

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Exatas

Departamento de Química

Junielly Tomaz Domingues

**ANÁLISE DE CONTAMINANTES EM AMOSTRAS DE ÁGUA APLICANDO
SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS (SAB) COMO MÉTODO DE EXTRAÇÃO**

BELO HORIZONTE

2023

Junielly Tomaz Domingues

**ANÁLISE DE CONTAMINANTES EM AMOSTRAS DE ÁGUA APLICANDO
SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS (SAB) COMO MÉTODO DE EXTRAÇÃO**

Tese apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências - Química.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Dias Rodrigues

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Mathias Orlando

BELO HORIZONTE

2023

Ficha Catalográfica

D671a
2023
T

Domingues, Junielly Tomaz.

Análise de contaminantes em amostras de água aplicando sistemas aquosos bifásicos (SAB) como método de extração [manuscrito] / Junielly Tomaz Domingues. 2023.

104 f. : il., gráfs., tabs.

Orientador: Guilherme Dias Rodrigues.

Coorientador: Ricardo Mathias Orlando.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais – Departamento de Química.

Inclui bibliografia.

1. Química analítica – Teses. 2. Extração (Química) – Teses. 3. Espectrofotometria – Teses. 4. Cromatografia líquida – Teses. 5. Espectrometria de massa – Teses. 6. Preparação de amostra (Química) – Teses. 7. Águas residuais - Análise – Teses. 8. Impacto ambiental – Teses. 9. Fármacos – Teses. 10. Hormônios – Teses. I. Rodrigues, Guilherme Dias, Orientador. II. Orlando, Ricardo Mathias, Coorientador. III. Título.

CDU 043



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

"Análise de contaminantes emergentes em amostras de água aplicando Sistemas Aquosos Bifásicos (SAB) como método de extração".

Junielly Tomaz Domingues

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Prof. Guilherme Dias Rodrigues - Orientador
UFMG

Prof. Ricardo Mathias Orlando - Coorientador
UFMG

Profa. Renata Pereira Lopes Moreira
UFV

Prof. Nathália Vieira Barbosa
IFSUL DE MINAS

Prof. Rodinei Augusti
UFMG

Prof. Bruno Gonçalves Botelho
UFMG

Belo Horizonte, 07 de novembro de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Guilherme Dias Rodrigues, Professor do Magistério Superior**, em 07/11/2022, às 13:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Bruno Goncalves Botelho, Professor do Magistério Superior**, em 07/11/2022, às 13:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Renata Pereira Lopes Moreira, Usuário Externo**, em 07/11/2022, às 13:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rodinei Augusti, Professor do Magistério Superior**, em 07/11/2022, às 13:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Nathalia Vieira Barbosa, Usuário Externo**, em 07/11/2022, às 13:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ricardo Mathias Orlando, Professor do Magistério Superior**, em 06/01/2023, às 12:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1878219** e o código CRC **55F51493**.

AGRADECIMENTOS

Aos órgãos de fomento CNPq, CAPES e FAPEMIG, pelo apoio financeiro. Ao programa de pós-graduação em Química da UFMG pela oportunidade de realização deste trabalho e a todos os professores e funcionários do Departamento de Química, mas em especial ao meu orientador (Prof. Guilherme Dias Rodrigues) e coorientador (Prof. Ricardo Mathias Orlando) que me deram um suporte essencial durante todo esse período, além de constantes incentivos. Vocês se tornaram um exemplo para mim, amigos. À professora Mariana Ramos de Almeida que também contribuiu significativamente para o desenvolvimento desse trabalho.

Aos meus amigos que sempre estiveram comigo durante todos esses anos, me apoiando. Aos amigos de Viçosa, em especial a Vivian, que foi uma irmã em BH. Aos amigos do Lab214 agradeço a parceria, amizade e companheirismo. Sobretudo, Daniela, Mariana e Roberta que foram sustento durante esse período, sempre deixaram meus dias mais leves e feliz.

À minha família, em especial à minha mãe Devani e ao meu pai José Luiz. Vocês sempre apoiaram a realização dos meus sonhos e me incentivaram sempre. Vocês são meu orgulho e meu maior exemplo. Ao meu irmão, minha metade. Ao Rafael, por estar sempre do meu lado e ser meu amigo além de tudo, sendo a minha alegria diária e a minha fonte de calma. Vocês foram peças essenciais nesse processo!

A todos que confiaram em mim e me incentivaram, obrigada!

Resumo

O estudo da extração/partição para determinação do coeficiente de partição (K) dos hormônios 17 α -etinilestradiol (EE2), levonorgestrel (LV), gestodeno (GD), acetato de ciproterona (AC) e valerato de estradiol (VE) obtidos de pílulas anticoncepcionais foi realizado na fase superior do Sistema Aquoso Bifásico (SAB) com posterior determinação por espectrofotometria Ultravioleta-Visível (UV-Vis). Os parâmetros de partição avaliados do sistema foram: o valor de pH do meio (3,00; 5,00; 7,00; 9,00 e 11,00); a natureza do eletrólito (Na_2SO_4 , $\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e do polímero (PEO1500, L64 e L35) formador do SAB; o comprimento da linha de amarração do sistema (CLA); a temperatura controlada do banho termostático (5,00; 15,0; 25,0; e 40,0 °C); e a relação mássica das fases inferior e superior do sistema ($m_{\text{FI}}/m_{\text{FS}}$: 1/1, 2/1, 3/1, 4/1 e 5/1). Essa avaliação foi realizada através de otimização univariada e multivariada, empregando planejamento experimental. A condição otimizada para todos os hormônios foi L35 + Na_2SO_4 + H_2O , em pH = 3,00, CLA = 64,06% m/m, T = 25 °C e $m_{\text{FI}}/m_{\text{FS}} = 5/1$. Essa condição de extração dos hormônios foi aplicada em amostras de água potável, água de lagoa e rio e água filtrada de uma estação de tratamento de água e mostrou resultados promissores, diante dos altos sinais analíticos dos hormônios obtidos da fase superior do SAB. A validação do método de preparo de amostra utilizando SAB e quantificação de amoxicilina a partir do UPLC-MS/MS também foi realizada. A faixa linear determinada foi de 0 – 750 $\mu\text{g L}^{-1}$, com limite de quantificação (LQ) de 30 $\mu\text{g L}^{-1}$. A precisão e exatidão foram avaliadas em três níveis de concentração (30, 250 e 750 $\mu\text{g L}^{-1}$), alcançando coeficientes de variação menores que 3% e recuperações maiores que 92%.

Palavras-chave: Contaminantes emergentes. Sistemas aquosos bifásicos. Extração. Amostras aquosas.

Abstract

The study of the extraction/partition for determination of partition coefficient (K) of the hormones 17 α -ethinylestradiol (EE2), levonorgestrel (LV), gestodene (GD), cyproterone acetate (AC) and estradiol valerate (VE) obtained from birth control pills was carried out in aqueous two-phase system (ATPS) upper phase with later determination by ultraviolet-visible spectrophotometry (UV-Vis). The partition parameters evaluated for the system were: pH (3.00; 5.00; 7.00; 9.00 and 11.00); ATPS forming electrolytes (Na₂SO₄, Li₂SO₄·H₂O, MgSO₄·7H₂O, Na₂C₄H₄O₆·2H₂O, Na₃C₆H₅O₇·2H₂O) and polymers (PEO1500, L64 and L35); tie-line length (TLL); temperature (5.00; 15.0; 25.0; and 40.0 °C); and mass ratio between top and bottom phases (m_{BP}/m_{TP} : 1/1, 2/1, 3/1, 4/1 and 5/1). This evaluation was carried out through univariate and multivariate optimization, using experimental design. It was observed, for the first time, interactions of TLL and polymer with temperature, directly influencing the partition of hormones in ATPS. The best conditions obtained for all hormones was L35 + Na₂SO₄ + H₂O, at pH = 3.00, TLL = 64.06% w/w, T = 25 °C and m_{BP}/m_{TP} = 5/1. This condition of hormone extraction was applied to samples of drinking water, lake and river water and filtered water from a water treatment plant and showed promising results, given the high analytical signals of the hormones obtained from the upper phase of the ATPS. The validation of the sample preparation method using ATPS and amoxicillin quantification from the UPLC-MS/MS was also performed. The linear range determined was 0 – 750 $\mu\text{g L}^{-1}$, with a quantification limit (LQ) of 30 $\mu\text{g L}^{-1}$. Precision and accuracy were evaluated at three concentration levels (30, 250 and 750 $\mu\text{g L}^{-1}$), reaching coefficients of variation less than 3% and recoveries greater than 92%.

Keywords: Emerging contaminants. Aqueous two-phase systems. Extraction. Aqueous samples.

Lista de Figuras

- Figura 1.1.** Esquema de processos e destinos dos CE no meio ambiente (Campbell C. G. et al. 2006). 22
- Figura 1.2.** Composições para um ponto de mistura do sistema aquoso bifásico L35 + Na₂SO₄ + H₂O, a 25,0 °C (2ª linha de amarração), sendo ● a representação do L35 e ● do Na₂SO₄ (Da Silva M. D. H. *et al.*, 2006). 26
- Figura 1.3.** Diagrama de fases de um SAB constituído por polímero e eletrólito. Sendo CFS a composição da fase superior, CFI a composição da fase inferior, CGL a composição global do sistema e PC o ponto crítico (Rodrigues G. D., 2012). 27
- Figura 1.4.** Diagrama de fases apresentando sistemas de diferentes pontos (A, B, C e D) de misturas globais. Sendo CFS a composição da fase superior, CFI a composição da fase inferior e PC o ponto crítico (Rodrigues G. D. 2012). 28
- Figura 1.5.** Esquema de formação de micelas: (a) molécula de copolímero tribloco formado por blocos de óxido de propileno (PPO) e óxido de etileno (PEO); (b) sistema aquoso bifásico formado por copolímero tribloco e sal; (c) estrutura das micelas formadas pelos copolímeros na FS (Rodrigues G. *et al.*, 2008). 30
- Figura 3.1.** Espectros de absorção na região UV-Visível das soluções dos medicamentos A) Minesse, B) Ciclo 21, C) Diane 35 e D) Mesigyna. 47
- Figura 3.2.** Medicamentos utilizados nesse trabalho como fonte dos hormônios. 48
- Figura 3.3.** Representação esquemática do processo de extração empregado para os hormônios esteroides. 50
- Figura 3.4.** Efeito da natureza do polímero ou copolímero (L35, L64 e PEO1500) formador do SAB (Na₂SO₄ + H₂O) na partição dos fármacos presentes nos medicamentos, em pH = 5,00: A) Minesse e Ciclo 21; B) Diane 35 e Mesigyna. 57
- Figura 3.5.** Efeito da natureza do eletrólito formador do SAB na partição dos fármacos: A) Minesse e Ciclo 21 (PEO + sal + H₂O); B) Diane 35 (L64 + sal + H₂O) e Mesigyna (L35 + sal + H₂O). 59
- Figura 3.6.** Efeito da influência do pH (3,00; 5,00; 7,00; 9,00; 11,00) do meio na partição dos hormônios EE2, LV, AC, GD e VE componentes dos medicamentos: A) Ciclo 21 e Minesse; B) Diane 35 e Mesigyna. 60
- Figura 3.7.** Efeito dos cinco comprimentos das linhas de amarração nas composições de SAB otimizadas no processo de partição dos hormônios presentes nos medicamentos: A) L64 + MgSO₄ + H₂O: Diane 35; B) PEO1500 + Na₂SO₄ + H₂O: Minesse e Ciclo 21; C) L35 + Li₂SO₄ + H₂O: Mesigyna. 63

- Figura 3.8.** Influência da temperatura do sistema na partição dos hormônios contidos nos medicamentos: A) Diane 35; B) Ciclo 21 e Minesse; C) Mesigyna. 65
- Figura 3.9.** Influência da razão das massas das FS e FI ($m_{FI}/m_{FS} = 1/1, 2/1, 3/1, 4/1$ e $5/1$) na partição dos hormônios contidos nos medicamentos: A) Diane 35 e Mesigyna; B) Ciclo 21 e Minesse. 68
- Figura 3.10.** Distribuição normal (Z) dos efeitos positivos (●) e negativos (●) das variáveis na partição dos hormônios EE2 e LV em SAB, via planejamento fatorial 2^{6-1} (A: polímero; B: eletrólito; C: CLA; D: pH; E: razão entre massas de fase; F: temperatura). 72
- Figura 3.11.** Distribuição normal (Z) dos efeitos negativos (●) e positivos (●) das variáveis independentes na partição dos hormônios EE2 e LV, via planejamento fatorial 2^3 em duplicata (A: polímero; B: CLA; C: temperatura). 73
- Figura 3.12.** Superfície de resposta do planejamento 2^3 com replicatas de extração de EE2 e LV na FS de SAB composto de (A) PEO1500 ou (B) L35 + Na₂SO₄ + H₂O em função da temperatura e linha de amarração, em pH = 3,00. 75
- Figura 3.13.** Estudo da condição intermediária para partição dos hormônios contidos nos fármacos Ciclo 21, Minesse, Mesigyna e Diane 35. 77
- Figura 3.14.** Efeito das amostras de água de torneira, de lagoa, de rio, água filtrada de uma ETA e em água deionizada na permanência dos hormônios na FS do SAB. 78
- Figura 4.1.** Transições MRM da amoxicilina, sendo A) 366 – 114 *m/z* e B) 366 – 349 *m/z*. 88
- Figura 4.2.** Gradiente de injeção usado na análise de amoxicilina por UPLC-MS/MS. 92
- Figura 4.3.** Efeito da variação da energia de colisão e voltagem do cone na ionização da amoxicilina para a análise em UPLC-MS/MS. 97
- Figura 4.4.** Curvas de área do pico *versus* concentração de amoxicilina construídas em solvente (água ultrapura) e água de rio (n = 3). 99

Lista de Tabelas

Tabela 1.1. Revisão dos métodos de determinação de CE em amostras de águas ambientais baseados em técnicas analíticas de separação.	24
Tabela 3.1. Estruturas químicas dos hormônios estudados e suas propriedades: nome, fórmula molecular, massa molecular, constante de dissociação ácida (pK_a) e coeficiente de partição octanol/água ($\log K_{ow}$).	44
Tabela 3.2. Sistemas utilizados como base de SAB para a realização da partição de hormônios em diferentes composições de polímero, eletrólito e água.	49
Tabela 3.3. Planejamento Fracionário (2^{6-1}) para partição dos hormônios em sistemas aquosos bifásicos.	53
Tabela 3.4. Dados retirados da literatura das concentrações em % m/m de polímero (m_p) e sal (m_s) na fase superior (FS) e fase inferior (FI) para os SAB estudados e os respectivos comprimentos de linha de amarração (CLA), a 25°C e 40 °C (da Silva <i>et al.</i> , 2006; Martins <i>et al.</i> , 2008).	54
Tabela 3.5. Planejamento Fatorial 2^3 com duplicatas para a extração de hormônios SAB formado por PEO 1500 ou L35 + Na ₂ SO ₄ + H ₂ O.	55
Tabela 3.6. Valores calculados dos parâmetros termodinâmicos ($\Delta_p G$, $\Delta_p H$ e $\Delta_p S$) determinados no processo de partição dos hormônios empregando SAB.	66
Tabela 3.7. Parâmetros otimizados no estudo de partição em SAB dos hormônios EE2, GD, LV, AC e VE contidos nos fármacos estudados.	69
Tabela 3.8. Condições avaliadas e respostas obtidas pelo planejamento fracionário 2^{6-1} para partição dos hormônios contidos no Ciclo 21 em sistemas aquosos bifásicos.	71
Tabela 3.9. Análise de variâncias do modelo matemático proposto.	74
Tabela 4.1. Níveis inferior e superior das variáveis estudadas para o analito amoxicilina.	92
Tabela 4.2. Respostas analíticas obtidas nas diferentes fases móveis avaliadas.	98
Tabela 4.3. Parâmetros da validação da amoxicilina: curva analítica, faixa linear e coeficiente de correlação.	98
Tabela 4.4. Valores de precisão intradia e interdias e exatidão para amoxicilina (n = 6).	100

Siglas e Abreviações

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AC – Acetato de Ciproterona

ANOVA – Análise de Variância

APDC - Pirrolidina Ditiocarbamato de Amônio

ATPS – *Aqueous-two Phase System*

CE – Contaminantes emergentes

CFI – Composição da Fase Inferior

CFS – Composição da Fase Superior

CG – Composição Global

CLA – Comprimento da Linha de Amarração

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CG - Composições Globais

CFS - Composição da Fase Superior

CFI - Composição da Fase Inferior

CMC – Concentração Micelar Crítica

CNS – Conselho Nacional de Saúde

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

CV – Coeficiente de Variação

DES - Dietilbestrol

EC – Comissão Europeia

EDCs – *Endocrine Disrupting Compounds*

EE2 – 17 α -Ethinilestradiol

ETA – Estação de Tratamento de Água

ETE – Estação de Tratamento de Esgoto

FI – Fase Inferior

FS – Fase Superior

GC-MS – *Gas-chromatography - Mass Spectrometry*

GD – Gestodeno

GL – Grau de Liberdade

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia

K – Coeficiente de Partição

K_{ow} - Coeficiente de Partição octanol/água

LA – Linha Amarração

LB – Linha Binodal

LC-DAD - *Liquid Chromatography - Diode Array Detector*

LC – MS - *Liquid Chromatography Mass Spectrometry*

LC-MS/MS – *Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry*

L35 – Copolímero Tribloco L35

L64 - Polietileno Glicol e Polipropileno Glicol

LD – Limite de Detecção

LQ – Limite de Quantificação

LV – Levonorgestrel

MDSPE - extração de fase sólida dispersiva magnética

m_{FI} – Massa da Fase Inferior

m_{FS} – Massa da Fase Superior

MRM – Monitoramento de Reações Múltiplas

NA – Não Apresentado

OE – Óxido de Etileno

OP – Óxido de Propileno

P_c – Ponto Crítico

PEG – Polietileno Glicol

pK_a – Constante de Dissociação Ácida

PEO – Poli (óxido de etileno)

SAAE – Serviço Autônomo de Água e Esgoto

SAB – Sistema Aquoso Bifásico

SBSE - extração com barra de agitação

SNIS – Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento

SPE – Extração em Fase Sólida

TOF-MS - *Time of Flight Mass Spectrometry*

UPLC-MS/MS – *Ultra Performance Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry*

US EPA – Agência de proteção Ambiental dos Estados Unidos

USGS – Serviço Geológico dos Estados Unidos

UV-Vis – Espectroscopia Ultravioleta-Visível

VE – Valerato de Estradiol

VMP – Valores Máximos Permitidos

WFD - *Water Framework Directive*

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1. Introdução.....	19
1.1 Contaminantes emergentes.....	19
1.2 Técnicas de tratamento e de preparo de amostra para remoção ou determinação de contaminantes emergentes.....	21
1.3 Sistemas Aquosos Bifásicos.....	25
1.4 Referências bibliográficas.....	32
CAPÍTULO 2. Objetivos.....	39
2.1 Objetivos gerais.....	39
2.2 Objetivos específicos.....	39
CAPÍTULO 3. Extração de hormônios esteroides provenientes de pílulas anticoncepcionais aplicando sistemas aquosos bifásicos.....	40
3.1. Introdução.....	40
3.1.1 Hormônios esteroides.....	41
3.1.2 Origem de hormônios esteroides no ambiente.....	43
3.2. Parte experimental.....	46
3.2.1. Instrumentação.....	46
3.2.2 Reagentes.....	47
3.2.3 Composição do SAB e procedimento de extração.....	48
3.2.4 Otimização da extração.....	50
3.2.5 Avaliação da partição dos analitos.....	51
3.2.6 Planejamento experimental para extração de hormônios em sistemas aquosos bifásicos.....	52

3.2.7	Aplicação do método de extração otimizado em amostras aquosas ambientais.....	55
3.3.	Resultados e discussão.....	56
3.3.1	Otimização dos parâmetros do SAB.....	56
3.3.1.1.	Efeito do polímero formador do SAB.....	56
3.3.1.2.	Influência do eletrólito formador do SAB.....	58
3.3.1.3.	Efeito do pH na partição de hormônios em SAB.....	60
3.3.1.4.	Influência do comprimento da linha de amarração.....	62
3.3.1.5.	Efeito da temperatura do sistema.....	64
3.3.1.6.	Parâmetros termodinâmicos.....	66
3.3.1.7.	Efeito da razão das massas das fases.....	67
3.3.1.8.	Planejamento experimental.....	69
3.3.1.9.	Estudo da condição intermediária para partição da mistura de hormônios.....	76
3.3.1.10.	Avaliação da partição em amostras de águas	77
3.4.	Conclusão.....	79
3.5.	Referências bibliográficas.....	80
CAPÍTULO 4. Validação do método de extração por sistemas aquosos bifásicos aplicado a amoxicilina utilizando UPLC-MS/MS.....		86
4.1.	Introdução.....	86
4.1.1	Cromatografia líquida acoplada à espectrômetro de massas sequencial na determinação de amoxicilina.....	87

4.1.2	Validação de método.....	88
4.2.	Parte experimental.....	90
4.2.1.	Instrumentação.....	90
4.2.2.	Reagentes.....	90
4.2.3.	Composição do SAB e procedimento de extração.....	91
4.2.4.	Condições cromatográficas e de espectrometria de massas.....	91
4.2.5.	Otimização dos parâmetros cromatográficos e de espectrometria de massas.....	92
4.2.5.1.	Avaliação do efeito dos parâmetros do espectrômetro de massas no sinal do analito.....	92
4.2.5.2.	Avaliação do efeito da composição da fase móvel.....	93
4.2.6.	Validação do método.....	93
4.2.6.1.	Seletividade.....	94
4.2.6.2.	Efeito de matriz.....	94
4.2.6.3.	Linearidade.....	94
4.2.6.4.	Limite de detecção e quantificação.....	95
4.2.6.5.	Precisão intradia e interdias.....	95
4.2.6.6.	Exatidão.....	95
4.3.	Resultados e discussão.....	97
4.3.1.	Otimização dos parâmetros cromatográficos e de espectrometria de massas.....	97

4.3.1.1.	Avaliação do efeito dos parâmetro do espectrômetro de massas no sinal do analito.....	97
4.3.1.2.	Avaliação do efeito da composição da fase móvel.....	98
4.3.2.	Determinação dos parâmetros de validação do método.....	99
4.4.	Conclusão.....	102
4.5.	Referências bibliográficas.....	103

CAPÍTULO 1. Introdução

1.1 Contaminantes emergentes

Contaminantes são definidos como quaisquer substâncias em que sua presença é indesejável ao ambiente (Jimoh A. A. e Lin J., 2019). De forma específica, os contaminantes denominados como emergentes (CE) são os compostos dos quais os riscos para a saúde do ser humano e meio ambiente não são totalmente conhecidos (Pollitt K. J. G. *et al.*, 2019). De forma similar, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US EPA, *United States Environmental Protection Agency*) define os contaminantes emergentes como poluentes presentes em frequências e níveis preocupantes em águas, podendo causar efeitos adversos na saúde das pessoas (US, 2015).

Através do aumento das atividades industriais, a preocupação com o aparecimento de novos CE cresceu devido às novas substâncias liberadas no ambiente (Galindo-Miranda J. M. *et al.*, 2019). Além disso, a mudança no estilo de vida das pessoas contribui para o aumento da lista de compostos classificados como CE, principalmente pelo crescimento dos componentes sintetizados nas indústrias, agricultura e para o uso pessoal (Pollitt K. J. G. *et al.*, 2019). Como exemplos de contaminantes emergentes, têm-se: pesticidas, produtos de cuidado pessoal, fármacos, drogas ilícitas, surfactantes, retardadores de chama, hormônios, cafeína, aditivos alimentares, entre outros (Galindo-Miranda J. M. *et al.*, 2019; Petrie B. *et al.*, 2015; Stuart M. *et al.*, 2012).

O aparecimento dos CE no ambiente é principalmente atribuído a descarga de águas residuais oriundas de tratamento de esgoto em rios, lagos, solo e mar, levando a uma bioacumulação e efeitos de biomagnificação ao longo do tempo (Jimoh A. A. e Lin J., 2019). Sendo assim, a presença dos CE nessas matrizes ocorre devido ao fato dos processos de tratamento de água e esgoto usuais, como o lodo ativado, a filtração e a desinfecção, não serem capazes de remover por completo essas substâncias (Petrie B. *et al.*, 2015). Além disso, de acordo com o Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento (SNIS), na maioria dos estados do Brasil há menos de 40% de atendimento urbano de esgoto, sendo que a coleta de esgoto ocorre apenas em 50% das regiões do país (SNIS, 2019; 2021). Também, cerca de 82% dos municípios brasileiros despejam a maior parte dos resíduos nas águas residuais em rios (Boger B. *et al.*, 2021).

Embora a descarga de CE ainda não tenha regulamentação na maioria dos países, na Suíça é exigido uma eficiência na remoção da carga total de CE de 80% nas águas residuais brutas. Além disso, a comissão europeia determina, em uma lista, 17 compostos a serem monitorados na região (Soriano-Molina P. *et al.*, 2019).

O aumento da poluição, acentuado pela contaminação por CE, ameaça os recursos hídricos e, pode afetar a qualidade da água fornecida para o consumo e a saúde humana e aquática (Galindo-Miranda J. M. *et al.*, 2019; Gao Y. X. *et al.*, 2019). Esses compostos estão presentes nas águas geralmente em concentrações traços, variando de nanograma por litro (ng L⁻¹) até micrograma por litro (µg L⁻¹) (Galindo-Miranda J. M. *et al.*, 2019). Mesmo em baixas concentrações, estudos prévios citam a presença dos CE no ambiente associada a efeitos à saúde humana e ao ambiente, como anormalidades reprodutivas, resistência bacteriana, danos morfológicos, danos a descendentes e efeitos carcinogênicos (Gao Y. X. *et al.*, 2019; Jimoh A. A. e Lin J. 2019; Schriks M. *et al.*, 2010). O conhecimento desses relatos na literatura induziu as Agências Federais dos Estados Unidos a reconhecerem as ameaças às águas causadas pela presença de contaminantes emergentes (Pollitt K. J. G. *et al.*, 2019).

No Brasil, Marcus Stumpf e colaboradores (1997) desenvolveram um dos trabalhos pioneiros, no qual foi divulgada a presença de alguns CE em água potável originadas de estações de tratamento de água da Região dos Lagos no estado do Rio de Janeiro (Stumpf M. *et al.*, 1997). Após esses trabalhos, muitos estudos sobre CE em diferentes matrizes aquáticas do Brasil têm surgido (Hoff R. *et al.*, 2019; Montagner C. C. e Jardim W. F., 2011; Pereira C. D. S. *et al.*, 2016).

Em geral, os principais CE estudados são hormônios, antibióticos e produtos de cuidados pessoais (Organization W. H., 2011; Vo H. N. P. *et al.*, 2019). Kim e colaboradores (2019) avaliaram a toxicidade de um antibiótico chamado triclosan e foi observado que o metabolismo da espécie *Caenorhabditis elegans* foi afetado, assim como os mecanismos de defesa da mesma (Kim H. M. *et al.*, 2019). Já, Zhou e colaboradores (2019) analisaram os efeitos das presenças de hormônios na saúde de peixes e perceberam uma inibição no desenvolvimento dos testículos e um aumento na carga metabólica dos organismos com o aumento do tempo de contato e confirmou o potencial de bioacumulação dos CE (Zhou X. Y. *et al.*, 2019).

O conhecimento da toxicidade de vários CE através de pesquisas induz a necessidade de legislações para determinar valores máximos permitidos (VMP) de concentração para esses compostos em águas. No Brasil, poucos CE possuem os VMP na água para consumo humano

definido, como alguns agrotóxicos que são aplicados e conhecidos a mais tempo (Anexo XX da Portaria de Consolidação nº 5 de 28 de setembro de 2017 do Ministério da Saúde). Em contrapartida, na Europa, além dos agrotóxicos, há determinado o VMP de alguns hormônios e fármacos, os quais são listados como substâncias prioritárias na Diretiva 2000/60/EC, conhecida também como diretiva de qualidade da água (WFD, *Water Framework Directive*) e desenvolvida pela Comissão Europeia (EC, *European Commission*) (EC, 2001). Posteriormente, a EC publicou outra diretiva (*Directive 2013/39/EU*) onde foram determinadas 45 substâncias prioritárias para monitoramento ambiental, visto que apresentavam alto potencial de risco principalmente para a ecotoxicidade aquática e humana (Gusmaroli M. *et al.*, 2018).

Nesse cenário, é importante o desenvolvimento de métodos de remoção dos CE das matrizes aquosas ambientais, assim como metodologias capazes de determinar essas substâncias em baixas concentrações.

1.2 Técnicas de tratamento e de preparo de amostra para remoção ou determinação de contaminantes emergentes

As estações de tratamento de esgoto e de água tem como principal objetivo a descontaminação do influente através da remoção de matérias orgânicas e de compostos indesejáveis. Com este fim, são utilizados tratamentos convencionais por serem amplamente empregados (Pescara I. C., 2014).

O tratamento do esgoto ocorre principalmente através de processos biológicos, os quais podem ser aeróbicos ou anaeróbicos e estar associados a separação de sólidos e outros processos físico-químicos. Nas estações de tratamento do esgoto (ETE), os seguintes processos com o influente são realizados: remoção de sólidos grosseiros através de mecanismos físicos, seguido por processo de decantação e tratamento biológico (Grosseli G. M., 2016). Como complemento, pode haver uma etapa adicional de desinfecção do efluente líquido antes do lançamento em corpos aquáticos para evitar a contaminação por protozoários, bactérias e vírus (Pescara I. C., 2014).

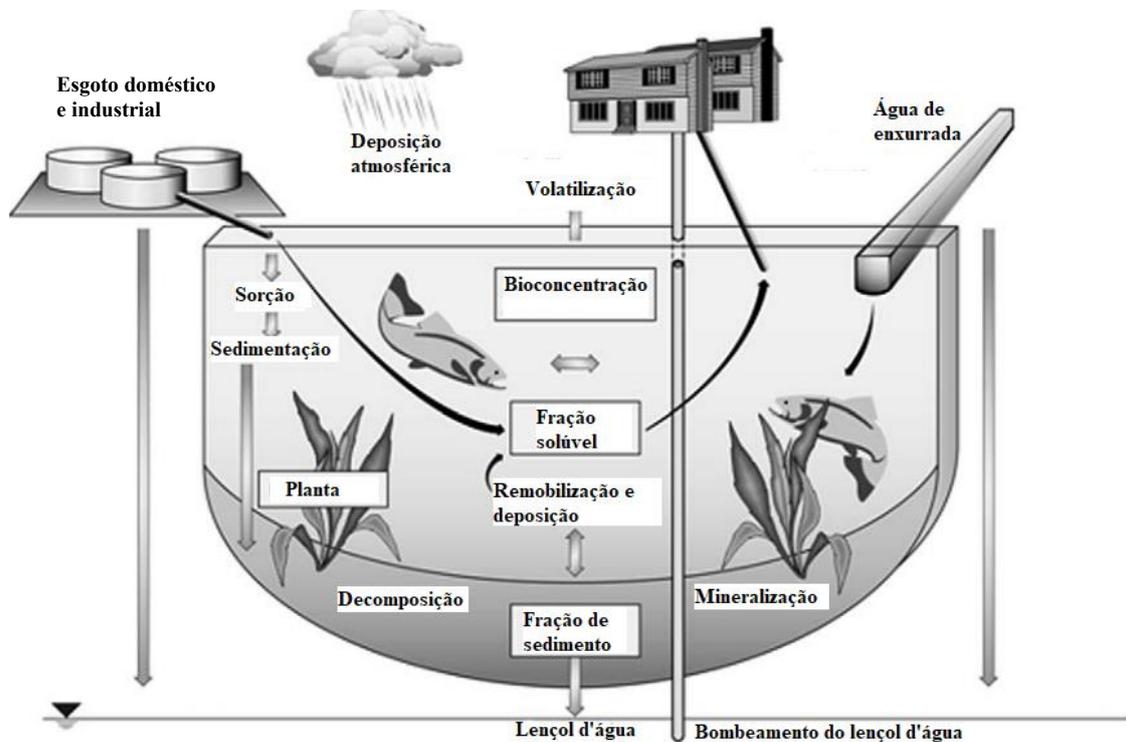
A remoção dos CE nas estações de tratamento depende das condições operacionais da ETE, assim como da composição do esgoto e das características físico-químicas dos seus

componentes, como sua hidrofobicidade, biodegradabilidade e volatilidade (Siaréz S. et al., 2008).

No Brasil, assim como em outros países, a água de abastecimento público deve seguir alguns parâmetros de qualidade regulados pelo Ministério da Saúde através da portaria nº 2.914 de 2011 (Brasil, 2011). O tratamento de água deve ser realizado de modo a seguir os parâmetros de qualidade e, para isso, são feitos processos físico-químico que podem seguir as seguintes etapas: aeração, pré-cloração, ajuste de pH, coagulação, floculação, sedimentação ou flotação, filtração, desinfecção e fluoretação (Pescara I. C., 2014). Porém, mesmo passando por todas essas etapas de tratamento, a remoção dos CE das águas pode ser insuficiente e, devido a isso, frequentemente são encontrados CE nos ambientes aquáticos (Garcia-Corcoles M. T. et al., 2019; Hoff R. et al., 2019).

Em situações em que existem problemas com a coleta de esgoto público e seu tratamento, esses efluentes são comumente lançados diretamente nos corpos aquáticos. Assim, a remoção de CE por tratamentos de águas superficiais convencionais se torna ainda mais difícil (Galindo-Miranda J. M. et al., 2019; Muckoya V. A. et al., 2019; Pescara I. C., 2014). Na Figura 1.1 está apresentado um esquema de possíveis rotas e destino dos CE no meio ambiente.

Figura 1.1. Esquema de rotas e destinos dos CE no meio ambiente (Campbell C. G. et al., 2006).



Nesse contexto, o monitoramento dos CE a fim de acompanhar a real poluição das águas e conhecer os efeitos adversos que podem ser causados ao ambiente é extremamente importante e desafiador devido à complexidade das matrizes e aos baixos níveis de concentração encontrados (Gusmaroli L. *et al.*, 2018; Quintana J. *et al.*, 2019). Diversos métodos para determinação de CE em amostras ambientais são relatados na literatura, conforme mostrado na Tabela 1.1. Visando a obtenção de resultados confiáveis na determinação desses contaminantes, tem sido empregadas metodologias de determinação dos CE com uma etapa de preparo de amostra. Essa etapa é adicionada ao método para reduzir o processo conhecido como efeito de matriz, o qual é a interferência na extração dos analitos causada pela presença de componentes da matriz, remover sujeiras da amostra, gerar métodos analíticos e resultados mais confiáveis e precisos (Abbas A. *et al.*, 2019).

Tabela 1.1. Revisão dos métodos de determinação de CE em amostras de águas ambientais baseados em técnicas analíticas de separação.

Analito	Técnica	Preparo de amostra	Faixa Linear (ng/L)	LD (ng/L)	LQ (ng/L)	Amostra	Referência
Estrona	CG-MS	SPE	0,10-50	0,10	0,29	Águas superficiais	(Cesen M. e Heath E., 2017)
17 β -estradiol	LC-MS/MS	SPE	0,10-10	NA	0,17	Águas subterrâneas	(Glineur A. <i>et al.</i> , 2018)
Cafeína	CG-MS	SPE	NA	30	100	Água de torneira	(Sodré F. F. <i>et al.</i> , 2010)
Atrazina	CGxCG-TOF-MS	SBSE	5-500	0,98	3,28	Águas superficiais	(Gomez M. J. <i>et al.</i> , 2011)
Acetamipride	LC-MS/MS	SPE	1,5-80	0,11	1,50	Águas superficiais	(Malvar J. L. <i>et al.</i> , 2018)
Bisfenol-A	LC-DAD	MSPE	2000-250000	600	NA	Água potável e águas superficiais	(Baile P. <i>et al.</i> , 2020)
Carbamazepina	LC-HR/MS/MS	SPE	NA	0,5	1,5	Águas residuais de plantas de tratamento	(Mohapatra S. <i>et al.</i> , 2016)
Ciprofloxacina	LC-MS/MS	SPE	31,0-925	0,10	0,33	Água para consumo humano	(Gaffney V. D. <i>et al.</i> , 2014)
Tiametoxan	LC	SPE	10-50000	0,01	NA	Águas superficiais	(Mahai G. <i>et al.</i> , 2019)
	LC-MS/MS	SPE	500 - 1000000	7,80	26,1	Águas residuais de plantas de tratamento	(Paiga P. <i>et al.</i> , 2019)

LC-MS: cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas; LC-MS/MS: cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequenciais; CGxCG-TOF-MS: Espectrometria gasosa seequencial com detector de massas de tempo de voo; LC-HR/MS/MS: Cromatografia líquida de alta resolução acoplada a espectrometria de massas sequencial; LC-DAD: cromatografia líquida com detector de arranjo de diodos; CG-MS: cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas; SPE: extração em fase sólida; SBSE: extração com barra de agitação; MSPE: extração de fase sólida dispersiva magnética; LC: Cromatografia Líquida; LD: limite de detecção; LQ: limite de quantificação; NA: não apresentado.

Dentre as técnicas analíticas existentes, a que vem sendo mais aplicada para preparo da amostra na determinação dos CE é a extração em fase sólida (*SPE - Solid-Phase Extraction*) conforme mostrado na Tabela 1.1. Além de gerar melhores resultados, a SPE é citada pela EC como técnica base de preparo de amostra na determinação de CE (Gusmaroli L. *et al.*, 2018; Souza M. O. D., 2016).

Mesmo diante de todas as vantagens da utilização da técnica de SPE para extração e pré-concentração dos CE, esse procedimento pode ter baixa eficiência e ser demorado quando são analisadas concomitantemente maiores quantidades de analitos com características químicas distintas (Asimakopoulos A. G. *et al.*, 2017). Sendo assim, o desenvolvimento de novas técnicas analíticas de baixo impacto ambiental para preparo de amostra é interessante, tanto no ponto de vista tecnológico quanto do ponto de vista econômico.

1.3 Sistemas Aquosos Bifásicos

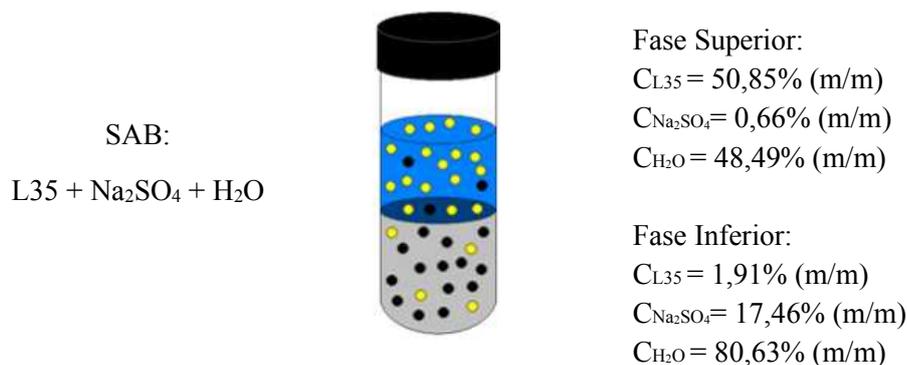
O Sistema Aquoso Bifásico (SAB ou ATPS – *Aqueous Two-Phase System*) é uma técnica de extração líquido-líquido que não faz o uso de solventes orgânicos (Ruiz-Ruiz F. *et al.*, 2012). Essa técnica foi descoberta em 1896 pelo pesquisador Martinus Willem Beijerinck ao reportar a formação de uma solução turva ao misturar soluções de gelatina e ágar ou gelatina e amido, sob determinadas temperatura e concentração, e posterior separação de duas fases distintas, após um tempo de repouso (Beijerinck M. W., 1896).

Apenas em 1956 houve a comprovação da aplicabilidade dos sistemas aquosos bifásicos por apresentar semelhanças com o ambiente celular ao separar e/ou purificar as células (Albertsson P. A., 1956). Em 1984, Zvarov e colaboradores publicaram o primeiro trabalho aplicando SAB para extração de íons metálicos, a partir do qual houve a expansão de estudos de melhoramento e aplicação dessa técnica para partição de outros compostos (Zvarova T. I. *et al.*, 1984). A partir disso, Rodrigues e colaboradores conseguiram aplicar pela primeira vez agentes hidrofóbicos para a extração de metais, conseguindo o aprimoramento da técnica, visto que até aquele momento só eram utilizados agentes extratores hidrofílicos, o que deixava a técnica limitada (Da Silva M. D. H. *et al.*, 2006; Rodrigues G. D. *et al.*, 2008). A nova metodologia proposta consistia na aplicação de copolímeros triblocos como agentes extratores em condições de temperatura, pressão e composição específicas, desse modo, formavam

micelas no meio, as quais eram responsáveis pela maior partição dos analitos menos hidrofílicos (Rodrigues G. D. *et al.*, 2008).

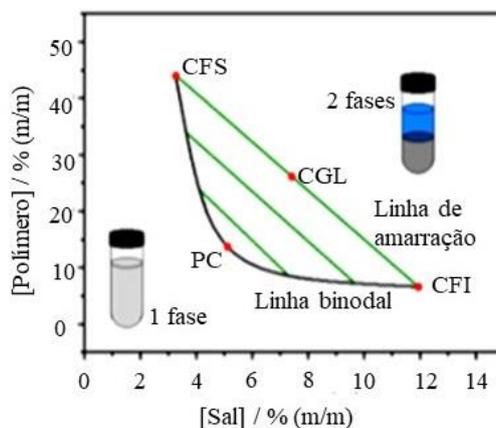
O SAB pode ser composto por duas soluções de polímero distintos (Zaslavsky B. Y., 1995), uma solução de polímero e uma de eletrólito (Rodrigues G. D. *et al.*, 2010) ou duas soluções de diferentes eletrólitos (De Alvarenga J. M. *et al.*, 2015), sendo que a água é o componente principal em todas as condições. Geralmente, quando o SAB é composto de polímero e eletrólito como mostrado na Figura 1.2, há a formação de uma fase superior (FS) rica em polímero e uma fase inferior (FI) rica em eletrólito.

Figura 1.2. Composições para um ponto de mistura do sistema aquoso bifásico L35 + Na₂SO₄ + H₂O, a 25,0 °C (2ª linha de amarração), sendo ● a representação do L35 e ● do Na₂SO₄ (Da Silva M. D. H. *et al.*, 2006).



A composição do SAB é representada, principalmente, através de um diagrama de fases retangular, como ilustrado na Figura 1.3, a qual exemplifica um sistema composto de um polímero e um eletrólito. Esse diagrama relaciona a concentração de eletrólito (eixo das abscissas) com a concentração de polímero (eixo das ordenadas), ambas dadas em % m/m. Sendo assim, esse gráfico tem extrema importância na aplicação da técnica de forma abrangente para extração de compostos químicos, visto que a partir dele são conhecidas as principais características do SAB, como as composições globais (CG), a composição da fase superior (CFS) e a composição da fase inferior (CFI). A construção desse diagrama acontece principalmente através da metodologia que inclui a titulação turbidimétrica, seguida pela quantificação dos componentes em cada fase do sistema (Rodrigues G. D., 2012; Zaslavsky B. Y., 1995).

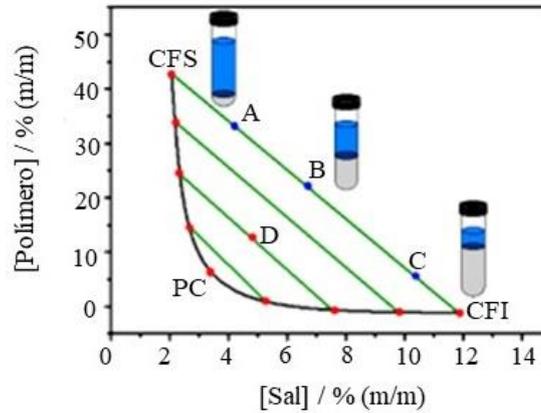
Figura 1.3. Diagrama de fases de um SAB constituído por polímero e eletrólito. Sendo CFS a composição da fase superior, CFI a composição da fase inferior, CGL a composição global do sistema e PC o ponto crítico (Rodrigues G. D., 2012).



No diagrama de fases da Figura 1.3 pode-se observar a presença da linha binodal (LB), a qual separa regiões onde há a formação de sistemas predominantemente heterogêneos das regiões de sistemas homogêneos. Abaixo da LB estão os pontos que geram sistemas monofásicos e acima há a formação de sistemas bifásicos. Nesta lógica, sob a LB, há um equilíbrio termodinâmico entre as composições globais que geram sistemas de fases miscíveis e imiscíveis (Rodrigues G. D., 2012). A posição da LB varia de acordo com o caráter hidrofóbico ou hidrofílico e massa molar do polímero, natureza química do eletrólito, temperatura e pressão (Martins J. P. *et al.*, 2008).

Além disso, no diagrama de fases retangular (Figura 1.3) existem as linhas de amarração (LA), responsáveis por ligar pontos de mistura global às suas respectivas composições das fases superior e inferior em equilíbrio termodinâmico (Leite D. D., 2018). Em uma linha de amarração, as propriedades termodinâmicas intensivas de cada fase (composição, condutividade, densidade, etc.) são constantes, contudo, as propriedades termodinâmicas extensivas (volume, massa, etc.) são distintas (Rodrigues G. D., 2012; Santhi J. V. *et al.*, 2020). A Figura 1.4 mostra três pontos (A, B e C) que representam três sistemas bifásicos diferentes em uma mesma LA, os quais possuem mesmas CFS e CFI, porém, volumes de fases diferentes.

Figura 1.4. Diagrama de fases apresentando sistemas de diferentes pontos (A, B, C e D) de misturas globais. Sendo CFS a composição da fase superior, CFI a composição da fase inferior e PC o ponto crítico (Rodrigues G. D. 2012).



Conforme observado na Figura 1.4, pontos que possuem composição global próximos ao ponto da CFI (ponto C) terão maior volume de fase inferior, em contrapartida, pontos que se encontram mais próximos da CFS (ponto A) terão maior volume de fase superior. Por conseguinte, o sistema representado pelo ponto B que se encontra no ponto médio da LA tem mesmos volumes de FI e FS. O ponto D, localizado em outra LA, possui também propriedades termodinâmicas intensivas distintas em relação aos outros (A, B e C). Como consequência da LA ser menor, as CFS e CFI do ponto D são menores e, à medida que se diminuem essas composições, os sistemas se tornam cada vez mais semelhantes, até que seja alcançado o ponto crítico (P_c), onde há a formação de sistemas homogêneos (Faria B. A. A., 2016; Rodrigues G. D., 2012).

O comprimento da linha de amarração (CLA) define as diferenças das propriedades intensivas das fases dos sistemas, tendo que quanto maior o CLA, maior a diferença das fases. Logo, se o analito de interesse possui afinidade apenas por uma das fases, é interessante se trabalhar em uma CLA maior para uma melhor extração. Assim, é extremamente importante o conhecimento desse parâmetro para a aplicação eficiente do SAB. O CLA é calculado a partir da composição dos componentes na FS e FI, de acordo com a Equação 1.1 (Santhi J. V. *et al.*, 2020).

$$CLA = [(C_p^S - C_p^I)^2 + (C_s^S - C_s^I)^2]^{1/2} \quad \text{Equação 1.1}$$

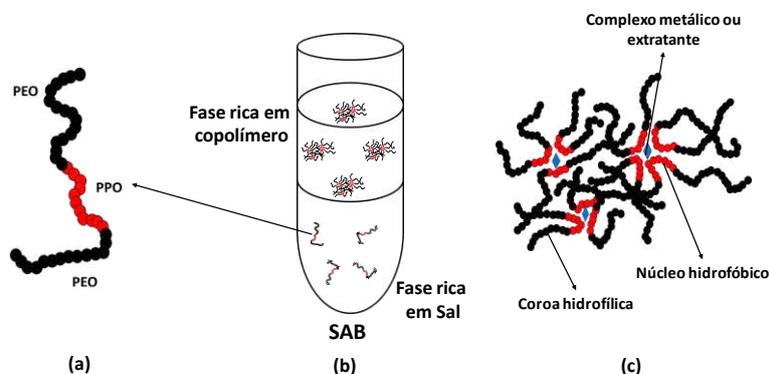
onde C_p^S e C_p^I são as concentrações de polímero e C_s^S e C_s^I são as concentrações do sal em % m/m nas fases superior e inferior, respectivamente.

Com o avanço da aplicabilidade do SAB em conjunto com a utilização de polímeros com características hidrofóbicas (copolímeros triblocos), a maioria dos estudos para partição/extração de diferentes analitos tem conseguido uma maior eficiência (Assis R. C. *et al.*, 2019; Leite D. D. *et al.*, 2019; Rodrigues G. D. *et al.*, 2008).

De forma geral, os polímeros podem ser classificados como homopolímeros ou copolímeros. Os homopolímeros contêm apenas uma unidade monomérica (como PEG – polietileno glicol), já os copolímeros são formados por duas ou mais unidades de monômeros diferentes, como no caso do polímero L64, que é formado por monômeros de polietileno glicol e polipropileno glicol.

Os copolímeros podem ter diferentes configurações, de acordo com a forma em que estão distribuídos os diferentes monômeros na molécula. As possíveis configurações para essas macromoléculas são: aleatória, alternado, em bloco ou enxertado (Caseli L. *et al.*, 2001; Yokoyama M., 1992). Dentre essas classificações, os copolímeros em bloco também podem ser agrupados em dibloco, tribloco, multibloco e estrela (Hirao A. *et al.* 2019). Esses polímeros configurados em bloco podem formar agregações de formas variadas, as quais são conhecidas como micelas (Figura 1.5). Essas organizações das macromoléculas de polímero ocorrem em condições de temperatura, pressão e concentração acima da Concentração Micelar Crítica (CMC). A partir da CMC, as moléculas se rearranjam de modo que haja uma parte interna hidrofóbica e uma parte externa em formato de coroa hidrofílica (Schacher F. *et al.*, 2009). Essa nova configuração proporciona ao polímero um caráter anfifílico e, devido a isso, a solubilização de compostos hidrofóbicos para aplicação do SAB torna-se vantajosa, levando em consideração que a água é o principal constituinte do sistema (Rodrigues G. D. *et al.*, 2008).

Figura 1.5. Esquema de formação de micelas: (a) molécula de copolímero tribloco formado por blocos de óxido de propileno (PPO) e óxido de etileno (PEO); (b) sistema aquoso bifásico formado por copolímero tribloco e sal; (c) estrutura das micelas formadas pelos copolímeros na FS (Rodrigues G. *et al.*, 2008).



A formação das micelas ocorre conforme mostrado na Figura 1.5. Nesse esquema foi utilizado como exemplo o copolímero tribloco L64 ((EO)₁₃(PPO)₃₀(PEO)₁₃, de massa molar 2900 g mol⁻¹), o qual é constituído por óxidos de propileno (PPO – parte hidrofóbica) e óxidos de etileno (PEO – parte hidrofílica).

Conhecendo as vantagens da aplicação dos copolímeros, Assis e colaboradores estudaram a extração seletiva do arsênio (III) em um SAB formado pelo copolímero L64 + Na₂SO₄ + H₂O na presença do extratante pirrolidina ditiocarbamato de amônio (APDC). Para uma melhor eficiência do método foram avaliados o pH do sistema, a natureza do polímero e sal formador do SAB, o CLA, o tipo e concentração de extrator e a razão mássica entre as fases. Por fim, foi conseguido uma extração de 98% de As(III) (Assis R. C. *et al.*, 2019). Além disso, outros pesquisadores também estudaram o comportamento da extração seletiva de bismuto em um SAB formado pelo copolímero tribloco L35 + NH₄NO₃ + H₂O, sem a presença de extratantes. Uma recuperação de 38,5 g de bismuto por quilograma de lixiviado foi observada diante de uma extração de 94,7% (Hespanhol M. C. *et al.*, 2019).

Além de ser aplicado a metais, o SAB também vem sendo estudado para extração/partição de analitos orgânicos, como a cafeína. Por exemplo, Yazdabadi e colaboradores propuseram a extração desse composto utilizando um sistema aquoso bifásico diferente formado por um líquido iônico (brometo de tetrabutílfosfônio) e o sorbitol. Sob condições ótimas, uma partição de 70,7% de cafeína foi obtida em um estágio de extração (Yazdabadi A. *et al.*, 2019).

Nesse contexto, o SAB apresenta grande potencial para extração de diversas classes de analitos, levando em consideração os ótimos resultados que vem apresentando como técnica de extração. Além disso, ao contrário da SPE, o SAB proporciona uma melhor frequência analítica e um baixo custo por análise, visto que necessita de pouca quantidade de reagentes como polímero e sal, os quais também têm baixo custo. Outras importantes vantagens são: ser composto majoritariamente por água e componentes biodegradáveis, pouco tóxicos e não inflamáveis, ter capacidade de extrair tanto espécies carregadas quanto neutras e apresentar baixa tensão interfacial (beneficiamento no processo de difusão de compostos através da interface) e possibilidade de aplicação em larga escala. Assim, a aplicação dessa técnica se torna vantajosa para o preparo de amostra visando a determinação de contaminantes em baixas concentrações, como hormônios e fármacos.

1.4 Referências bibliográficas

Abbas A, Schneider I, Bollmann A, Funke J, Oehlmann J, Prasse C, Schulte-Oehlmann U, Seitz W, Ternes T, Weber M, Wesely H, Wagner M (2019): What you extract is what you see: Optimising the preparation of water and wastewater samples for in vitro bioassays. *Water Research* 152, 47-60

Albertsson PA (1956): Chromatography and partition of cells and cell fragments. *Nature* 177, 771-774

Asimakopoulos AG, Kannan P, Higgins S, Kannan K (2017): Determination of 89 drugs and other micropollutants in unfiltered wastewater and freshwater by LC-MS/MS: an alternative sample preparation approach. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 409, 6205-6225

Assis RC, Faria BAD, Caldeira CL, Mageste AB, de Lemos LR, Rodrigues GD (2019): Extraction of arsenic(III) in aqueous two-phase systems: A new methodology for determination and speciation analysis of inorganic arsenic. *Microchemical Journal* 147, 429-436

Baile P, Medina J, Vidal L, Canals A (2020): Determination of four bisphenols in water and urine samples by magnetic dispersive solid-phase extraction using a modified zeolite/iron oxide composite prior to liquid chromatography diode array detection. *Journal of Separation Science*, 1-9

Beijerink MW (1896): Ueber eine eigentümlichkeit der löslichen Stärke. *Nature* 627, 697- 699

Boger B, Surek M, Vilhena R. O., Fachi M. M., Junkert A. M., Santos J. M. M. F., Domingos E. L., Cobre A. F., Momade D. R., Pontarolo R. (2021), Occurrence of antibiotics and antibiotic resistant bacteria in subtropical urban rivers in Brazil, *Journal of hazardous materials* 402, 123448.

BRASIL (2011): Ministério da Saúde - PORTARIA Nº 2.914, Brasília - DF, pp. 19

Campbell CG, Borglin SE, Green FB, Grayson A, Wozel E, Stringfellow WT (2006): Biologically directed environmental monitoring, fate, and transport of estrogenic endocrine disrupting compounds in water: A review. *Chemosphere* 65, 1265-1280.

Caseli L, Nobre TM, Silva DAK, Loh W, Zaniquelli MED (2001): Flexibility of the triblock copolymers modulating their penetration and expulsion mechanism in Langmuir monolayers of dihexadecyl phosphoric acid. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 22, 309-321

Cesen M, Heath E (2017): Disk-based solid phase extraction for the determination of diclofenac and steroidal estrogens E1, E2 and EE2 listed in the WFD watch list by GC-MS. *Science of the Total Environment* 590, 832-837

da Silva MDH, da Silva LHM, Amim J, Guimaraes RO, Martins JP (2006): Liquid-liquid equilibrium of aqueous mixture of triblock copolymers L35 and F68 with Na₂SO₄, Li₂SO₄, or MgSO₄. *Journal of Chemical and Engineering Data* 51, 2260-2264

de andradede Alvarenga JM, Fideles RA, da Silva MV, Murari GF, Taylor JG, de Lemos LR, Rodrigues GD, Mageste AB (2015): Partition study of textile dye Remazol Yellow Gold RNL in aqueous two-phase systems. *Fluid Phase Equilibria* 391, 1- 8

EC (2001): European Commission, Review of priority substances under the WFD. Disponível em: https://ec.europa.eu/info/index_en. Acessado em 12/2019.

Faria BAA 2016: Desenvolvimento de metodologia analítica ambientalmente segura para determinação de cromo em amostras de interesse ambiental por extração em sistemas bifásicos baseados em água, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG

Gaffney VD, Cardoso VV, Rodrigues A, Ferreira E, Benoliel MJ, Almeida CMM (2014): Analysis of pharmaceutical compounds in water by SPE-UPLC-ESI-MS/MS. *Quimica Nova* 37, 138-149

Galindo-Miranda JM, Guizar-Gonzalez C, Becerril-Bravo EJ, Moeller-Chavez G, LeonBecerril E, Vallejo-Rodriguez R (2019): Occurrence of emerging contaminants in environmental surface waters and their analytical methodology - a review. *Water Science and Technology-Water Supply* 19, 1871-1884

Gao YX, Xia J, Liu DC, Kang RX, Yu G, Deng SB (2019): Synthesis of mixed-linker ZrMOFs for emerging contaminant adsorption and photodegradation under visible light. *Chemical Engineering Journal* 378, 122118

Garcia-Corcoles MT, Rodriguez-Gomez R, de Alarcon-Gomez B, Cipa M, Martin-Pozo L, Kauffmann JM, Zafra-Gomez A (2019): Chromatographic Methods for the Determination of Emerging Contaminants in Natural Water and Wastewater Samples: A Review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 49, 160-186

Glineur A, Nott K, Carbonnelle P, Ronkart S, Lognay G, Tyteca E (2018): Trace analysis of estrogenic compounds in surface and groundwater by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry as pyridine-3-sulfonyl derivatives. *Journal of Chromatography A* 1534, 43-54

Gomez MJ, Herrera S, Sole D, Garcia-Calvo E, Fernandez-Alba AR (2011): Automatic Searching and Evaluation of Priority and Emerging Contaminants in Wastewater and River Water by Stir Bar Sorptive Extraction followed by Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography-Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* 83, 2638-2647

Grosseli GM 2016: Contaminantes emergentes em estações de tratamento de esgoto aeróbica e anaeróbica, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP

Gusmaroli L, Insa S, Petrovic M (2018): Development of an online SPE-UHPLC-MS/MS method for the multiresidue analysis of the 17 compounds from the EU "Watch list". *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 410, 4165-4176

Hespanhol MC, Patricio PR, da Silva LHM, Vargas SJR, Rezende TCS, Campos RA (2019): A Sustainable Methodology to Extract Bismuth from Secondary Sources. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 30, 2376-2385

Hirao A, Matsuo Y, Goseki R (2019): Synthesis of novel block polymers with unusual block sequences by methodology combining living anionic polymerization and designed linking chemistry. *Journal of Polymer Research* 26, 263

Hoff R, Echeverria AD, Hoff GD, Kneip RC, Jank L, Arsand J, Goncalves FF (2019): Efficiency of a low-cost pyramid-shaped solar still for pesticide removal from highly contaminated water. *Chemosphere* 234, 427-437

Jimoh AA, Lin J (2019): Biosurfactant: A new frontier for greener technology and environmental sustainability. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 184, 109607

Kim HM, Long NP, Yoon SJ, Nguyen HT, Kwon SW (2019): Metabolomics and phenotype assessment reveal cellular toxicity of triclosan in *Caenorhabditis elegans*. *Chemosphere* 236, 124306

Leite DD, Carvalho PLG, de Lemos LR, Mageste AB, Rodrigues GD (2019): Hydrometallurgical recovery of Zn(II) and Mn(II) from alkaline batteries waste employing aqueous two-phase system. *Separation and Purification Technology* 210, 327-334

Leite DS 2018: Desenvolvimento de novas rotas hidrometalúrgicas para recuperação de metais a partir de lixo eletrônico. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG

Mahai G, Wan YJ, Xia W, Yang SY, He ZY, Xu SQ (2019): Neonicotinoid insecticides in surface water from the central Yangtze River, China. *Chemosphere* 229, 452- 460

Malvar JL, Abril C, Martin J, Santos JL, Aparicio I, Escot C, Basanta A, Alonso E (2018): Development of an analytical method for the simultaneous determination of the 17 EU

Watch List compounds in surface waters: a Spanish case study. *Environmental Chemistry* 15, 493-505

Martins JP, Carvalho CP, da Silva LHM, Coimbra JSR, da Silva MCH, Rodrigues GD, Minim LA (2008): Liquid–liquid equilibria of an aqueous two-phase system containing Poly(ethylene) Glycol 1500 and sulfate salts at different temperatures. *Journal of Chemical & Engineering Data* 53, 238–241

Mastrup M, Schafer AI, Khan SJ (2005): Predicting fate of the contraceptive pill in wastewater treatment and discharge. *Water Science and Technology* 52, 279-286

Mohapatra S, Huang CH, Mukherji S, Padhye LP (2016): Occurrence and fate of pharmaceuticals in WWTPs in India and comparison with a similar study in the United States. *Chemosphere* 159, 526-535

Montagner CC, Jardim WF (2011): Spatial and Seasonal Variations of Pharmaceuticals and Endocrine Disruptors in the Atibaia River, Sao Paulo State (Brazil). *Journal of the Brazilian Chemical Society* 22, 1452-1462

Muckoya VA, Idris AO, Nomngongo PN, Ngila JC (2019): Synthesized carbon nanodots for simultaneous extraction of personal care products and organophosphorus pesticides in wastewater samples prior to LC-MS/MS determination. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 411, 6173-6187

Organization WH (2011): World Health Organization, Guidelines for drinking - water quality, . Acessado 01/2020.

Paiga P, Correia M, Fernandes MJ, Silva A, Carvalho M, Vieira J, Jorge S, Silva JG, Freire C, Delerue-Matos C (2019): Assessment of 83 pharmaceuticals in WWTP influent and effluent samples by UHPLC-MS/MS: Hourly variation. *Science of the Total Environment* 648, 582-600

Pereira CDS, Maranhão LA, Cortez FS, Pusceddu FH, Santos AR, Ribeiro DA, Cesar A, Guimaraes LL (2016): Occurrence of pharmaceuticals and cocaine in a Brazilian coastal zone. *Science of the Total Environment* 548, 148-154

Pescara IC 2014: Ocorrência e remoção de contaminantes emergentes por tratamentos convencionais de água e esgoto, Universidade Estadual de Campinas, Campinas - SP

Petrie B, Barden R, Kasprzyk-Hordern B (2015): A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: Current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. *Water Research* 72, 3-27

Pollitt KJG, Kim JH, Peccia J, Elimelech M, Zhang YW, Charkoftaki G, Hodges B, Zucker I, Huang H, Deziel NC, Murphy K, Ishii M, Johnson CH, Boissevain A, O'Keefe E, Anastas PT, Orlicky D, Thompson DC, Vasiliou V (2019): 1,4- Dioxane as an emerging water contaminant: State of the science and evaluation of research needs. *Science of the Total Environment* 690, 853-866

Quintana J, de la Cal A, Boleda MR (2019): Monitoring the complex occurrence of pesticides in the Llobregat basin, natural and drinking waters in Barcelona metropolitan area (Catalonia, NE Spain) by a validated multi-residue online analytical method. *Science of the Total Environment* 692, 952-965

Rodrigues GD, da Silva MDH, da Silva LHM, Paggioli FJ, Minim LA, Coimbra JSD (2008): Liquid-liquid extraction of metal ions without use of organic solvent. *Separation and Purification Technology* 62, 687-693

Rodrigues GD, de Lemos LR, da Silva LHM, da Silva MDH, Minim LA, Coimbra JSD (2010): A green and sensitive method to determine phenols in water and wastewater samples using an aqueous two-phase system. *Talanta* 80, 1139-1144

Rodrigues GD 2012: Desenvolvimento e Aplicação de novos Sistemas Aquosos Bifásicos para a determinação e separação de metais, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG

Ruiz-Ruiz F, Benavides J, Aguilar O, Rito-Palomares M (2012): Aqueous two-phase affinity partitioning systems: Current applications and trends. *Journal of Chromatography A* 1244, 1-13

Santhi JV, Tavanandi HA, Sharma R, Prabhakar G, Raghavarao K (2020): Differential partitioning of coconut whey proteins and fat using aqueous two phase extraction. *Fluid Phase Equilibria* 503, 112314

Schacher F, Walther A, Ruppel M, Drechsler M, Muller AHE (2009): Multicompartment Core Micelles of Triblock Terpolymers in Organic Media. *Macromolecules* 42, 3540-3548

Schriks M, Heringa MB, van der Kool MME, Voogt P, van Wezel AP (2010): Toxicological relevance of emerging contaminants for drinking water quality. *Water Research* 44, 461-476

SNIS (2019): Diagnóstico de água e esgotos - 2017. Disponível em: <http://www.snis.gov.br>. Acessado 12/2019

SNIS (2021): Diagnóstico de água e esgotos - 2020. Disponível em: <http://www.snis.gov.br/diagnosticos>. Acesso em: Acessado em 05/2022.

Sodré FF, Locatelli MAF, Jardim WF (2010): Occurrence of emerging contaminants in brazilian drinking waters: a sewage-to-tap issue. *Water, Air, Soil & Pollution* 206, 57–67

Soriano-Molina P, Sanchez JLG, Malato S, Plaza-Bolanos P, Aguera A, Perez JAS (2019): On the design and operation of solar photo-Fenton open reactors for the removal of contaminants of emerging concern from WWTP effluents at neutral pH. *Applied Catalysis B-Environmental* 256, 117801

Souza MPd 2016: Determinação de contaminantes emergentes em água utilizando microextração adsortiva em barra (BA μ E) e UHPLC-MS/MS, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria - RS

Stuart M, Lapworth D, Crane E, Hart A (2012): Review of risk from potential emerging contaminants in UK groundwater. *Science of the Total Environment* 416, 1-21

Stumpf M, Haberer K, Rodrigues SV, Baumann W (1997): Organic residues in lake and drinking water from the Lagoa de Juturnaiba (Região dos Lagos, RJ, Brazil). *Journal of the Brazilian Chemical Society* 8, 509-514

Suaréz S, Carballa M, Omil F, Lema JM (2008): How are pharmaceutical and personal care products (PPCPs) removed from urban wastewaters? *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 7, 125–138

Ternes TA, Stumpf M, Mueller J, Haberer K, Wilken RD, Servos M (1999): Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *Science of the Total Environment* 225, 81-90

US EPA (2015): United States Environmental Protection Agency. Disponível em: <https://www.govinfo.gov/content/pkg/FR-2015-02-04/pdf/2015-02210.pdf>. Acessado 11/2019

Vo HNP, Le GK, Nguyen TMH, Bui XT, Nguyen KH, Rene ER, Vo TDH, Cao NDT, Mohan R (2019): Acetaminophen micropollutant: Historical and current occurrences, toxicity, removal strategies and transformation pathways in different environments. *Chemosphere* 236, 15

Yazdabadi A, Shahriari S, Salehifar M (2019): Extraction of caffeine using aqueous twophase systems containing ionic liquid and sorbitol. *Fluid Phase Equilibria* 502, 8

Yokoyama M (1992): Block copolymers as drug carriers. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 9, 213-248

Zaslavsky BY (1995): Use of the aqueous two-phase partition technique for characterization and quality control of recombinant proteins. *Aqueous Biphasic Separations: Biomolecules to Metal Ions*, 177-183

Zhou XY, Li Y, Li HP, Yang ZG, Zuo CC (2019): Responses in the crucian carp (*Carassius auratus*) exposed to environmentally relevant concentration of 17 α Ethinylestradiol based on metabolomics. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 183, 109501

Zvarova TI, Shkinev VM, Vorobeva GA, Spivakov BY, Zolotov YA (1984): Liquidliquid extraction in the absence of usual organic-solvents - application of twophase aqueous systems based on a water-soluble polymer. *Microchimica Acta* 3, 449-458.

CAPÍTULO 2. Objetivos

2.1 Objetivos gerais

Este trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de uma nova metodologia de baixo impacto ambiental empregando SAB para a extração, pré-concentração e *clean-up*, de alguns hormônios esteroides classificados como contaminantes emergentes e interferentes endócrinos. Além de validar um método empregando sistemas aquosos bifásicos como preparo de amostras e UPLC-MS/MS como técnica analítica para determinação de fármacos, também classificados como contaminantes emergentes, em matrizes de águas superficiais.

2.2 Objetivos específicos

- Estudar a influência da composição do SAB na partição dos fármacos;
- Avaliar os efeitos do comprimento da linha de amarração (CLA), temperatura e pH do meio sobre a partição dos hormônios;
- Estudar o efeito da variação das massas das fases (m_F/m_S : 1/1, 2/1, 3/1, 4/1 e 5/1) sobre o comportamento de partição dos hormônios estudados;
- Avaliar o comportamento da partição dos hormônios em SAB através de um planejamento experimental, a fim de avaliar interações entre a resposta (absorbância) e os parâmetros estudados;
- Aplicar o SAB otimizado no estudo de partição dos hormônios em amostras de água;
- Otimizar as condições cromatográficas e de espectrometria de massas para determinação de amoxicilina;
- Validar um método empregando SAB como preparo de amostras e UPLC-MS/MS como técnica analítica para determinação de amoxicilina em matrizes de águas superficiais.

CAPÍTULO 3. Extração de hormônios esteroides provenientes de pílulas anticoncepcionais aplicando sistemas aquosos bifásicos

3.1. Introdução

Alguns dos contaminantes emergentes podem causar, além de todos os efeitos já citados, modificações no sistema endócrino de animais e humanos, as quais podem ser responsáveis por provocar efeitos adversos no desenvolvimento, reprodução e funções neurológicas e imunológicas. Esse grupo de substâncias é conhecido como interferentes endócrinos ou, do inglês, *endocrine disrupting compounds* (EDCs) (Wee S. Y. e Aris A. Z., 2019). Como exemplos de integrantes desse grupo tem-se os hormônios, metais e produtos de cuidados pessoais (Wee S. Y. *et al.*, 2019).

O sistema endócrino é responsável pelo controle de muitos processos, como a diferenciação das células para o desenvolvimento embrionário, além de controlar o metabolismo e a reprodução dos seres humanos. Seu funcionamento acontece por meio da interação entre células e hormônios através de receptores específicos, a partir daí a mensagem é transmitida através da corrente sanguínea (Cais T. A., 2016). A influência desse sistema em processos biológicos importantes, aumenta a sua vulnerabilidade aos distúrbios externos, mesmo em baixas concentrações (ng L^{-1} ou pg L^{-1}) (Deich C. *et al.*, 2020).

Os EDCs podem agir de modo a induzir o corpo a responder excessivamente ao estímulo a que está sendo induzido, como ocorre com os hormônios de crescimento, responder de forma inapropriada aos estímulos, bloquear o efeito de outros hormônios ou causar uma maior ou menor produção de hormônios do que o natural (Wee S. Y. e Aris A. Z., 2019). Weiss e colaboradores reportaram o efeito inibidor de um EDCs da classe dos surfactantes sobre os níveis hormonais da tireoide, visto que compete com outro hormônio pela interação com a enzima responsável em manter os níveis hormonais do corpo adequados (Weiss J. M. *et al.*, 2009).

A permanência desses compostos nas matrizes ambientais tem sido o principal fator que causou o aumento nos estudos relacionados aos EDCs, diante do alto potencial como contaminante. De toda a América Latina, o Brasil e o México são os países com mais estudos relacionados a análise de EDCs no ambiente em geral, mas principalmente em águas tratadas e águas superficiais (Reichert G. *et al.*, 2019). Diversos estudos citam a presença desses

compostos nas diversas matrizes aquosas ambientais, sendo que os principais reportados são os hormônios, e apresentam possíveis consequências para o ecossistema e saúde pública (Deich C. *et al.*, 2020).

Jardim e colaboradores avaliaram a estrogenicidade das águas potáveis de São Paulo no Brasil e encontraram valores na faixa de 0,13-3,10 ng L⁻¹ (Jardim W. F. *et al.*, 2012). Além disso, Dias e colaboradores estudaram amostras de águas superficiais do estado do Rio de Janeiro e observaram uma faixa mais ampla de concentração de 0,0-16 ng L⁻¹ de hormônios nessas matrizes (Dias A. C. V. *et al.*, 2015). Em amostras de um estuário localizado na cidade do Rio de Janeiro foi detectado uma faixa de concentração de hormônios esteroides de 0,5-3,2 ng L⁻¹ (Do Nascimento M. T. L. *et al.*, 2018).

Wee e colaboradores estudaram a ocorrência e distribuição dos EDCs nas águas superficiais da Malásia e observaram a presença de hormônios, fármacos, pesticidas e plastificantes. Dentre todos os EDCs encontrados, os que apresentaram maiores concentrações foram a cafeína (19,33 ng L⁻¹), o bisfenol A (8,24 ng L⁻¹) e o fármaco diclofenaco (6,15 ng L⁻¹) (Wee S. Y. *et al.*, 2019).

Diante de todos os possíveis impactos causados por essa classe de compostos, a União Europeia já regulamenta a presença desses compostos em suas águas e considera este grupo como sendo altamente perigoso (EC, 2001).

Dentre todas as classes dos EDCs, os hormônios esteroides tem um dos mais significativos potencial de interferência no sistema endócrino, visto que tem um dos maiores efeitos estrogênicos. Além disso, é um dos compostos mais abrangentes no ambiente aquático, devido à sua ampla biodisponibilidade (Chang H. *et al.*, 2018). Assim, é de suma importância o desenvolvimento de métodos eficientes para detecção e quantificação destas substâncias nas matrizes aquosas a fim de evitar problemas futuros.

3.1.1 Hormônios esteroides

O tecido esteroidogênico é o único responsável por utilizar a molécula de colesterol como material de partida para a biossíntese da pregnenolona, que é o esteroide precursor para os hormônios esteroides (Schiffer L. *et al.*, 2019). Esses tipos de compostos podem ainda ser classificados como andrógenos, estrógenos, glicocorticoides, mineralocorticoides e progestágenos, de acordo com sua estrutura ou atividade (Robles J. *et al.*, 2017). Dentre esses,

os hormônios andrógenos são hormônios sexuais masculinos e os estrógenos e progestágenos são hormônios sexuais femininos. Além disso, os hormônios estrógenos podem existir na sua forma natural, como o 17β -estradiol e na sua forma sintética, obtidos principalmente por uso de métodos contraceptivos (Chang H. *et al.*, 2018; Dallegrave A., 2012).

Os primeiros relatos, associando a presença dos hormônios com interferências no sistema endócrino, ocorreram com a utilização do hormônio estrógeno sintético dietilbestrol (DES), que era muito aplicado na prevenção do aborto entre os anos 1940-1970. Mães que fizeram uso desses medicamentos geraram filhas que apresentaram problemas na gravidez, disfunção nos órgãos reprodutivos e distúrbios no sistema imunológico (Colborn T. *et al.*, 1993). Conhecidos esses problemas, o uso do DES foi então proibido e, somente na década de 1990 os estudos dos efeitos dos diferentes hormônios no ambiente se iniciaram.

Dentre as diferentes classes, os hormônios sexuais femininos acarretam maior preocupação ambiental devido a sua maior disponibilidade e a conformação que apresenta, a qual favorece a interação com o receptores do sistema, resultando em uma resposta mais intensa (Machado K. S., 2010). Mesmo assim, os andrógenos também são substâncias que requerem atenção, visto que apresentam riscos aos animais aquáticos, podendo causar, dentre outras coisas, a masculinização de peixes fêmeas. Além disso, os andrógenos são amplamente empregados em uso médico em animais e humanos, assim como, excretados em grande quantidade (Liu S. S. *et al.*, 2020; Yu Q. M. *et al.*, 2019).

A grande parte da excreção dos hormônios naturais e sintéticos ocorre através da urina ou, em menor proporção, por meio das fezes como substâncias solúveis. Sob condições naturais, estes metabólitos podem ser rapidamente hidrolisados retornando a sua forma original (Robles J. *et al.*, 2017; Yu Q. M. *et al.*, 2019). Todas essas substâncias já foram detectadas em diversas matrizes ambientais, como águas superficiais, plantas de tratamento de esgoto e águas nascentes (Liu S. S. *et al.*, 2020).

Portanto, com o aumento do uso desses hormônios para diversos fins, a probabilidade desses compostos serem despejados de forma inadequada e estarem presentes nas matrizes ambientais se eleva. Assim, a remediação de matrizes contaminadas e a determinação e quantificação dos EDCs no ambiente se torna muito importante (Lima D. R. S. *et al.*, 2017; Yu Q. M. *et al.*, 2019).

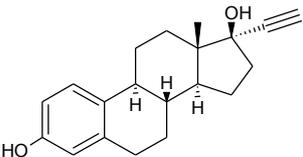
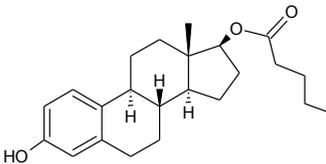
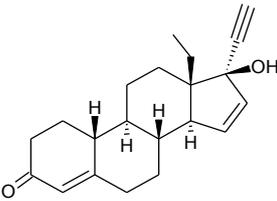
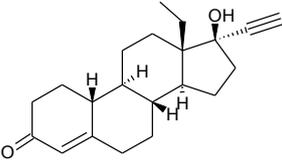
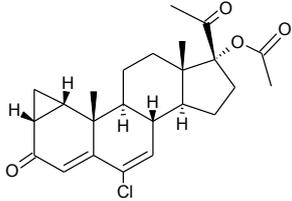
3.1.2 Origem de hormônios esteroides no ambiente

O uso de hormônios em medicamentos destinados para tratamento de reposição hormonal em mulheres na menopausa, prevenção de osteoporose e, até mesmo, tratamentos de câncer de mama e próstata foi inovador para a saúde. Devido a isso, o aprimoramento no desenvolvimento desses medicamentos tende a ser constante (Andrade L. R., 2013). Como exemplo, para o controle da natalidade da população tem sido aplicados hormônios sintéticos, visto que os naturais não possuem lipofilicidade suficiente para sua absorção pelo trato digestivo (Mastrup M. *et al.*, 2005). Para isso, hormônios estrogênicos como o 17 α -etinilestradiol são comumente empregados em pílulas anticoncepcionais.

No Brasil, Ternes e colaboradores foram responsáveis pelo primeiro estudo relacionado à presença de hormônios estrogênicos nas águas, o qual foi publicado em 1999. Os autores determinaram a eficiência na remoção de estrogênios em plantas de tratamento de esgoto da cidade do Rio de Janeiro, observando falha no sistema para esse fim. Nesse estudo foram encontrados nos efluentes das plantas de tratamento de esgoto 0,021 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 0,040 $\mu\text{g L}^{-1}$ dos hormônios 17 β -estradiol e estrona, respectivamente (Ternes T. A. *et al.*, 1999). Atualmente, a presença de hormônios nos corpos aquáticos é um tema muito relevante e, por isso, é estudado mundialmente devido aos problemas associados à sua presença (Chang H. *et al.*, 2018; Yu Q. M. *et al.*, 2019).

Neste contexto, os hormônios a serem estudados foram escolhidos por serem componentes de medicamentos de contracepção comumente usados no Brasil, como o Minesse[®] (Gestodeno - GD e 17 α -etinilestradiol – EE2), Ciclo 21[®] (Levonorgestrel – LV e EE2), Diane 35[®] (Acetato de ciproterona - AC e EE2) e Mesigyna[®] (Valerato de estradiol - VE). As estruturas químicas e algumas características físico-químicas, compreendida pela constante de dissociação (pK_a) e coeficiente de partição metanol-água ($\log K_{ow}$) de cada um dos hormônios estudados estão agrupadas na Tabela 3.1. Através desses dados é possível compreender a polaridade da molécula, assim como, conhecer a espécie presente de acordo com o pH do meio. É importante destacar que o governo brasileiro disponibiliza de forma gratuita, através do programa “Farmácia Popular” os fármacos Ciclo 21[®] e Mesigyna[®] (Saúde, 2017).

Tabela 3.1. Estruturas químicas dos hormônios estudados e suas propriedades: nome, fórmula molecular, massa molecular, constante de dissociação ácida (pK_a) e coeficiente de partição octanol/água ($\log K_{ow}$).

Nome	Fórmula molecular	Massa molecular (g mol ⁻¹)	Estrutura química	pK_a	Log K_{ow}	Referências
EE2	C ₂₀ H ₂₄ O ₂	296,4		10,5	4,11	Chaves K. S., 2016; Lai K. M. <i>et al.</i> , 2000; Dorwald F. Z., 2012
VE	C ₂₃ H ₃₂ O ₃	356,5		10,3	6,41	Bergamin B. <i>et al.</i> , 2019; Lai K. M. <i>et al.</i> , 2000; Dorwald F. Z., 2012
GD	C ₂₁ H ₂₆ O ₂	310,4		-	2,02	Rokhina E. V. <i>et al.</i> , 2012; Dorwald F. Z., 2012
LV	C ₂₁ H ₂₈ O ₂	312,4		19,3	3,37	Nasuhoglu D. <i>et al.</i> , 2012; Dorwald F. Z., 2012
AC	C ₂₄ H ₂₉ ClO ₄	416,9		-	3,81	Ghasemiyeh P. <i>et al.</i> , 2019; Dorwald F. Z., 2012

De acordo com os dados descritos da Tabela 3.1, o alto valor pK_a para LV demonstra que a ionização dessa molécula não é favorável. Dentre todos os hormônios estudados, os hormônios esteroides (EE2 e VE) possuem maior valor de Log K_{ow} , o que atribui a eles uma menor polaridade e, conseqüentemente, uma menor afinidade por fases aquosas. A partir dessas informações uma melhor compreensão do comportamento de extração dos analitos é possível.

Dentre os hormônios escolhidos, apenas o 17α -etinilestradiol tem o limite máximo permitido no ambiente estabelecido pela EU, o qual é $0,035 \text{ ng L}^{-1}$ (Cesen M. *et al.*, 2017). O alto potencial como interferente endócrino de todos os compostos é conhecido e vem sendo estudado continuamente, porém ainda não há uma diretriz que estabeleça normas para aparecimento no ambiente.

Com isso, a importância do desenvolvimento de metodologias de análise eficientes para esses compostos em matrizes ambientais aumenta. Nesse sentido, o SAB é apresentado como uma técnica que visa a extração e pré-concentração de hormônios exógenos encontrados em pílulas anticoncepcionais. Apesar do SAB já ser aplicado na partição e pré-concentração de vários compostos estratégicos, como metais, corantes e polissacarídeos, é a primeira vez que será utilizado como técnica de preparo de amostra para determinação de hormônios.

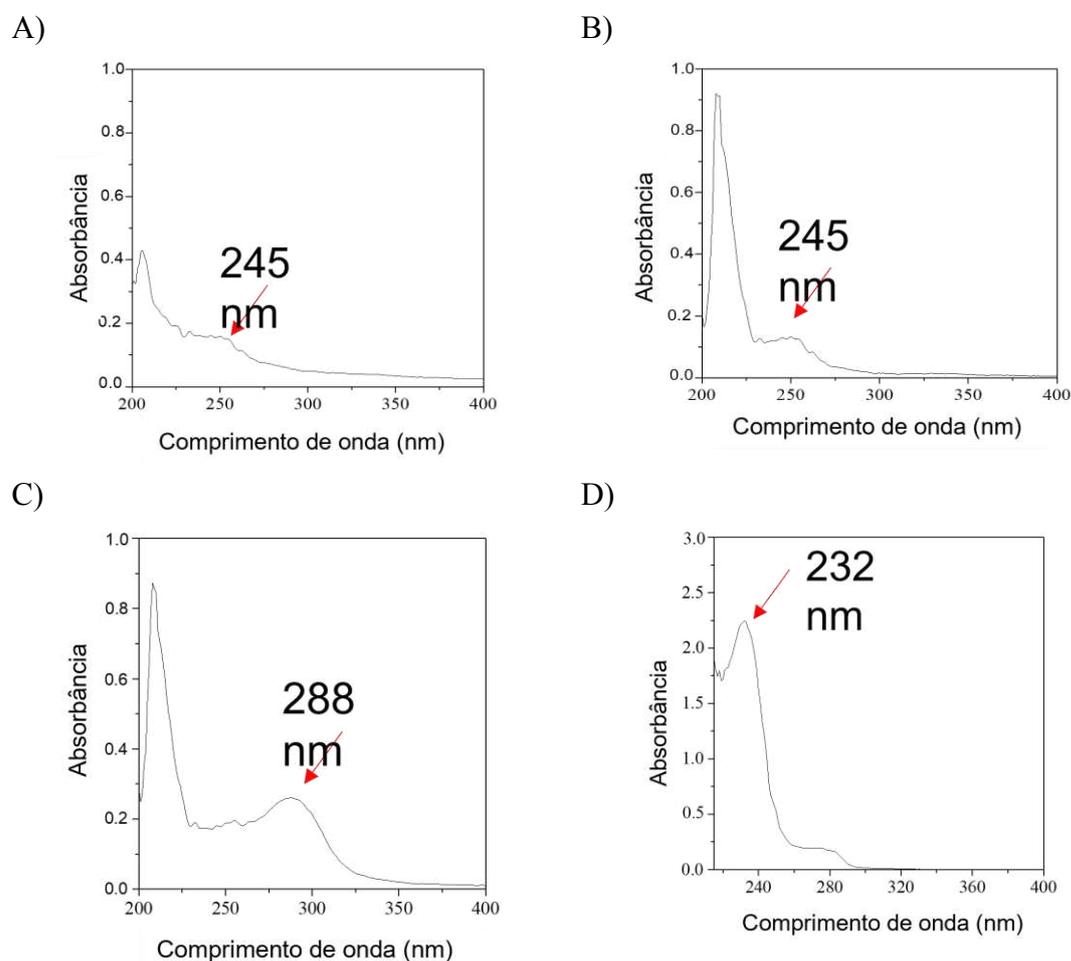
3.2. Parte experimental

3.2.1 Instrumentação

O ajuste de pH da água deionizada utilizada para preparo das soluções estoques do SAB foi realizado em um pHmetro digital (Hanna Instruments, HI 2221). Para a preparação das soluções foi utilizada uma balança analítica (AUY 220, Shimadzu) com uma incerteza de $\pm 0,0001$ g. Para agilizar a separação de fases foi utilizada uma centrífuga (Excelsa II, FANEN) e o equilíbrio termodinâmico das amostras foi estabelecido através de um banho ultratermostático de incerteza $\pm 0,1$ °C (MA 184, Marconi). Além disso, um banho de ultrassom (Sanders medical) foi utilizado para auxiliar a limpeza de materiais plásticos e vidrarias.

Os sinais analíticos foram obtidos através de um espectrofotômetro de absorção UV-Vis (Hitachi U-2010) utilizando uma cubeta de quartzo de 1,0 cm de comprimento óptico nos comprimentos de onda máximos previamente determinados pela obtenção dos respectivos espectros de absorção das soluções dos medicamentos Minesse (245nm), Diane 35 (288 nm), Ciclo 21 (245 nm) e Mesigyna (232 nm), conforme mostrado na Figura 3.1.

Figura 3.1. Espectros de absorção na região UV-Visível das soluções dos medicamentos A) Minesse, B) Ciclo 21, C) Diane 35 e D) Mesigyna.



3.2.2 Reagentes

Os polímeros utilizados para formação dos SAB foram o PEO1500 (fórmula molecular $\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n\text{H}$ e $\text{MM} = 1500 \text{ g mol}^{-1}$) obtido da Vetec e os copolímeros tribloco L64 (fórmula molecular $(\text{EO})_{13}(\text{PO})_{30}(\text{EO})_{13}$ e $\text{MM} = 2900 \text{ g mol}^{-1}$) e L35 (fórmula molecular $(\text{EO})_{11}(\text{PO})_{16}(\text{EO})_{11}$ e $\text{MM} = 1900 \text{ g mol}^{-1}$), fabricados pela Sigma-Aldrich. Os sais utilizados foram: sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), tartarato de sódio ($\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e sulfato de lítio ($\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) obtidos da Vetec, e o sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) fornecido pela Synth.

Os anticoncepcionais Diane 35 (2 mg de AC e 0,035 mg de EE2) e o Mesigyna (50 mg mL^{-1} de enantato de noretisterona e 5 mg L^{-1} de VE) foram obtidos da Bayer, o Minesse (60 mg de GD e 15 mg de EE2) pela Wyeth e o Ciclo 21 (0,15 mg de LV e 0,03 mg de EE2) adquirido

da União Química. A Figura 3.2 mostram os fármacos utilizados nesse trabalho. Esses medicamentos foram escolhidos por serem os anticoncepcionais mais utilizados no Brasil devido ao seu baixo custo e grande disponibilidade.

Figura 3.2. Medicamentos utilizados nesse trabalho como fonte dos hormônios.



Todos os experimentos foram realizados utilizando água deionizada (resistividade = 18,2 M Ω .cm a 298,15 K) obtida do Ultrapore Water Simplicity UV (Millipore). Para os ajustes de pH das soluções foram utilizados ácido sulfúrico (H₂SO₄, 96,0%) da Merck e hidróxido de sódio (NaOH, 99,0%), adquirido da Vetec.

3.2.3 Composição do SAB e procedimento de extração

Soluções aquosas estoque de polímero e eletrólito foram preparadas medindo-se massas específicas de cada reagente em água deionizada após os ajustes de pH. As concentrações dessas soluções foram obtidas através do comprimento de linha de amarração (CLA) predeterminadas do sistema, baseadas na literatura para os diferentes sistemas estudados (Tabela 3.2).

Tabela 3.2. Sistemas utilizados como base de SAB para a realização da partição de hormônios em diferentes composições de polímero, eletrólito e água.

Sistemas	Referências
L35 + Na ₂ SO ₄ + H ₂ O	(Da Silva M. D. H. <i>et al.</i> , 2006)
L35 + Li ₂ SO ₄ .H ₂ O + H ₂ O	
L35 + MgSO ₄ .7H ₂ O + H ₂ O	
L35 + Na ₂ C ₄ H ₄ O ₆ .2H ₂ O + H ₂ O	(Martins J. P. <i>et al.</i> , 2009)
L35 + Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ .2H ₂ O + H ₂ O	
L64 + Na ₂ SO ₄ + H ₂ O	(Rodrigues G. D. <i>et al.</i> , 2009)
L64 + Li ₂ SO ₄ .H ₂ O + H ₂ O	
L64 + MgSO ₄ .7H ₂ O + H ₂ O	
L64 + Na ₂ C ₄ H ₄ O ₆ .2H ₂ O + H ₂ O	(De Andrade V. M. <i>et al.</i> , 2011)
L64 + Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ .2H ₂ O + H ₂ O	
PEO1500 + Na ₂ SO ₄ + H ₂ O	(Martins J. P. <i>et al.</i> , 2008)
PEO1500 + Li ₂ SO ₄ .H ₂ O + H ₂ O	
PEO1500 + MgSO ₄ .7H ₂ O + H ₂ O	
PEO1500 + Na ₂ C ₄ H ₄ O ₆ .2H ₂ O + H ₂ O	(Martins J. P. <i>et al.</i> , 2008)
PEO1500 + Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ .2H ₂ O + H ₂ O	

Em todos os experimentos foram utilizadas soluções preparadas com as pílulas anticoncepcionais previamente trituradas com almofariz e pistilo e armazenadas, separadamente, em ambiente sem luz para garantir sua estabilidade. O procedimento de extração dos analitos foi realizado em duas etapas.

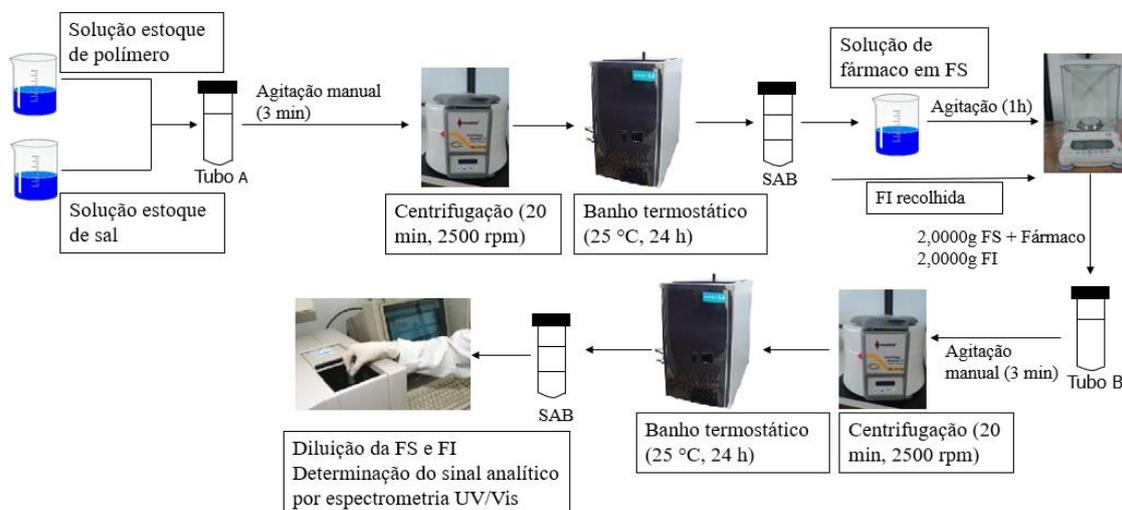
Primeiramente, sistemas estoques foram preparados através da mistura das soluções de polímero e eletrólito em tubos de ensaio de 50 mL, de acordo com a composição global desejada. Os tubos foram agitados manualmente por 3 minutos, centrifugados por 20 minutos com uma força centrífuga de 560 x g e colocados em banho termostático por 24 horas a 25,0 °C para estabelecer o equilíbrio termodinâmico das fases, exceto nos experimentos onde a temperatura foi variada.

Posteriormente, as fases foram coletadas separadamente utilizando seringas e a fase superior foi utilizada como solvente no preparo das soluções dos hormônios. Sabendo da presença de dois hormônios por medicamento, as soluções foram preparadas levando em consideração a concentração do princípio ativo presente em menor quantidade (EE2 e EV).

Com isso, a concentração do analito de menor quantidade foi mantida constante e igual a $4,00 \text{ mg kg}^{-1}$ em todos os experimentos. Então, 2,0000 g dessas soluções de hormônios foram pesados em tubos de ensaio de 15 mL e misturados com 2,0000 g de fase inferior recolhida anteriormente do SAB estoque (FI). Apenas nos experimentos que avaliaram a pré-concentração dos analitos foi alterada a massa de FS e FI. Todos os experimentos foram realizados em duplicata, e um branco foi preparado para cada um dos diferentes ensaios.

Os tubos de 15 mL também foram agitados manualmente por 3 minutos e depois centrifugados por 20 minutos a $560 \times g$ para acelerar a separação de fases. Assim como para os SAB's estoque, esses tubos foram mantidos em banho termostático por 24 horas a $25,0 \text{ }^\circ\text{C}$ para estabelecer o equilíbrio termodinâmico, exceto nos experimentos onde a temperatura foi variada. As FS e FI de cada tubo foram coletadas com auxílio de seringas e diluídas em um intervalo de fator de diluição de 1 a 10 para análise no espectrofotômetro UV-Vis. Todo o processo de extração é sumarizado na Figura 3.3.

Figura 3.3. Representação esquemática do processo de extração empregado para os hormônios esteroides.



3.2.4 Otimização de extração

A influência de alguns parâmetros possivelmente importantes para a partição dos hormônios no SAB foram avaliados, tais como: o pH do meio (3,00; 5,00; 7,00; 9,00 e 11,00); a natureza do eletrólito (Na_2SO_4 , $\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e do polímero (PEO1500, L64 e L35) formador do SAB; o comprimento da

linha de amarração do sistema; a temperatura controlada do banho termostático (5,00; 15,0; 25,0; e 40,0 °C); e a relação mássica das fases inferior e superior do sistema (m_{FI}/m_{FS} : 1/1, 2/1, 3/1, 4/1 e 5/1).

3.2.5 Avaliação da partição dos analitos

A partição dos hormônios foi avaliada através do coeficiente de partição (K) obtido em cada ensaio. O cálculo do K foi realizado levando em consideração a lei de Lambert-Beer que enuncia que a concentração do analito é proporcional à absorbância. Assim, o K foi calculado através da razão dos sinais de absorção molecular dos analitos obtidos nas duas fases do SAB (Equação 3.1).

$$K = \frac{[\text{hormônios}]^{FS}}{[\text{hormônios}]^{FI}} = \frac{\text{Abs}^{FS} \times f^{FS}}{\text{Abs}^{FI} \times f^{FI}} \quad \text{Equação 3.1}$$

onde Abs^{FS} e Abs^{FI} o sinal da absorbância das fases superior e inferior, respectivamente, no comprimento de onda específico apresentado por cada medicamento, conforme Figura 3.1. Os termos f^{FS} e f^{FI} representam os fatores de diluição de cada fase.

Além disso, parâmetros termodinâmicos também foram determinados com o objetivo de conhecer a espontaneidade do processo de partição nos SAB estudados. A variação da energia livre de Gibbs foi calculada através dos valores de K obtidos nos ensaios em diferentes temperaturas, a partir da Equação 3.2.

$$\Delta_p G = -RT \ln K \quad \text{Equação 3.2}$$

onde $\Delta_p G$ é a variação da energia livre de Gibbs molar dos hormônios particionados para a FS (J mol^{-1}); T é a temperatura na qual o experimento foi realizado (em Kelvin); R é a constante real dos gases ($8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$); e K é o coeficiente de partição obtidos nos ensaios de cada fármaco.

A variação de entalpia ($\Delta_p H$) do processo de partição dos fármacos foi obtida através da aproximação de Van't Hoff, a qual relaciona a variação da constante de equilíbrio com a variação de temperatura (Equação 3.3). Para isso, gerou-se a equação da reta de um gráfico de eixos iguais a $\ln K \times 1/T$. Assim, $\Delta_p H$ foi obtido através do valor de inclinação da curva resultante da regressão linear do gráfico construído.

$$\ln K = -\frac{\Delta_p H}{R} \left(\frac{1}{T} \right) + \frac{\Delta_p S}{R} \quad \text{Equação 3.3}$$

onde $\Delta_p H$ é a variação de entalpia molar do fármaco particionado para a FS (J mol^{-1}); T é a temperatura na qual o experimento foi realizado (em Kelvin); R é a constante real dos gases ($8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$); $\Delta_p S$ é a variação de entropia molar no processo de partição de cada fármaco ($\text{J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$); e K é o coeficiente de partição dos hormônios.

A variação de entropia ($\Delta_p S$) do processo de partição também foi calculada. Esse parâmetro foi determinado a partir da equação de variação da energia livre de Gibbs (Equação 3.4), visto que os valores de $\Delta_p H$ e $\Delta_p G$ já eram conhecidos.

$$\Delta_p G = \Delta_p H - T\Delta_p S \quad \text{Equação 3.4}$$

3.2.6 Planejamento experimental para extração de hormônios em sistema aquoso bifásico

O planejamento experimental foi aplicado para otimizar a partição dos hormônios LV e EE2 obtidos do fármaco Ciclo 21, a fim de comparar os resultados obtidos com aqueles provenientes da otimização univariada para cada fármaco. Esse ensaio teve como objetivo verificar a existência de possíveis interações entre os parâmetros do SAB analisados, tomando como base as condições do SAB já determinadas para o Ciclo 21 na otimização anteriormente realizada. Assim, os SAB's utilizados nesses experimentos foram preparados a partir de soluções estoque de polímero (L35 ou PEO1500) e eletrólito (sulfato de sódio ou citrato de sódio). Esses polímeros e sais específicos foram utilizados por serem componentes das condições de extrações que apresentaram melhores resultados de extração na otimização univariada para o Ciclo 21. Toda a extração foi realizada conforme já descrito anteriormente.

Primeiramente, uma triagem das variáveis do SAB foi realizada empregando planejamento fatorial fracionário (2^{6-1}). Os softwares Excel e Desing Expert 11 foram empregados para o cálculo dos efeitos e construção dos gráficos. A resposta analisada foi a absorção da FS resultante da análise em espectrometria de absorção molecular UV/Vis. A Tabela 3.3 sumariza as variáveis e os níveis estudados.

Tabela 3.3. Planejamento Fracionário (2^{6-1}) para partição dos hormônios em sistemas aquosos bifásicos.

Variáveis	Nível (-)	Nível (+)
Polímero	PEO 1500	L35
Eletrólito	Sulfato de sódio	Citrato de sódio
Linha de amarração (LA)	2	5
pH	3	7
Razão das massas (m_{FI}/m_{FS})	2/1	5/1
Temperatura (°C)	25	40

Nesse contexto, quatro SAB's diferentes foram avaliados em relação ao comportamento de partição dos hormônios: L35 + Na₂SO₄ + H₂O, PEO1500 + Na₂SO₄ + H₂O, L35 + Na₃C₆H₅O₇.2H₂O + H₂O e PEO1500 + Na₃C₆H₅O₇.2H₂O + H₂O. A composição dos sistemas aquosos bifásicos foi baseada na literatura e a descrição encontra-se na Tabela 3.4.

Tabela 3.4. Dados retirados da literatura das concentrações em % m/m de polímero (m_p) e sal (m_s) na fase superior (FS) e fase inferior (FI) para os SAB estudados e os respectivos comprimentos de linha de amarração (CLA), a 25°C e 40 °C (da Silva *et al.*, 2006; Martins *et al.*, 2008).

T (°C)	FS		FI		CLA (% m/m)	LA
	m_p	m_s	m_p	m_s		
L35 + Na₂SO₄ + H₂O						
25	50,85	0,66	1,91	17,46	51,74	2
	59,59	0,15	0,77	25,53	64,04	5
40	47,55	1,09	1,92	9,14	46,33	2
	60,06	0,61	0,09	12,98	61,23	5
PEO1500 + Na₂SO₄ + H₂O						
25	34,51	2,16	2,12	17,77	35,95	2
	46,29	1,20	0,59	23,58	50,88	5
40	39,07	2,29	1,43	17,03	40,42	2
	48,79	1,07	0,91	22,54	52,47	5
L35 + Na₃C₆H₅O₇.2H₂O + H₂O						
25	41,58	2,11	2,33	17,24	42,16	2
	57,56	0,75	3,32	25,16	59,48	5
40	50,88	1,25	2,81	16,97	50,58	2
	63,24	0,49	5,18	24,20	62,71	5
PEO1500 + Na₃C₆H₅O₇.2H₂O + H₂O						
25	32,31	4,39	0,46	22,29	36,54	2
	45,63	1,70	0,01	30,29	53,84	5
40	36,35	3,54	0,35	21,47	40,22	2
	48,99	1,51	0,01	30,56	56,95	5

Posteriormente, foi feito um planejamento fatorial 2^3 em duplicata ($n = 2$), em SAB formado pelo sal Na₂SO₄ na razão das massas (m_{FI}/m_{FS}) de 5/1 e em pH 3,00 a fim de proporcionar uma melhor partição dos analitos e a sua pré-concentração. As variáveis e os níveis estudados encontram-se na Tabela 3.5.

Tabela 3.5. Planejamento Fatorial 2^3 com duplicatas para a extração de hormônios SAB formado por PEO 1500 ou L35 + Na_2SO_4 + H_2O .

Variáveis	Nível (-)	Nível (+)
Polímero	PEO 1500	L35
Linha de amarração (LA)	2	5
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	25	40

Com base nisso, a extração dos hormônios foi seguida na condição ótima de composição do sistema.

3.2.7 Aplicação do método de extração otimizado em amostras aquosas ambientais

A condição otimizada (L35 + Na_2SO_4 + H_2O em pH 3,00; LA 5 - CLA = 64,06% m/m; temperatura de 25 $^{\circ}\text{C}$) encontrada nas etapas de otimização foi aplicada em quatro diferentes amostras de água: água da rede de abastecimento público de Belo Horizonte, coletada na torneira do departamento de química da UFMG - laboratório 214; água superficial, coletada na margem da Lagoa da Pampulha localizada na cidade de Belo Horizonte - MG; água filtrada obtida na estação de tratamento de água do Serviço Autônomo de Água e Esgoto (SAAE) da cidade de Viçosa-MG; e água do Rio Doce coletada na estação de recebimento do SAAE da cidade de Governador Valadares-MG.

Com a finalidade de caracterizar as amostras, o pH de cada solução foi medido e são 7,81; 7,92; 7,70 e 7,63 para a água de torneira, água da lagoa, água filtrada e água de rio, respectivamente.

As referidas amostras foram selecionadas devido às diferentes etapas de tratamento que foram ou não submetidas, podendo ter diferentes composições e, conseqüentemente, diferentes quantidades de hormônios presentes. Dentre as águas avaliadas, a água da torneira é considerada potável, já que recebeu todo o tratamento convencional utilizado na maioria das ETA's. As águas da lagoa e do rio, classificadas como classe 3 de acordo com o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) (CONAMA 430/2011), recebem pouco ou nenhum tipo de tratamento. A amostra de água da ETA recebeu os tratamentos prévios até o processo de filtração, já que a coleta foi realizada em um filtro anterior a etapa de desinfecção.

3.3. Resultados e discussão

3.3.1 Otimização dos parâmetros do SAB

Frequentemente, agentes extratantes são aplicados no SAB com o objetivo de formar complexos com o analito de interesse, o qual normalmente tem natureza inorgânica e tende a ter maior interação pelos eletrólitos presentes em maior quantidade na fase inferior. Assim, complexos formados entre o extratante e o analito determinam a partição para uma das fases (Leite D. D. *et al.*, 2019). Quando não há a presença de nenhum composto adicional, o analito tende a permanecer na fase em que possui maior afinidade depois da formação do sistema.

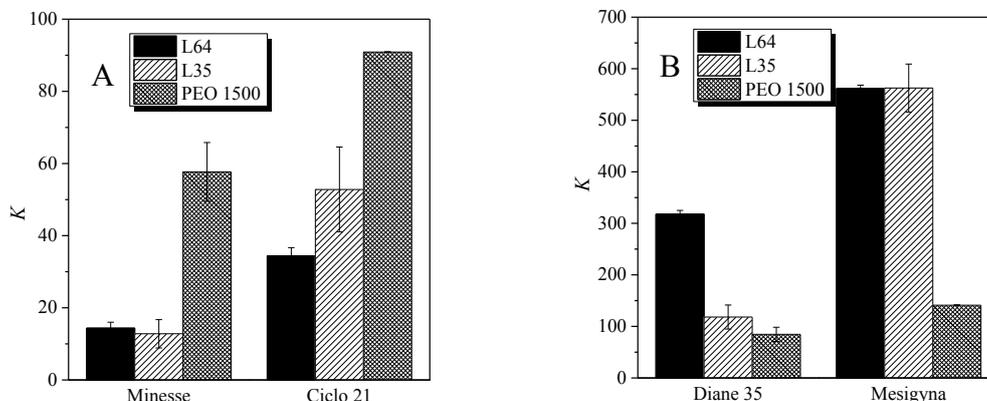
Nesse sentido, o analito com menor caráter hidrofílico tende a particionar para a fase polimérica (FS) do sistema, visto que o polímero possui menor afinidade com o meio aquoso do que a fase salina. Nesse caso, o valor de K tende a ser maior ($K > 1$) devido a permanência de mais analitos na fase superior. Ao contrário, o analito terá uma interação mais forte com os eletrólitos do sistema quando ele tiver maior caráter hidrofílico.

Os hormônios esteroides possuem caráter hidrofóbico e, por isso, pode-se supor que a partição ocorra preferencialmente para a fase superior do SAB, quando não há nenhum agente extratante. Além da FS ter maior caráter hidrofóbico, nela pode haver a formação de micelas acima da CMC quando aplicados copolímeros. Entretanto, a partição das moléculas orgânicas em SAB não depende somente das suas características físico-química, mas também da composição do sistema (Azevedo A. M. *et al.*, 2009). Sendo assim, visando uma maior partição dos analitos estudados, vários parâmetros do sistema podem ser variados, como: a composição e o CLA do sistema, o pH do meio, a temperatura, a variação das massas etc.

3.3.1.1 Efeito do polímero formador do SAB

A natureza do polímero formador do SAB é um parâmetro muito importante para a partição dos analitos no sistema, uma vez que podem possuir diferentes grau de hidrofobicidade e massas molares. Sabendo disso, foram avaliados os SAB compostos por: PEO 1500 + Na₂SO₄ + H₂O; L35 + Na₂SO₄ + H₂O e L64 + Na₂SO₄ + H₂O, em pH = 5,00 e CLA = 46,97; 46,77; 47,82 % m/m, respectivamente. A Figura 3.4 ilustra o comportamento de extração dos hormônios contidos nos diferentes medicamentos aplicados.

Figura 3.4. Efeito da natureza do polímero ou copolímero (L35, L64 e PEO1500) formador do SAB ($\text{Na}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{O}$) na partição dos fármacos presentes nos medicamentos, em $\text{pH} = 5,00$: A) Minesse e Ciclo 21; B) Diane 35 e Mesigyna.



Nota-se que a partição de todos os hormônios estudados foi influenciada pela presença dos diferentes polímeros e que todos os analitos foram particionados preferencialmente para a FS do sistema, como observado pelos valores de K maiores do que 1.

Os fármacos dos medicamentos Minesse e Ciclo 21 apresentaram comportamento similar frente à variada composição do SAB. Em ambos, a maior partição para a FS foi obtida com a utilização do polímero PEO 1500, o qual é mais hidrossolúvel. Nessa condição, foram obtidos os valores de K iguais a (58 ± 8) para o Minesse e $(91,91 \pm 0,07)$ para o Ciclo 21. Essa maior afinidade por PEO 1500 observada pode ser atribuída ao menor grau de lipofilicidade dos hormônios GD e LV constituintes desses fármacos, dada pelos menores valores de $\log K_{ow}$ (2,02 e 3,37, respectivamente) mostrados na Tabela 3.1. As características do EE2, também constituinte dessas pílulas, não foi levado em consideração devido a estar presente também no Diane 35, o qual apresentou resultado diferente.

A partição do Diane 35 para a FS do sistema foi maior e igual a (318 ± 7) quando aplicado um SAB de composição L64 + $\text{Na}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{O}$. Já, o Mesigyna apresentou um comportamento de partição semelhante em L64 ($K = 562 \pm 6$) e L35 ($K = 562 \pm 47$). Tanto o copolímero L64 quanto o L35 são formados por óxido de etileno (PEO) e óxido de propileno (PPO), o que proporciona um maior grau hidrofóbico para ambos.

Nesse contexto, a melhor afinidade do Diane 35 e do Mesigyna pelos copolímeros L64 e L35, respectivamente, está relacionada com a menor afinidade por água dos hormônios AC

($\log K_{ow} = 3,81$) e VE ($\log K_{ow} = 6,41$), e do maior grau de hidrofobicidade desses polímeros em relação ao PEO 1500.

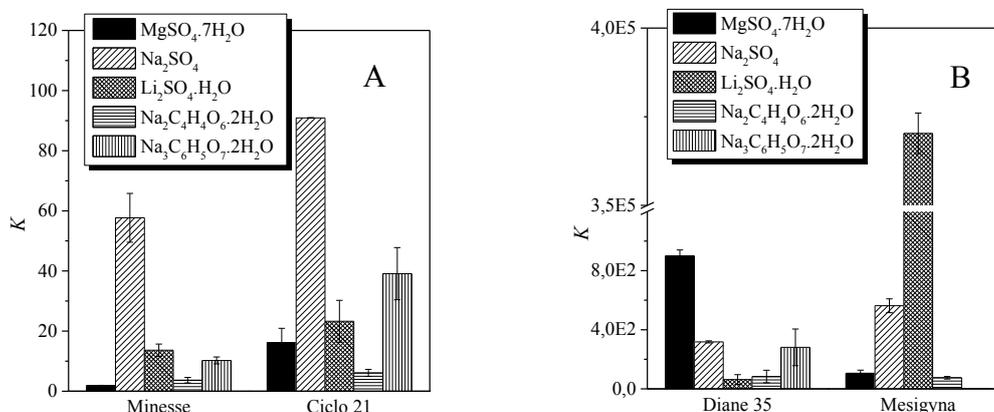
Sendo assim, o SAB composto pelo polímero PEO 1500 foi escolhido para seguir os estudos com os medicamentos Ciclo 21 e Minesse. Já, para os demais estudos com o Diane 35 e Mesigyna foram aplicados os copolímeros L64 e L35, respectivamente.

Apesar da partição dos analitos ser bastante influenciada pela natureza do polímero, esse não é o único parâmetro importante para aprimorar a metodologia. Por se tratar de moléculas orgânicas polares, a partição para a FS do sistema também pode ser influenciada pelo pH do meio e pelo eletrólito presente na FI.

3.3.1.2 Influência do eletrólito formador do SAB

O efeito do eletrólito na partição dos hormônios no SAB foi avaliado utilizando os seguintes sais na composição da FI: Na_2SO_4 , $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e pH 5,00. Nesse ensaio foram utilizados os polímeros selecionados anteriormente. Além disso, valores de CLA semelhantes foram aplicados para os diferentes sistemas, visando manter a magnitude das diferenças das propriedades termodinâmicas intensivas das FS e FI do sistema, avaliando apenas a natureza do sal formador do sistema. Os valores de K obtidos após a partição dos fármacos nos diferentes sistemas estão apresentados na Figura 3.5.

Figura 3.5. Efeito da natureza do eletrólito formador do SAB na partição dos fármacos: A) Minesse e Ciclo 21 (PEO + sal + H₂O); B) Diane 35 (L64 + sal + H₂O) e Mesigyna (L35 + sal + H₂O).



O efeito do eletrólito formador do SAB mostrou ser significativo na partição dos hormônios. O sal sulfato de sódio (Na_2SO_4) foi o eletrólito que mais favoreceu a partição dos fármacos Minesse e Ciclo 21 preferencialmente para a fase superior do sistema. Por outro lado, os hormônios presentes no Diane 35 apresentaram maior partição para a FS na presença do sal sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), com um K igual a (899 ± 41) . No caso do fármaco Mesigyna, a partição dos hormônios foi aumentada significativamente com o sal sulfato de lítio ($\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), alcançando um valor de K igual a $(4 \times 10^5 \pm 6 \times 10^3)$.

Diante desses resultados, pode-se observar que o ânion sulfato apresentou significativa influência na partição dos analitos, visto que seus sais correspondentes proporcionaram uma maior partição de todos os hormônios para a FS. Esse resultado está de acordo com o apresentado na literatura, na qual cita a formação de SAB com sais de sulfato, mesmo que em condição diferente, sem perda de eficiência na partição de moléculas orgânicas (Li N. *et al.*, 2015). Além do mais, o efeito causado pelo ânion sulfato pode ter ocorrido devido ao fenômeno “*salting-out*”, visto que esse ânion possui uma alta capacidade de estruturar as moléculas de água no sistema, deixando os ânions fortemente hidratados (Rogers R. D. *et al.*, 1996). A consequência disso é que as fases superior e inferior do sistema se tornam mais diferentes, o que intensifica a interação dos hormônios com a fase pela qual tem maior afinidade, que neste caso é a FS.

Além disso, percebe-se que os cátions (Li^+ , Na^+ e Mg^{+2}) dos sais de sulfato também influenciaram a distribuição dos diferentes hormônios entre as fases do sistema. O modo exato

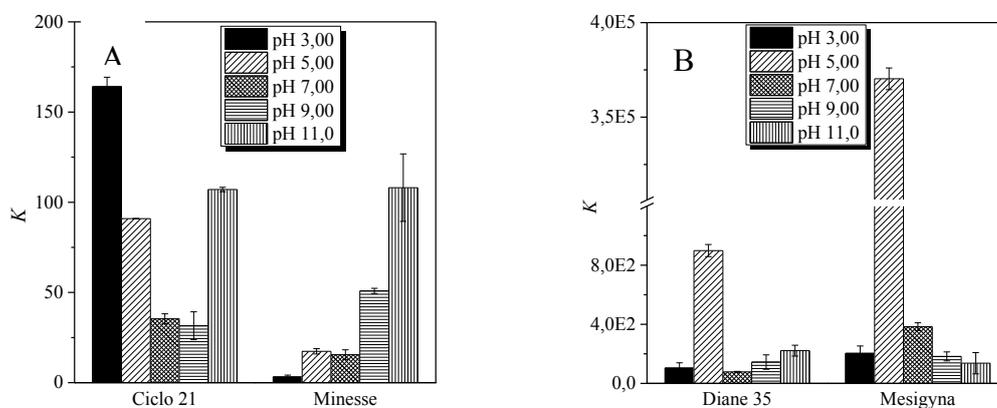
como ocorre essa interferência na partição ainda não é claro, porém existe uma discussão na literatura relacionada a possíveis formações de pseudopolications no sistema (Silva L. H. M. D. e Loh W., 2000). Essa espécie é um agregado constituído de molécula de polímero solvatada pelos íons formadores do sistema, a qual pode apresentar diferentes densidades de carga, dependendo do sal presente.

Nessa linha de raciocínio, sabendo que um mesmo sistema formado por PEO 1500 + Na₂SO₄ + H₂O obteve uma melhor partição dos hormônios presentes no Minesse e Ciclo 21, pode-se supor que esse polímero forma espécies de pseudopolications com o cátion Na⁺ que favorecem sua partição para a FS. Do mesmo modo, os outros polímeros (L64 e L35) formam espécies com os cátions Mg²⁺ e Li⁺ que favorecem a partição dos analitos contidos nos fármacos Diane 35 e Mesigyna, respectivamente.

3.3.1.3 Efeito do pH na partição de hormônios em SAB

A Figura 3.6 ilustra a influência do pH na partição de hormônios em SAB compostos por: PEO 1500 + Na₂SO₄ + H₂O (Ciclo 21 e Minesse), L35 + Li₂SO₄ + H₂O (Mesigyna) e L64 + MgSO₄ + H₂O (Diane 35). Os diferentes valores de pH do meio interferiram consideravelmente na partição dos diferentes hormônios em SAB.

Figura 3.6. Efeito da influência do pH (3,00; 5,00; 7,00; 9,00; 11,00) do meio na partição dos hormônios EE2, LV, AC, GD e VE componentes dos medicamentos: A) Ciclo 21 e Minesse; B) Diane 35 e Mesigyna.



Os hormônios EE2 e LV contidos nas pílulas anticoncepcionais do Ciclo 21 foram mais bem particionados em pH 3,00 ($K = 164 \pm 5$), porém apresentou valor alto de K também em pH 11,0 ($K = 107 \pm 1$). Em pH 3,00 ambos os hormônios se encontram na sua forma neutra, de acordo com os respectivos pK_a (10,5 e 19,3, respectivamente), o que facilita a interação com as macromoléculas de polímero. Conforme o pH do meio vai aumentando, maior quantidade de moléculas de EE2 se encontram desprotonadas em solução, o que proporciona um aumento na afinidade pela fase rica em sal, prejudicando então a partição para a FS. Entretanto, esse comportamento muda em pH 11,0 provavelmente devido à maior quantidade de moléculas de EE2 disponíveis na forma iônica ($pK_a = 10,5$), as quais causam a saturação da FI do sistema e começam a ser particionadas para a FS. Assim como a parte orgânica do polímero atrai de forma mais efetiva a parte orgânica dos analitos através de forças de London, a qual é característica de interações entre moléculas orgânicas (Mantri R. V. *et al.*, 2017).

Nesse mesmo sistema, a partição dos hormônios GD ($pK_a = 2,02$) e EE2 ($pK_a = 10,5$) componentes do medicamento Minesse para a FS do SAB tornou-se mais eficiente com o aumento do pH do meio, sendo que o maior coeficiente de partição foi obtido em pH 11,0 ($K = 108 \pm 19$). Tanto o Ciclo 21 quanto o Minesse possuem o EE2 em sua composição, nesse sentido, a diferença no desempenho de partição observado pode ser relacionada com a presença do GD. Além disso, o K encontrado para o Minesse em pH 11,0 é similar ao do Ciclo 21 neste mesmo pH, indicando que nessa condição ocorre uma saturação da FI, seguida da partição das moléculas desprotonadas restantes de hormônio para a FS, conforme discutido anteriormente.

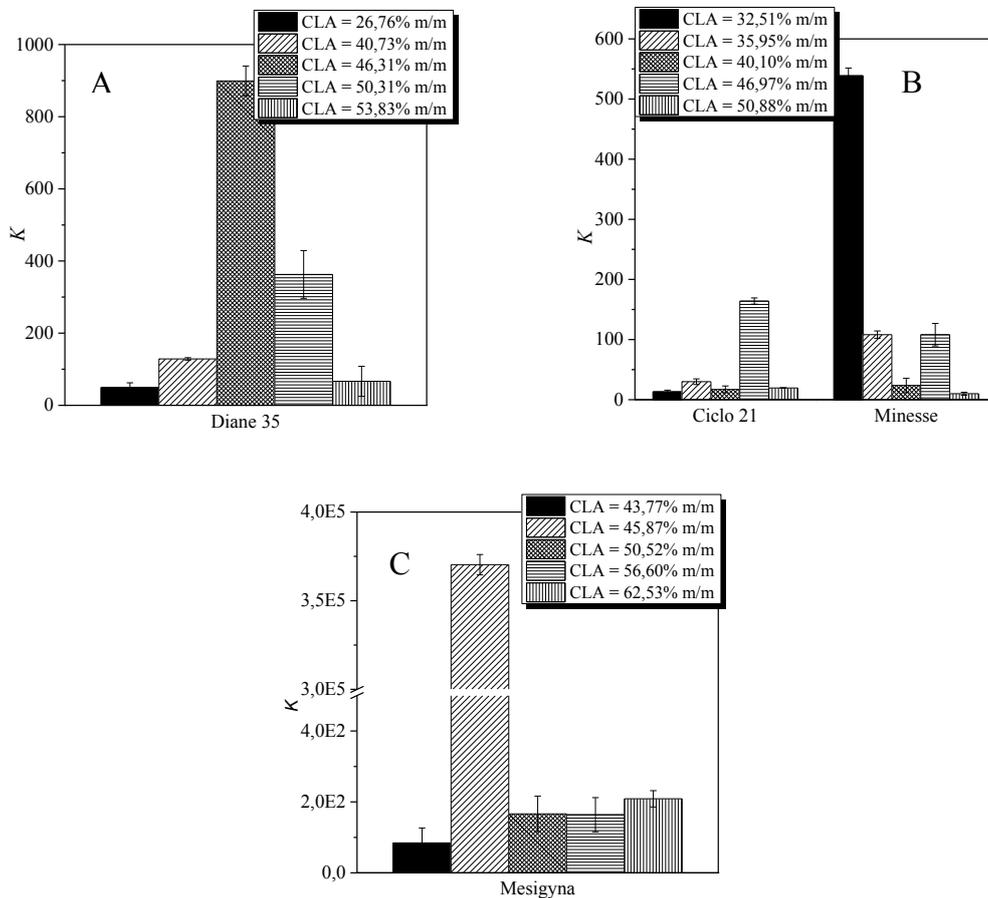
No caso dos fármacos presentes no Diane 35 (AC + EE2) e Mesigyna (VE), os maiores coeficientes de partição foram obtidos em pH 5,00, sendo eles iguais a (899 ± 41) e ($4 \times 10^5 \pm 6 \times 10^3$), respectivamente. Nos demais valores de pH estudados não houve uma grande influência na partição dos hormônios avaliados para a FS do sistema. Esse resultado não permite uma explicação baseada somente nas informações presentes, como as moléculas envolvidas no sistema e o valor de pH usado nos estudos.

O SAB pode ser considerado um sistema de extração complexo diante das diversas variáveis que o influencia, como polímero, sal, pH, temperatura, dentre outros. Nessas circunstâncias, cada analito se comporta de forma única no sistema. Assim, mais estudos a fim de compreender os possíveis comportamentos apresentados pelos diversos analitos devem ser realizados.

3.3.1.4 Influência do comprimento da linha de amarração

O comprimento da linha de amarração (CLA) é um parâmetro importante a ser estudado, uma vez que é uma variável que normalmente influencia na distribuição do soluto entre as fases do sistema (De Lemos L. R. *et al.*, 2013). Diante disso, diferentes CLAs foram avaliados para os sistemas de cada um dos medicamentos, nas condições anteriormente estabelecidas. Através dos diagramas de fases previamente relatados na literatura (Tabela 3.2) foram obtidos os níveis a serem estudados, os quais foram: 43,77; 45,87; 50,52; 56,60; 62,53% m/m em SAB formado por L35 + Li₂SO₄ + H₂O, 26,76; 40,73; 46,31; 50,31; 53,83% m/m em SAB formado por L64 + MgSO₄ + H₂O e 32,51; 35,95; 40,10; 46,97; 50,88% m/m em SAB formado por PEO1500 + Na₂SO₄ + H₂O. Os resultados obtidos são mostrados no gráfico da Figura 3.7. Nota-se que houve uma grande influência na partição de todos os hormônios com a variação do CLA do sistema.

Figura 3.7. Efeito dos cinco comprimentos das linhas de amarração nas composições de SAB otimizadas no processo de partição dos hormônios presentes nos medicamentos: A) L64 + MgSO₄ + H₂O: Diane 35; B) PEO1500 + Na₂SO₄ + H₂O: Minesse e Ciclo 21; C) L35 + Li₂SO₄ + H₂O: Mesigyna.



De acordo com a Figura 3.7A, a maior partição dos hormônios contidos no Diane 35 (AC e EE2) ocorreu no sistema com um CLA igual a 46,31% m/m, alcançando um valor de K igual a (899 ± 41) . No caso dos fármacos Minesse e Ciclo 21, os quais são particionados em um sistema de mesmos componentes, o K variou de forma diferente. Os hormônios do Ciclo 21 permaneceram preferencialmente na FS ao usar a quarta LA (CLA = 46,97% m/m), apresentando um valor de K igual a (164 ± 5) . Já, o Minesse foi mais bem particionado para a FS pelo sistema de CLA igual a 32,51% m/m. A partição dos hormônios do Mesigyna foi extraordinariamente aumentada ao aplicar o sistema no CLA igual a 45,87% m/m, obtendo um valor de K igual a $(4 \times 10^5 \pm 6 \times 10^3)$.

A diferença na partição dos hormônios componentes dos fármacos Minesse e Ciclo 21 em um sistema com componentes iguais, mas em meio com diferentes valores de pH, pode ser

atribuída a presença de diferentes quantidades de moléculas ionizadas. Como já discutido, em $\text{pH} = 11,00$ as moléculas de EE2 contidas no Minesse se encontram mais ionizadas, assim, o sistema em menor CLA se torna a condição em que a partição para a FS é favorecida visto que a diferença das fases é menor. Além disso, a tensão superficial entre as fases é mínima em menores CLAs, beneficiando a transferência dos analitos entre as fases. Baseado nesse resultado, a maior hidrofobicidade do GD (componente do Minesse) em relação ao LV (componente do Ciclo 21) mostrou não ser a principal característica que causa as mudanças dos valores de K nos diferentes CLAs. No caso do Ciclo 21, a interação do LV com o polímero em maior CLA é favorecida energeticamente devido à presença de moléculas neutras em $\text{pH} = 3,00$, as quais são mais bem particionadas com o aumento dos sítios ativos proporcionado pela maior diferença das fases do sistema.

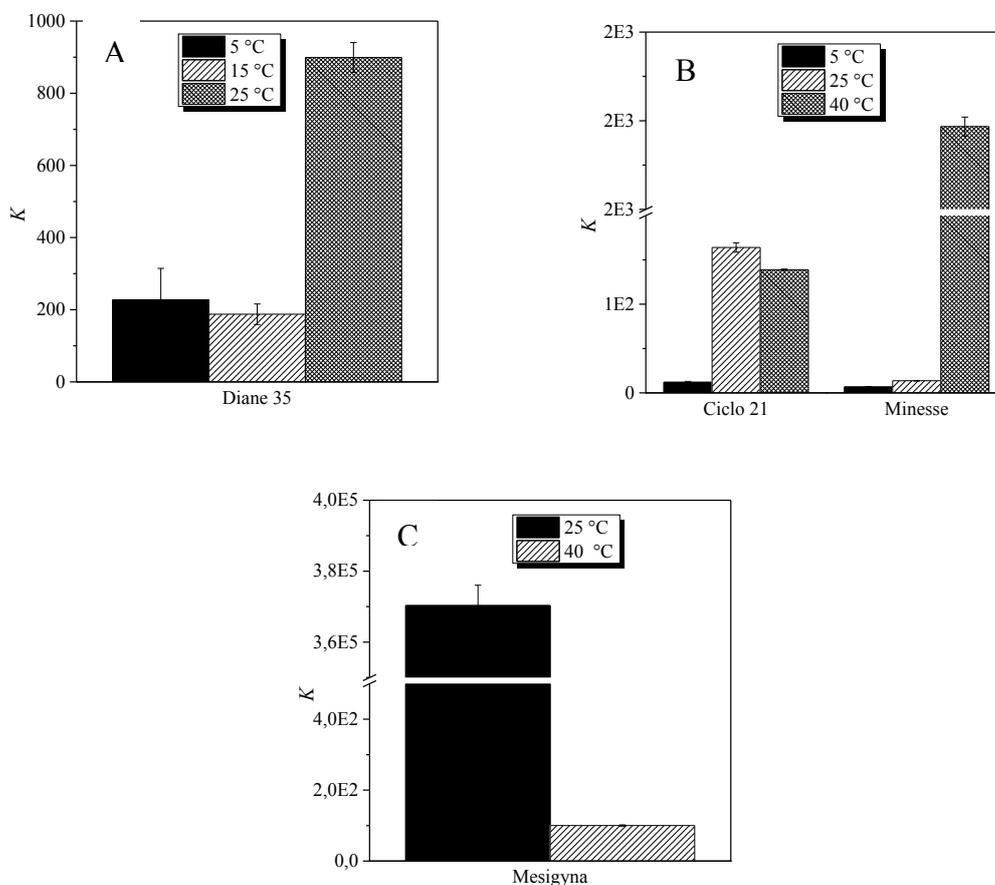
A diminuição da partição dos hormônios componentes do Diane 35 (EE2 e AC) observado após o $\text{CLA} = 46,31\% \text{ m/m}$ deve ser atribuída ao aumento na viscosidade do sistema, o que dificulta a transferência dos analitos entre as fases. O mesmo ocorre com a partição do VE contido no Mesigyna, que é prejudicada a partir do $\text{CLA} = 45,87\% \text{ m/m}$.

Assim, nas determinadas composições, pH e condições de trabalho em que o CLA era igual a $46,31\% \text{ m/m}$ para o Diane 35; $46,97\% \text{ m/m}$ para o Ciclo 21; $32,51\% \text{ m/m}$ para o Minesse e $45,87\% \text{ m/m}$ para o Mesigyna foi possível obter uma melhor condição de partição no SAB.

3.3.1.5 Efeito da temperatura do sistema

Cada sistema estudado possui diferentes valores de temperaturas possíveis para sua aplicação, as quais podem ser encontradas em diagramas de fases na literatura (Da Silva M. D. H. *et al.*, 2006; Martins J. P. *et al.*, 2008; Rodrigues G. D. *et al.*, 2009). Portanto, a temperatura mostra ser uma variável importante para o sistema e, por isso, foi avaliada na partição dos analitos. As temperaturas que formam os diagramas dos diferentes sistemas otimizados para cada medicamento são: $5,00$, $15,0$ e $25,0 \text{ }^\circ\text{C}$ para o SAB composto por $\text{L64} + \text{MgSO}_4 + \text{H}_2\text{O}$; $5,00$, $25,0$ e $40,0 \text{ }^\circ\text{C}$ para o SAB formado por $\text{PEO 1500} + \text{Na}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{O}$ e $25,0$ e $40,0 \text{ }^\circ\text{C}$ para o sistema $\text{L35} + \text{Li}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{O}$. O efeito na partição dos analitos causados pela variação desse parâmetro é mostrado na Figura 3.8.

Figura 3.8. Influência da temperatura do sistema na partição dos hormônios contidos nos medicamentos: A) Diane 35; B) Ciclo 21 e Minesse; C) Mesigyna.



Os maiores valores de K para os hormônios contidos nos fármacos Diane 35 (EE2 e AC), Ciclo21 (LV e EE2) e Mesigyna (VE) foram obtidos a 25,0 °C, sendo iguais a (899 ± 41) , (164 ± 5) e $(4 \times 10^5 \pm 6 \times 10^3)$, respectivamente. Já os hormônios constituintes do Minesse (GD e EE2) foram mais bem particionados para a FS em 40 °C, apresentando um K igual a $(2 \times 10^3 \pm 11)$.

A maior partição dos hormônios constituintes dos medicamentos Diane 35 e Minesse, observada ao aumentar a temperatura do sistema, sugere que o processo de partição no SAB, sob estas condições, é endotérmico. Ao invés disso, os hormônios do Mesigyna foram mais bem particionados para a FS em menor temperatura, o que infere que, nessas condições, o processo é exotérmico. Como o Ciclo 21 permaneceu na FS em condição intermediária de temperatura, estudos adicionais a fim de conhecer a espontaneidade do processo de partição são necessários.

3.3.1.6 Parâmetros termodinâmicos

Parâmetros termodinâmicos ($\Delta_p G$, $\Delta_p H$ e $\Delta_p S$) da partição dos hormônios de cada fármaco foram calculados baseados nos valores de K obtidos no estudo da temperatura. Todos os cálculos foram realizados aplicando as equações 3.2, 3.3 e 3.4, conforme mencionado na seção 3.3.5. As temperaturas aplicadas para este estudo foram as anteriormente utilizadas para determinação dos diagramas de fases dos SABs aplicados. A Tabela 3.6 sumariza os valores calculados de todas as variáveis analisadas.

Tabela 3.6. Valores calculados dos parâmetros termodinâmicos ($\Delta_p G$, $\Delta_p H$ e $\Delta_p S$) determinados no processo de partição dos hormônios empregando SAB.

	Temperatura (K)	Coefficiente de partição (K)	ΔG (kJ/mol)	ΔH (KJ/mol)	ΔS (KJ/mol)
Diane 35 (EE2 e AC)	278,15	227,3	-225,6		168,7
	288,15	187,5	-652,7	$466,91 \cdot 10^2$	164,3
	298,15	899,1	-1413		161,3
Minesse (EE2 e GD)	278,15	6,676	-78,92		401,0
	298,15	13,65	-543,3	$111,47 \cdot 10^3$	375,7
	313,15	2093	-2542		364,1
Ciclo 21 (EE2 e LV)	278,15	11,93	-103,0		380,1
	298,15	164,0	-1060	$105,61 \cdot 10^3$	357,8
	313,15	138,9	-1640		342,5
Mesigyna (VE)	298,15	$3,703 \cdot 10^5$	-2665		-889,3
	313,15	100,2	-1532	$-267,83 \cdot 10^3$	-850,3

Como pode ser observado, os valores encontrados para a $\Delta_p H$ partindo da aproximação de Van't Hoff são positivos para a partição dos hormônios do Diane 35, Minesse e Ciclo 21, mostrando que o processo é endotérmico. Ao contrário, o processo de partição dos hormônios do Mesigyna é exotérmico ($\Delta_p H < 0$). Esse resultado concorda com o resultado observado da menor partição obtida com o aumento da temperatura do sistema, para o Mesigyna.

Todos os valores calculados de $\Delta_p G$ para as diferentes temperaturas avaliadas foram negativos, confirmando a espontaneidade do processo de partição de todos os hormônios para

a FS do sistema. Além disso, quanto mais negativo é o valor de $\Delta_p G$ (maior espontaneidade), maior é a partição dos hormônios para a FS do sistema e maior é o valor de K , o que está de acordo com o comportamento observado dos analitos no SAB.

Por fim, os valores de $\Delta_p S$ positivos encontrados para o Diane 35, Minesse e Ciclo 21 mostram que o processo também é entropicamente favorável. Entretanto, os valores de $\Delta_p S$ negativos para o Mesigyna indicam que houve uma diminuição na entropia do sistema durante a sua partição para a FS.

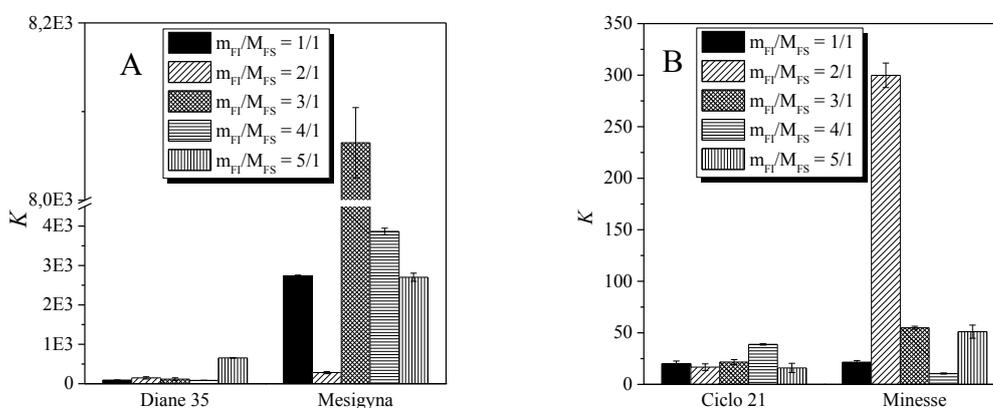
Portanto, o processo de partição dos hormônios EE2, LV, GD e AC, referentes aos fármacos Diane 35, Minesse e Ciclo 21, é considerado entropicamente favorável, devido a ter $\Delta_p S > 0$ e $\Delta_p H > 0$. Diferentemente, a partição do analito VE (Mesigyna) para a FS é considerada entalpicamente dirigida, pois $\Delta_p S < 0$ e $\Delta_p H < 0$.

3.3.1.7 Efeito da razão das massas das fases

A influência da razão das massas das fases permite avaliar a possibilidade de pré-concentração dos analitos em SAB, o que pode auxiliar na posterior aplicação do sistema para análise de amostras de águas ambientais. Sabendo disso, esse parâmetro foi estudado aplicando as razões mássicas (m_{FI}/m_{FS}) entre as fases de 1/1, 2/1, 3/1, 4/1 e 5/1. O aumento da massa da FI em relação a FS foi aplicado justamente para conseguir manter uma alta eficiência de extração em conjunto com uma pré-concentração dos analitos, a fim de ter uma maior sensibilidade do método visando uma posterior validação de um método com alta sensibilidade.

O gráfico da Figura 3.9 relaciona os valores de K com as diferentes razões mássicas testadas para cada fármaco estudado, nos respectivos sistemas otimizados. Verifica-se que a partição em SAB de todos os hormônios foi afetada de forma diferente com a variação das massas das fases.

Figura 3.9. Influência da razão das massas das FS e FI ($m_{FI}/m_{FS} = 1/1, 2/1, 3/1, 4/1$ e $5/1$) na partição dos hormônios contidos nos medicamentos: A) Diane 35 e Mesigyna; B) Ciclo 21 e Minesse.



De acordo com a Figura 3.9A, os hormônios contidos no Diane 35 foram mais bem particionados para a FS quando a razão de massas foi de 5/1 ($K = 655 \pm 6$), em contrapartida, o sinal da FS foi maior na razão mássica de 3/1 para o Mesigyna ($K = 9 \times 10^3 \pm 40$). O Ciclo 21 e o Minesse permaneceram em maior quantidade na FS nas condições de m_{FI}/m_{FS} de 4/1 ($K = 38,8 \pm 0,7$) e 2/1 ($K = 300 \pm 12$), respectivamente, conforme visualizado na Figura 2.9B.

Com esse resultado, percebe-se que para todos os analitos, o aumento da massa da fase inferior em relação à fase superior favoreceu a maior partição dos hormônios para a FS até um valor máximo. Esse efeito pode ter ocorrido devido a maior interação dos analitos com o polímero até atingir a saturação da FS. Nesse momento, diferentes níveis de pré-concentração dos analitos na FS são alcançados. Como resultado, a aplicação da metodologia para análise de compostos em baixas concentrações se torna mais favorável devido ao aumento na sensibilidade.

O decaimento bruto dos resultados da partição dos analitos a partir de um determinado valor pode ser explicado devido a pequenas variações nas propriedades termodinâmicas do SAB comumente causam mudanças bruscas (da Silva L. H. M. *et al.*, 2006). Em 1929, Ostwald e Hertel verificaram que pequenas mudanças nas características dos amidos que estava utilizando produziam diferentes diagrama de fases, o que mostrava que pequenas variações nas interações intermoleculares tinham significativa influência sobre a composição das fases em equilíbrio (Ostwald W. e Hertel R. H., 1929).

Sendo assim, as razões mássicas que obtiveram maior valor de K para os diferentes analitos foram utilizadas para os demais estudos. A Tabela 3.7 sumariza todos os parâmetros otimizados para cada um dos fármacos no SAB.

Tabela 3.7. Parâmetros otimizados no estudo de partição em SAB dos hormônios EE2, GD, LV, AC e VE contidos nos fármacos estudados.

Fármacos	Polímero	Sal	pH	CLA (% m/m)	Temperatura (K)	m_{FI}/m_{FS}
Diane 35	L64	MgSO ₄	5,00	46,31	273,15	5/1
Minesse	PEO 1500	Na ₂ SO ₄	11,00	32,51	313,15	2/1
Ciclo 21	PEO 1500	Na ₂ SO ₄	3,00	46,97	273,15	4/1
Mesigyna	L35	Li ₂ SO ₄	5,00	45,87	273,15	3/1

Apesar de todas as condições de partição dos hormônios em SAB terem sido determinadas, a possível existência de interações entre as variáveis ainda não é conhecida. A fim de compreender melhor o comportamento de partição dos hormônios em SAB um planejamento experimental foi realizado.

3.3.1.8 Planejamento experimental

O planejamento de experimentos já vem sendo utilizado para otimização do SAB para análise de outros analitos, como proteases e ânion perrenato (Muruchi L. *et al.*, 2008). Entretanto, o efeito das possíveis interações das variáveis do SAB na partição de hormônios para a FS do sistema ainda não é conhecido. Sabendo disso, uma otimização multivariada foi realizada para um dos fármacos estudados (Ciclo 21) com o objetivo de descobrir a existência de interferências entre os parâmetros do SAB na partição dos hormônios LV e EE2 para a FS. Esse medicamento foi o aplicado nesse estudo para melhorar a partição dos analitos, visto que, apresentou menores respostas comparado aos demais fármacos estudados.

Primeiramente, um planejamento fatorial fracionário 2^{6-1} com resolução VI foi realizado visando a triagem das variáveis mais importantes para a partição dos hormônios. Nesse estudo foram avaliadas as seguintes variáveis: polímero e eletrólito formadores do SAB, CLA, pH, razão entre as massas de fase (m_{FI}/m_{FS}) e temperatura. Os níveis trabalhados foram definidos de

acordo com os melhores resultados de cada estudo de otimização realizado anteriormente para este fármaco.

Como constituinte da FS foram avaliados o copolímero tribloco L35 (nível +1) e o polímero PEO 1500 (nível -1), visto que possuem solubilidades diferentes e podem afetar na partição dos analitos em SAB. Além disso, os sais sulfato de sódio (nível -1) e citrato de sódio (nível +1) foram aplicados por possuírem diferentes ânions. Para o CLA, o nível -1 foi determinado para os menores valores relacionados a cada condição de SAB aplicada, já os números maiores foram denominados como nível +1. Os níveis aplicados para as demais variáveis foram os seguintes: pH = 3 (nível -1) e 7 (nível +1); $m_{FI}/m_{FS} = 2/1$ (nível -1) e $5/1$ (nível +1); temperaturas = 25 °C (nível -1) e 40 °C (nível +1). Após definidas as variáveis, um total de 32 experimentos foram realizados de forma aleatória e a resposta foi obtida em termos da absorbância da FS do SAB. As condições aplicadas para todos os experimentos realizados estão sumarizadas na Tabela 3.8.

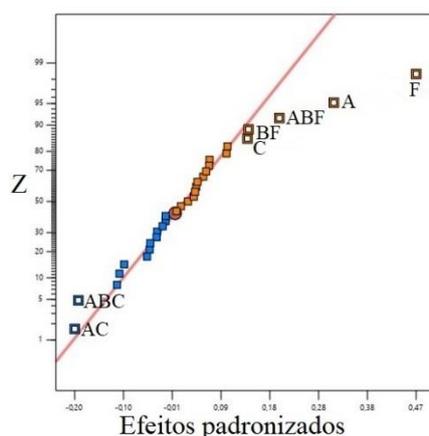
Tabela 3.8. Condições avaliadas e respostas obtidas pelo planejamento fracionário 2^{6-1} para partição dos hormônios contidos no Ciclo 21 em sistemas aquosos bifásicos.

Polímero	Eletrólito	CLA (% m/m)	pH	Razão das massas de fase (m_{FI}/m_{FS})	Temperatura (°C)	Absorbância
PEO1500	NaSO ₄	35,95	3	2/1	25	0,5810
L35	NaSO ₄	51,74	3	2/1	40	1,3162
PEO1500	Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	36,54	3	2/1	40	1,1017
L35	Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	42,16	3	2/1	25	1,2005
PEO1500	NaSO ₄	50,88	3	2/1	40	1,4666
L35	NaSO ₄	64,06	3	2/1	25	1,2209
PEO1500	Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	53,84	3	2/1	25	0,9701
L35	Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	59,48	3	2/1	40	1,3721
PEO1500	NaSO ₄	35,95	7	2/1	40	1,2351
L35	NaSO ₄	51,74	7	2/1	25	1,0400
PEO1500	Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	36,54	7	2/1	25	0,4808
L35	Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	42,16	7	2/1	40	1,8549
PEO1500	NaSO ₄	50,88	7	2/1	25	0,9402
L35	NaSO ₄	64,06	7	2/1	40	1,3779
PEO1500	Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	53,84	7	2/1	40	1,4776
L35	Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	59,48	7	2/1	25	0,8299
PEO1500	NaSO ₄	35,95	3	5/1	40	1,4445
L35	NaSO ₄	51,74	3	5/1	25	1,1007
PEO1500	Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	36,54	3	5/1	25	0,5703
L35	Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	42,16	3	5/1	40	2,1725
PEO1500	NaSO ₄	50,88	3	5/1	25	0,9509
L35	NaSO ₄	64,06	3	5/1	40	1,2630
PEO1500	Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	53,84	3	5/1	40	1,4774
L35	Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	59,48	3	5/1	25	1,0806
PEO1500	NaSO ₄	35,95	7	5/1	25	0,5201
L35	NaSO ₄	51,74	7	5/1	40	1,1960
PEO1500	Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	36,54	7	5/1	40	0,9648
L35	Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	42,16	7	5/1	25	1,0897

PEO1500	NaSO ₄	50,88	7	5/1	40	1,4208
L35	NaSO ₄	64,06	7	5/1	25	1,7311
PEO1500	Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	53,84	7	5/1	25	0,9106
L35	Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	59,48	7	5/1	40	1,6262

A significância das variáveis na partição dos hormônios para a FS do sistema e as interações principais são mostradas no gráfico de distribuição normal (Figura 3.10). Como a resolução do planejamento é VI, não há perda de informação em relação às interações de primeira, segunda e terceira ordem.

Figura 3.10. Distribuição normal (Z) dos efeitos positivos (●) e negativos (●) das variáveis na partição dos hormônios EE2 e LV em SAB, via planejamento fatorial 2^{6-1} (A: polímero; B: eletrólito; C: CLA; D: pH; E: razão entre massas de fase; F: temperatura).



De acordo com o resultado, os efeitos de maior significância foram A (polímero), C (CLA) e F (temperatura), os quais apresentaram um efeito positivo na partição dos hormônios avaliados. Então, a aplicação do polímero L35 na quinta LA e na temperatura de 313,15 K proporciona melhores respostas para a partição dos hormônios para a FS. Além disso, as interações de segunda ordem AC (polímero-CLA) e BF (eletrólito-temperatura) também tiveram uma influência na resposta.

No geral, tanto o polímero formador do SAB quanto a temperatura de trabalho e a linha de amarração são parâmetros considerados importantes para o entendimento do mecanismo da separação de fase (Carvalho R. D. *et al.*, 2019). Assis e colaboradores reportaram mudanças na partição de fármacos devido a variações de polímero, eletrólito e temperatura, visto que o

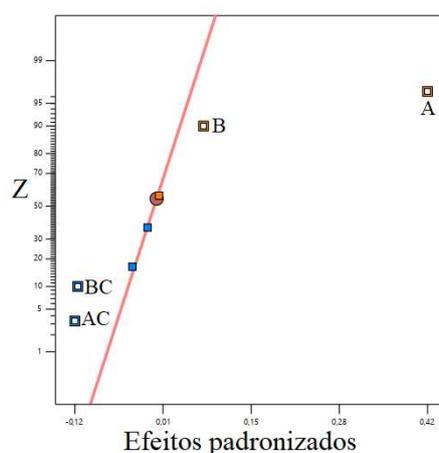
processo de partição dos analitos ocorre de forma endotérmica ou exotérmica (Assis R. C. *et al.*, 2020).

Nas melhores condições indicadas pela análise dos efeitos, as respostas obtidas para a aplicação do sulfato de sódio e citrato de sódio não diferiram consideravelmente. Com isso, foi decidido trabalhar com o SAB composto pelo sal sulfato de sódio em pH 3,00 e na razão das massas de 5/1 no planejamento fatorial completo 2^3 . Essa condição foi escolhida levando em consideração a facilidade de obtenção do sal e seu menor custo.

Sabendo dos efeitos não significativos das demais variáveis estudadas, qualquer um dos níveis (+ ou -) podem ser aplicados na continuação do trabalho. O menor pH (pH 3,00) foi estabelecido por ser a condição mais próxima das matrizes aquosas ambientais, as quais possuem em sua constituição muitos compostos ácidos. Objetivando uma pré-concentração dos hormônios na FS, a razão das massas de fase aplicada foi a de 5/1.

Após a obtenção desse resultado preliminar, um planejamento fatorial completo 2^3 com replicadas (16 experimentos) foi realizado, levando em consideração apenas as três variáveis independentes de primeira ordem importantes para o processo de partição (temperatura, polímero e CLA). A distribuição normal dos efeitos mostrada na Figura 3.11, explicita os efeitos positivos e negativos das variáveis bem como suas interações de primeira, segunda e terceira ordens.

Figura 3.11. Distribuição normal (Z) dos efeitos negativos (●) e positivos (○) das variáveis independentes na partição dos hormônios EE2 e LV, via planejamento fatorial 2^3 em duplicata (A: polímero; B: CLA; C: temperatura).



Analisando a Figura 3.11, um efeito significativo do polímero e CLA na absorvância da FS foi observado, assim como os efeitos de segunda ordem BC (CLA-temperatura) e AC (polímero-temperatura). Sendo assim, a variável temperatura mostrou não ser significativa individualmente para o sistema, porém, interage significativamente com as outras variáveis (polímero e CLA), causando mudanças no sistema de forma indireta. Essas interações ocorrem provavelmente devido às mudanças de conformação dos polímeros de formas individuais com a temperatura e a variação nas diferenças de fases do SAB causada pelos diferentes CLAs nas temperaturas estudadas (Vieira A. W. *et al.*, 2019).

Tendo como base esses resultados, foi obtida a seguinte equação matemática: $Y = 1,46 + 0,208 X_1 + 0,0375 X_2 - 0,0604 X_1X_3 - 0,0581 X_2X_3$. A qualidade do ajuste do modelo proposto foi analisada pela análise das variâncias (ANOVA). A Tabela 3.9 resume a significância da regressão, resíduos, falta de ajuste e erro puro. Para isso, foram aplicados número de experimentos totais (n) igual a 16, número de experimentos diferentes (m) igual a 8 e quantidade de parâmetros (p) 5. O teste *F* a 95% de confiança mostrou que a regressão foi significativa e não apresentou falta de ajuste. Os resultados levaram a uma regressão significativa e coeficiente de determinação aceitável (0,83). Assim, os resultados da ANOVA evidenciaram que o modelo quadrático ajustado para as respostas do processo foi satisfatório.

Tabela 3.9. Análise de variâncias do modelo matemático proposto.

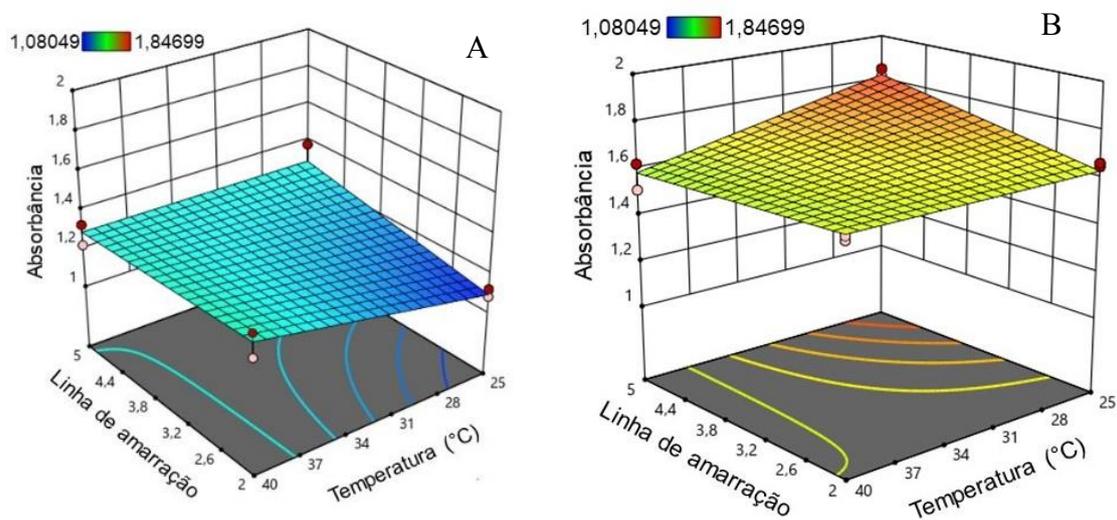
	SQ¹	GL²	GL²	MQ³
Regressão	0,827468	p-1	4	0,206867
Resíduos	0,035228	n-p	11	0,003203
Falta de ajuste	0,005049	m-p	3	0,001683
Erro Puro	0,030179	n-m	8	0,003772
Total	0,862696	n-1	15	
%var. explicada	0,959165			

¹SQ é a soma quadrática. ²GL é o grau de liberdade. ³MQ é o Mínimo quadrado.

Analisando a equação, é observado que a natureza do polímero e a LA tem um efeito positivo na extração do analito para a FS. Além do mais, as interações observadas mostraram ter um efeito negativo sob a resposta.

A Figura 3.12 mostra dois gráficos de superfícies de resposta para a absorvância dos analitos na FS das condições analisadas dos SAB em função da temperatura (25 e 40 °C) e da linha de amarração 2 e 5, referentes aos CLAs iguais a 35,95 e 50,89 % m/m no sistema formado por PEO 1500 e 51,74 e 64,06% m/m no SAB formado por L35 em pH = 3,00. Considerando o polímero como variável categórica, a Figura 3.12A refere-se aos resultados obtidos com o polímero PEO 1500 e a Figura 3.12B com o copolímero L35.

Figura 3.12. Superfície de resposta do planejamento 2³ com replicatas de extração de EE2 e LV na FS de SAB composto de (A) PEO1500 ou (B) L35 + Na₂SO₄ + H₂O em função da temperatura e linha de amarração, em pH = 3,00.



Analisando as superfícies de resposta obtidas, observa-se que, independentemente da temperatura, a aplicação do polímero L35 se mostrou mais vantajosa para o aumento da absorvância na fase superior do SAB, o que indica uma maior partição dos hormônios. Além disso, a interação da temperatura com as demais variáveis foi negativa, tendo em vista que diminuiu a absorvância da FS.

Em menor temperatura, o polímero PEO 1500 se torna mais hidrofóbico, o que favorece a partição do analito para a FS na LA maior, na qual há maior diferença entre as fases do SAB. Em contrapartida, o copolímero L35 apresenta poucas mudanças de conformação em temperatura mais baixa, o que provavelmente favorece a interação com os analitos. Além disso, a maior diferença das fases na quinta LA contribuiu para a melhor interação dos hormônios com a fase rica em polímero, apresentando uma maior extração.

Com base nesses resultados, a condição em que uma maior resposta foi determinada foi: L35 + Na₂SO₄ + H₂O, no LA 5 (CLA = 64,06% m/m) em pH 3,00 e temperatura de 25 °C.

Os efeitos do polímero e do CLA sempre são considerados nos estudos de partição de analitos em sistemas aquosos bifásicos. No entanto, pela primeira vez foi possível observar o efeito de interação de segunda ordem significativo entre a temperatura e essas duas variáveis na partição de hormônios. Sendo assim, essa ferramenta de análise mostra ser vantajosa no entendimento do efeito das variáveis no processo de partição, como um todo.

3.3.1.9 Estudo da condição intermediária para partição da mistura de hormônios

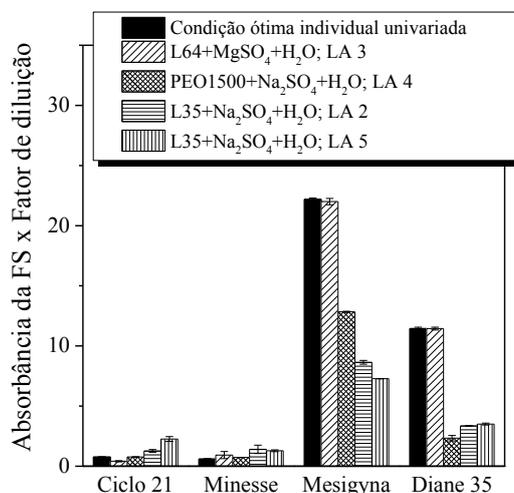
O desenvolvimento de um método de análise rápido e eficiente requer um preparo de amostra simples. Visando a simplificação da aplicação do SAB, primeiramente foi determinada uma condição ótima comum dentre as anteriormente otimizadas de modo univariado para a partição dos hormônios. Para isso, experimentos aplicando as condições otimizadas foram realizados novamente para todos os fármacos.

Nessa etapa, as condições ótimas para o Diane 35 (L64 + MgSO₄ + H₂O em pH 5,00; LA 3 - CLA = 46,31% m/m; temperatura de 25 °C; razão de massas de fases de 5/1) e para o Ciclo 21 (PEO 1500 + Na₂SO₄ + H₂O em pH 3,00; LA 4 - CLA = 46,97% m/m; temperatura de 25 °C; razão das massas de fases de 4/1) mostraram melhores resultados para partição dos hormônios para a FS.

Posteriormente, a melhor condição de partição dos hormônios contidos no Ciclo 21 pela otimização multivariada (L35 + Na₂SO₄ + H₂O em pH 3,00; LA 5 - CLA = 64,06% m/m; temperatura de 25 °C) foi aplicada para os demais medicamentos. A fim de não perder informações, a situação em que obteve o segundo maior valor de absorbância na FS na análise multivariada (L35 + Na₂SO₄ + H₂O em pH 3,00; LA 2 - CLA = 51,74% m/m; temperatura de 25 °C) também foi analisada.

A Figura 3.13 apresenta os resultados obtidos para todas as condições aplicadas, conforme mencionado anteriormente. Para comparação da eficiência dessas condições na partição dos analitos para a FS, os resultados obtidos na condição otimizada individualmente para os fármacos foram adicionados ao gráfico.

Figura 3.13. Estudo da condição intermediária para partição dos hormônios contidos nos fármacos Ciclo 21, Minesse, Mesigyna e Diane 35.



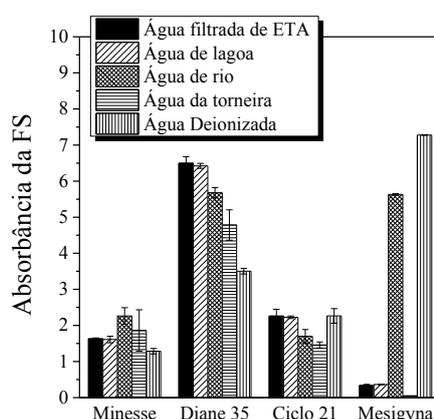
O sistema formado por L35 + Na₂SO₄ + H₂O, em pH = 3,00 e CLA = 64,06% m/m foi o sistema que melhor possibilitou a partição dos fármacos Ciclo 21 e Minesse, porém proporcionou a diminuição dos sinais obtidos pelo Mesigyna e Diane 35. Como nesta etapa do trabalho a detectabilidade do método está relacionada a absorbância dos medicamentos, a escolha do SAB compromisso para todos os hormônios foi condicionada ao melhor sistema para o Ciclo 21 e o Minesse, que possuem menor sinal. Nessa condição, os valores obtidos do sinal na FS para o Ciclo 21, Minesse, Mesigyna e Diane 35 foram iguais a $(2,3 \pm 0,2)$, $(1,29 \pm 0,08)$, $(7 \pm 9 \times 10^{-4})$ e $(3,50 \pm 0,08)$, respectivamente. Assim, essa condição foi utilizada para todos os fármacos no estudo de partição aplicado em amostras reais.

3.3.1.10 Avaliação da partição em amostras de águas

Os cinco fármacos aplicados como fonte dos hormônios EE2, LV, GD, AC e VE foram adicionados a amostras de águas coletadas de quatro fontes diferentes: água do sistema de abastecimento público, água superficial e água filtrada de uma ETA e água proveniente de rio. Essas amostras foram centrifugadas e fortificadas de modo que a concentração do hormônio em menor quantidade fosse a mesma aplicada em todos os estudos ($4,00 \text{ mg kg}^{-1}$). Essa etapa de fortificação foi realizada devido à baixa sensibilidade do equipamento (espectrofotômetro UV-Vis) utilizado. Além disso, as amostras analisadas previamente não apresentaram nenhum sinal

analítico no equipamento. A Figura 3.14 mostra o efeito da partição dos hormônios em diferentes amostras ambientais.

Figura 3.14. Efeito das amostras de água de torneira, de lagoa, de rio, água filtrada de uma ETA e em água deionizada na permanência dos hormônios na FS do SAB.



A extração dos hormônios constituintes dos medicamentos Ciclo 21 e Mesigyna mostrou ser influenciada pelos constituintes das águas de formas diferentes. No caso do Ciclo 21, apenas as amostras da água da torneira e lagoa não interferiram no processo. Para o Mesigyna, dentre as amostras, apenas a do rio doce permitiu a permanência dos analitos na FS do sistema, mas em menores quantidades do que em água deionizada. Esse resultado indica que os constituintes dessa amostra têm maior potencial como interferentes na partição dos hormônios em SAB. Ao contrário, para os fármacos Minesse e Diane 35, a presença das diferentes amostras favoreceu a partição dos hormônios para a FS do sistema.

Portanto, a composição das águas mostrou influenciar na permanência dos hormônios na FS do sistema. Como a maioria dos hormônios interagem com os constituintes das amostras de modo a aumentar o sinal da FS, o emprego do SAB para determinação desses contaminantes emergentes em outras amostras de água torna-se viável, já que mostrou possuir potencial como técnica de extração nessas condições. Na literatura ainda não há trabalhos aplicando SAB para análise de hormônios esteroides, mas os resultados prévios encontrados nesses trabalhos agregam a esse processo de alta capacidade de aplicabilidade.

3.4. Conclusão

Neste capítulo foram avaliadas, através da análise por espectrometria de absorção molecular UV/Vis, diferentes variáveis para a otimização do método de extração dos hormônios EE2, GD, LV, AC e VE provenientes dos anticoncepcionais Minesse, Ciclo 21, Diane 35 e Mesigyna aplicando os sistemas aquosos bifásicos. O SAB, além de ter baixo impacto ambiental, se mostrou eficiente para análise de hormônios em amostras de águas ambientais, haja vista os altos valores obtidos de partição e os maiores sinais de FS observados na presença de diferentes matrizes de água.

A condição determinada como ótima para partição dos hormônios para a FS do sistema foi obtida no SAB formado por L35 + Na₂SO₄ + H₂O, em pH = 3,00; CLA = 64,06% m/m e razão entre as massas de fase de 5/1. Nessa condição conseguiu-se uma pré-concentração e melhor partição dos analitos. Além disso, o SAB mostrou ser uma técnica de preparo de amostra eficiente na partição de hormônios mesmo quando aplicado em matrizes de água complexas e de diferentes origens.

Nessa perspectiva, a aplicação do SAB para análise de hormônios esteroides se torna uma alternativa nova e ambientalmente segura, frente às outras utilizadas para esse fim que requerem o uso de solventes, como a extração em fase sólida (SPE).

3.5. Referências bibliográficas

- Andrade LR 2013: Poluição do ambiente aquático por hormônios naturais e sintéticos: um estudo em Poços de Caldas/MG, Centro das faculdade associadas de ensino, São João da Boa Vista - MG
- Assis RC, Mageste AB, De Lemos LR, Orlando RM, Rodrigues GD (2020): Application of aqueous two-phase systems for the extraction of pharmaceutical compounds from water samples. *Journal of Molecular Liquids* 301, 112411
- Azevedo AM, Rosa PAJ, Ferreira IF, Aires-Barros MR (2009): Chromatography-free recovery of biopharmaceuticals through aqueous two-phase processing. *Trends in Biotechnology* 27, 240-247
- Bergamin B, Pupin RR, Wong A, Sotomayor M (2019): A New Electrochemical Platform Based on a Polyurethane Composite Electrode Modified with Magnetic Nanoparticles Coated with Molecularly Imprinted Polymer for the Determination of Estradiol Valerate in Different Matrices. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 30, 2344-2354
- Cais TA 2016: Determinação de hormônios estrogênicos em águas superficiais do lago de furnas no município de Alfenas-MG, Universidade Federal de Itajubá, Itajubá-MG
- Carvalho RD, Penido JA, Lobo FA, Machado PAL, Teixeira NHL, Virtuoso LS, de Lemos LR, Rodrigues GD, Mageste AB (2019): Thermodynamic Investigation of the Aqueous Two-Phase Systems Formed by PEG 400+Water + Either Sodium Carbonate or Potassium Carbonate at Different Temperatures: Experimental and Correlational Approaches. *Journal of Chemical and Engineering Data* 64, 448-458
- Cesen M, Heath E (2017): Disk-based solid phase extraction for the determination of diclofenac and steroidal estrogens E1, E2 and EE2 listed in the WFD watch list by GC-MS. *Science of the Total Environment* 590, 832-837
- Chang H, Shen XY, Shao B, Wu FC (2018): Sensitive analysis of steroid estrogens and bisphenol a in small volumes of water using isotope-dilution ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Environmental Pollution* 235, 881-888
- Chaves KS 2016: Determinação de desreguladores endócrinos bisfenol-A, β -estradiol, 17α -etinilestradiol e estrona no Rio Paraíba do Sul, Universidade de São Paulo, Lorena - SP
- Colborn T, Saal FSV, Soto AM (1993): Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environmental Health Perspectives* 101, 378-384

- Dallegrave A 2012: Determinação de hormônios estrógenos e progestágenos em amostras ambientais por GC-MS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS
- da Silva L. H. M. e Lo W. (2006): Sistemas aquosos bifásicos: fundamentos e aplicações para partição/purificação de proteínas. *Química nova* 29
- da Silva MDH, da Silva LHM, Amim J, Guimaraes RO, Martins JP (2006): Liquid-liquid equilibrium of aqueous mixture of triblock copolymers L35 and F68 with Na₂SO₄, Li₂SO₄, or MgSO₄. *Journal of Chemical and Engineering Data* 51, 2260-2264
- de Andrade VM, Rodrigues GD, de Carvalho RMM, da Silva LHM, da Silva MCH (2011): Aqueous two-phase systems of copolymer L64 plus organic salt plus water: Enthalpic L64-salt interaction and Othmer-Tobias, NRTL and UNIFAC thermodynamic modeling. *Chemical Engineering Journal* 171, 9-15
- Deich C, Kanwischer M, Jahne M, Waniek JJ (2020): Patterns of estrogenic activity in the Baltic Sea. *Chemosphere* 240, 124870
- de Lemos LR, Campos RA, Rodrigues GD, da Silva LHM, da Silva MCH (2013): Green separation of copper and zinc using triblock copolymer aqueous two-phase systems. *Separation and Purification Technology* 115, 107-113
- Dias ACV, Gomes FW, Bila DM, Sant'Anna GL, Dezotti M (2015): Analysis of estrogenic activity in environmental waters in Rio de Janeiro state (Brazil) using the yeast estrogen screen. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 120, 41-47
- do Nascimento MTL, Santos ADD, Felix LC, Gomes G, Sa MDE, da Cunha DL, Vieira N, Hauser-Davis RA, Neto JAB, Bila DM (2018): Determination of water quality, toxicity and estrogenic activity in a nearshore marine environment in Rio de Janeiro, Southeastern Brazil. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 149, 197-202
- Dorwald FZ (2012): Lead optimization for medicinal chemists: pharmacokinetic properties of functional groups and organic compounds, 1st. Wiley-VCH, 622 pp
- EC (2001): European Commission, Review of priority substances under the WFD. Disponível em: http://ec.europa.eu/environment/water/water-dangersub/pri_substances.html. Acessado em 12/2019.
- Fang H, Tong WD, Branham WS, Moland CL, Dial SL, Hong HX, Xie Q, Perkins R, Owens W, Sheehan DM (2003): Study of 202 natural, synthetic, and environmental chemicals for binding to the androgen receptor. *Chemical Research in Toxicology* 16, 1338-1358

- Ghasemiyeh P, Azadi A, Daneshamouz S, Heidari R, Negar, Azarpira, Mohammadi-Samani S (2019): Cyproterone Acetate-Loaded Nanostructured Lipid Carriers: Effect of Particle Size on Skin Penetration and Follicular Targeting. *Pharmaceutical Development and Technology* 24, 812-823
- Jardim WF, Montagner CC, Pescara IC, Umbuzeiro GA, Bergamasco AMDD, Eldridge ML, Sodré FF (2012): An integrated approach to evaluate emerging contaminants in drinking water. *Separation and Purification Technology* 84, 3-8
- Lai KM, L. JK, D. SM, N. LJ (2000): Binding of Waterborne Steroid Estrogens to Solid Phases in River and Estuarine Systems. *Environmental Science & Technology* 34, 3890–3894
- Leite DD, Carvalho PLG, de Lemos LR, Mageste AB, Rodrigues GD (2019): Hydrometallurgical recovery of Zn(II) and Mn(II) from alkaline batteries waste employing aqueous two-phase system. *Separation and Purification Technology* 210, 327-334
- Li N, Yang X, Nian L, Wang ZB, Lei L, Wang K, Zhang HQ, Yu AM, Zhang ZW (2015): Determination of steroid hormones in milk using aqueous two-phase extraction coupled to liquid chromatography. *Analytical Methods* 7, 2514-2522
- Lima DRS, Tonucci MC, Libanio M, de Aquino SF (2017): Pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in Brazilian waters: occurrence and removal techniques. *Engenharia Sanitaria e Ambiental* 22, 1043-1054
- Liu SS, Chen J, Zhang JN, Liu YS, Hu LX, Chen XW, Liu S, Xu XR, Ying GG (2020): Microbial transformation of progesterone and dydrogesterone by bacteria from swine wastewater: Degradation kinetics and products identification. *Science of the Total Environment* 701, 134930
- Machado KS 2010: Determinação de hormônios sexuais femininos na Bacia do Alto Iguaçu, região metropolitana de Curitiba-PR, Universidade Federal do Paraná, Curitiba – PR
- Mantri R. V., Sanghvi R., Zhu H. J. 2017: Developing Solid Oral Dosage Forms - Chapter 1 – Solubility of Pharmaceutical Solids, *Pharmaceutical Theory and Practice*, ed. 2, 3-22.
- Martins JP, Carvalho CP, da Silva LHM, Coimbra JSR, da Silva MCH, Rodrigues GD, Minim LA (2008): Liquid–liquid equilibria of an aqueous two-phase system containing Poly(ethylene) Glycol 1500 and sulfate salts at different temperatures. *Journal of Chemical & Engineering Data* 53, 238–241

- Martins JP, Mageste AB, da Silva MCH, da Silva LHM, Patrício PR, Coimbra JSR, Minim LA (2009): Liquid-liquid equilibria of an aqueous two-phase system formed by a triblock copolymer and sodium salts at different temperatures. *Journal of Chemical & Engineering Data* 54, 2891–2894
- Mastrup M, Schafer AI, Khan SJ (2005): Predicting fate of the contraceptive pill in wastewater treatment and discharge. *Water Science and Technology* 52, 279-286
- Muruchi L, Lunario LD, Jimenez YP (2019): Application of central composite design to the partition of perrhenate anion in aqueous two phase system $\text{Na}_2\text{MoO}_4 + \text{PEG 4000} + \text{H}_2\text{O}$. *Journal of Molecular Liquids* 279, 67-76
- Nasuhoglu D, Berk D, Yargeau V (2012): Photocatalytic removal of 17α -ethinylestradiol (EE2) and levonorgestrel (LNG) from contraceptive pill manufacturing plant wastewater under UVC radiation. *Chemical Engineering Journal* 185-186, 52-60
- Ostwald W. e Hertel R. H. (1929): Kolloidchemische Reaktionen zwischen Solen von Eiweißkörpern und polymeren Kohlehydraten. I. *Kolloid-Zeitschrift* 47, 258-268.
- Ostwald W. e Hertel R. H. (1929): Kolloidchemische Reaktionen zwischen Solen von Eiweißkörpern und polymeren Kohlehydraten. II. *Kolloid-Zeitschrift* 47, 357-370.
- Patricio PD, Mageste AB, de Lemos LR, de Carvalho RMM, da Silva LHM, da Silva MCH (2011): Phase diagram and thermodynamic modeling of PEO plus organic salts + H_2O and PPO + organic salts + H_2O aqueous two-phase systems. *Fluid Phase Equilibria* 305, 1-8
- Pires J 2009: Avaliação do processo oxidativo avançado $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$ na remoção do hormônio 17β -estradiol presente em efluente de produção de medicamentos hormonais de uso veterinário, Universidade de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto - SP
- Porto TS, Silva G, Porto CS, Cavalcanti MTH, Neto BB, Lima JL, Converti A, Porto ALF, Pessoa A (2008): Liquid-liquid extraction of proteases from fermented broth by PEG/citrate aqueous two-phase system. *Chemical Engineering and Processing-Process Intensification* 47, 716-721
- Reichert G, Hilgert S, Fuchs S, Azevedo JCR (2019): Emerging contaminants and antibiotic resistance in the different environmental matrices of Latin America. *Environmental Pollution* 255, 113140
- Robles J, Marcos J, Renau N, Garrostas L, Segura J, Ventura R, Barcelo B, Barcelo A, Pozo OJ (2017): Quantifying endogenous androgens, estrogens, pregnenolone and

- progesterone metabolites in human urine by gas chromatography tandem mass spectrometry. *Talanta* 169, 20-29
- Rodrigues GD, da Silva MCH, da Silva LHM, Teixeira LS, de Andrade VM (2009): Liquid-liquid phase equilibrium of triblock copolymer L64, Poly(ethylene oxide-b-propylene oxide-b-ethylene oxide), with sulfate salts from (278.15 to 298.15) K. *Journal of Chemical & Engineering Data* 54, 1894-1898
- Rogers RD, Bond AH, Bauer CB, Zhang JH, Griffin ST (1996): Metal ion separations in polyethylene glycol-based aqueous biphasic systems: Correlation of partitioning behavior with available thermodynamic hydration data. *Journal of Chromatography B-Biomedical Applications* 680, 221-229
- Rokhina EV, Vattikonda NS, Johnson C, Suri RPS (2012): Ozonation of a mixture of estrogens and progestins in aqueous solution: Interpretation of experimental results by computational methods. *Chemosphere* 89, 1323-1329
- Saúde Md (2017): Ministério da Saúde, Relação Nacional de Medicamentos Essenciais – RENAME. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/relacao_medicamentos_rename_2020.pdf. Acessado 12/2019
- Schiffer L, Barnard L, Baranowski ES, Gilligan LC, Taylor AE, Arlt W, Shackleton CHL, Storbeck KH (2019): Human steroid biosynthesis, metabolism and excretion are differentially reflected by serum and urine steroid metabolomes: A comprehensive review. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 194, 105439
- Silva LHMD, Loh W (2000): Calorimetric investigation of the formation of Aqueous Two-Phase Systems in ternary mixtures of water, Poly(ethylene oxide) and electrolytes (or Dextran). *Journal of Physical Chemistry B* 104, 10069-10073
- Sliwka-Kaszynska M, Jakimska-Nagorska A, Wasik A, Kot-Wasik A (2019): Phototransformation of three selected pharmaceuticals, naproxen, 17 α -Ethinylestradiol and tetracycline in water: Identification of photoproducts and transformation pathways. *Microchemical Journal* 148, 673-683
- Ternes TA, Stumpf M, Mueller J, Haberer K, Wilken RD, Servos M (1999): Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *Science of the Total Environment* 225, 81-90

- Vieira AW, Molina G, Mageste AB, Rodrigues GD, de Lemos LR (2019): Partitioning of salicylic and acetylsalicylic acids by aqueous two-phase systems: Mechanism aspects and optimization study. *Journal of Molecular Liquids* 296, 111775
- Wee SY, Aris AZ (2019): Occurrence and public-perceived risk of endocrine disrupting compounds in drinking water. *Npj Clean Water* 2, 14
- Wee SY, Aris AZ, Yusoff FM, Praveena SM (2019): Occurrence and risk assessment of multiclass endocrine disrupting compounds in an urban tropical river and a proposed risk management and monitoring framework. *Science of the Total Environment* 671, 431-442
- Weiss JM, Andersson PL, Lamoree MH, Leonards PEG, van Leeuwen SPJ, Hamers T (2009): Competitive Binding of Poly- and Perfluorinated Compounds to the Thyroid Hormone Transport Protein Transthyretin. *Toxicological Sciences* 109, 206-216
- Yu QM, Geng JJ, Ren HQ (2019): Occurrence and fate of androgens in municipal wastewater treatment plants in China. *Chemosphere* 237, 124371

CAPÍTULO 4. Validação do método de extração por sistemas aquosos bifásicos aplicado a amoxicilina utilizando UPLC-MS/MS

4.1. Introdução

O uso indiscriminado de medicamentos no Brasil tem sido um ponto crítico no aspecto ambiental, dado que, no geral, o sistema de tratamento de água e esgoto tem tido dificuldade de suprir essa demanda visando a remoção desses agentes contaminantes do ambiente (Assis, R. C., 2020; Huschek, G. *et al.*, 2004, Anastopoulos I. *et al.*, 2020). Dentre as diversas classes farmacêuticas, as principais encontradas no meio ambiente tem sido os antibióticos, anti-inflamatórios, antitérmicos e analgésicos, tais como, amoxicilina, ibuprofeno, nimesulida, amoxicilina e diclofenaco (Homem, V., 2014; Diaz-Bao M., 2015, Assis R. C., 2020).

Como já mencionado, a presença desses ativos nas matrizes aquosas tem causado, dentre outras adversidades, o aumento na resistência bacteriana (Fabregat-Safont D. *et al.*, 2021). Os ativos potencialmente antibióticos presentes no ambiente causam um estresse na população bacteriana, a qual reage tentando resistir e se adaptar ao novo meio através da alteração das características genéticas (Buelow, E. *et al.*, 2021, Ma J. *et al.*, 2022). Esse problema tem sido tratado como uma causa sanitária diante da influência direta na saúde humana e de animais (Homem V. *et al.*, 2014).

Nesse contexto, a determinação e quantificação desses contaminantes nas matrizes aquosas são importantes e extremamente necessários, uma vez que auxiliam no monitoramento ambiental.

Diante dessa demanda, Assis e colaboradores desenvolveram um método de extração dos fármacos amoxicilina, ibuprofeno, paracetamol, ciprofloxacino e norfloxacino através da aplicação de sistemas aquosos bifásicos. Resultados promissores com valores de coeficiente de partição (K) maiores que 1 foram obtidos para as amostras de água potável, água superficial e água filtrada proveniente do sistema de tratamento de água. Todos estes resultados foram obtidos através da análise por espectrofotômetro UV/Vis, sem a quantificação da amostra.

Com o objetivo de complementar esse estudo, a inclusão de uma técnica de análise adequada para a quantificação desses analitos em baixas concentrações se torna primordial. Esse contexto estimulou a elaboração desse capítulo, com enfoque na otimização e validação do método de análise para a amoxicilina utilizando as técnicas analíticas de cromatografia

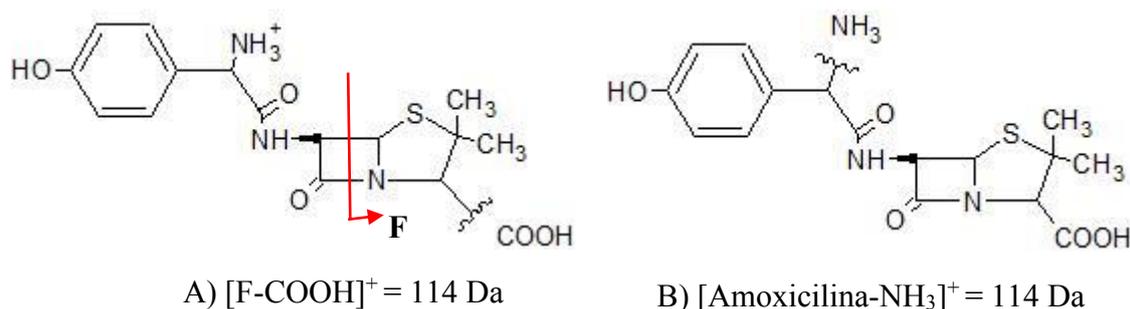
líquida e espectrometria de massas hífenadas. O acoplamento dessas técnicas proporciona ao método uma maior sensibilidade, colaborando para uma detecção e quantificação assertiva para o analito de interesse em matriz ambiental complexa.

4.1.1 Cromatografia líquida acoplada à espectrômetro de massas sequencial na determinação de amoxicilina

O desenvolvimento de métodos sensíveis para a determinação e quantificação da amoxicilina em níveis de traços (ng L^{-1} ou $\mu\text{g L}^{-1}$) tem sido buscado, diante do potencial efeito nocivo ao meio ambiente proporcionado pelo alto consumo desse antibiótico (Fabregat-Safont *et al.*, 2021). Diversos métodos para determinação desse analito em amostras ambientais tem sido relatado na literatura, sendo que a maior parte deles utilizam a cromatografia líquida acoplada ao detector de arranjos de diodos (LC-DAD) ou ao espectrômetro de massas (LC-MS ou LC-MS-MS) (Pingale S. G., 2012, Chen L. *et al.*, 2019, Vooren S. V. *et al.*, 2021). Dentre essas, o HPLC-DAD constantemente apresenta coeluição entre analitos e constituintes da matriz, requerendo um preparo de amostra mais requintado ou a aplicação de uma análise multivariada capaz de identificar interferentes (Vosough M. *et al.*, 2015). Técnicas eletroquímicas também tem sido utilizada para análise de amoxicilina, como a eletroforese capilar (CE), porém a sua aplicação requer aparatos específicos de laboratório e, algumas vezes, a derivatização da molécula ou a complexação da amoxicilina com metais (Pajchel G. *et al.*, 2002; Hrioua A. *et al.*, 2021).

Para a amoxicilina, o íon $[\text{M}+\text{H}]^+$ de relação massa-carga (m/z) de 366 é utilizado como precursor (Chen L., 2019, Diaz-Bao M., 2015). Cardoso e colaboradores desenvolveram um método analítico para determinação de amoxicilina e cefalexina utilizando SPE para preparo da amostra e cromatografia líquida de alta performance acoplado a espectrometria de massas sequencial (HPLC-MS/MS). Para quantificar a amoxicilina, os autores utilizaram o modo de monitoramento de múltiplas reações (MRM) e a transição 366-114 m/z visto que apresentou uma maior intensidade (Cardoso C. R. F., 2012). Outra transição da amoxicilina que ocorre com considerável intensidade é a 366-349 m/z , segundo Chen e colaboradores (Chen L., 2019). A Figura 4.1 mostra os locais onde ocorrem as principais fragmentações da molécula de amoxicilina para formar os íons supracitados

Figura 4.1. Transições MRM da amoxicilina, sendo A) 366 – 114 m/z e B) 366 – 349 m/z .



Como as transições de cada molécula são individuais, essa técnica agrega ao método de determinação e quantificação uma maior seletividade. Porém, é importante que esse parâmetro seja determinado através de um estudo que visa comprovar a confiabilidade dos resultados gerados pelo modelo sugerido.

4.1.2 Validação de método

A etapa de validação do método é essencial para garantir a confiabilidade dos resultados obtidos e a sua realização deve seguir alguns dos procedimentos preconizados por agências governamentais relacionadas ao objetivo da análise, tais como instituto nacional de metrologia (INMETRO) e agência nacional de vigilância sanitária (ANVISA) (Souza, S. V. C., 2007). Sendo que todos sugerem avaliações de parâmetros de desempenho como linearidade, faixa de trabalho, seletividade, efeito de matriz, exatidão, precisão e limites de detecção e quantificação.

Através da avaliação da linearidade do método é possível determinar, neste caso, a relação entre a resposta do detector e a concentração do analito na amostra. Além disso, a faixa linear de trabalho deve estar contida na faixa estudada, sendo que o seu limite inferior é normalmente igual ao limite de detecção ou quantificação (De Souza, 2007). A seletividade determina a capacidade do método de distinguir o analito de possíveis interferentes da matriz ambiental, assim como o efeito de matriz avalia possíveis interações do analito com componentes da matriz (Ribani, 2004). A exatidão é a concordância entre a média dos resultados e um valor de referência, expressando os erros sistemáticos. Por fim, a precisão avalia a proximidade entre resultados de ensaios independentes, tendo como resultado a distribuição de erros aleatórios do sistema de medição (De Souza, 2007).

A precisão pode ser dividida em três etapas, que são: repetitividade, precisão intermediária e precisão interlaboratorial. Porém, os mais frequentemente aplicados e sugeridos pelos guias como INMETRO são a repetitividade e precisão intermediária. A última não é obrigatória de acordo com guias como INMETRO, mas pode ser realizada como forma de refinamento do método (De Souza, 2007).

4.2. Parte experimental

4.2.1. Instrumentação

O ajuste de pH da água deionizada utilizada para preparo das soluções estoques do SAB foi realizado em um pHmetro digital (Hanna Instruments, HI 2221). Para a preparação das soluções foi utilizada uma balança analítica (AUY 220, Shimadzu) com uma incerteza de $\pm 0,0001$ g. Para agilizar a separação de fases foi utilizada uma centrífuga (Excelsa II, FANEN) e o equilíbrio termodinâmico das amostras foi estabelecido através de um banho ultratermostático de incerteza $\pm 0,1$ °C (MA 184, Marconi). Além disso, um banho ultrassom (Sanders medical) foi utilizado para auxiliar a limpeza de materiais plásticos e vidrarias.

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo líquido de ultra performance UPLC® Aquity H-Class (Waters). O sistema de detecção consistiu em um espectrômetro de massa A Xevo TQD (Waters) do tipo triplo quadrupolo com ionização por eletronebulização, no modo positivo.

4.2.2. Reagentes

O polímero utilizado para formação dos SABs foi o PEO1500 (fórmula molecular $\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n\text{H}$ e $\text{MM} = 1500 \text{ g mol}^{-1}$) obtido da Vetec (Xerem Duque de Caxias, RJ, Brasil). O sal aplicado foi o sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) fornecido pela Synth (Dadema, SP, Brasil).

O padrão analítico de amoxicilina aplicado foi obtido da Sigma-Aldrich (Darmstadt, Alemanha), com pureza de $900 \mu\text{g mg}^{-1}$. O solvente metanol (MeOH) foi obtido da J. T. Baker (Center Valley, PA, EUA), com grau HPLC. O reagente para análise (PA) ácido fórmico foi adquirido da Merck (Darmstadt, HE, Alemanha).

Todos os experimentos de extração foram realizados utilizando água deionizada (resistividade = $18,2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ a $298,15 \text{ K}$) obtida do Ultrapore Water Simplicity UV (Millipore). Para os ajustes de pH das soluções foram utilizados ácido sulfúrico (H_2SO_4 , 96,0%) da Merck e hidróxido de sódio (NaOH, 99,0%), adquirido da Vetec.

4.2.3. Composição do SAB e procedimento de extração

Os sistemas aquosos bifásicos utilizados neste estudo foram preparados segundo o trabalho descrito por Assis e colaboradores. Todo o estudo foi realizado aplicando a condição de extração que apresentou melhores resultados: pH do meio igual a 2,00; razão das massas de m_{FF}/m_{FS} : 1/1 e CLA igual a 47,36% (m/m).

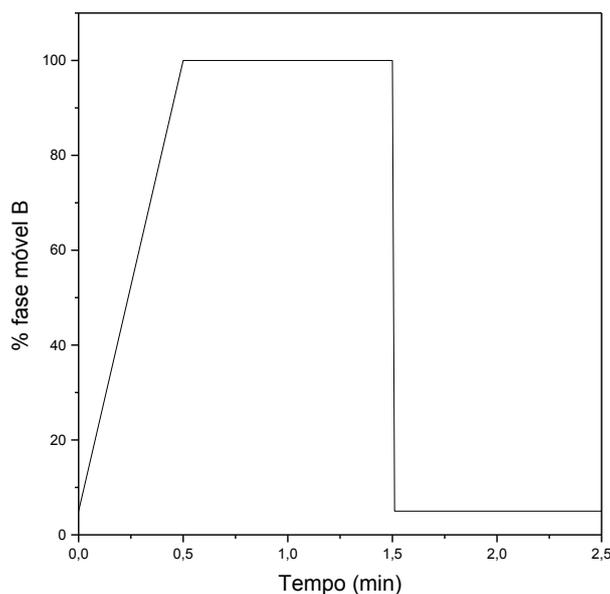
As fases obtidas no tubo de estoque foram coletadas separadamente utilizando seringas e a fase superior foi utilizada como solvente no preparo da solução de amoxicilina. Então, 2,0000 g dessas soluções de amoxicilina foram pesados em tubos de ensaio de 15 mL e misturados com 2,0000 g de fase inferior recolhida anteriormente do SAB estoque (FI).

Os tubos de 15 mL também foram agitados manualmente por 3 minutos e depois centrifugados por 20 minutos a $560 \times g$ para acelerar a separação de fases. Assim como para os SABs estoques, esses tubos foram mantidos em banho termostático por 24 horas a $10,0 \text{ }^\circ\text{C}$ para estabelecer o equilíbrio termodinâmico. As FS de cada tubo foram coletadas com auxílio de seringas e transferidas diretamente para um tubo *vial* para análise no LC-MS/MS.

4.2.4. Condições cromatográficas e de espectrometria de massas

A separação cromatográfica foi obtida usando uma coluna cromatográfica Acquity UPLC® HSS C18 SB de 100 mm de comprimento, 2,1 mm de tamanho de partícula e diâmetro interno $1,8 \text{ }\mu\text{m}$. A temperatura da coluna foi mantida a 45°C e a temperatura da amostra foi mantida a 25°C . Um volume de $1 \text{ }\mu\text{L}$ de cada amostra extraída foi injetado diretamente no cromatógrafo para análise. Foi utilizado um gradiente de (A) ácido fórmico 0,1% (v/v) e (B) metanol com ácido fórmico a 0,1% (v/v), com uma vazão de $0,4 \text{ mL min}^{-1}$. O gradiente inicial foi mantido 5% de B e aumentou para 100% de B até 0,5 min, durante 1 min o gradiente foi mantido 100% de B, voltando para 5% de B (tempo total de execução 2,5 min), conforme mostrado na Figura 4.2. O tempo de retenção da amoxicilina foi de 1,55 min.

Figura 4.2. Gradiente de injeção usado na análise de amoxicilina por UPLC-MS/MS.



As condições da fonte do espectrômetro de massas foram as seguintes: tensão capilar (positiva), 3000 V; temperatura do gás de dessolvatação de 450 °C; temperatura da fonte: 150 °C; vazão dos gases de dessolvatação (N₂) de 700 L h⁻¹ e do contrafluxo do cone (N₂) de 25 L h⁻¹. Foi utilizado nitrogênio de alta pureza como gás de colisão. As transições (m/z) utilizadas para quantificação e confirmação foram: amoxicilina (366-114 e 366-349). Esses fragmentos já foram descritos na literatura (Chen L., 2019, Cardoso C. R. F., 2012). A voltagem do cone e energia de colisão referente à primeira transição utilizada foi 30 V e 15 V, respectivamente. Enquanto para a segunda transição utilizou-se 30 V e 5 V de voltagem de cone e colisão, respectivamente. As análises dos dados foram realizadas utilizando o software MassLynx 4.1 (Waters).

4.2.5. Otimização dos parâmetros cromatográficos e de espectrometria de massas

4.2.5.1. Avaliação do efeito dos parâmetros do espectrômetro de massas no sinal do analito

Para a otimização da resposta da amoxicilina obtida pelo espectrômetro de massas foram avaliados os efeitos da variação de alguns parâmetros, os quais estão descritos na tabela 4.1.

Para isso, soluções de amoxicilina na concentração de 1 mg L^{-1} foram preparadas utilizando uma mistura de água e metanol (1:1 v/v) como diluente e utilizadas nesse estudo.

Tabela 4.1. Níveis inferior e superior das variáveis estudadas para o analito amoxicilina.

Transição	Voltagem de cone (V)	Energia de colisão (V)
366 – 349 m/z	28	33
	28	20
	35	26
	21	26
	15	30

4.2.5.2. Avaliação do efeito da composição da fase móvel

Neste estudo foram avaliadas as fases móveis compostas de metanol e água sem ajuste de pHe metanol e água acidificada com 0,1% de ácido fórmico. Soluções de amoxicilina na concentração de 1 mg L^{-1} foram preparadas utilizando uma mistura de água e metanol (1:1 v/v) como diluente e utilizadas nesse estudo.

4.2.6. Validação do método

Após a otimização das condições cromatográficas, do espectrômetro de massas e aplicando a condição otimizada da extração da amoxicilina em SAB, o método foi validado. Para a validação foi utilizada água do Rio Doce coletada na estação de recebimento do SAAE da cidade de Governador Valadares-MG. As condições analíticas para validação foram descritas nas seções 3.3.3 para a cromatografia e 3.3.4 para a espectrometria de massas. Os ensaios de validação do método utilizado seguiram as diretrizes do guia do INMETRO. Os parâmetros avaliados, bem como a maneira pela qual eles foram estimados estão descritos a seguir.

4.2.6.1. Seletividade

A amostra de água do rio “*in natura*” foi submetida aos processos de extração e posterior injeção no UPLC-MS/MS. A presença de sinal no tempo de retenção do analito foi avaliada para determinar a seletividade do método analítico para a determinação e quantificação dos fármacos estudados.

4.2.6.2. Efeito de matriz

Duas curvas analíticas foram construídas, sendo uma em água deionizada e outra no extrato da matriz real, contendo os analitos na faixa de 30 a 750 $\mu\text{g L}^{-1}$. Cada nível da curva analítica foi fortificado com o analito. Para a curva em água deionizada e em água de rio, soluções estoques de amoxicilina foram preparadas através da fortificação direta da matriz branca e no extrato da matriz em diferentes concentrações. Utilizando a fase superior do SAB estoque como solvente, diluições específicas das soluções de amoxicilina foram realizadas para os diferentes níveis estudados, mantendo a quantidade adicionada da solução de amoxicilina constante e igual a 0,6 g. A comparação da inclinação das curvas foi realizada através dos testes F (Fisher-Snedecor) e t (Student) ao nível de confiança de 95%.

4.2.6.3. Linearidade

Uma curva matrizada foi construída, em triplicata, nos níveis de fortificação: 30, 100, 200, 250, 300, 500 e 750 $\mu\text{g L}^{-1}$ na água de rio. Após a extração, as áreas correspondentes ao sinal dos compostos de interesse foram inseridas em um gráfico de área *versus* concentração. Uma equação que descreve uma relação linear foi obtida através de um modelo de regressão linear, aplicando o método dos mínimos quadrados ordinários. O modelo de regressão do tipo $y = ax + b$ foi obtido após os testes para detecção de *outliers de Jackknife*, linearidade através da ANOVA e homocedasticidade de Brown Forsythe, seguindo a metodologia de Souza e Junqueira (2005) (Souza S. V. C. *et al.*, 2005).

4.2.6.4. Limite de detecção e quantificação

Para a determinação dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), a extração de 10 amostras aplicando SAB foram realizadas procedendo com o preparo de diferentes concentrações de amoxicilina por via da fortificação da matriz de água de rio. Então, diluições dessas soluções foram realizadas aplicando a fase superior do SAB estoque como solvente e mantendo a quantidade de amoxicilina na alíquota constante e igual a 0,6 mg. Depois da extração, a fase superior do SAB foi transferida diretamente para *vial* para ser injetada no UPLC-MS/MS. Os valores de LD e LQ foram estimados, respectivamente, determinando o ruído da linha de base e estipulando a concentração do ativo que produz uma relação sinal-ruído superior a 3 e 10.

4.2.6.5. Precisão intradia e interdias

A precisão foi estimada em três pontos da curva analítica (30, 150 e 750 $\mu\text{g L}^{-1}$) a partir de seis replicatas de extração em cada um desses pontos, que foi realizada no mesmo dia para a precisão intradias (repetitividade) e em outro dia para a precisão interdias, ou precisão intermediária. Os resultados foram expressos pelo coeficiente de variação (CV), calculado através da Equação 4.1:

$$CV = \frac{s}{C_{\text{Amoxicilina}}^{\text{média}}} \times 100 \quad \text{Equação 4.1}$$

Onde s é o desvio padrão das concentrações de amoxicilina encontradas e $C_{\text{Amoxicilina}}$ é a concentração de amoxicilina encontrada.

4.2.6.6. Exatidão

A exatidão foi estimada em três pontos da curva (30, 250 e 750 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Foram feitas seis replicatas de extração aplicando a matriz fortificada nos níveis já mencionados. Após a extração, a fase superior foi transferida para um frasco *vial* para ser analisada. Após a análise por UHPLC-MS/MS usou-se a Equação 4.2 para calcular a recuperação para cada uma das concentrações:

$$R = \frac{C_{\text{Amoxicilina}}^{\text{obtida}}}{C_{\text{Amoxicilina}}^{\text{teórica}}} \times 100 \quad \text{Equação 4.2}$$

Onde R é a recuperação e $C_{\text{Amoxicilina}}$ é a concentração de amoxicilina.

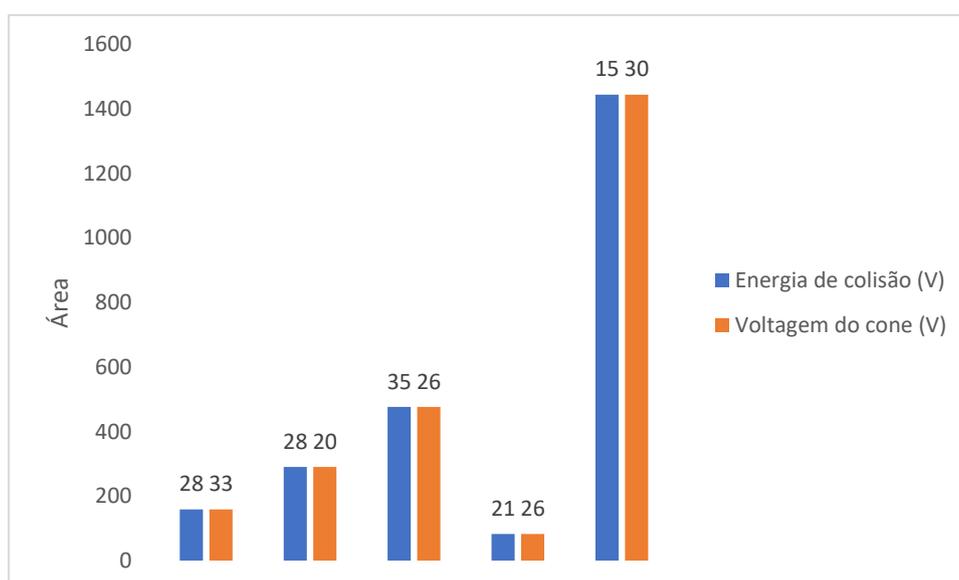
4.3. Resultados e discussão

4.3.1. Otimização dos parâmetros cromatográficos e de espectrometria de massas

4.3.1.1. Avaliação do efeito dos parâmetros do espectrômetro de massas no sinal do analito

A otimização dos parâmetros cromatográficos e de espectrometria de massas é muito importante para alcançar a condição em que se obtém os melhores resultados, com respostas mais expressivas e, conseqüentemente, uma melhor sensibilidade e detectabilidade. Sabendo disso, primeiramente foi avaliado o efeito da variação da voltagem do cone e da energia de colisão, que são parâmetros importantes da espectrometria de massas (Figura 4.3).

Figura 4.3. Efeito da variação da energia de colisão e voltagem do cone na ionização da amoxicilina para a análise em UPLC-MS/MS.



De acordo com a Figura 4.3, a maior área do pico para a amoxicilina foi obtida ao aplicar uma voltagem de cone de 30 V e energia de colisão de 15 V. Essa condição de ionização possibilitou uma maior formação dos íons de interesse para a detecção e quantificação da amoxicilina em UPLC-MS/MS. O aumento da energia de colisão pode ter atrapalhado o processo de ionização do analito, gerando uma resposta inferior, mesmo nas mesmas

circunstâncias (amoxicilina 1 mg L⁻¹). A diminuição da voltagem do cone também proporcionou menores respostas que pode ter ocorrido devido a uma menor extração de íons da região de pressão atmosférica da fonte de íons para a região de alto vácuo do analisador de massa.

4.3.1.2. Avaliação do efeito da composição da fase móvel

Outro parâmetro cromatográfico que foi avaliado foi o efeito da acidificação da fase móvel na ionização da amoxicilina. Para isso foram testadas a fase móvel neutra (A: H₂O e B: MeOH) e acidificada (A: H₂O + 0,1% de ácido fórmico e B: MeOH + 0,1% de ácido fórmico). O efeito da alteração da fase móvel na resposta da amoxicilina é mostrado na Tabela 4.2.

Tabela 4.2. Respostas analíticas obtidas nas diferentes fases móveis avaliadas.

Fase móvel	Transições	Área
A: H ₂ O; B: MeOH	366 – 114 m/z	10082
	366 – 349 m/z	10965
A: H ₂ O + 0,1% de ácido fórmico; B: MeOH + 0,1% de ácido fórmico	366 – 114 m/z	32288
	366 – 349 m/z	37452

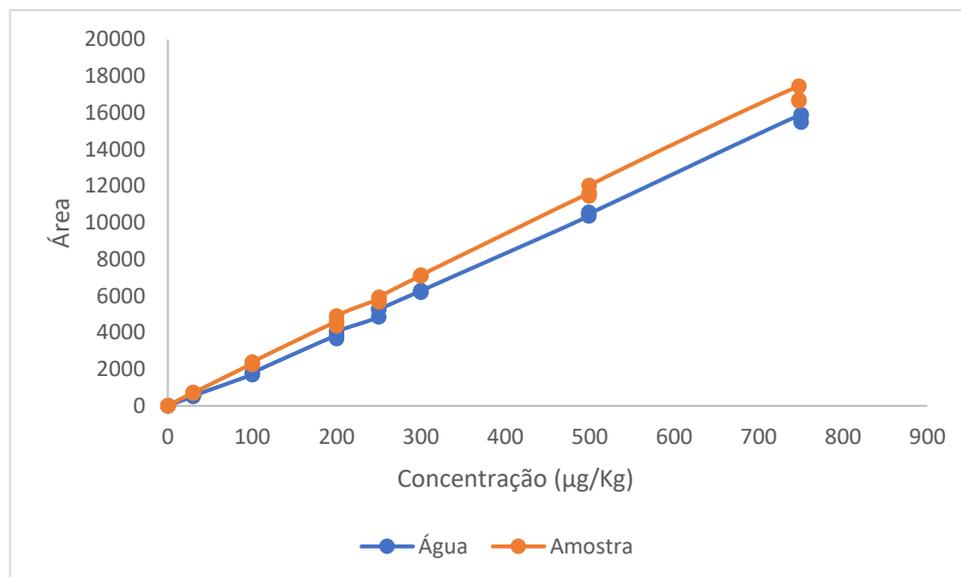
A presença do ácido fórmico na fase móvel permitiu a obtenção de melhores respostas e isso se deu devido a uma melhor ionização da amoxicilina que está sendo ionizada por eletronebulização no modo positivo com a formação do íon precursor que é um aduto com próton [M+H]⁺. Homem e colaboradores também observaram um comportamento de ionização da amoxicilina similar a esse, além de propor que a amoxicilina é mais eficientemente ionizada em solventes próticos (Homem, V., 2014). Corroborando com essa premissa, os grupos com característica ácida se tornam mais estáveis ao desfazer a ligação com os demais grupos da molécula, o que favorece a formação dos íons e proporciona uma melhor sensibilidade ao método analítico.

4.3.2. Determinação dos parâmetros de validação do método

A princípio, a seletividade do método foi avaliada a fim de determinar a presença de possíveis concomitantes no tempo de retenção da amoxicilina. Através da avaliação dos cromatogramas da amostra sem o analito e da amostra fortificada pôde-se concluir que não há outro composto isômero que coeluiu com a amoxicilina no tempo de retenção de 1,55 minutos e que apresenta as transições empregadas (366-114 e 366-349).

Para avaliar se houve efeito de matriz, comparou-se as inclinações das curvas preparadas em solvente (água ultrapura) e na amostra de água do rio, através dos testes F e t. Visualmente, observou-se que as inclinações das retas não eram coincidentes, o que sugere que há efeito de matriz. Através do teste F essa suposição foi confirmada diante do apontamento estatístico que diferencia os coeficientes angulares das curvas analíticas, com $p > 0,05$. A Figura 4.4 dispõe as curvas para a amoxicilina nos diferentes meios de dissolução.

Figura 4.4. Curvas de área do pico *versus* concentração de amoxicilina construídas em solvente (água ultrapura) e água de rio (n = 3).



Como a desigualdade dos coeficientes angulares das curvas analíticas foi confirmada, as substâncias presentes na matriz interferem na extração e/ou quantificação da amoxicilina. Analisando a Figura 4.4 observa-se que essa interferência proporciona o aumento do sinal da amoxicilina (incremento iônico). Então, é importante que toda a quantificação do analito seja

realizada na presença da matriz para que esse efeito seja minimizado e resultados confiáveis sejam obtidos.

A linearidade do método foi demonstrada para a faixa de concentração 30-750 $\mu\text{g kg}^{-1}$, apresentando coeficientes de correlação superiores a 0,99. Esse resultado comprova a capacidade preditiva do método proposto. Os coeficientes angulares (inclinação), linear (intercepto) e de correlação (r) obtidos pela regressão pelo método dos mínimos quadrados ordinários são apresentados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3. Parâmetros da validação da amoxicilina: curva analítica, faixa linear e coeficiente de correlação.

Parâmetros	Valores
Inclinação	27,785
Intercepto	146,60
Faixa linear de trabalho ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0-750
Coefficiente de correção (r)	0,9985

A dispersão dos resultados foi avaliada através do parâmetro de precisão, onde foi determinado o coeficiente de variação (CV) relativo às replicatas analisadas, seguindo a equação 4.1. Já, para determinar a exatidão do método analítico, testes de recuperação foram feitos para verificar se os valores obtidos pelo modelo proposto equivalem aos valores teóricos. Os valores de recuperação foram expressos em termos de porcentagem, seguindo a equação 4.2. Os resultados obtidos para a precisão repetibilidade (intradia) e intermediária (interdias) e exatidão estão descritos na Tabela 4.4.

Tabela 4.4. Valores de precisão intradia e interdias e exatidão para amoxicilina (n = 6).

Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Intradia (%CV)	Interdias (%CV)	Exatidão (%Recuperação \pm DPR)
30	2,2	2,2	115 \pm 3
250	1,5	2,3	94 \pm 2
750	1,4	3,7	94 \pm 1

De acordo com o guia de validação do INMETRO, recuperações médias entre 60-115 para o nível de 30 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 80-110 para os níveis 250 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 750 $\mu\text{g kg}^{-1}$ são aceitáveis.

Além disso, o coeficiente de variação obtido na precisão foi consideravelmente inferior ao determinado pelo INMETRO (15%) (INMETRO, 2018). Tendo em vista os resultados mostrados na Tabela 4.5, pode-se concluir que os valores de recuperação e os coeficientes de variação obtidos na precisão estão dentro da faixa aceitável, configurando ao modelo proposto uma exatidão e precisão adequadas. Além disso, o método proposto apresentou uma boa exatidão, alcançando recuperações superiores a 94%, que é superior a alguns valores já reportados na literatura (Homem, V., 2014).

O limite de quantificação foi determinado experimentalmente através da realização de diluições sucessivas da amostra de amoxicilina. A concentração de $30 \mu\text{g kg}^{-1}$ foi então determinada como limite de quantificação do método, visto que a razão entre sinal ruído obtida nessa concentração foi igual a 64. Almalki e colaboradores propuseram um método para quantificar a amoxicilina, dicloxacilina e as impurezas oficiais nas formas puras e farmacêuticas, porém conseguiram apenas um limite de quantificação (LQ) de $1322 \mu\text{g L}^{-1}$ (Almalki *et al.*, 2021). Gaikwad e colaboradores conseguiram valores de LQ para a quantificação da amoxicilina de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ (Gaikwad *et al.*, 2013), mas ainda assim inferiores ao alcançado pelo método analítico proposto nesse trabalho. Nessa perspectiva, o resultado obtido mostra que o método proposto nesse trabalho é capaz de quantificar baixas concentrações de amoxicilina, sendo então mais sensível.

4.4. Conclusão

Neste capítulo o método analítico de extração da amoxicilina aplicando sistemas aquosos bifásicos foi validado através da análise por UPLC-MS/MS. Com esse objetivo, parâmetros cromatográficos e de espectrometria de massas foram otimizados a fim de gerar melhores resultados.

Durante a validação foi observado efeito de matriz quando o método foi aplicado a água de rio. Essa limitação foi contornada através da determinação da linearidade do método utilizando curvas analíticas matrizadas. Assim, após a validação constatou-se que o método é seletivo, preciso, exato, e com limites de quantificação e detecção aceitáveis. Esses resultados demonstram a aplicabilidade do método utilizando SAB para preparo da amostra para quantificação da amoxicilina.

Nesse contexto, o SAB atrelado a UPLC-MS/MS formaram um método eficiente para a determinação e quantificação de amoxicilina, mesmo em matriz de água complexa. Portanto, a aplicação do SAB para preparo de amostra de fármacos em conjunto com a análise por cromatografia líquida e espectrometria de massas se torna uma alternativa nova, eficiente, confiável e ambientalmente segura.

Como perspectiva futura, a aplicação dessa técnica de preparo de amostra em conjunto a outras técnicas de análise se torna interessante para a extração, determinação e quantificação de outras classes de contaminantes emergentes.

4.5. Referências bibliográficas

Almalki A. H., Hussein E. A., Naguib I. A., Abdelaleem E. A., Zaazaa H. E., Abdallah (2021), Development and validation of ecofriendly HPLC-MS method for quantitative assay of amoxicillin, dicloxacillin, and their official impurity in pure and dosage forms, *Journal of analytical methods in chemistry* 2021. 5570938.

Anastopoulos I., Pashaldis I., Orfanos A. G., Manariotis I. D., Tatarchuk T., Sellaoui L., Bonilla-Petriciolet A., Mittal A., Nunez-Delgado A. (2020), Removal of caffeine, nicotine, and amoxicillin from (waste)waters by various adsorbents. A review, *Journal of environmental management* 261, 110236.

Cardoso C. R. F., Alvez M. I. R., Filho N. R. A. (2012), Determination of amoxicillin in human plasma using cephalexin as an internal standard and HPLC-MS/MS for the application of bioequivalence studies, *International Research Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2, 299-305

Chen L., Wang B., Diao Z. Zhao M. Xie K., Zhang P., Wang, X., Zhang T., Wang J. (2019), Development and validation of an HPLC-ESI/MS/MS method for the determination of amoxicillin, its major metabolites, and ampicillin residues in chicken tissues, *Molecules* 24. 2652.

Costa L. P. L. (2017). Avaliação de diferentes técnicas de preparo de amostras para determinação de bixina e metformina em plasma de rato por UHPLC-DAD-MS/MS, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – MG.

De Souza SVC, Junqueira RG. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. *Anal Chim Acta.* 2005;552(1–2):25–35

De Souza SVC (2007), Procedimento para validação interlaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – MG.

Diaz-Bao M., Barreiro R., Miranda J. M., Cepeda A., Regal P. (2015), Fast HPLC-MS/MS method for determining penicillin antibiotics in infant formulas using molecularly imprinted solid-phase extraction, *Journal of analytical methods chemistry* 2015, 959675.

Fabregat-Safont D., Pitarch E., Bijlsma L., Matei I., Hernandez F. (2021), Rapid and sensitive analytical method for the determination of amoxicillin and related compounds in water

meeting the requirements of the European union watch list, *Journal of chromatography A* 1658, 462605.

Gaikwad A., Gavali S., Narendiran, Katale D., Bonde S., Bhadane R. P. (2013), An LC-MS-MS method for the simultaneous quantification of amoxicillin and clavulanic acid in human plasma and its pharmacokinetic application, *Journal of pharmacy research* 6, 804-812.

Homem V., Alves A., Santos L. (2014), Development and validation of a fast procedure to analyze amoxicillin in river waters by direct-injection LC-MS/MS, *Journal of chemical education* 91, 1961-1965.

Hrioua A., Loudiki A., Farahi A., Bakasse M., Lahrich S., Saqrane S., El Mhammedi M. A. (2021), Recent advances in electrochemical sensors for amoxicillin detection in biological and environmental samples 137, 107687.

INMETRO (2018), Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. Inmetro. Rio de Janeiro, Julho.

Ma J., Gao M. Liu Q., Wang Q. (2022), High efficiency three-dimensional electrochemical treatment of amoxicillin wastewater using Mn-Co/GAC particle electrodes and optimization of operating condition 209, 112728.

Pajchel G., Pawlowski K., Tyski S. (2002), CE versus LC for simultaneous determination of amoxicillin/clavulanic and ampicillin/sulbactam in pharmaceutical formulations for injections 29. 75-81.

Pingale S. G., Badgujar M., Mangaonkar K. V., Mastorakis N. E. (2012), Determination of amoxicillin in human plasma by LC-MS/MS and its application to a bioequivalence study, *WSEAS Transaction on Biology and Biomedicine* 1, 1-13.

Vooren S. V., Waele J. J. D., Boelens J., Polet M., Stove V., Vanhaecke L., Verstraete A. G. (2021), Development and validation of a liquid chromatography high-resolution mass spectrometry orbitrap method for the sensitive quantification of amoxicillin, piperacillin, tazobactam and meropenem in human faeces, *Analytica Chimica Acta* 1177, 338760.

Vosough M., Rashvand M., Esfahani H. M., Kargosha K., Salemi A. (2015), Direct analysis of six antibiotics in wastewater sample using rapid high-performance liquid chromatography coupled with diode array detector: A chemometric study towards green analytical chemistry, *Talanta* 135, 7-17.