do equip. (ng.L ⁻¹)	LD do método (ng.L ⁻¹)	LQ equip. (ng.L ⁻¹)	LQ do método (ng.L ⁻¹)	Recuperação (%)
IBU	900	5,6	2990	18,7	81,8
4OF	310	3,3	1050	11,0	85,5
4NF	340	4,6	1120	15,2	86,1
GEN	490	3,8	1620	12,7	75,9
NPX	680	5,2	2280	17,4	71,2
BPA	140	0,8	470	2,6	94,1
E2	1500	20,6	4990	68,5	72,5

O limite de detecção (LD) foi estabelecido por meio da relação sinal/ruído do equipamento, sendo ele 3 vezes superior ao observado na linha de base dos padrões de menor concentração ($5 \mu\text{g.L}^{-1}$), exceto o estradiol, o qual a menor concentração obtida foi de $10 \mu\text{g.L}^{-1}$. Já o limite de detecção (LQ) é 10 vezes superior ao observado na linha de base. Para determinação de LD e LQ do método, foi considerado o fator de concentração, obtido pela extração em fase sólida e secagem do extrato em fluxo de N_2 , neste caso de 200 vezes, além do valor de recuperação do método.

5.3.5. Efeito matriz

O efeito matriz está comumente presente em amostras complexas como as de esgoto. Este efeito faz com que o sinal da amostra seja maior ou menor de acordo com o tipo de interferência. A tabela 12 apresenta os dados obtidos nesse trabalho.

Para o cálculo do efeito de matriz foi necessário a utilização de *spike*, que é a análise da amostra acrescida de uma quantidade de padrão conhecida ($30 \mu\text{g.L}^{-1}$ neste caso) e comparada com a amostra sem o padrão; pela equação 3 é possível definir o valor do efeito de matriz e, em seguida, definir se ele é supressivo ao aumentativo.

$$E. M. = \frac{(A_{spike} - 0,7 \times A_{amostra})}{A_{padrão\ 30\mu\text{g.L}^{-1}}} \quad (3)$$

Na equação 3, A_{spike} representa a área de $70 \mu\text{L}$ de amostra com $30 \mu\text{L}$ de padrão, $A_{amostra}$ é amostra sem adição de padrão, $A_{padrão\ 30\mu\text{g.L}^{-1}}$ é a área da leitura de $1 \mu\text{L}$ do padrão de $30 \mu\text{g.L}^{-1}$. Para se determinar se o efeito de matriz é aumentativo ou supressivo basta observar o valor de E.M.; se este for maior que 1 será aumentativo, se menor, será supressivo.

Tabela 12 – Fatores de correção nos efeitos de matriz.

Analito	Fator de correção Média ± (D.P.)	Tipo de efeito
Ibuprofeno	0,73 ±0,12	Supressivo
4-octilfenol	0,78 ±0,07	Supressivo
4-nonilfenol	0,76±0,10	Supressivo
Genfibrozila	0,66 ±0,09	Supressivo
Naproxeno	0,70 ±0,3	Supressivo
Bisfenol A	0,58 ±0,11	Supressivo
Estradiol	0,50 ±0,07	Supressivo

Todos os analitos investigados sofreram efeito de supressão, por força de alguma interferência presente na matriz. Embora se faça pré-tratamento nas amostras com uso de cartuchos de SPE, ainda assim, não é possível eliminar esses interferentes indesejados, apenas reduzi-los.

5.3.6. Exatidão do método

A determinação da exatidão do método foi feita por meio de adição e recuperação. As amostras coletadas foram fortificadas com os padrões em três níveis distintos (10, 75 e 150 µg.L⁻¹) em triplicata. Os cálculos de recuperação consideraram o efeito matriz, uma vez que em amostras de esgoto os analitos investigados provavelmente estarão presentes. Foi utilizada a equação 4 para o cálculo da recuperação:

$$Recuperação (\%) = \frac{A_{amostraf} - A_{amostra}}{A_{padrão} \times EM} \quad (4)$$

Na equação 4 $A_{amostraf}$ representa a área da amostra fortificada; $A_{amostra}$ a área da amostra isenta de padrão; $A_{padrão}$ a área do padrão correspondente a concentração utilizada para fortificar a amostra e EM o fator calculado do efeito matriz para o analito referente. Os valores encontrados estão dispostos na tabela 13.

Tabela 13. Índices de recuperação e coeficientes de variação dos microcontaminantes investigados

Analito	Concentração µg.L-1	Recuperação (%)	C.V. (%)
IBU	10	81,8	4,0
	75	85,6	3,1
	150	78,5	7,5
4OF	10	85,5	3,7
	75	84,7	3,3
	150	76,5	5,4
4NF	10	86,1	4,0
	75	78,5	1,7
	150	109,3	6,2
GEN	10	75,9	3,8
	75	87,7	3,0
	150	75,4	10,1
NPX	10	83,3	4,3
	75	81,5	2,9
	150	82,6	6,4
BPA	10	94,1	4,0
	75	76,4	4,3
	150	76,3	6,5
E2	10	72,5	6,3
	75	71,1	2,1
	150	70,8	6,8

Os resultados de recuperação apresentaram valores de coeficiente de variação entre 1,7 e 10,1%. Como o valor de referência é de até 20%, os valores obtidos foram todos aceitáveis, devido à complexidade de amostras provenientes de esgoto é comum a oscilação entre as replicatas e função de possíveis interferentes.

Já em relação ao valor de recuperação, para níveis de traços são aceitos valores entre 70 e 120%. Apenas o 4NF teve um valor superior a 100% na concentração de 150 ppb. Isso se deve à questão de alguns microcontaminantes serem adsorvidos nos sítios ativos do *liner* e se acumularem em sua superfície, principalmente ao se analisar padrões isentos de matriz, quando se analisa uma amostra que contenha em sua composição

impurezas que competem efetivamente com o analito adsorvido no *liner*, o mesmo seguirá para o interior da coluna cromatográfica, fazendo com que o valor observado seja superestimado e obtendo recuperação com valores superiores a 100%⁴³.

5.3.6.1. Resultados das amostras de esgoto

As amostras utilizadas para avaliar o método, provenientes do CePTS – UFMG/COPASA foram coletadas em 7 dias seguidos e submetidas a análises, estas amostras oriundas de esgoto bruto foram submetidas apenas a tratamento preliminar (gradeamento). As concentrações encontradas neste trabalho (tabela 14) foram inferiores ao limite de detecção do método (LDM) para a maioria dos analitos investigados. Apenas bisfenol A e 4-octilfenol foram possíveis de quantificar (dados apresentados na tabela 9); estes valores, principalmente o bisfenol A, eram esperados uma vez que na literatura eles são apresentados, comumente, em concentrações mais expressivas. Quanto aos demais analitos, os mesmos podem ter degradado parcialmente, além do fato de estar em período chuvoso quando as amostras foram coletadas.

Tabela 14 – Concentrações (ng.L⁻¹) das médias, mínimos e máximos dos analitos monitorados.

Analitos	1º dia	2º dia	3º dia	4º dia	5º dia	6º dia	7º dia
Ibuprofeno	ND	ND	ND	<LQM	ND	ND	ND
4-octilfenol	13,0	ND	<LQM	14,5	ND	<LQM	ND
4-nonilfenol	<LQM	ND	ND	ND	<LQM	ND	ND
Genfibrozila	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Naproxeno	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Bisfenol A	22,5	ND	17,49	<LQM	ND	<LQM	<LQM
Estradiol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND: não detectado

6. CONCLUSÃO

Neste estudo a execução de um planejamento fatorial fracionário possibilitou investigar as influências da temperatura do injetor, pressão no injetor/início da coluna e volume de reagente derivatizante na derivatização *online*. Sendo a temperatura e pressão os fatores estatisticamente significativos e utilizados para efetuar a otimização.

O uso do método de superfície de resposta do tipo CCD possibilitou a obtenção de superfícies de 10 dos 12 analitos investigados. Porém, apenas dois compostos apresentaram modelos com ajuste satisfatório (NPX e E1). Levando em consideração esses aspectos, a otimização foi realizada com as melhores condições obtidas experimentalmente, que foram faixa de aquecimento de 80 a 315 °C e pressão constante do injetor de 140 kPa.

Foi possível averiguar também que o volume de derivatizante, apesar de não ser uma variável significativa, contribuiu com êxito para a proposta deste trabalho, pois foi possível utilizar o menor volume de BSTFA investigado na etapa de triagem, neste caso 1 µL. Além disso, atendeu satisfatoriamente o método analítico proposto, gerando uma redução de 50 vezes no volume de reagente derivatizante em relação à técnica de derivatização convencional *offline*.

A validação do método foi executada com sucesso nos termos do guia da IUPAC e dos 12 compostos investigados foram possíveis validar 7, entre eles o IBU, 4OF, 4NF, GEN, NPX, BPA e E2. Foi observado que compostos que possuem mais de um H ativo apresentam maior dificuldade para sofrerem derivatização, principalmente pelo fato de o analito não ficar em contato o tempo suficiente para que ocorra a substituição em todos os hidrogênios, além de possuírem maior energia de ativação.

7. TRABALHOS FUTUROS

Como recomendação para trabalhos futuros é sugerido o uso de um GC/MS com injetor do tipo PTV (*programmed temperature vaporizing*). Este possibilita tanto a elevação da temperatura, quanto a redução da mesma em taxas mais eficientes, além de diminuir o tempo de residência do interior do injetor.

Outra recomendação é investigar se o uso de reagente derivatizante combinado com outros solventes em proporções do tipo 1:1; 2:1 ou 3:2 podem ser significativas no processo de derivatização *online*.

8. REFERÊNCIAS

1. Aquino, S.F.d., E.M.F. Brandt, and C.A.d.L. Chernicharo, *Remoção de fármacos e desreguladores endócrinos em estações de tratamento de esgoto: revisão da literatura*. 2013.
2. Petrie, B., R. Barden, and B. Kasprzyk-Hordern, *A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring*. Water Res, 2015. **72**: p. 3-27.
3. Nogueira, J., *Desreguladores endócrinos: efeitos adversos e estratégias para monitorização dos sistemas aquáticos*. Química Nova, 2003. **88**: p. 65-71.
4. Gorito, A.M., et al., *A review on the application of constructed wetlands for the removal of priority substances and contaminants of emerging concern listed in recently launched EU legislation*. Environ Pollut, 2017. **227**: p. 428-443.
5. Jeannot, R., et al., *Determination of endocrine-disrupting compounds in environmental samples using gas and liquid chromatography with mass spectrometry*. J Chromatogr A, 2002. **974**(1-2): p. 143-59.
6. Sodré, F., et al., *Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos em águas superficiais da região de Campinas (SP, Brasil)*. J. Braz. Soc. Ecotoxicol, 2007. **2**(2): p. 187-196.
7. Zorita, S., L. Martensson, and L. Mathiasson, *Occurrence and removal of pharmaceuticals in a municipal sewage treatment system in the south of Sweden*. Sci Total Environ, 2009. **407**(8): p. 2760-70.
8. Ribani, M., et al., *Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos*. Química nova, 2004.
9. Ribeiro, F.A.d.L., et al., *Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados*. Química nova, 2008.
10. Bergman, Å., et al., *State-of-the-science of endocrine disrupting chemicals*, 2012. Toxicology Letters, 2012. **211**: p. S3.
11. Geissen, V., et al., *Emerging pollutants in the environment: a challenge for water resource management*. International soil and water conservation research, 2015. **3**(1): p. 57-65.
12. Kolpin, D.W., et al., *Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: a national reconnaissance*. Environ Sci Technol, 2002. **36**(6): p. 1202-11.
13. EPA, U.S., *Treating Contaminants of Emerging Concern: A Literature Review Database*. U. S. Environmental Protection Agency, 2010: p. 100.
14. Boxall, A.B., et al., *Pharmaceuticals and personal care products in the environment: what are the big questions?* Environ Health Perspect, 2012. **120**(9): p. 1221-9.
15. Organization, W.H. *Pharmaceutical products*. Disponível em: <http://www.who.int/topics/pharmaceutical_products/en/>. Acesso em:
16. Zhang, Y., S.-U. Geißen, and C. Gal, *Carbamazepine and diclofenac: removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies*. Chemosphere, 2008. **73**(8): p. 1151-1161.
17. Bila, D.M. and M. Dezotti, *Fármacos no meio ambiente*. Química Nova, 2003. **26**(4): p. 523-530.
18. Narsinghani, T. and R. Sharma, *Lead optimization on conventional non-steroidal anti-inflammatory drugs: an approach to reduce gastrointestinal toxicity*. Chemical biology & drug design, 2014. **84**(1): p. 1-23.

19. McGettigan, P. and D. Henry, *Use of non-steroidal anti-inflammatory drugs that elevate cardiovascular risk: an examination of sales and essential medicines lists in low-, middle-, and high-income countries*. PLoS Med, 2013. **10**(2): p. e1001388.
20. Jones, R., et al., *Gastrointestinal and cardiovascular risks of nonsteroidal anti-inflammatory drugs*. Am J Med, 2008. **121**(6): p. 464-74.
21. Lee, M., et al., *Efficacy of fibrates for cardiovascular risk reduction in persons with atherogenic dyslipidemia: a meta-analysis*. Atherosclerosis, 2011. **217**(2): p. 492-8.
22. Xavier, H.T., *Pharmacology of fibrates*. Arquivos brasileiros de cardiologia, 2005. **85**: p. 15-16.
23. Zurita, J.L., et al., *Toxicological effects of the lipid regulator gemfibrozil in four aquatic systems*. Aquat Toxicol, 2007. **81**(1): p. 106-15.
24. Castro, C.M.B.d., *Perturbadores endócrinos ambientais: uma questão a ser discutida*. Engenharia sanitária e ambiental: órgão oficial de informação técnica da ABES. Vol. 7, n. 1/2 (jan./jun. 2002), p. 4-5, 2002.
25. Li, Y., K.A. Burns, and K.S. Korach, *Estrogen receptor (ER)-mediated activation by endocrine disrupting chemicals (EDCs) A comparison between synthetic and natural compounds*. Endocrine Disruptors, 2013. **1**(1): p. 459-66, e1-6.
26. Bila, D.M. and M. Dezotti, *Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências*. Química nova, 2007. **30**(3): p. 651.
27. Baker, T.R., R.E. Peterson, and W. Heideman, *Adverse effects in adulthood resulting from low-level dioxin exposure in juvenile zebrafish*. Endocrine Disruptors, 2014. **2**(1): p. e28309.
28. Dietrich, D., et al., *Open letter to the European Commission: scientifically unfounded precaution drives European Commission's recommendations on EDC regulation, while defying common sense, well-established science, and risk assessment principles*. Archives of toxicology, 2013. **87**(9): p. 1739-1741.
29. Watson, C.S., *Progress in understanding endocrine disruption requires cross-disciplinary approaches and concepts*. 2013, Taylor & Francis.
30. Rogers, H.R., *Sources, behaviour and fate of organic contaminants during sewage treatment and in sewage sludges*. Science of the total environment, 1996. **185**(1-3): p. 3-26.
31. Atkins, P.W. and L. Jones, *Princípios de Química-: Questionando a Vida Moderna e o Meio Ambiente*. 2009: Bookman Editora.
32. Atkins, P. and J. De Paula, *Físico-Química*. v. 1. LTC: Rio de Janeiro, 2008.
33. Rouessac, F. and A. Rouessac, *Chemical analysis: modern instrumentation methods and techniques*. 2013: John Wiley & Sons.
34. Kotz, J.C. and M. Paul Jr, *Química geral e reações químicas*. 2010: Cengage Learning Edições Ltda.
35. Holler, F.J., D.A. Skoog, and S.R. Crouch, *Princípios de análise instrumental*. 2009: Bookman. 1055.
36. Collins, C.H., G.L. Braga, and P.S. Bonato, *Fundamentos de cromatografia, in Fundamentos de cromatografia*. 2006, Unicamp.
37. Aquino Neto, F.R. and D. Nunes, *Cromatografia: princípios básicos e técnicas afins*. Rio de Janeiro: Interciência, 2003: p. 64-8.
38. De Hoffmann, E. and V. Stroobant, *Mass spectrometry: principles and applications*. 2007: John Wiley & Sons.
39. Ferreira, C., *Caracterização por GC-MS de glicídios derivatização assistida por microondas*. 2011. Place.
40. Zhang, K. and Y. Zuo, *Pitfalls and solution for simultaneous determination of estrone and 17 α -ethinylestradiol by gas chromatography-mass spectrometry after derivatization with N, O-bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide*. Analytica Chimica Acta, 2005. **554**(1-2): p. 190-196.

41. Englert, B., *Method 1698: Steroids and Hormones in Water, Soil, Sediment, and Biosolids by HRGC/HRMS*. US Environmental Protection Agency (EPA) 2007: p. 1-.
42. Thurman, E.M. and I. Ferrer, *Injection Port Derivatization for GC/MS–MS: Analysis of Hormones in Water*. Advanced Techniques in Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC–MS–MS and GC–TOF–MS) for Environmental Chemistry, 2013. **61**: p. 115.
43. Caldas, S.S., et al., *Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas*. 2011.
44. Das, D., U. Gupta, and A.K. Das, *Recent developments in solid phase extraction in elemental speciation of environmental samples with special reference to aqueous solutions*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2012. **38**: p. 163-171.
45. Schummer, C., et al., *Comparison of MTBSTFA and BSTFA in derivatization reactions of polar compounds prior to GC/MS analysis*. Talanta, 2009. **77**(4): p. 1473-82.
46. Halket, J.M. and V.G. Zaikin, *Derivatization in mass spectrometry--1. Silylation*. Eur J Mass Spectrom (Chichester), 2003. **9**(1): p. 1-21.
47. Lanças, F.M., *Cromatografia em fase gasosa*. Vol. 1. 1993: Acta.
48. Orata, F., *Derivatization reactions and reagents for gas chromatography analysis, in Advanced Gas Chromatography-Progress in Agricultural, Biomedical and Industrial Applications*. 2012, InTech.
49. Wu, J., et al., *Determination of fecal sterols by gas chromatography-mass spectrometry with solid-phase extraction and injection-port derivatization*. J Chromatogr A, 2009. **1216**(7): p. 1053-8.
50. Wang, Q., et al., *Developments in injection port derivatization*. J Chromatogr A, 2013. **1296**: p. 25-35.
51. Ding, W.H. and C.C. Chiang, *Derivatization procedures for the detection of estrogenic chemicals by gas chromatography/mass spectrometry*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2003. **17**(1): p. 56-63.
52. Dalmázio, I., T. Alves, and R. Augusti, *An appraisal on the degradation of paracetamol by TiO₂/UV system in aqueous medium: product identification by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)*. Journal of the Brazilian Chemical Society, 2008. **19**(1): p. 81-88.
53. Blau, K. and J. Halket, *Handbook of Derivatives for Chromatography*, 1993. John Wiley & Sons, Chichester.
54. Rasmussen, K.E., *Quantitative morphine assay by means of gas-liquid chromatography and on-column silylation*. J Chromatogr, 1976. **120**(2): p. 491-5.
55. Wu, J. and H.K. Lee, *Injection port derivatization following ion-pair hollow fiber-protected liquid-phase microextraction for determining acidic herbicides by gas chromatography/mass spectrometry*. Anal Chem, 2006. **78**(20): p. 7292-301.
56. Marsol-Vall, A., et al., *Dispersive liquid-liquid microextraction and injection-port derivatization for the determination of free lipophilic compounds in fruit juices by gas chromatography-mass spectrometry*. J Chromatogr A, 2017. **1495**: p. 12-21.
57. Toledano, R.M., et al., *On-line derivatization with on-line coupled normal phase liquid chromatography-gas chromatography using the through oven transfer adsorption desorption interface: application to the analysis of total sterols in edible oils*. J Chromatogr A, 2012. **1256**: p. 191-6.
58. Marsol-Vall, A., et al., *Injection-port derivatization coupled to GC-MS/MS for the analysis of glycosylated and non-glycosylated polyphenols in fruit samples*. Food Chem, 2016. **204**: p. 210-7.
59. Basheer, C. and H.K. Lee, *Analysis of endocrine disrupting alkylphenols, chlorophenols and bisphenol-A using hollow fiber-protected liquid-phase microextraction coupled*

- with injection port-derivatization gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 2004. **1057**(1-2): p. 163-9.
60. Cho, S., *Sample stacking with in-column silylation for less volatile polar compounds using GC-MS*. *J Sep Sci*, 2012. **35**(5-6): p. 661-5.
 61. Helaleh, M.I., S. Fujii, and T. Korenaga, *Column silylation method for determining endocrine disruptors from environmental water samples by solid phase micro-extraction*. *Talanta*, 2001. **54**(6): p. 1039-47.
 62. Cheng, C.Y., Y.C. Wang, and W.H. Ding, *Determination of triclosan in aqueous samples using solid-phase extraction followed by on-line derivatization gas chromatography-mass spectrometry*. *Anal Sci*, 2011. **27**(2): p. 197-202.
 63. Perez, R.A., et al., *Determination of endocrine-disrupting compounds in water samples by magnetic nanoparticle-assisted dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography-tandem mass spectrometry*. *Anal Bioanal Chem*, 2016. **408**(28): p. 8013-8023.
 64. Gupta, M.K., et al., *Determination of Urinary PAH Metabolites Using DLLME Hyphenated to Injector Port Silylation and GC-MS-MS*. *J Anal Toxicol*, 2015. **39**(5): p. 365-73.
 65. Mudiam, M.K.R., R. Jain, and R. Singh, *Application of ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction and automated in-port silylation for the simultaneous determination of phenolic endocrine disruptor chemicals in water samples by gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry*. *Analytical Methods*, 2014. **6**(6): p. 1802-1810.
 66. Teófilo, R.F. and M. Ferreira, *Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial*. Química Nova, 2006.
 67. Neto, B.B., I.S. Scarminio, and R.E. Bruns, *Como Fazer Experimentos-: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria*. 2010: Bookman Editora.
 68. Brereton, R.G., *Chemometrics: data analysis for the laboratory and chemical plant*. 2003: John Wiley & Sons.
 69. Paschoal, J.A.R., et al., *Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos*. Química Nova, 2008.
 70. Thompson, M., S.L. Ellison, and R. Wood, *Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report)*. *Pure and Applied Chemistry*, 2002. **74**(5): p. 835-855.
 71. Caban, M. and P. Stepnowski, *Silylation of acetaminophen by trifluoroacetamide-based silylation agents*. *J Pharm Biomed Anal*, 2018. **154**: p. 433-437.
 72. Englert, B., *Method 1694: Pharmaceuticals and personal care products in water, soil, sediment, and biosolids by HPLC/MS/MS*. US Environmental Protection Agency (EPA), 2007: p. 1-72.
 73. Bezerra, M.A., et al., *Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry*. *Talanta*, 2008. **76**(5): p. 965-977.
 74. Morshedi, A. and M. Akbarian, *Application of response surface methodology: design of experiments and optimization: a mini review*. *J Fund Appl Life Sci*, 2014. **54**: p. 2434-9.
 75. Mason, R.L., R.F. Gunst, and J.L. Hess, *Statistical design and analysis of experiments: with applications to engineering and science*. Vol. 474. 2003: John Wiley & Sons.
 76. Kashutina, M., S.L. Ioffe, and V.A. Tartakovskii, *Silylation of organic compounds*. *Russian Chemical Reviews*, 1975. **44**(9): p. 733.
 77. Shareef, A., et al., *Suitability of N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide and N-(tert-butyltrimethylsilyl)-N-methyltrifluoroacetamide as derivatization reagents for the determination of the estrogens estrone and 17alpha-ethinylestradiol by gas chromatography-mass spectrometry*. *J Chromatogr A*, 2004. **1026**(1-2): p. 295-300.
 78. de Acreditação, C.G., *Orientação sobre Validação de métodos analíticos*. 2010, DOQ-CGCRE-008-Revisão 03–Fev.

9. APÊNDICE

Tabela A. 1. Tabela de análise de variância para o planejamento CCD executado no estudo da otimização das condições operacionais da derivatização online para determinação de ibuprofeno em esgoto doméstico, no nível de significância de 0,05.

Análise de Variância - Modelo Quadrático					
FV	SQ	nGL	MQ	Fcalc.	p
Regressão	5E+08	5	1E+08	0,92141	0,519004
Resíduos	8E+08	7	1E+08		
F. Ajuste	4E+08	3	1E+08	1,39612	0,366122
Erro Puro	4E+08	4	1E+08		
Total	1E+09	12			
% variação explicada				39,69184	
% máx. de variação explicável				70,53957	

Tabela A. 2. Tabela de análise de variância para o planejamento CCD executado no estudo da otimização das condições operacionais da derivatização online para determinação de 4-octilfenol em esgoto doméstico, no nível de significância de 0,05.

Análise de Variância - Modelo Quadrático					
FV	SQ	nGL	MQ	Fcalc.	p
Regressão	3E+09	5	6E+08	1,305147	0,360501
Resíduos	3E+09	7	5E+08		
F. Ajuste	1E+09	3	4E+08	0,775651	0,565439
Erro Puro	2E+09	4	5E+08		
Total	7E+09	12			
% variação explicada				48,2468	
% máx. de variação explicável				67,28081	

Tabela A. 3. Tabela de análise de variância para o planejamento CCD executado no estudo da otimização das condições operacionais da derivatização online para determinação de 4-nonilfenol em esgoto doméstico, no nível de significância de 0,05.

Análise de Variância - Modelo Quadrático					
FV	SQ	nGL	MQ	Fcalc.	p
Regressão	3E+09	5	6E+08	0,990715	0,485599
Resíduos	4E+09	7	6E+08		
F. Ajuste	2E+09	3	8E+08	1,973711	0,260091
Erro Puro	2E+09	4	4E+08		
Total	7E+09	12			
% variação explicada				41,44011	
% máx. de variação explicável				76,38984	

Tabela A. 4. Tabela de análise de variância para o planejamento CCD executado no estudo da otimização das condições operacionais da derivatização online para determinação de genfibrozila em esgoto doméstico, no nível de significância de 0,05.

Análise de Variância - Modelo Quadrático					
FV	SQ	nGL	MQ	Fcalc.	p
Regressão	3E+09	5	5E+08	1,473208	0,308889
Resíduos	3E+09	7	4E+08		
F. Ajuste	2E+09	3	8E+08		
Erro Puro	3E+08	4	7E+07		
Total	5E+09	12			
% variação explicada				51,27398	
% máx. de variação explicável				94,64165	

Tabela A. 5. Tabela A1. Tabela de análise de variância para o planejamento CCD executado no estudo da otimização das condições operacionais da derivatização online para determinação de naproxeno em esgoto doméstico, no nível de significância de 0,05.

Análise de Variância - Modelo Quadrático					
FV	SQ	nGL	MQ	Fcalc.	p
Regressão	1E+11	5	2E+10	6,746523	SG 0,013173
Resíduos	3E+10	7	4E+09		
F. Ajuste	2E+10	3	7E+09	5,699336	0,062973
Erro Puro	5E+09	4	1E+09		
Total	1E+11	12			
% variação explicada				82,81475	
% máx. de variação explicável				96,74183	

Tabela A. 6. Tabela de análise de variância para o planejamento CCD executado no estudo da otimização das condições operacionais da derivatização online para determinação de bisfenol A em esgoto doméstico, no nível de significância de 0,05.

Análise de Variância - Modelo Quadrático					
FV	SQ	nGL	MQ	Fcalc.	p
Regressão	2E+10	5	4E+09	1,083404	0,444384
Resíduos	3E+10	7	4E+09		
F. Ajuste	1E+10	3	5E+09	1,731466	0,298257
Erro Puro	1E+10	4	3E+09		
Total	4E+10	12			
% variação explicada				43,62577	
% máx. de variação explicável				75,47453	

Tabela A. 7. Tabela de análise de variância para o planejamento CCD executado no estudo da otimização das condições operacionais da derivatização online para determinação de estrona em esgoto doméstico, no nível de significância de 0,05.

Análise de Variância - Modelo Quadrático						
FV	SQ	nGL	MQ	Fcalc.		p
Regressão	3E+09	5	6E+08	9,346096	SG	0,005278
Resíduos	5E+08	7	7E+07			
F. Ajuste	2E+08	3	7E+07	1,14229		0,433361
Erro Puro	3E+08	4	6E+07			
Total	4E+09	12				
% variação explicada				86,97201		
% máx. de variação explicável				92,98332		

Tabela A. 8. Tabela de análise de variância para o planejamento CCD executado no estudo da otimização das condições operacionais da derivatização online para determinação de estradiol em esgoto doméstico, no nível de significância de 0,05.

Análise de Variância - Modelo Quadrático						
FV	SQ	nGL	MQ	Fcalc.		p
Regressão	7E+08	5	1E+08	2,176122		0,169612
Resíduos	4E+08	7	6E+07			
F. Ajuste	1E+08	3	4E+07	0,532563		0,684072
Erro Puro	3E+08	4	8E+07			
Total	1E+09	12				
% variação explicada				60,85145		
% máx. de variação explicável				72,0252		

Tabela A. 9. Tabela de análise de variância para o planejamento CCD executado no estudo da otimização das condições operacionais da derivatização online para determinação de etinilestradiol em esgoto doméstico, no nível de significância de 0,05.

Análise de Variância - Modelo Quadrático						
FV	SQ	nGL	MQ	Fcalc.		p
Regressão	9E+06	5	2E+06	1,165718		0,410937
Resíduos	1E+07	7	2E+06			
F. Ajuste	7E+06	3	2E+06	2,544941		0,194306
Erro Puro	4E+06	4	926082			
Total	2E+07	12				
% variação explicada				45,43439		
% máx. de variação explicável				81,24059		

Tabela A. 10. Tabela de análise de variância para o planejamento CCD executado no estudo da otimização das condições operacionais da derivatização online para determinação de estriol em esgoto doméstico, no nível de significância de 0,05.

Análise de Variância - Modelo Quadrático					
FV	SQ	nGL	MQ	Fcalc.	p
Regressão	2E+07	5	4E+06	0,585438	0,713315
Resíduos	5E+07	7	8E+06		
F. Ajuste	4E+07	3	1E+07	3,007992	0,194952
Erro Puro	2E+07	4	4E+06		
Total	8E+07	12			
% variação explicada				29,48659	
% máx. de variação explicável				78,34351	

Tabela A. 11. Tabela de análise de variância para o planejamento CCD executado no estudo da otimização das condições operacionais da derivatização online para determinação de 4-nonilfenol deuterado em esgoto doméstico, no nível de significância de 0,05.

Análise de Variância - Modelo Quadrático					
FV	SQ	nGL	MQ	Fcalc.	p
Regressão	1E+10	5	3E+09	1,894297	0,213695
Resíduos	1E+10	7	1E+09		
F. Ajuste	4E+09	3	1E+09	0,801657	0,554377
Erro Puro	6E+09	4	2E+09		
Total	2E+10	12			
% variação explicada				57,50231	
% máx. de variação explicável				73,45956	