

**Universidade Federal de Santa Catarina
Departamento de Química – CFM
Programa de Pós Graduação em Química**

Jéssica Maria Espurio Pusch

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA
PARA DETERMINAÇÃO DE MARCADORES QUÍMICOS DE
CONTAMINAÇÃO FECAL EM AMOSTRAS DE SEDIMENTO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Augusto dos Santos Madureira

Florianópolis - SC
2016

Pusch, Jéssica Maria Espurio

Desenvolvimento de metodologia analítica para
determinação de marcadores químicos de contaminação fecal em
amostras de sedimento / Jéssica Maria Espurio Pusch ;
orientador, Luiz Augusto dos Santos Madureira -
Florianópolis, SC, 2016.

88 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas.
Programa de Pós-Graduação em Química.

Inclui referências

1. Química. 2. Esteroides. 3. Sedimento. 4.
Derivatização. 5. Cromatografia a gás. I. Madureira, Luiz
Augusto dos Santos. II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Daiane, meu pai José Antônio, e minhas irmãs Andressa e Camila, por ser meu alicerce e por estarem sempre ao meu lado;

Aos meus avós, Dioracy, Marita, Valdemar e Maria, por tudo que fazem por seus filhos e netos e por todo o amor depositado;

Ao meu companheiro Vicente, por todo o carinho, compreensão e ajuda ao longo desta etapa e de tantas outras;

Ao Professor Luiz A. S. Madureira, por todos os ensinamentos, orientação e confiança a mim investida;

À Morgana, pela amizade construída e por toda a disposição e entusiasmo que sempre respondeu quando procurei auxílio, assim como faz com todos os colegas de laboratório;

Aos amigos e colegas do Laboratório de Química Ambiental e Geoquímica Orgânica, Vânia, Michele, Larissa, Leila, Ana Paula e Karine, pelo convívio, discussões e cafés da manhã reforçados deliciosos;

Aos amigos e colegas do Laboratório de Biossensores, Eduardo, Daniela, Tânia e Larissa pela amizade que perdurou, conversas e ajuda ao longo deste trabalho;

Aos membros da banca examinadora de defesa, pelo aceite do convite de participação desta dissertação;

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina pela oportunidade e condições de trabalho;

A todos os professores da Universidade Federal de Santa Catarina
que contribuíram para minha formação profissional e pessoal;

À UFSC pela estrutura;

Ao CNPq pela bolsa de estudo.

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo otimizar uma metodologia analítica, considerando alterações e adaptações ambientalmente amigáveis, para determinação de esteroides em amostras de sedimentos utilizando as técnicas de cromatografia a gás com detector por ionização em chama (GC/FID) e cromatografia a gás com espectrometria de massas (GC-MS). Foram levados em consideração, particularmente, procedimentos de extração e derivatização. Para a etapa de extração foi utilizado banho de ultrassom e avaliada a eficiência de recuperação dos analitos empregando etanol como solvente extrator. As variáveis volume de etanol e tempo de ultrassom foram otimizadas por método multivariado com o programa *Statistica*, sendo obtida resposta mais adequada na extração com a combinação do uso de 21 mL de etanol em 30 min de sonicação. Na etapa de derivatização realizou-se a avaliação e otimização do método de derivatização no injetor do GC. A otimização multivariada também foi empregada para avaliar este procedimento. A interação dos fatores temperatura do injetor em 290 °C, tempo de *splitless* de 2 min e volume de agente derivatizante de 40 µL resultou em satisfatória resposta analítica. O método proposto foi aplicado sob as condições otimizadas em matrizes sedimentares, que possibilitou amplas faixas lineares, com boas linearidades e baixos desvios padrão relativos (RSD) para os seis esteroides estudados. Os limites de detecção variaram entre 3 e 14 ng mL⁻¹ e os de quantificação entre 10 e 47 ng mL⁻¹. Ainda, a exatidão e precisão do método foram avaliadas por meio de ensaios de recuperação por fortificação de matriz e atestaram o bom desempenho desta metodologia.

Palavras-chave: esteroides; sedimento; derivatização; cromatografia a gás.

ABSTRACT

This study aimed to optimize an analytical methodology, considering environmental friendly alterations, to quantify steroids in sediment through gas chromatography with flame ionization detector (GC/FID) and gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). Extraction and derivatization procedures were, particularly, taken into consideration. In the extraction procedure an ultrasonic bath was used to access the analytes recovery efficiency with the use of ethanol as extracting solvent. The factors, volume of ethanol and ultrasonic bath time, were optimized by multivariate method using *Statistica* software, where 21 mL of ethanol and 30 min of sonication time were found to be the most adequate combination for the experimental procedure. At the derivatization step, an injection port derivatization method was evaluated and optimized. The multivariate technique was also used to investigate relevant variables. In this way, it was found that the interaction between the factors injection port temperature at 290 °C, splitless time of 2 min, and derivatization reagent volume of 40 µL, resulted in a satisfactory analytical response. The proposed method under the optimized conditions, employed in sedimentary matrices, presented broad linear ranges, good linearities and low relative standard deviation (RSD) for all the six studied steroids. The limits of detection varied between 3 and 14 ng mL⁻¹ and the limits of quantification between 10 and 47 ng mL⁻¹. In addition, recovery assays through matrices fortification, used in order to evaluate the precision and accuracy, attested the good performance of the proposed method.

Keywords: steroids; sediment; derivatization; gas chromatography.

LISTA DE FIGURAS E ESQUEMAS

- Figura 1. Estrutura básica dos esteroides. Fonte: elaborado pela autora. 22
- Figura 2. Representação estrutural dos esteroides: Coprostanol, Colesterol, Colestanol, Etigmasterol, Estigmastanol e Ácido hiodesoxicólico. Fonte: Elaborado pela autora. 24
- Esquema 1. Representação genérica da reação de derivatização de um álcool ou fenol através da formação de produto derivado acrescido de um grupo trimetilsilil. Fonte: ORATA, 2012. 31
- Figura 3. Representação gráfica de planejamentos compostos centrais de (a) duas variáveis ($\alpha=1,41$) e (b) três variáveis ($\alpha=1,68$). (●) pontos do planejamento fatorial, (○) pontos axiais e (□) ponto central (BEZERRA *et al.*, 2008). 36
- Figura 4. Cromatograma obtido por GC/FID dos compostos: padrão de recuperação, androstanol a $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ (1), padrão interno, 5α -colestano a $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ (2); coprostanol (3), colesterol (4), colestanol (5), éster metílico do ácido hiodesoxicólico (6), estigmasterol (7), estigmastanol (8) a $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ cada. 45
- Figura 5. Imagem da coluna de limpeza, composta de alumina (5% desativada) e sulfato de sódio, empregada após os ensaios de extração. Fonte: elaborado pela autora. 51
- Figura 6. Eficiência da reação de derivatização em injetor e em estufa dos analitos: coprostanol, colesterol, colestanol, éster metílico do ácido hiodesoxicólico, estigmasterol e estigmastanol, em concentrações de $30 \mu\text{g mL}^{-1}$. Área PI = área do padrão interno 5α -colestano referente a $12 \mu\text{g mL}^{-1}$. 56
- Figura 7. Efeito de diferentes solventes orgânicos como meio reacional da reação de derivatização na resposta

analítica dos analitos: coprostanol, colesterol, colestanol, éster metílico do ácido hiodesoxicólico, estigmasterol e estigmastanol, em concentrações de $30 \mu\text{g mL}^{-1}$. Área PI = área do padrão interno 5α -colestano referente a $12 \mu\text{g mL}^{-1}$. 58

Figura 8. Gráfico de pareto gerado pelo planejamento composto central para as variáveis temperatura do injetor, tempo de splitless e volume de BSTFA:TMCS (99:1) e suas interações no procedimento de derivatização dos analitos. 61

Figura 9. Superfícies de respostas obtidas a partir do planejamento composto central da combinação dos efeitos das variáveis (a) tempo de *splitless* e volume de BSTFA:TMCS (99:1), (b) volume de BSTFA:TMCS(99:1), e temperatura do injetor e (c) tempo de *splitless* e temperatura do injetor. O eixo z representa a média geométrica das razões das áreas dos picos dos analitos e área do pico do padrão interno. 62

Figura 10. Superfície de resposta obtida a partir do planejamento composto central da combinação dos efeitos das variáveis volume de etanol e tempo de ultrassom. O eixo z representa a média geométrica das razões das áreas dos picos dos analitos e área do pico do padrão interno. 66

Figura 11. Avaliação da estabilidade do meio reacional da reação de derivatização dos esteroides através de ensaios mantidos em temperatura ambiente e sob refrigeração. Área = média das áreas dos esteroides coprostanol, colesterol, colestanol, éster metílico do ácido hiodesoxicólico, estigmasterol e estigmastanol em concentrações de $30 \mu\text{g mL}^{-1}$. Área PI = área do padrão interno 5α -colestano à $20 \mu\text{g mL}^{-1}$. 72

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Matrizes de planejamentos compostos centrais com duas e três variáveis. Adaptado de TEÓFILO e FERREIRA (2006). 37
- Tabela 2. Tempos de retenção, íons de identificação e quantificação dos seis esteroides, padrão de recuperação, androstanol e padrão interno, 5 α -colestano. 44
- Tabela 3. Matriz do planejamento composto central para otimização das variáveis temperatura, volume de BSTFA:TMCS e tempo de *splitless* do procedimento de derivatização dos analitos. 48
- Tabela 4. Matriz do planejamento composto central para otimização de das variáveis tempo de ultrassom e volume de etanol do procedimento de extração dos analitos 50
- Tabela 5. Faixa linear, coeficiente de correlação, desvios padrão relativos, limites de detecção e quantificação obtidos para determinação de coprostanol, colesterol, colestano, éster metílico do ácido hiodesoxicólico, estigmasterol e estigmastanol. 67
- Tabela 6. Valores de recuperação, fatores de recuperação e desvio padrão relativo dos experimentos (n=3), de fortificação de matriz em três níveis de concentração e precisão intra-dia e inter-dia em termos de desvio padrão relativo em três níveis de concentração (n=3). 69

LISTA DE ABREVIATURAS

BSTFA – *N,O*-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida
(*Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide*)

BSA – Bis(trimetilsilil)acetamida (*Bis(trimethylsilyl)acetamide*)

CCD – Planejamento composto central (*Central composite design*)

GC – Cromatografia a gás (*Gas chromatography*)

GC/FID – Cromatografia gasosa /Detector por ionização em chama (*Gas chromatography/Flame ionization detector*)

GC-MS – Cromatografia gasosa acoplada à-espectrometria de massas (*Gas chromatography-Mass Spectrometry - GC-MS*)

IPD – Derivatização em injetor (*Injection port-derivatization*)

IUPAC – União Internacional de química pura e aplicada
(*International Union of Pure and Applied Chemistry*)

LOD – Limite de detecção (*Limit of detection*)

LOQ – Limite de quantificação (*Limit of quantification*)

MSTFA – *N*-metil-*N*-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (*N-Methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide*)

m/z – Razão massa/carga

OMS – Organização mundial da saúde

PI – Padrão interno

RSD – Desvio padrão relativo (*Relative standard deviation*)

RSM – Metodologia de superfície de reposta (*Response surface methodology*)

SPE – Extração em fase sólida (*Solid phase extraction*)

TMCS – trimetilclorosilano (*trimethylchlorosilane*)

U.S.EPA – Agência de proteção ambiental americana (*American Environmental Protection Agency*)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS	19
1.2 INDICADORES DE POLUIÇÃO FECAL	20
1.3 PREPARO DE AMOSTRA E ADAPTAÇÕES PARA DETERMINAÇÃO DE ESTEROIDES	26
1.3.1 Métodos de extração para determinação de esteroides	27
1.3.2 Métodos de derivatização para determinação de esteroides	30
1.3.2.1 Derivatização em injetor	31
1.4 QUIMIOMETRIA	33
1.4.1 Planejamento compostos central (<i>Central Composite design – CCD</i>)	35
2 OBJETIVOS	38
2.1 OBJETIVO GERAL	38
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
3 MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES	39
3.2 LIMPEZA DE UTENSÍLIOS DE LABORATÓRIO	40
3.3 INSTRUMENTAÇÃO	40
3.4 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS ANALITOS	42
3.5 COMPARAÇÃO ENTRE PROCEDIMENTOS DE DERIVATIZAÇÃO	45
3.6 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE DERIVATIZAÇÃO	46
3.6.1 Seleção da composição do meio reacional da derivatização	46
3.6.2 Otimização multivariada para reação de derivatização	47

3.7 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO	49
3.8 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DA METODOLOGIA ANALÍTICA PROPOSTA	52
3.8.1 Testes de adição e recuperação em matriz e avaliação da precisão e exatidão do método	53
3.9 ESTUDO DA ESTABILIDADE DO MEIO REACIONAL DA DERIVATIZAÇÃO	51
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	55
4.1 COMPARAÇÃO ENTRE PROCEDIMENTOS DE DERIVATIZAÇÃO	55
4.2 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE DERIVATIZAÇÃO EM INJETOR	57
4.2.1 Seleção da composição do meio reacional da derivatização em injetor	57
4.2.2 Otimização multivariada para reação de derivatização em injetor	59
4.3 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO	64
4.4 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DA METODOLOGIA ANALÍTICA PROPOSTA	66
4.5 ESTUDO DA ESTABILIDADE DO MEIO REACIONAL PARA REAÇÃO DE DERIVATIZAÇÃO	70
5 CONCLUSÃO	74
6 PERSPECTIVAS	75

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

O modo como a sociedade se relaciona com a natureza, implica invariavelmente em impactos diretos sobre seus diversos sub-sistemas: água, solo, atmosfera, entre outros. Não necessariamente estes impactos devem ser considerados negativos, mas fatores como o crescimento exacerbado e inadequado de áreas urbanas trazem sérias consequências à qualidade de recursos ambientais; estes denominados como "recursos" por motivos evidentes, visto que são extraídos, aproveitados e reaproveitados pela humanidade e de inigualável importância para conservação de nosso ecossistema como um todo (BRÜGGER, 1996).

A gestão inadequada de resíduos como efluentes domésticos e decorrentes da produção intensiva de animais são as principais atividades responsáveis pela degradação de corpos d'água e solo (SILVA e MATTOS, 2002). Ao final de 2011, estimou-se que 2,5 bilhões de pessoas careciam de instalações sanitárias adequadas (OMS - Organização Mundial da Saúde, 2013) e em 2007 avaliou-se que uma quantia significativamente maior de dejetos fecais são gerados por animais de produção, em comparação à população humana (DUFOR *et al.*, 2012). A contaminação fecal de recursos, como fontes de água potável, de irrigação, recreação e outras, é considerada como um grande problema de saúde pública, haja vista a possibilidade de agentes responsáveis por doenças de veiculação hídrica, como a febre tifóide, cólera, hepatite, entre outras, estarem agregadas a matéria fecal (OMS, 2003).

Ambientes suscetíveis a cenários como os discutidos anteriormente remetem a extrema importância de avaliações periódicas de nossos recursos hídricos e pedológicos. Contexto no qual se enquadra o presente trabalho que propõe a análise de indicadores fecais esteroidais em amostras de sedimentos por

meio da aplicação de uma metodologia simples, rápida e orientada na diminuição da utilização de insumos e geração de passivos laboratoriais.

1.2 INDICADORES DE POLUIÇÃO FECAL

Técnicas de isolamento e identificação dos numerosos patógenos responsáveis pela propagação de doenças são muitas vezes complexas e onerosas. Por este motivo, e por ser a maneira mais eficiente para avaliação de contaminação fecal, o controle da qualidade de água e solo é mais comumente realizado de maneira indireta, através da verificação da presença de indicadores de poluição fecal (FRANCY e HELSEL, 2000; SAIM *et al.*, 2009).

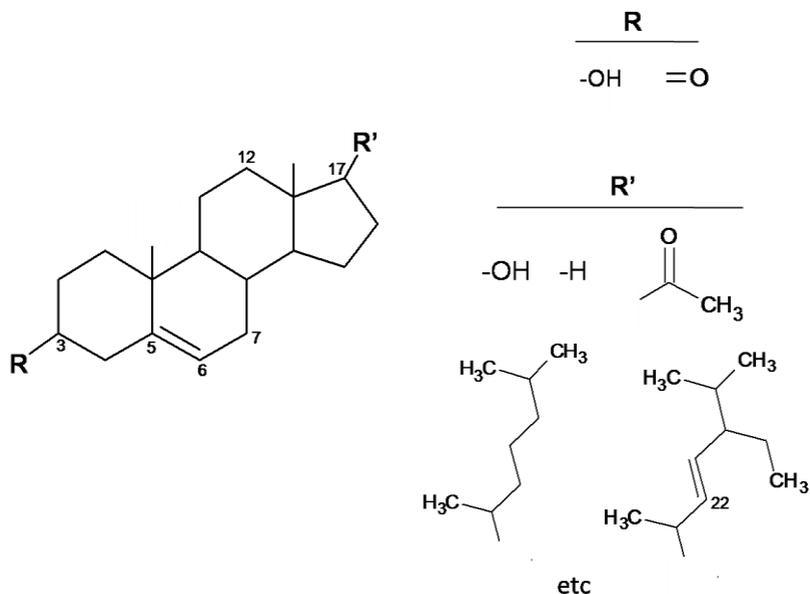
Há muitos anos tem sido avaliada a presença de indicadores microbiológicos de poluição fecal no ambiente, sendo os principais grupos de bactérias usados como indicadores os coliformes totais, coliformes termotolerantes e os enterococos. Os métodos utilizados para investigação da presença destes microrganismos são considerados simples e rápidos, e ainda são utilizados em muitos países, inclusive no Brasil. No entanto, são observadas flutuações nas contagens de população destes microrganismos, rápida degradação em ambientes tropicais e, como estão presentes nos intestinos e fezes de humanos e animais homeotérmicos, não há possibilidade de identificar com clareza a origem da contaminação fecal (CHAGAS *et al.*, 1981; SAIM *et al.*, 2009; SULLIVAN *et al.*, 2010; ADNAN *et al.*, 2012).

Com intenção de aprimorar o monitoramento de recursos ambientais e aprofundar o conhecimento em relação à natureza de contaminação, diversos métodos alternativos de rastreamento de contaminação fecal foram desenvolvidos e reportados na literatura, como por exemplo: determinação de bacteriófagos, de vírus entéricos, uso de genes de bactérias anaeróbicas específicas ao hospedeiro (*host-specific*), contaminantes orgânicos, entre outros (TRAN *et al.*, 2015). Os métodos citados acima também

compreendem o uso de biomarcadores lipídicos, mais especificamente esteroides (presentes no intestino e nas fezes de humanos e animais homeotérmicos), como promissores marcadores químicos de contaminação fecal. Estes são amplamente empregados em pesquisas metodológicas e avaliações ambientais associadas à contaminação fecal em corpos d'água e em sedimento (TYAGI *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2010; ARAUJO *et al.*, 2011; BIRK *et al.*, 2012; SOJINU *et al.*, 2012; GRILO *et al.*, 2013; FRENA *et al.*, 2016). Ainda que a quantificação de marcadores químicos seja mais trabalhosa e custosa, esses compostos possuem alta especificidade quanto à fonte de contaminação e persistem no ambiente por mais tempo quando comparados a bactérias. Quando a matéria fecal é introduzida em ambientes aquáticos, compostos lipofílicos, como esteroides, interagem fortemente com a matéria particulada, limitando significativamente a degradação destes compostos.

Os esteroides são um grupo de lipídios cujos membros afetam uma grande matriz de funções celulares. Estes compostos possuem sua estrutura baseada na fusão de três anéis de 6 membros e um de 5 membros como mostra a Figura 1.

Figura 1. Estrutura básica dos esteroides. Fonte: elaborado pela autora.



Fazem parte desta família, dentre outros:

- Esteróis, que apresentam grupo hidroxil em C₃ da cadeia alifática, e uma cadeia alifática ramificada lateral ligada ao C₁₇ no anel de 5 membros;

- Estenóis, que são esteróis insaturados no carbono C₅, como por exemplo, o Colesterol (colest-5-en-3β-ol) e também em alguns casos no carbono C₂₂, como por exemplo o estigmasterol (24β-colestadien-5,22-dien-3β-ol);

- Estanóis, que são produto de reações de hidrogenação dos estenóis, promovidas por bactérias;

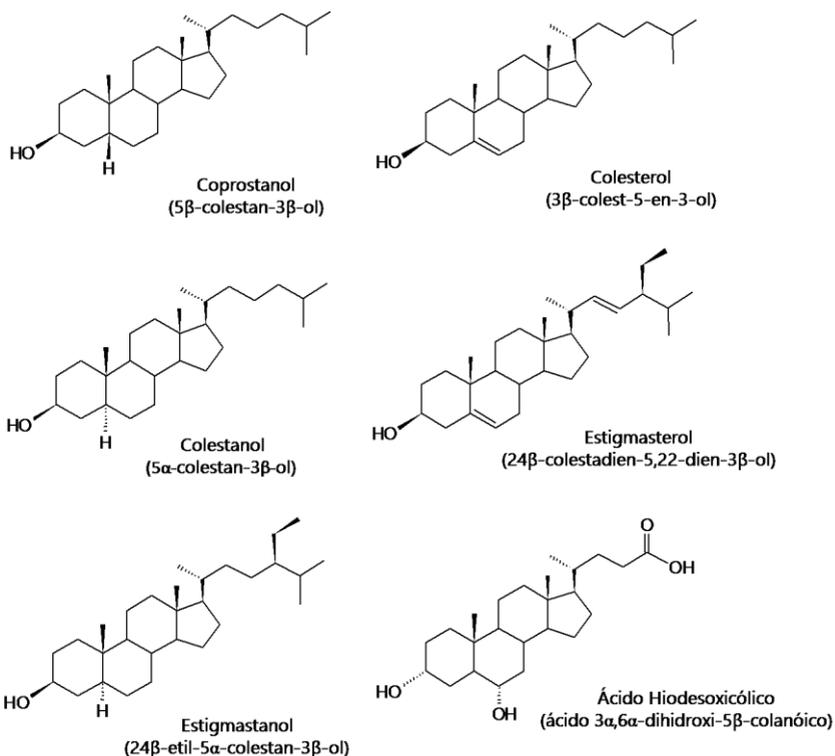
- Estanonas, onde se encontra o grupo cetona em C₃ ao invés do grupo hidroxil;

- Ácidos biliares, sintetizados pelo fígado, derivados do colesterol, apresentam grupos hidroxil ligados em variadas posições, C₆, C₇, C₁₂ em diversas combinações, e também contém grupo carboxil ligado a extremidade da cadeia lateral ramificada em C₁₇;

Compostos pertencentes aos grupos esteróis, estenóis, estanóis e estanonas, são encontrados em animais, plantas, algas e fungos. Ácidos biliares são encontrados predominantemente em mamíferos e outros vertebrados (ENGEL e MACKO, 1993; MARTINS, 2001; MONTE *et al.*, 2009; HOFMANN *et al.*, 2010; TAVERNA, 2011).

Os esteroides considerados neste trabalho: coprostanol, colesterol, colestanol, estigmasterol, estigmastanol e ácido hiodesoxicólico, foram selecionados devido à especificidade de suas origens e devido à disponibilidade para estudo. Suas respectivas representações estruturais estão ilustradas na Figura 2.

Figura 2. Representação estrutural dos esteroides: Coprostanol, Colesterol, Colestanol, Etigmasterol, Estigmastanol e Ácido hiodesoxicólico. Fonte: Elaborado pela autora.



O coprostanol é um dos mais empregados biomarcadores de poluição fecal derivada de humanos devido à grande quantidade presente no trato digestivo (40-60% entre os esteróis totais), por ser produzido exclusivamente por humanos e outros animais de grande porte, e também devido à característica de persistir no meio ambiente, comuns aos esteroides. Como este biomarcador também apresenta elevada concentração na matéria fecal de porcos, cavalos e outros animais, tornou-se necessário o desenvolvimento de associações e razões estatísticas para

obtenção de metodologias de rastreamento de contaminação fecal humana confiáveis. Como por exemplo, a razão coprostanol/(coprostanol + colestanol), desenvolvida por Grimalt e outros pesquisadores em 1990, ou então, a razão (coprostanol+epicoprostanol)/(coprostanol+epicoprostanol+colestanol) desenvolvida por Bull e outros pesquisadores em 1999 (GRIMALT *et al.*, 1990; BULL *et al.*, 1999; BULL *et al.*, 2003; TYAGI *et al.*, 2008; LYONS *et al.*, 2015).

O colesterol é um esteroide de ampla ocorrência em nosso ecossistema. Sua presença no solo e corpos d'água pode ser decorrente de fontes naturais e antropogênicas. E como se encontra presente nas fezes de diversos animais em diferentes concentrações, também se emprega este biomarcador associado a outros esteroides, como na razão coprostanol/colesterol reportada por Grimalt *et al.*, em avaliações de contaminação por esgoto doméstico (GRIMALT *et al.*, 1990; TAVERNA, 2011).

O colestanol, derivado da hidrogenação do colesterol, ocorre em concentrações bem menores que seu precursor. Ainda assim, é utilizado em avaliações de perfis esteroidais de amostras de fezes e em associações como já mencionado anteriormente (BATTA *et al.*, 1988; SHAH *et al.*, 2007; TYAGI *et al.*, 2008; LYONS *et al.*, 2015).

O estigmasterol encontra-se amplamente distribuído em plantas, assim está presente nas dietas da maioria dos animais. Muitos trabalhos incorporam este esteroide à pesquisa, frequentemente atribuindo a sua ocorrência nas amostras à presença de plantas superiores, apesar de serem reportadas quantidades significativas nos dejetos de porcos, cavalos, vacas e galinhas (ENEROTH *et al.*, 1965; IBAÑEZ *et al.*, 2000; TYAGI *et al.*, 2008).

O estigmastanol é o principal esteroide encontrado nos dejetos de mamíferos herbívoros, sendo produto da redução de sitosterol no rúmen em alguns animais. Em estudos avaliando a presença de esteroides em diferentes animais, destaca-se a grande quantidade de estigmastanol presente nos dejetos de

porcos, podendo assim sua presença em elevadas quantidades ser considerada uma importante indicação auxiliar da contaminação fecal do ambiente por esta espécie (EVERSHED *et al.*, 1997; BULL *et al.*, 1999; TYAGI *et al.*, 2008).

O ácido hiodesoxicólico é um ácido biliar secundário, produto metabólico da ação de bactérias intestinais. Na literatura referente a marcadores fecais, este esteroide se destaca devido a sua presença, e em grandes quantidades, quase que exclusiva em dejetos de porcos. Permitindo assim, uma distinção clara de dejetos de diferentes animais, ou então da presença deste tipo de contaminação em amostras ambientais (MONTE *et al.*, 2009).

Por meio da avaliação destes compostos em amostras de sedimento, é possível inferir quanto à presença de contaminação fecal de maneira generalizada, assim como buscar a determinação da contaminação fecal de esgoto doméstico e da produção de porcos, visto que esta espécie animal apresenta a maior discrepância nas concentrações e ocorrência destes esteroides quando comparada a outras espécies (BULL *et al.*, 1999; SHAH *et al.*, 2007; TYAGI *et al.*, 2008).

1.3 PREPARO DE AMOSTRA E ADAPTAÇÕES PARA DETERMINAÇÃO DE ESTEROIDES

Em todos os setores da indústria, áreas de pesquisa e educação dentro da química, nos últimos 30 anos, observa-se o crescimento da busca e emprego de práticas ambientalmente amigáveis. As práticas empregadas no ambiente de pesquisa não se comparam, em termos de magnitude, ao impacto ambiental gerado pela indústria, no entanto, em teoria, grande parcela de metodologias e procedimentos submetidos à pesquisa tende a ser posteriormente aplicada, muitas vezes, em larga escala. Ainda assim, a geração de resíduos não deve ser incentivada, independentemente de sua extensão.

O preparo de amostra está compreendido dentro das diversas etapas de um procedimento analítico e é considerada

umas das etapas críticas na obtenção de resultados. No entanto, possui um grande potencial de consumo de solventes, reagentes e geração de resíduos.

Os procedimentos de preparo de amostra incluem extração, remoção de interferentes e/ou limpeza e derivatização. Estas etapas envolvem fatores como massa de amostra, pH, volume e natureza do solventes extrator e/ou derivatizante, tempo de extração, entre outros que devem ser avaliados em função dos diferentes compostos de interesse, técnicas e equipamentos envolvidos em uma metodologia de análise. Isto tendo em vista que os custos financeiros, operacionais e ecológicos, o uso de insumos e equipamentos, além da disponibilidade e facilidade de manuseio dos mesmos, são aspectos orientadores de uma pesquisa (LANÇAS, 2003; FUMES *et al.*, 2015; POOLE e LENCA, 2015).

1.3.1 Métodos de extração para determinação de esteroides

Para a determinação de esteroides em amostras de sedimentos encontram-se, como duas partes fundamentais, o tratamento e o preparo de amostra e a análise por cromatografia a gás (GC) ou cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). Na literatura científica, não há um consenso claramente definido de procedimentos que devem ser empregados. Geralmente, a extração de lipídios totais é obtida por *soxhlet* (ELHMMALI *et al.*, 1997; IBANEZ *et al.*, 2000; SHAH *et al.*, 2007; MARTINS *et al.*, 2010; BIRK *et al.*, 2012) ou em banho de ultrassom (EVERSHED *et al.*, 1997; ISOBE *et al.*, 2002; TYAGI *et al.*, 2008; FRENA *et al.*, 2016).

A extração por *soxhlet* requer um equipamento específico e o processo demanda de 12 a 24 horas. A amostra, em quantidades relativamente grandes (5 a 25 g), é inserida dentro do equipamento de extração, e extraída mediante uma destilação cíclica de misturas de solventes orgânicos, usualmente misturas envolvendo diclorometano e metanol. Por outro lado, extrações

por ultrassom costumam empregar quantidades menores de amostras (até 5g) e de volume de solventes em misturas similares à extração por *soxhlet*. O tempo de extração em ultrassom também é significativamente menor, de 10 a 45 min (SANEZ *et al.*, 2014).

Posteriormente a procedimentos de extração, amostras são frequentemente submetidas a uma saponificação e dois tipos de fracionamento/purificação. No primeiro fracionamento são extraídos compostos neutros, onde são obtidos os esteróis, estenóis e estanóis. O extrato que permanece após o primeiro fracionamento é acidificado para a extração dos ácidos biliares e, posteriormente, esterificado. Em seguida, ambos os extratos finais, já isolados, são submetidos à reação de silanização, antes da análise.

Estes procedimentos de extração, principalmente a extração por *soxhlet*, e subseqüentes etapas de fracionamento, muitas vezes acabam produzindo significativos volumes de resíduos orgânicos prejudiciais à saúde do analista e também ao ambiente, decorrente de grandes quantidades de amostras e devido à complexidade das substâncias empregadas. O consumo, nestes procedimentos, pode alcançar de 100 a 400 mL de solventes orgânicos, como hexano, acetona, clorofórmio, metanol e éter de petróleo, para cada amostra, em investigações que podem chegar a avaliar de 3 a 30 amostras (IBANEZ *et al.*, 2000; BULL *et al.*, 2003; CORDEIRO, 2006; SHAH *et al.*, 2007; TYAGI *et al.*, 2008; FROEHNER *et al.*, 2009; MARTINS *et al.*, 2010; BATAGLION, 2012; BIRK *et al.*, 2012; LYONS *et al.*, 2015).

Em vista de procedimentos onerosos e vinculados à degradação ambiental, frequentemente reportados na literatura, diversos pesquisadores se comprometeram à investigação de métodos alternativos. Como exemplo, destaca-se o trabalho de Nguyen *et al.* (1995) sobre a determinação de esteróis por extração com fluido supercrítico. Empregou-se como solvente extrator o CO₂, uma substância não tóxica, não inflamável e de baixo custo, que sob condições de pressão e temperaturas críticas

se mostra adequado para extração de compostos hidrofóbicos e levemente hidrofílicos. Neste contexto, incluem-se os esteróis de interesse avaliados pelos autores, visto que se obtiveram valores de recuperação de esteróis totais equivalente aos valores obtidos através da metodologia recomendada (EPA 3550) pela Agência de proteção ambiental americana (*American Environmental Protection Agency - U.S.EPA*).

A determinação de esteroides também foi investigada por extração em fase sólida (*Solid phase extraction – SPE*) por WU *et al.* (2009), técnica que reduz significativamente o volume de solventes empregados, e que conferiu resultados de recuperação elevados, na faixa de 83 a 97%. Outro exemplo encontrado na literatura é a substituição de solventes orgânicos, como os citados anteriormente, pela utilização de etanol em procedimentos de extração em *soxhlet*. O etanol é um solvente de baixo custo, baixa toxicidade e requer procedimentos de descarte e tratamento menos complexos. No trabalho reportado por, Kawakami e Montone (2002), testes de extração de esteroides em *soxhlet* empregando diferentes solventes apontaram a utilização de etanol como a alternativa mais adequada, conferindo valores de recuperação de 70 a 93%. Em vista de resultados satisfatórios descritos por Kawakami e Montone (2002), empregou-se com sucesso o solvente etanol para extração (em *soxhlet*) e determinação de esteroides de amostras de sedimento de um ambiente estuarino no sul do Brasil e na Baía de Santos em São Paulo (MARTINS *et al.*, 2008 e ABREU-MOTA *et al.*, 2014).

Neste contexto norteou-se o desenvolvimento deste trabalho: a investigação da extração de esteroides em amostras de sedimento utilizando o etanol. Ainda, buscou-se a utilização da técnica de extração por ultrassom, com objetivo de se empregar menor volume de solventes e resíduos e menor tempo de trabalho.

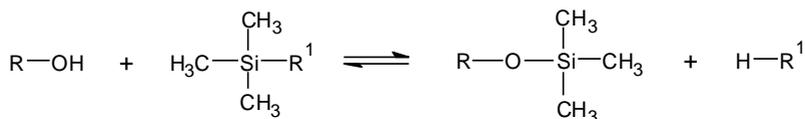
1.3.2 Métodos de derivatização para determinação de esteroides

Também podemos observar potenciais alterações e adaptações em outras etapas de preparo de amostras, como nas reações de derivatização.

Como os esteroides possuem baixa volatilidade, a derivatização destes compostos é uma etapa importante de metodologias de análise que empregam a técnica de GC. Diferentes reações de derivatização são atualmente empregadas com objetivo de aumentar a volatilidade e/ou estabilidade térmica, como reações de alquilação, acilação e outras, destacando-se a reação de silanização, método de derivatização mais versátil e comumente empregado para esteroides (COLLINS *et al.*, 2006).

Neste tipo de reação, em álcoois e fenóis, ocorre substituição nucleofílica de segunda ordem, onde o oxigênio do grupo hidroxil ataca o átomo de silício do grupo alquilsilil menos impedido do agente derivatizante, como representado no esquema 1. São variados os agentes derivatizantes que promovem este tipo de reação, entre eles os mais empregados são trimetilclorosilano (TMCS), bis(trimetilsilil)acetamida (BSA), N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA), N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (MSTFA), além do uso de misturas entre estes reagentes ou adição de catalisadores (ORATA, 2012; FARAJZADEH *et al.*, 2014; PINTO, 2015).

Esquema 1. Representação genérica da reação de derivatização de um álcool ou fenol através da formação de produto derivado acrescido de um grupo trimetilsilil. Fonte: Elaborado pela autora.



Derivados trimetilsilil de esteroides são mais frequentemente formados através de procedimento de derivatização em estufa, submetidos a temperaturas de 60 a 70 °C por período de tempo de 60 a 90 min (ELHMMALI *et al.*, 1997; TYAGI *et al.*, 2008; BIRK *et al.*, 2012; BIACHE e PHILP, 2013; ABREU-MOTA *et al.*, 2014; SANEZ *et al.*, 2014). O tempo de reação prolongado e algumas etapas de secagem de reagentes em excesso deste procedimento o tornam tedioso e maçante. Assim, estimula-se a busca de procedimentos de reações de derivatização que diminuam o tempo, o volume de reagentes entre outros fatores, agregando vantagens às metodologias de análise como um todo. Enquadra-se neste cenário, vinculado à análise de esteroides fecais, um método de derivatização associado à extração em uma única etapa proposto por Nguyen *et al.* (1995), discutido anteriormente por promover extração diferenciada com fluido supercrítico. Destaca-se também a metodologia de derivatização em injetor reportada por WU *et al.* (2009), garantindo alta eficiência da derivatização dos esteroides em um procedimento simples e rápido.

1.3.2.1 Derivatização em injetor

A derivatização em injetor (*Injection port-derivatization - IPD*), ou como também é chamada, derivatização *on-line*, remete à metodologia de reação de derivatização que ocorre dentro do *liner* de injeção de um cromatógrafo gasoso sob altas temperaturas. Comparada com outras técnicas de derivatização, a

IPD traz vantagens ao preparo de amostra devido à simplicidade do procedimento. A injeção da amostra e agente(s) derivatizante(s), misturados ou separadamente, diretamente no GC, dispensam a necessidade de estufas, banhos ou outros equipamentos térmicos para completar esta etapa de derivatização, diminuindo não só o tempo de reação, que devido a altas temperaturas ocorre em segundos, mas também diminui o tempo de exposição dos reagentes ao entorno. A mínima exposição dos reagentes neste procedimento é vantajosa, uma vez que agentes derivatizantes como os citados anteriormente, são extremamente sensíveis à umidade, o que frequentemente provoca resultados com baixa repetibilidade, por exigir um controle rigoroso no manuseio dos mesmos. Além de reações de silanização, este método de derivatização também foi empregado com bons desempenhos em reações de alquilação, acilação, entre outras (LIU *et al.*, 2002; BASHEER e LEE, 2004; LIN, *et al.*, 2005; TZING *et al.*, 2006; HSU e DING, 2009; WU *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2013).

Os parâmetros que influenciam a eficiência de derivatização neste método variam de acordo com o modo de injeção utilizado. Em GC encontramos os modos de injeção *split/splitless*, a frio direto na coluna, de vaporização com temperatura programada, de grande volume, assim como suas combinações. No modo de injeção *split/splitless*, as variáveis que devem ser avaliadas são temperatura do injetor, tempo *purge-off* ou tempo de *splitless* e quantidade de reagente derivatizante (COLLINS *et al.*, 2006; WU e LEE, 2006; WU *et al.*, 2009).

A temperatura do injetor deve ser suficiente para assegurar que a reação de derivatização do analito de interesse ocorra de maneira eficiente e rápida. Levando em consideração que baixas temperaturas podem promover reações incompletas e temperaturas muito altas apresentam possibilidade de provocar reações paralelas ou degradação dos derivados, entre outros efeitos (WU e LEE, 2006; WU *et al.*, 2009).

O tempo de *splitless*, em qualquer análise, deve ser longo o suficiente para introduzir uma grande quantidade dos analitos à coluna, principalmente quando se trata de amostras de baixa concentração. No entanto, não se aconselha prolongar esse tempo, a fim de evitar a formação de cauda do solvente, fenômeno que pode interferir na visualização de picos de compostos que são eluídos em poucos minutos. Com estas observações, é de se esperar que as avaliações do tempo de *splitless* na eficiência de reações reportadas na literatura apresentem um aumento do sinal analítico decorrente do aumento do tempo até um máximo de resposta, sem grandes diferenças após este ponto. (WU e LEE, 2006; WU *et al.*, 2009; ELIE *et al.*, 2012; LIU, W. *et al.*, 2012).

A quantidade de reagente derivatizante também é uma variável importante deste método. A prática de se utilizar agente derivatizante em excesso é frequentemente empregada em diferentes métodos de derivatização, assim como em IPD. Mas, como foram reportados alguns casos em que quantidades excessivas de reagente reduziram a eficiência de derivatização e quantidades insuficientes podem levar a reações incompletas, torna-se indispensável o desenvolvimento de estudos de otimização desta variável (BASHEER *et al.*, 2005 e TOLEDANO *et al.*, 2012).

1.4 QUIMIOMETRIA

Estudos quimiométricos podem ser definidos pelo uso de técnicas estatísticas e matemáticas para extração de informações relevantes de experimentos e/ou padrões relacionados à química. O planejamento e otimização de experimentos, reconhecimento de padrões, processamento de sinais analíticos e calibração multivariada são algumas das áreas em que se divide a quimiometria (FERREIRA *et al.*, 1999; NETO *et al.*, 2006).

Principalmente na área de química analítica, a aquisição de dados aliada ao crescimento do interfaceamento de

instrumentos a computadores se tornou uma tarefa muitas vezes complexa e variada. Dentro deste contexto observa-se o aumento de desenvolvimento de métodos e tratamentos de dados aliados a ferramentas quimiométricas. Estas ferramentas dentro da quimiometria permitem, por exemplo, otimizações simultâneas de variáveis metodológicas, resultando na extração máxima de informações realmente relevantes, em números mínimos de experimentos. A eficácia de otimizações multivariadas, além da economia de reagentes e do menor tempo de trabalho em laboratório, também reside na possibilidade de observar a influencia que interações entre variáveis exercem nas respostas analíticas (FERREIRA *et al.*, 1999).

Para o planejamento de experimentos quimiométricos deve-se estabelecer alguns critérios:

- Os fatores que o analista tem condições e interesse de controlar, qualitativos ou quantitativos;
- O domínio experimental, através da definição dos níveis de alteração dos ensaios, valores quantitativos máximos, mínimos, e/ou centrais e intermediários, ou a presença/ausência qualitativa de algum fator;
- A execução de experimentos de forma aleatória, para impedir que desvios atípicos sejam obrigatoriamente associados a determinadas combinações de níveis.

Segundo Bezerra *et al.* (2008), entre as técnicas multivariadas usadas em otimização analítica, destaca-se a metodologia de superfície de resposta (*Response surface methodology – RSM*). A RSM baseia-se na construção de modelos empíricos que geralmente empregam funções polinomiais lineares ou quadráticas para descrever o comportamento de um determinado conjunto de dados, proporcionando a indicação da melhor região de desempenho do domínio experimental estudado, através da obtenção e avaliação de uma superfície de resposta.

O planejamento composto central (*Central composite design – CCD*) destaca-se entre os diversos tipos de planejamentos multivariados, juntamente com planejamentos Doehlert e Box-Benken (NETO *et al.*, 2001; FERREIRA *et al.*, 2004; BEZERRA *et al.*, 2008; LARA, 2008).

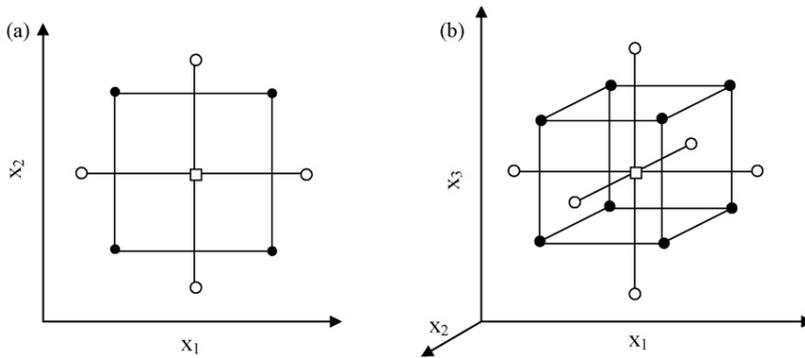
1.4.1 Planejamento composto central (*Central composite design – CCD*)

Em geral, um planejamento composto central para determinado número de fatores (k), devidamente codificados como (x_1, x_2, \dots, x_k) , apresenta as seguintes características:

- Número de experimentos de acordo com a equação $N = k^2 + 2k + c_p$, onde c_p = representa o número de replicatas no ponto central;
- Todos os fatores são estudados em cinco níveis $(-\alpha, -1, 0, +1, +\alpha)$;
- Uma parte chamada fatorial contendo pontos de coordenadas $x_i = -1$ ou $x_i = +1$, $i = 1, 2, \dots, k$;
- Uma parte axial, ou em estrela, formada por pontos com as coordenadas de valor α ou $-\alpha$. Para duas, três e quatro variáveis, os valores de α são respectivamente: 1,41; 1,68 e 2,00;
- Um total de ensaios no ponto central, c_p , onde $x_1, x_2, \dots, x_k = 0$ (TEÓFILO e FERREIRA, 2006; BEZERRA *et al.*, 2008).

A Figura 3 ilustra a representação gráfica de planejamentos composto central para duas e três variáveis.

Figura 3. Representação gráfica de planejamentos compostos centrais de (a) duas variáveis ($\alpha=1,41$) e (b) três variáveis ($\alpha=1,68$). (●) pontos do planejamento fatorial, (○) pontos axiais e (□) ponto central (BEZERRA *et al.*, 2008).



Através da definição dos fatores que serão considerados, do número de replicatas no ponto central e distribuição de um determinado domínio experimental de cada variável nos cinco níveis são obtidas matrizes de planejamento como apresentadas na Tabela 1, para 2 e 3 variáveis.

Tabela 1. Matrizes de planejamentos compostos centrais com duas e três variáveis. Adaptado de TEÓFILO e FERREIRA (2006).

Planejamento CCD – 2 variáveis			Planejamento CCD – 3 variáveis			
X1	X2		X1	X2	X3	
-1	-1	Planejamento fatorial	-1	-1	-1	Planejamento fatorial
1	-1		1	-1	-1	
-1	1		-1	1	-1	
1	1		1	1	-1	
0	0	Ponto central	-1	-1	1	
$-\alpha$	0	Pontos axiais	1	-1	1	Ponto central
α	0		-1	1	1	
0	$-\alpha$		1	1	1	
0	α		0	0	0	
			$-\alpha$	0	0	Pontos axiais
			α	0	0	
			0	$-\alpha$	0	
			0	α	0	
			0	0	$-\alpha$	
			0	0	α	

Na área de química analítica, que abrange uma série de técnicas de análise, como técnicas voltamétricas, cromatográficas, espectrofotométricas, eletroforéticas e outras, o uso de planejamentos multivariados é bastante apreciado e considerado uma importante ferramenta estatística para avaliação e investigação de metodologias e processamento de dados (ZOU *et al.*, 2007; FANG *et al.*, 2014; GHOREISHI *et al.*, 2015; TRINDADE *et al.*, 2015; VANINI *et al.*, 2015).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver uma metodologia analítica para a quantificação de diferentes esteroides em amostras de sedimentos com o uso da técnica de GC/FID e GC-MS.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver metodologia analítica, com alterações e adaptações econômicas e ambientalmente amigáveis em etapas de preparo de amostras, para a determinação simultânea dos compostos: coprostanol, colesterol, colestanol, estigmasterol, estigmastanol, e éster metílico do ácido hiodesoxicólico;
- Otimizar variáveis dos procedimentos de extração e derivatização dos analitos por meio de ferramentas quimiométricas;
- Avaliar o desempenho da metodologia analítica proposta por meio da determinação dos principais parâmetros analíticos de mérito (faixa linear, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão) com o emprego as condições otimizadas;
- Avaliar a estabilidade do meio reacional da derivatização;

3 MATERIAS E MÉTODOS

3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Padrões sólidos dos esteroides coprostanol, estigmastanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), colesterol, colestanol, estigmasterol (Spectrum, New Brunswick, New Jersey, USA), do éster metílico do ácido hiodesoxicólico (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), padrão interno 5 α -colestano e padrão de recuperação androstanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) solubilizados em diclorometano (Tedia, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) foram utilizados para a comparação entre procedimentos de derivatização, nas otimizações de extração e derivatização, curvas analíticas, fortificação nos ensaios de recuperação e estudo de estabilidade do meio reacional da derivatização. Devido à falta de disponibilidade de compra do padrão do ácido hiodesoxicólico, optou-se pela compra de seu derivado esterificado. A esterificação deste ácido seria mais uma das etapas do preparo de amostra, comumente executada em amostras onde se busca determinar ácidos biliares (SANEZ *et al.*, 2014).

As amostras de sedimentos superficiais, coletadas no estuário do rio Itajaí-Açu, foram empregadas para o desenvolvimento da metodologia proposta neste trabalho devido à disponibilidade das mesmas em laboratório. Para verificar a ausência de interferentes nas amostras, estas foram submetidas a um branco de análise.

Hexano, diclorometano, ambos grau UV/HPLC (Tedia, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), acetonitrila e acetona grau UV/HPLC (Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) foram utilizados no procedimento de seleção do solvente orgânico do meio reacional da derivatização.

Metanol e diclorometano grau UV/HPLC (Tedia, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) foram utilizados no procedimento de limpeza das amostras de sedimentos empregados nos ensaios de recuperação por fortificação de matriz.

Etanol grau UV/HPLC (Panreac, Castellar Del Vallès, Cataluña, Espanha), alumina (Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), sulfato de sódio (Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e lâ de vidro (Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) foram utilizados na otimização do procedimento de extração.

N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) 99% (Supelco, Bellefonte, PA, USA) e trimetilclorosilano (TMCS) 99% (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) foram utilizados como agente derivatizante e catalisador de reação, respectivamente, nas reações de derivatização.

Gás nitrogênio pureza 99,996 % (White Martins, Brasil) foi utilizado para secagem de solvente quando necessário.

3.2 LIMPEZA DE UTENSÍLIOS DE LABORATÓRIO

Para limpeza de vidrarias utilizadas em todas as etapas deste trabalho, foi empregada lavagem com água corrente e solução 5% (v/v) de Extran (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil). Em seguida, havendo necessidade, foram deixadas em repouso mergulhadas em solução de Extran a 5%(v/v) por pelo menos 24 h em recipiente fechado e posteriormente enxaguadas com água desionizada. Para remoção de resíduos orgânicos, vidrarias, folhas de alumínio e outros utensílios, com exceção de vidraria volumétrica, foram calcinados em mufla Quimis (modelo Q.318.24 - Diadema, SP, Brasil) a 400 °C durante 4 h. Após estas etapas de limpeza, os utensílios foram armazenados em local apropriado e manuseados apenas com o uso de luvas de polietileno.

3.3 INSTRUMENTAÇÃO

As amostras de sedimento foram liofilizadas utilizando o liofilizador Edwards Micromodulyo15k acoplado à bomba de vácuo Edwards modelo E2M2 (São Paulo, SP, Brasil), e peneiradas após a liofilização em malha de 250 µm.

Para as medições de massa utilizou-se a balança analítica Bel Engineering Mark modelo 210A (Piracicaba, SP, Brasil) (precisão $\pm 0,0005$ g).

Os equipamentos utilizados no procedimento de extração das amostras de sedimento foram: ultrassom Unique modelo USC 1450 (25 kHz)(Indaiatuba, SP, Brasil), agitador de tubos tipo vortex Phoenix modelo AP56 (Araraquara, SP, Brasil), centrífuga Fanem – Excelsa Baby II -206R (São Paulo, SP, Brasil) e rotaevaporador Fisaton modelo 802 com banho termostatizado 550D (1200W) (São Paulo, SP, Brasil) e bomba de vácuo modelo Scrubber TE-152.

As análises de experimentos iniciais, experimentos de otimização de extração e derivatização, e estudo da estabilidade do meio reacional da reação de derivatização foram realizadas em um cromatógrafo a gás modelo GC 2014 (Shimadzu, Kyoto, Japão), equipado com detector FID e injetor *split/splitless*, utilizando o *software* GC Solution para aquisição e tratamento dos dados. Como gás de arraste empregou-se gás hidrogênio ultra puro (99,995%) em fluxo de 1 mL min^{-1} . A temperatura do injetor e o tempo de *splitless* foram objetos de estudo otimizados neste trabalho. Usou-se razão de *split* de 1:20, após determinado tempo de *splitless* e fixou-se a temperatura do detector em $300 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

A construção das curvas de calibração dos analitos, e análise dos ensaios de recuperação por fortificação de matriz, foram realizadas em um cromatógrafo a gás modelo Clarus 680 (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) acoplado a um espectrômetro de massas modelo Clarus SQ 8 S (PerkinElmer, Waltham, MA, USA), utilizando o *software* TurboMass versão 6.1 para aquisição e tratamento dos dados. Como gás de arraste empregou-se gás Hélio ultra puro (99,995%) em fluxo de 1 mL min^{-1} . A temperatura do injetor e o tempo de *splitless* foram otimizados neste trabalho. Usou-se razão de *split* de 1:20, após determinado tempo de *splitless*. As temperaturas da linha de transferência e da fonte de íons foram de 300 e $250 \text{ }^{\circ}\text{C}$, respectivamente.

Em ambos os cromatógrafos, foram realizadas injeções manuais de 1 μL e a separação dos analitos foi sucedida em coluna capilar DB-5MS (30m x 0,25 mm x 0,25 μm) composta de 95% de polidimetilsiloxano e 5% de fenila (Agilent J&W GC Columns, Santa Clara, CA, USA). O programa de temperatura do forno iniciou em 100 $^{\circ}\text{C}$, mantendo programação em isoterma por 2 min. Em seguida, estabelecida uma taxa de aquecimento de 20 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até atingir 280 $^{\circ}\text{C}$, mantida em isoterma por 2 min e alterada a taxa de aquecimento para 1 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até finalmente atingir 300 $^{\circ}\text{C}$, temperatura que foi mantida por mais 2 min.

Deve-se destacar que ao final de cada dia de uso dos cromatógrafos, eram retirados os *liners* de injeção para limpeza, usando algodão, diclorometano e/ou hexano e posteriormente banho de ultrassom, garantindo melhor desempenho do equipamento, principalmente em relação às reações de derivatização no injetor.

3.4 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS ANALITOS

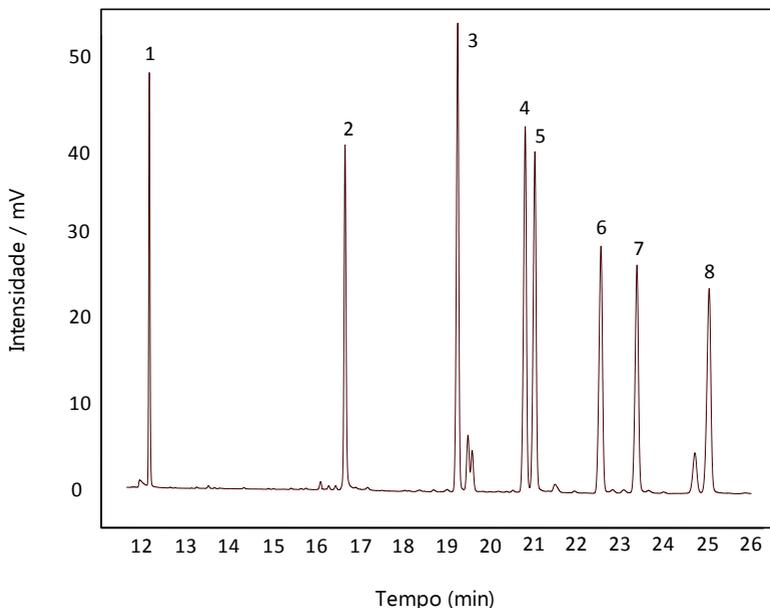
Em análises realizadas no sistema de cromatografia gasosa com detector por ionização em chama (*Gas Chromatography/Flame ionization detector – GC/FID*) os esteroides e padrão interno foram identificados com base nos seus respectivos tempos de retenção, através da injeção de soluções padrão dos analitos separadamente e também, posteriormente, em uma mistura, como apresentado na Figura 4. Para análises empregando o sistema de GC-MS a identificação dos compostos foi realizada com base nos seus respectivos tempos de retenção e através do monitoramento dos íons de fragmentação característicos e de maior abundância dos analitos. A quantificação dos analitos em ambos os sistemas foi realizada através da razão da área do pico cromatográfico dos analitos e área do pico cromatográfico do padrão interno. Os íons de quantificação e identificação dos esteroides, padrão de

recuperação e padrão interno, assim como os tempos de retenção dos mesmos, encontram-se descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Tempos de retenção, íons de identificação e quantificação dos seis esteroides, padrão de recuperação, androstanol e padrão interno, 5 α -colestano.

Analito	Tempo de retenção (min)	Íons de identificação (m/z)	Íon de quantificação (m/z)
Androstanol (5 α -androstan-3 β -ol)	12,2	243, 258, 333	333
Colestano (5 α -colestano)	16,6	217, 357, 372	217
Coprostanol (5 β -colestano-3 β -ol)	19,2	215, 355, 370, 460	370
Colesterol (3 β -colest-5-en-3-ol)	20,8	129, 329, 368, 458	129
Colestanol (5 α -colestano-3 β -ol)	21,0	215, 355, 445, 460	215
Ácido Hiodesoxicólico (ácido 3 α ,6 α - dihidroxi-5 β - colanólico)	22,6	255, 355, 370, 460	370
Estigmasterol (24 β -colestadien- 5,22-dien-3 β -ol)	23,5	129, 255, 394, 484	129
Estigmastanol (24 β -etil-5 α - colestano-3 β -ol)	25,0	215, 383, 473, 488	215

Figura 4. Cromatograma obtido por GC/FID dos compostos: padrão de recuperação, androstanol a $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ (1), padrão interno, 5α -colestano a $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ (2); coprostanol (3), colesterol (4), colestanol (5), éster metílico do ácido hiodesoxicólico (6), estigmasterol (7), estigmastanol (8) a $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ cada.



3.5 COMPARAÇÃO ENTRE PROCEDIMENTOS DE DERIVATIZAÇÃO

A eficiência da reação de derivatização foi testada por dois procedimentos, derivatização em estufa a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ e derivatização em injetor a $280 \text{ }^\circ\text{C}$.

O procedimento analítico da derivatização em estufa iniciou-se a partir da secagem de alíquotas de $180 \mu\text{L}$ de solução estoque de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de uma mistura dos seis esteroides sob fluxo de nitrogênio em frasco de vidro âmbar de 2 mL . Em seguida, adicionou-se $50 \mu\text{L}$ do agente derivatizante BSTFA:TMCS (99:1) e manteve-se o experimento em estufa a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ por 90 min . Após este período de tempo, secou-se o excesso de agente

derivatizante, novamente sob fluxo de nitrogênio, e foi adicionado 20 μL de solução de 5α -colestano $180 \mu\text{g mL}^{-1}$ como padrão interno e 280 μL de diclorometano com a finalidade de promover volume total de solução de 300 μL e, conseqüentemente, concentração de cada analito de $30 \mu\text{g mL}^{-1}$. Esta solução foi agitada em vortex por 10 segundos e 1 μL foi injetado no cromatógrafo.

O procedimento analítico da derivatização em injetor iniciou-se com a secagem de 180 μL de solução estoque dos analitos sob fluxo de nitrogênio em frasco de vidro âmbar de 2 mL. Em seguida, foi adicionado volume de 230 μL de diclorometano, 20 μL de uma solução estoque de 5α -colestano $180 \mu\text{g mL}^{-1}$ como padrão interno e 50 μL do agente derivatizante BSTFA:TMCS (99:1), totalizando volume final de solução sempre em 300 μL e concentração de cada analito de $30 \mu\text{g mL}^{-1}$. Esta solução foi então agitada em vortex por 10 segundos e 1 μL foi injetado no cromatógrafo.

As razões entre as áreas dos picos dos analitos e a área do pico do padrão interno foram empregadas para verificar as respostas cromatográficas.

3.6 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE DERIVATIZAÇÃO

3.6.1 Seleção da composição do meio reacional da derivatização

Quatro diferentes solventes orgânicos foram testados para avaliar a eficiência da reação de derivatização em injetor, são eles: diclorometano, hexano, acetonitrila e acetona.

Alíquotas de 180 μL de solução estoque dos analitos foram secas sob fluxo de nitrogênio em frasco de vidro âmbar de 2 mL. Em seguida, foi adicionado volume de 230 μL de solvente orgânico, 20 μL de uma solução estoque do padrão interno e 50 μL do agente derivatizante BSTFA:TMCS (99:1), totalizando volume final de solução sempre em 300 μL e concentração de

cada analito de $30 \mu\text{g mL}^{-1}$. Esta solução foi então agitada em vortex por 10 segundos e $1 \mu\text{L}$ foi injetado no cromatógrafo.

As médias das razões ($n=3$) entre as áreas dos picos dos analitos e a área do pico do padrão interno foram calculadas para verificar a melhor resposta cromatográfica.

3.6.2 Otimização multivariada para reação de derivatização

Um planejamento composto central de três variáveis foi usado para estudar o procedimento de derivatização em cinco níveis de magnitude para cada variável, totalizando 17 experimentos, sendo 3 destes replicatas do ponto central. Os experimentos foram realizados de forma aleatória. Foram estudadas as condições de temperatura do injetor (255; 265; 280; 295 e 305 °C), volume do agente derivatizante BSTFA:TMCS (99:1) (33; 40; 50; 60 e 67 μL) e tempo de *splitless* (0,6; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,4 min). A Tabela 3 apresenta as combinações entre os níveis estudados para cada variável e as replicatas do ponto central.

Tabela 3. Matriz do planejamento composto central para otimização das variáveis temperatura, volume de BSTFA:TMCS e tempo de *splitless* do procedimento de derivatização dos analitos.

Experimento	Temperatura (°C)	Volume BSTFA:TMCS (µL)	Tempo de <i>splitless</i> (min)
1	265	40	1,0
2	265	40	2,0
3	265	60	1,0
4	265	60	2,0
5	295	40	1,0
6	295	40	2,0
7	295	60	1,0
8	295	60	2,0
9	255	50	1,5
10	305	50	1,5
11	280	33	1,5
12	280	67	1,5
13	280	50	0,6
14	280	50	2,4
15	280	50	1,5
16	280	50	1,5
17	280	50	1,5

Em todos os experimentos foi executado procedimento analítico similar ao descrito no tópico anterior (3.5.1). O mesmo volume de solução estoque dos analitos, foram secos sob fluxo de nitrogênio em frasco de vidro âmbar de 2 mL e o mesmo volume de solução estoque de padrão interno foi empregado. Como se variou o volume de BSTFA:TMCS (99:1) nestes experimentos, corrigiu-se o volume de solvente orgânico adicionado com a finalidade de proporcionar volume final de solução de 300 µL. Assim, esta otimização foi realizada com soluções contendo 30 µg mL⁻¹ de cada analito. Em sequência, 1

μL de solução de cada experimento foi injetada no cromatógrafo para análise.

Com intenção de obter um resultado representativo de condição de compromisso para todos os analitos foi empregada a média geométrica das razões entre as áreas dos picos dos analitos e a área do pico do padrão interno para processamento dos dados no *software Statistica* 10.0 (StatSoft Inc., Tulsa, USA).

3.7 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO

Também foi empregada estratégia de otimização multivariada para a otimização do procedimento de extração com o planejamento composto central. Neste caso, duas variáveis foram avaliadas em cinco níveis, totalizando 10 experimentos, sendo dois destes replicatas do ponto central, que foram realizados de forma aleatória. Estudaram-se as variáveis tempo de ultrassom (10; 15; 30; 45 e 50 min) e volume do solvente extrator etanol (9; 12; 18; 24 e 27 mL). A Tabela 4 apresenta as combinações entre os níveis estudados para cada variável e as replicatas do ponto central.

Tabela 4. Matriz do planejamento composto central para otimização das variáveis tempo de ultrassom e volume de etanol do procedimento de extração dos analitos.

Experimento	Tempo de ultrassom (min)	Volume de etanol (mL)
1	15	12
2	15	24
3	45	12
4	45	24
5	10	18
6	50	18
7	30	9
8	30	27
9	30	18
10	30	18

O procedimento analítico destes ensaios foi realizado da seguinte maneira:

Pesou-se 1g de sedimento liofilizado em frascos de extração de 40 mL. Separaram-se dois ensaios para controle e assegurou-se a ausência de esteroides e outras substâncias potencialmente prejudiciais a visualização dos sinais de interesse nos cromatogramas. A outros 10 ensaios, alíquotas de solução estoque dos analitos foram adicionadas e estes foram deixados em repouso por 24 horas a temperatura ambiente. Este procedimento de extração foi realizado em triplicata. Em cada etapa foi transferida uma fração de 1/3 dos volumes de etanol estudados. Os ensaios foram agitados em vortex para homogeneização e submetidos a uma fração de 1/3 dos períodos de tempo de ultrassom estudados. Em seguida os ensaios foram centrifugados durante 15 minutos e o extrato sobrenadante foi transferido para um balão de fundo redondo de 250 mL com

auxílio de uma pipeta de Pasteur. Ao final das três etapas de extração, o extrato combinado foi concentrado a um volume de aproximadamente 2 mL em rotaevaporador e em seguida transferido a uma coluna de limpeza composta de 1g de alumina (5% desativada com água) e de aproximadamente 50 mg de sulfato de sódio (empacotamento realizado usando uma suspensão de alumina em etanol e adição de sulfato de sódio com auxílio de uma espátula), como ilustrado na Figura 5.

Figura 5. Imagem da coluna de limpeza, composta de alumina (5% desativada) e sulfato de sódio, empregada após os ensaios de extração. Fonte: elaborado pela autora.



O extrato concentrado foi eluído na coluna com 10 mL de etanol em balão de fundo redondo de 250 mL e o extrato obtido desta limpeza foi completamente seco em rotaevaporador. Para recuperação dos analitos foi adicionado pequeno volume, aproximadamente 1 mL, de diclorometano. Este volume foi então

transferido a um frasco de vidro âmbar de 2 mL e seco sob fluxo de nitrogênio. Em seguida foi realizado o procedimento para reação de derivatização em injetor, descrito previamente, utilizando as condições experimentais otimizadas. A concentração final de cada analito foi ajustada para $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $1 \mu\text{L}$ da solução final de cada ensaio foi injetada no cromatógrafo para análise.

Calculou-se a média geométrica das razões entre as áreas dos picos dos analitos e a área do pico do padrão interno para processamento dos dados no *software Statistica 10.0* (StatSoft Inc., Tulsa, USA).

3.8 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DA METODOLOGIA ANALÍTICA PROPOSTA

Depois de estabelecidas as melhores condições experimentais para quantificação dos esteroides, o desempenho da metodologia analítica proposta foi avaliado através da investigação dos principais parâmetros analíticos de mérito (faixa linear da resposta analítica, coeficiente de correlação, limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão).

Para construção de curvas de calibração foram preparadas soluções dos analitos (coprostanol, colesterol, colestanol, éster metílico do ácido hiodesoxicólico, estigmasterol e estigmastanol), nas concentrações de 20, 30, 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000 ng mL⁻¹. Em todas as soluções utilizou-se padrão interno 5α -colestano na concentração fixa de 250 ng mL^{-1} . Os limites de detecção e quantificação foram estimados através de parâmetros da equação da reta da curva de calibração e medidas do sinal analítico de brancos, ou seja, da linha base dos cromatogramas. Os limites de detecção foram estimados como $3s_b/m$ e os limites de quantificação como $10s_b/m$, onde s_b é o do desvio padrão de 6 medidas de branco e m o coeficiente angular da equação da reta de cada analito.

A precisão do método foi avaliada em ensaios inter-dia e intra-dia, ambos realizados em triplicata. Valores de desvio padrão relativo (*Relative standard deviation - RSD*) menores que 15% foram considerados aceitáveis (LEITE, 2002).

A exatidão do método foi avaliada por meio de testes de adição e recuperação dos analitos em matriz (sedimento). As respostas de recuperação dos analitos destes ensaios foram comparadas com as respostas da curva de calibração.

3.8.1 Testes de adição e recuperação em matriz e avaliação da precisão e exatidão do método

Para os testes de adição e recuperação mostrou-se necessária uma limpeza da matriz, uma vez que o sedimento apresentou sinais da presença de alguns esteroides. O procedimento de limpeza foi realizado em triplicata através da adição de 5 mL de diclorometano e 5 mL de metanol em 1 g de sedimento para cada um dos 12 ensaios realizados. As amostras de sedimento foram agitadas em vortex e submetidas a 10 minutos de ultrassom. O extrato sobrenadante gerado em cada replicata do procedimento foi descartado em local apropriado e os ensaios foram secos sob fluxo de nitrogênio e deixados descansar por 24 horas. Posteriormente foi realizada extração com etanol proposta neste trabalho para verificar a eficiência da limpeza. Uma vez confirmada a ausência de esteroides foram adicionadas alíquotas da solução estoque dos analitos e estes foram deixados em repouso por 24 horas sob refrigeração. Em seguida, foi realizado o procedimento de extração e derivatização proposto neste trabalho utilizando as condições experimentais otimizadas. As concentrações finais obtida para cada analito foram de 100, 500 e 1000 ng mL⁻¹ e 1 µL das soluções de cada ensaio foi injetada em cromatógrafo para análise. As médias das razões (n=3) entre as áreas dos picos dos analitos e a área do pico do padrão interno foram calculadas para verificar as respostas analíticas.

Para avaliar a precisão intra-dia do método, foram analisadas, em triplicata no mesmo dia, uma das replicatas de cada nível de concentração dos experimentos de adição e recuperação. E para a precisão inter-dia, os mesmos experimentos de cada nível de concentração foram analisados por três dias consecutivos, sendo que o preparo das soluções para a derivatização foi realizada no primeiro dia, e a mesma solução foi analisada nos dias subsequentes. Para ambas as avaliações, precisão intra-dia e inter-dia, foram calculadas as médias das razões ($n=3$) entre as áreas dos picos dos analitos e a área do pico do padrão interno para verificar as respostas analíticas.

3.9 ESTUDO DA ESTABILIDADE DO MEIO REACIONAL DA DERIVATIZAÇÃO

Para avaliar a estabilidade do meio reacional para reação de derivatização foram preparados dois ensaios em frascos de vidro âmbar de 2 mL empregando condições experimentais otimizadas do procedimento de derivatização já descrito anteriormente. Na sequência do preparo de ambos, foram injetados 1 μ L da solução em cromatógrafo. Um dos frascos de vidro âmbar foi mantido sob refrigeração, em freezer (aproximadamente -4 °C), e removido somente nos momentos de novas injeções, após 8, 24 e 32 h. O outro ensaio foi mantido em temperatura ambiente (aproximadamente 23 °C), e novas injeções foram realizadas após 8, 24, 32, 48 e 72 h. Para verificar as respostas analíticas foram calculadas as médias aritméticas das razões entre as áreas dos picos dos analitos e área do pico do padrão interno.

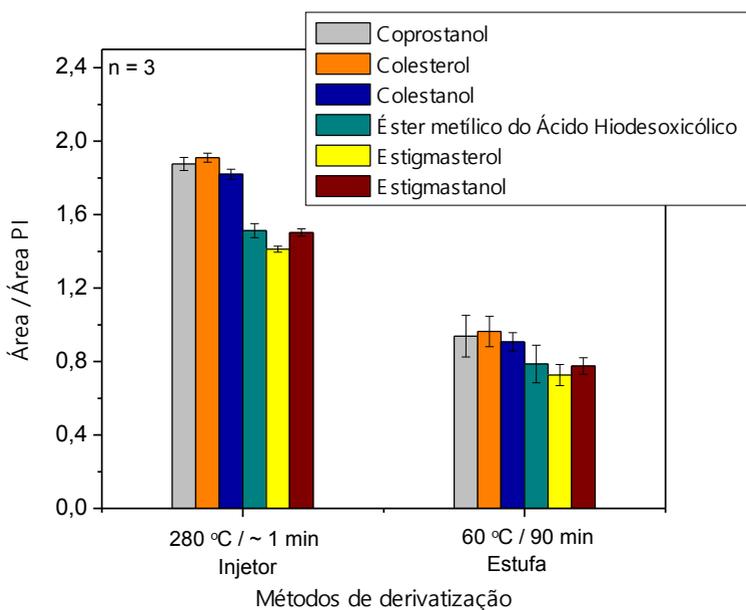
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 COMPARAÇÃO ENTRE PROCEDIMENTOS DE DERIVATIZAÇÃO

Com o objetivo de se empregar uma técnica de derivatização mais rápida e de maior eficiência, foram comparadas as metodologias de derivatização em injetor e derivatização em estufa, sendo este último, o método mais frequentemente adotado para derivatização de esteroides (ELHMMALI *et al.*, 1997; TYAGI *et al.*, 2008; BIRK *et al.*, 2012; BIACHE e PHILP, 2013; ABREU-MOTA *et al.*, 2014; SANEZ *et al.*, 2014). Em termos práticos, durante o desenvolvimento do trabalho, verificou-se que o método de derivatização em estufa apresenta maiores tendências a erros experimentais, visto uma maior dificuldade na reprodução dos resultados, sendo observados experimentos que resultaram em baixa qualidade de separação dos picos e, ocasionalmente, reações de derivatização incompletas, verificadas através da presença de picos característicos de esteroides não derivatizados no cromatograma. Os experimentos que apresentaram pobre separação dos picos tornaram inviável a medida quantitativa das respostas, resultando no descarte dos dados referentes aos mesmos. Na Figura 6 estão representados os resultados da comparação das razões entre as áreas dos picos de esteroides e área do pico do padrão interno das duas metodologias de derivatização, a partir de experimentos em que foi possível a separação dos analitos. As reações de derivatização em injetor ocorreram a 280 °C, e estimou-se o período de 1 minuto como o tempo máximo de reação através da observação dos picos do solvente e excesso de agente derivatizante no primeiro minuto dos cromatogramas. E as reações de derivatização em estufa foram submetidas temperatura de 60 °C por 90 min. As respostas analíticas da derivatização em injetor foram superiores quando comparadas com as respostas obtidas empregando a derivatização em estufa, evento que se deve a alta temperatura que os reagentes são

submetidos, uma vez que, provou-se a influência significativa da temperatura na reação de derivatização, como discutido no item 4.2.2. Em conclusão, as observações reunidas deste estudo, assim como a simplicidade e rapidez do procedimento, ratificaram a escolha da derivatização em injetor no desenvolvimento deste trabalho.

Figura 6. Eficiência da reação de derivatização em injetor e em estufa dos analitos: coprostanol, colesterol, colestanol, éster metílico do ácido hiodesoxicólico, estigmasterol e estigmastanol, em concentrações de $30 \mu\text{g mL}^{-1}$. Área PI = área do padrão interno 5α -colestano referente a $12 \mu\text{g mL}^{-1}$.



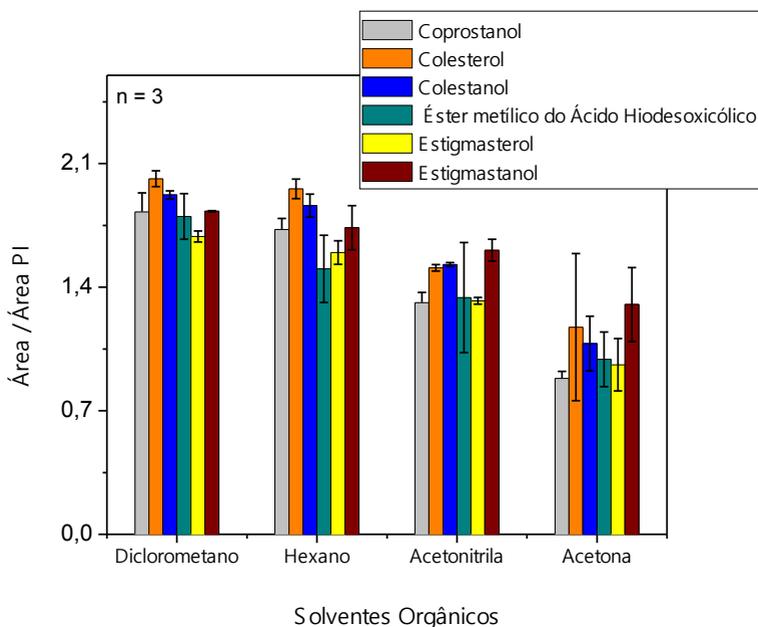
4.2 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE DERIVATIZAÇÃO EM INJETOR

A otimização das condições de derivatização dos analitos em injetor busca obter condições experimentais e instrumentais que ocasionem boa separação cromatográfica dos picos, maior rendimento dos analitos trimetilsilanizados empregando pequena quantidade de reagentes e adequada repetibilidade dos resultados.

4.2.1 Seleção da composição do meio reacional da derivatização em injetor

Na escolha do solvente do meio reacional da derivatização devem-se levar em consideração algumas características essenciais. O solvente empregado deve possuir alto poder de dissolução dos analitos de interesse e deve ser aprótico, ausente de hidrogênios ativos. (WU *et al.*, 2009). Desta maneira, foi testada a eficiência da reação de derivatização dos analitos em diclorometano, hexano, acetonitrila e acetona. Na Figura 7 podem ser observados os resultados obtidos do uso de cada solvente para os cinco esteroides e éster metílico do ácido biliar.

Figura 7. Efeito de diferentes solventes orgânicos como meio reacional da reação de derivatização na resposta analítica dos analitos: coprostanol, colesterol, colestanol, éster metílico do ácido hiodesoicólico, estigmasterol e estigmastanol, em concentrações de 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Área PI = área do padrão interno 5 α -colestano referente a 12 $\mu\text{g mL}^{-1}$.



O emprego dos solventes diclorometano e hexano resultaram nas maiores respostas analíticas e menores desvios padrão referentes à triplicata deste experimento. Por outro lado, o uso dos solventes acetonitrila e acetona resultaram inferior eficiência de derivatização e desvios significativos entre as respostas analíticas dos experimentos. Pode-se estimar que os grandes desvios relacionados ao uso dos solventes acetonitrila e acetona se devem a elevada polaridade dos mesmos (índices de polaridade: 5,8 e 5,1 respectivamente), que reflete em um baixo poder de dissolução dos esteroides, moléculas de polaridade

baixa. Quanto aos resultados obtidos com o uso dos solventes diclorometano e hexano (índices de polaridade: 3,1 e 0,0 respectivamente), a mesma linha de raciocínio mostra-se adequada por serem solventes menos polares. Ainda assim, através de observações visuais em laboratório e por meio destes resultados há uma inferior solubilidade do éster metílico do ácido hiodesoxicólico em hexano, desta maneira optou-se pelo uso do diclorometano como solvente do meio reacional da derivatização em estudos subsequentes.

4.2.2 Otimização multivariada para reação de derivatização em injetor

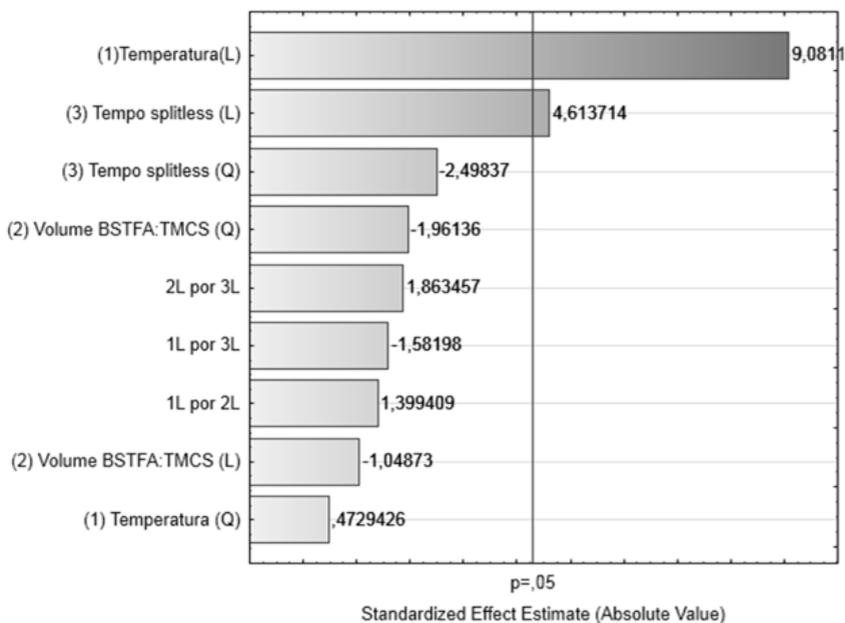
Para otimização de demais parâmetros do procedimento de derivatização dos analitos realizou-se um planejamento composto central em cinco níveis para três variáveis, são elas: temperatura do injetor (255 – 305 °C), volume do agente derivatizante BSTFA:TMCS (99:1) (33 – 67 mL) e tempo de *splitless* do programa de fluxo do cromatógrafo (0,6 – 2,4 minutos).

A partir do processamento dos resultados obtidos gerou-se o gráfico de Pareto, que permite verificar os efeitos das variáveis investigadas, assim como o efeito das interações entre elas. As variáveis ou interações que são significativas para o procedimento de derivatização, considerando um nível de confiança de 95%, são aquelas que produziram alteração significativa do sinal analítico, ultrapassando o valor de efeito mínimo indicado pela linha tracejada. Como se pode observar na Figura 8, as variáveis consideradas significativas são temperatura do injetor e tempo de *splitless*, e por resultarem em valores de efeito positivos, concluí-se que o aumento dos valores destas variáveis influencia positivamente no sinal analítico deste procedimento. O efeito da temperatura do injetor para este procedimento é fundamental, uma vez que a temperatura acelera a reação de derivatização que deve ser completa em um intervalo de tempo pequeno, na ordem de segundos. O tempo de *splitless*

é um parâmetro instrumental que estabelece o tempo de interrupção da purga do fluxo de gás de arraste no momento seguinte à injeção. Desta maneira, não é perdida nenhuma fração das substâncias injetadas. O aumento deste parâmetro favorece o aumento do sinal analítico pela razão inerente à sua função, sendo frequentemente empregado para análises de amostras com baixas concentrações de substâncias de interesse.

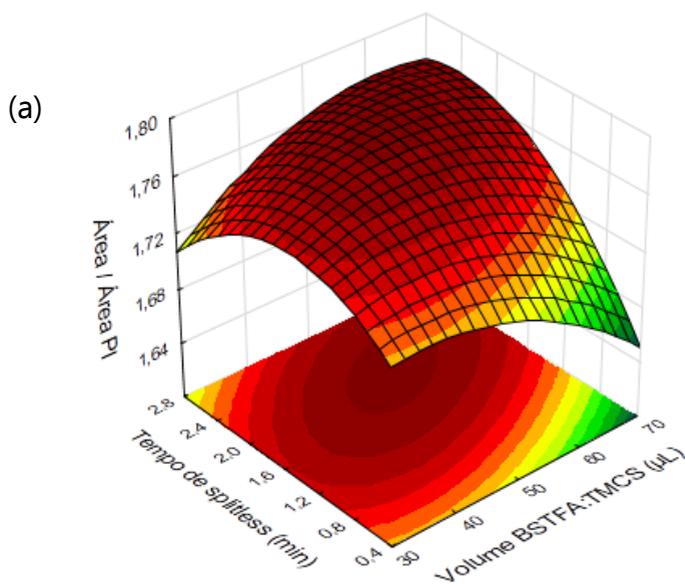
A falta de significância, a um nível de confiança de 95%, do volume de agente derivatizante, pode ser explicada pelo fato de que para toda a faixa de volume empregada para avaliar a eficiência da derivatização, esta substância encontrava-se em um excesso de no mínimo 3,5 vezes em relação aos analitos. Esta observação, portanto, implica que dentro do domínio que este reagente foi avaliado não houve diferenças estatisticamente significativas da resposta analítica baseadas no aumento ou diminuição do valor de volume em relação ao ponto central do planejamento.

Figura 8. Gráfico de pareto gerado pelo planejamento composto central para as variáveis temperatura do injetor, tempo de splitless e volume de BSTFA:TMCS (99:1) e suas interações no procedimento de derivatização dos analitos.

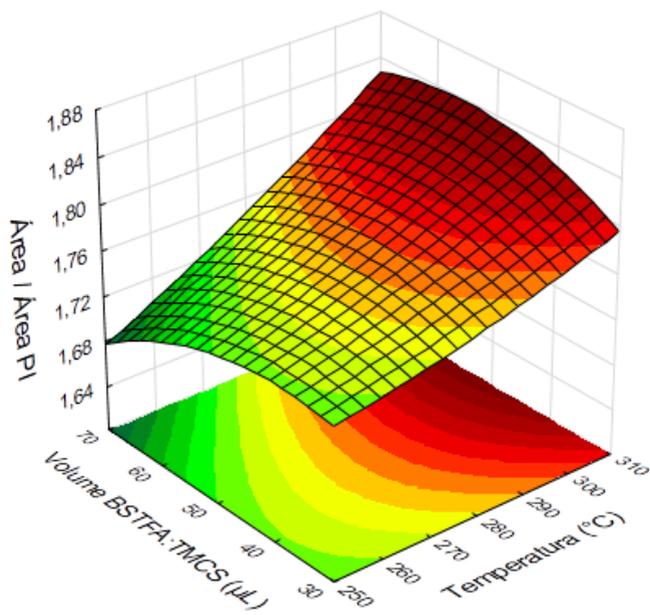


Para a determinação das melhores condições experimentais para o procedimento de derivatização dos analitos, foi utilizada análise visual das superfícies de resposta geradas pelo planejamento composto central (Figura 9). A resposta analítica para cada combinação de fatores confere à média geométrica das respostas de cada analito submetido à estas combinações. Assim, nestas superfícies, podemos observar as melhores condições experimentais como condições de compromisso para todos os analitos estudados.

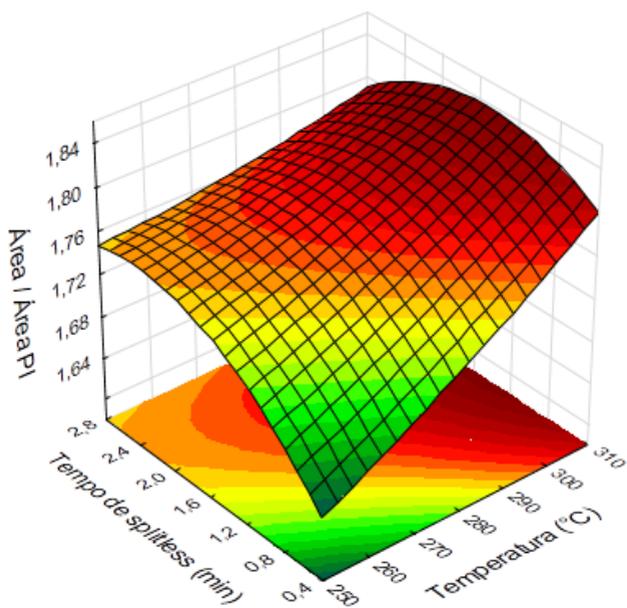
Figura 9. Superfícies de respostas obtidas a partir do planejamento composto central da combinação dos efeitos das variáveis (a) tempo de *splitless* e volume de BSTFA:TMCS (99:1), (b) volume de BSTFA:TMCS(99:1), e temperatura do injetor e (c) tempo de *splitless* e temperatura do injetor. O eixo z representa a média geométrica das razões das áreas dos picos dos analitos e área do pico do padrão interno (Área PI).



(b)



(c)



Na Figura 9, as regiões em vermelho correspondem aos valores de melhor resposta analítica, e podemos observar claramente que as melhores respostas analíticas resultam dos maiores valores de temperatura de injetor em combinação com qualquer valor de volume de BSTFA:TMCS (99:1) empregados, assim como em combinação com qualquer valor de tempo de *splitless*. Desta maneira, determinou-se como suficiente a temperatura de injetor em 290 °C, uma vez que valores muito mais elevados podem ocasionar danos ao septo de borracha encontrado na extremidade do *liner* de injeção nos cromatógrafos. Os resultados dos efeitos combinados de tempo de *splitless* e volume de BSTFA:TMCS (99:1) apresentaram área de resposta analítica ótima em quase todo o domínio estudado das duas variáveis. Desta maneira, optou-se o emprego de 40 µL de agente derivatizante para estudos subsequentes. O tempo de *splitless* é frequentemente ajustado em 1,0 minuto em diversas metodologias de análise (BIRK *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2014; MALLETT e CASALE, 2014 e SIREN *et al.*, 2014), visto que valores muito altos deste parâmetro podem ocasionar uma larga cauda no pico do solvente, que por sua vez, pode encobrir picos de analitos que são eluídos em minutos iniciais da corrida cromatográfica. Em razão da eluição tardia dos analitos, com início em aproximadamente 12 minutos, a formação de cauda do pico do solvente não causou problemas em nenhum dos experimentos deste planejamento. Assim, o valor de 2,0 minutos de tempo de *splitless*, embora seja considerado um longo período para este parâmetro, foi selecionado para análises posteriores por fornecer as melhores respostas analíticas.

4.3 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO

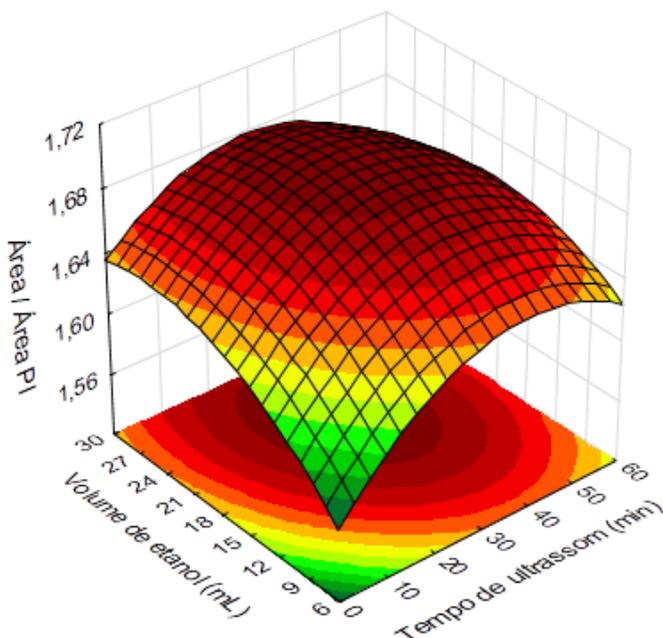
Em procedimentos de preparo de amostra e extração de esteroides em amostras de sedimento reportados na literatura, são frequentemente empregados volumes consideráveis de

solventes orgânicos (MOON *et al.*, 2008; BIRK *et al.*, 2012; SOJINU *et al.*, 2012; DERRIEN *et al.*, 2015; LYONS *et al.*, 2015). E como são submetidas a estes processos, grandes quantidades de amostras, é pertinente a busca de procedimentos que se orientam na diminuição ou eliminação do uso destes solventes. O solvente extrator escolhido para desenvolvimento deste trabalho, o etanol, apresenta reduzida toxicidade, baixo custo e boas porcentagens de recuperação de lipídios, como já reportadas em metodologias distintas (KAWAKAMI e MONTONE *et al.*, 2002; MARTINS *et al.*, 2012). Desta maneira, estudaram-se as melhores condições de extração, empregando este solvente e a técnica de ultrassom, para posteriormente verificar a eficiência de extração desta metodologia.

Para a otimização das condições de extração, também foi realizado um planejamento composto central em cinco níveis, mas com alterações em somente duas variáveis. Foram estudados o tempo de ultrassom (10 – 50 min) e o volume de etanol (9 – 27 mL).

Após processamento dos resultados obteve-se a superfície de resposta (Figura 10) para investigação dos parâmetros volume de etanol e tempo de ultrassom. A resposta analítica deste estudo, como na otimização multivariada da derivatização, também foi avaliada através da média geométrica das respostas de cada analito e recorrendo ao método visual para determinação dos pontos críticos da superfície de resposta foram estabelecidos 30 minutos de tempo de ultrassom e 21 mL de etanol como condições ótimas da etapa de extração dos analitos.

Figura 10. Superfície de resposta obtida a partir do planejamento composto central da combinação dos efeitos das variáveis: volume de etanol e tempo de ultrassom. O eixo z representa a média geométrica das razões das áreas dos picos dos analitos e área do pico do padrão interno (Área PI).



4.4 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DA METODOLOGIA ANALÍTICA PROPOSTA

O desempenho da metodologia de análise proposta neste trabalho para determinação de esteroides foi verificada através da obtenção de parâmetros analíticos de mérito sob as condições experimentais otimizadas. Na Tabela 5 encontram-se alguns parâmetros alcançados por meio da construção de curvas de calibração.

Tabela 5. Faixa linear, coeficiente de correlação, desvios padrão relativos, limites de detecção e quantificação obtidos para determinação de coprostanol, colesterol, colestanol, éster metílico do ácido hiodesoxicólico, estigmasterol e estigmastanol.

Analito	Faixa Linear (ng mL ⁻¹)	R ^{2a}	RSD (%) ^b	LOD ^c (ng mL ⁻¹)	LOQ ^d (ng mL ⁻¹)
Coprostanol	20 – 1000	0,9970	3,0	3	11
Colesterol	20 – 1000	0,9924	5,1	3	10
Colestanol	20 – 1000	0,9930	4,1	4	15
Éster metílico do Ácido Hiodesoxicólico	50 – 1000	0,9930	5,7	14	47
Estigmasterol	30 – 1000	0,9948	6,0	6	21
Estigmastanol	20 – 1000	0,9952	4,5	4	14

^aR²: Coeficiente de correlação

^bRSD (desvio padrão relativo) médio de todos os pontos da curva. n=2 para cada ponto da curva.

^cLOD: Limite de detecção

^dLOQ: Limite de quantificação

Obtiveram-se satisfatórios coeficientes de correlação, limites de detecção e quantificação, sendo semelhantes a outros trabalhos publicados que relatam a determinação de esteroides (BIRK *et al.*, 2012 e MATIC *et al.*, 2014). Os limites de detecção variaram entre 3 ng mL⁻¹ para o colesterol e 14 ng mL⁻¹ para o éster metílico do ácido hiodesoxicólico, e limites de quantificação entre 10 e 47 ng mL⁻¹. Estes valores também se adequam a estudos ambientais, de maneira que ao observar o coprostanol, pode-se notar que os limites de detecção e quantificação estão abaixo de limites de concentração indicativas de contaminação por esgoto reportados por Grimalt (1990) e González-Oreja e Saiz-Salina (1998), de 100 e 500 ng mL⁻¹, respectivamente.

Para os cálculos dos limites de detecção e quantificação, foi utilizada a definição IUPAC (MOCAK *et al.*, 1997 e LONG e

WINEFORDNER, 1983), que relata a menor concentração detectável do analito, c_L , como mostra a equação 1:

$$c_L = \frac{k s_B}{m} \quad (1)$$

onde, k é um fator numérico escolhido de acordo com o nível de confiança desejado, s_B é o desvio padrão de medidas do branco e m , o coeficiente angular da curva de calibração de cada analito. Foram realizadas 6 medidas de branco para o cálculo do valor de s_B e aplicou-se fator numérico $k = 3$, que estima-se permitir a confiança de 98,3% que o sinal analítico de determinado analito, que é função de c_L , é diferente do sinal do branco. Os limites de quantificação foram calculados de maneira similar, alterando o valor de k para 10. Também foram verificadas as respostas analíticas obtidas nas concentrações 5, 10 e 20 ng mL⁻¹ e observadas a proximidade de valores da razão sinal do analito/sinal ruído, igual a 3 e 10 para os limites de detecção e quantificação, respectivamente, para cada analito (SKOOG *et al.*, 2014).

Outros fatores adotados para avaliação do desempenho do método foram a exatidão e a precisão. A exatidão foi investigada por meio de ensaios de fortificação de matriz, em três níveis de concentração. Foram avaliadas as recuperações de todos os analitos estudados e também do padrão de recuperação, androstanol. Aproveitando os ensaios de recuperação foi avaliada a precisão do método, através de análises intra-dia e inter-dia dos mesmos. Os dados encontram-se apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Valores de recuperação, fatores de recuperação e desvio padrão relativo dos experimentos (n=3), de fortificação de matriz em três níveis de concentração e precisão intra-dia e inter-dia em termos de desvio padrão relativo em três níveis de concentração (n=3).

Analito	Adicionado (ng mL ⁻¹)	Recupera- do ^a (ng mL ⁻¹)	Exatidão		Precisão	
			Fator de recupera- ção (%)	R S D (%) ^b	Intra- dia RSD (%) ^b	Inter- dia RSD (%) ^b
Coprostanol	100	93 ± 8	93	6	3	5
	500	481 ± 14	96	3	5	10
	1000	973 ± 16	97	1	2	6
Colesterol	100	95 ± 3	95	2	7	12
	500	479 ± 11	96	2	6	4
	1000	960 ± 63	96	4	4	4
Coletanol	100	94 ± 8	94	7	4	14
	500	488 ± 24	98	4	1	11
	1000	950 ± 17	95	1	2	7
Éster						
metílico do	100	92 ± 4	92	3	7	7
Ácido	500	493 ± 17	99	4	5	14
Hiodesoxi- cólico	1000	956 ± 35	96	2	3	8
Estigmasterol	100	93 ± 3	93	3	10	4
	500	431 ± 55	86	9	4	10
	1000	964 ± 46	96	3	2	15
Estigmastanol	100	95 ± 4	95	3	2	13
	500	482 ± 12	96	2	3	8
	1000	892 ± 83	89	6	3	17
Androstanol	100	98 ± 7	98	5	7	10
	500	490 ± 18	98	3	8	8
	1000	965 ± 32	97	2	1	12

^a Média ± Intervalo de confiança. Intervalo de confiança considerando nível de 95%.

^b RSD: desvio padrão relativo. n=3

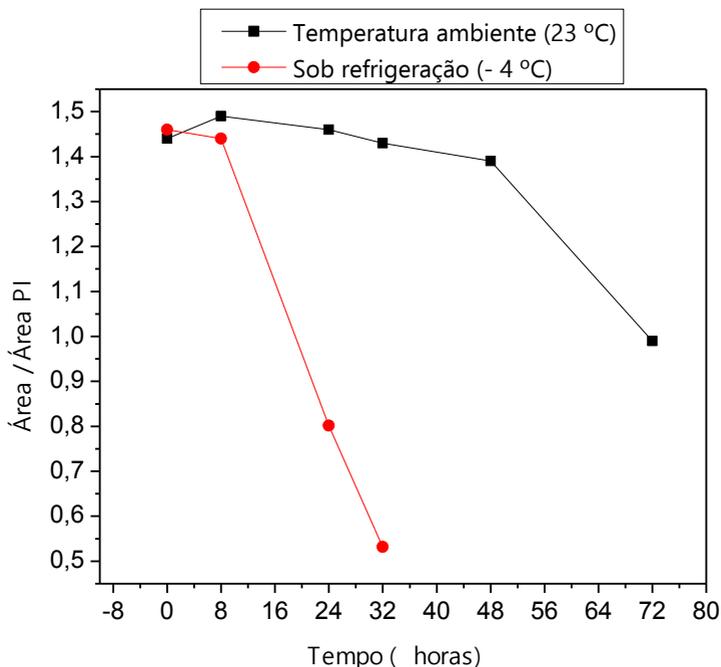
As recuperações obtidas através da aplicação do método proposto, em triplicata, variaram entre 86 e 99%, sendo considerados valores satisfatórios, em razão dos baixos níveis de concentração avaliados e tratando-se de fortificação em uma matriz complexa. Para mensurar a precisão intra-dia do método, uma das replicatas da extração de cada nível de concentração foram analisadas em triplicata e em sequência no mesmo dia. Estes ensaios resultaram em desvios padrão relativos de até no máximo 9%, todos considerados valores adequados. A precisão inter-dia foi estimada através da análise, por três dias consecutivos, dos mesmos ensaios utilizados na avaliação de precisão intra-dia para os três níveis de concentração. Ao verificar os resultados obtidos através destes testes, mesmo estes apresentando valores relativamente aceitáveis de desvio padrão relativo, de 4 a 17%, foi possível notar decaimento do sinal no segundo dia de avaliação e decaimento ainda mais significativo no terceiro dia. Concluiu-se que algumas das razões que poderiam ocasionar estes resultados seriam a hidrólise e/ou a volatilização do agente derivatizante presente no meio reacional da reação de derivatização preparado prévio à injeção. Outro fator que não deve ser descartado seria a volatilização do solvente orgânico, também presente no meio reacional e em pequeno volume. Este fator deveria causar fenômeno oposto ao que foi observado na maioria dos ensaios. Assim, devido a presença de observações que corroboraram ambas as teorias, foi realizado na sequência um estudo de estabilidade do meio reacional de análise.

4.5 ESTUDO DA ESTABILIDADE DO MEIO REACIONAL PARA REAÇÃO DE DERIVATIZAÇÃO

Elaborou-se um estudo de estabilidade do meio reacional para reação de derivatização devido à possibilidade de volatilização e hidrólise do agente derivatizante e catalisador, e

volatilização do solvente orgânico, que com o passar do tempo pode acarretar erros e imprecisão na quantificação dos analitos. Em todos os experimentos realizados neste trabalho, como última etapa de qualquer procedimento, foi preparada a solução para reação de derivatização para injeção imediata após o preparo, visto que se trata de um procedimento extremamente simples e rápido. Desta maneira, este estudo de estabilidade visa aprofundar o conhecimento da precisão do método e sua aplicabilidade de maneira distinta à que foi estabelecida, caso houvesse necessidade.

Figura 11. Avaliação da estabilidade do meio reacional da reação de derivatização dos esteroides através de ensaios mantidos em temperatura ambiente e sob refrigeração. Área = média geométrica das áreas dos esteroides coprostanol, colesterol, colestanol, éster metílico do ácido hiodesoxicólico, estigmasterol e estigmastanol em concentrações de $30 \mu\text{g mL}^{-1}$. Área PI = área do padrão interno 5α -colestano à $20 \mu\text{g mL}^{-1}$.



Foram preparados dois ensaios sob as mesmas condições experimentais. Ambos foram analisados no tempo zero, ou seja, logo após o preparo da solução para reação de derivatização no injetor. Um dos ensaios foi mantido sob refrigeração, entre as análises e o outro foi mantido em temperatura ambiente. Retirou-se o experimento mantido sob refrigeração para análise após 8, 24, e 32 h. Como apresentado na Figura 11, devido à significativa diminuição da resposta analítica em função da perda de resolução e separação dos picos após 24 h e ainda mais

significativa em 32 h, optou-se por interromper a avaliação quantitativa deste experimento. O ensaio mantido sob temperatura ambiente manteve-se estável e sem grandes desvios de resposta analítica (RSD - 2,6%) até a análise após 48 horas de preparo. Sobre a análise de 72 horas após o preparo, notou-se um decréscimo de resposta, de aproximadamente 69%, e optou-se pela execução do teste Q para avaliar se este ensaio deve ser aceito na amplitude de todas as medidas. Obteve-se $Q = 0,80$, valor superior ao valor de $Q_{95\%;n=6} = 0,62$ tabelado. Desta maneira rejeitou-se a possibilidade do último ensaio integrar o conjunto de medidas. E concluiu-se, também se baseando em testes Q dos outros pontos da nova faixa de medidas, que estão preservados, o agente derivatizante e solvente orgânico, até 48 h após o preparo da solução. Portanto, determinada amostra que empregue o método de derivatização proposto neste estudo pode ser analisada até no máximo 48 h após a adição do agente derivatizante à solução extraída contendo os analitos.

5 CONCLUSÃO

Desenvolveu-se uma metodologia analítica, agregando alterações e adaptações de técnicas previamente reportadas de preparo de amostras, que resultou em procedimentos simples e econômicos para determinação simultânea de seis esteroides em amostras de sedimento utilizando as técnicas de GC/FID e GC-MS.

A utilização da técnica de otimização multivariada denominada de planejamento composto central, bem como de técnicas univariadas, possibilitaram a determinação das melhores combinações entre fatores envolvidos nas etapas de extração e derivatização, de maneira rápida e eficiente. As etapas de extração e derivatização resultaram em favoráveis métodos alternativos aos convencionais, podendo ser empregados em amostras de sedimentos provenientes de diferentes tipos de ambientes, assim como em análises de rotina, devido à alta frequência analítica, baixo custo e consumo de amostra.

O método proposto apresentou bom desempenho analítico em termos de linearidade em uma ampla faixa de concentração (20 – 1000 ng mL⁻¹), baixos limites de detecção, que variaram de 3 a 14 ng mL⁻¹ e de quantificação, apresentado valores de 10 a 47 ng mL⁻¹. A precisão, expressa em termos de desvio padrão relativo, e a exatidão, avaliada por meio de ensaios de recuperação, também foram satisfatórias. Ademais, demonstrou-se a possibilidade de se determinar esteroides em amostras de sedimento empregando reagentes de baixa toxicidade, e mínimos volumes de reagentes considerados prejudiciais à saúde humana e ao ambiente.

6 PERSPECTIVAS

- Construção de curvas de calibração em matrizes sedimentares;
- Avaliação da robustez da metodologia analítica;
- Aplicação do método em amostras reais de sedimentos potencialmente contaminados por efluentes de esgotos domésticos e efluentes da suinocultura.

REFERÊNCIAS

ABREU-MOTA, M. A.; BARBOZA, C. A. de M.; BÍCEGO, M. C.; MARTINS, C. C. Sedimentary biomarkers along a contamination gradient in a human-impacted sub-estuary in southern Brazil: A multi-parameter approach based on spatial and seasonal variability. **Chemosphere**, 103, 156-163, 2014.

ADNAN, N. H.; ZAKARIA, M. P.; JUAHIR, H.; ALI, M. M. Faecal sterols as sewage markers in the Langat River, Malaysia: Integration of biomarker and multivariate statistical approaches. **J. Environ. Sciences**, 24, 9, 1600-1608, 2012.

ARAUJO, M. P.; COSTA, T. L. F.; CARREIRA, R. S. Esteróis como indicadores do acúmulo de esgotos domésticos em sedimentos de um sistema estuarino-lagunar tropical (Mundaú-Manguaba, AL). **Quim. Nova**, 34, 1, 64-70, 2011.

BASHEER, C.; LEE, H. K.; Analysis of endocrine disrupting alkylphenols, chlorophenols and bisphenol-A using hollow fiber-protected liquid-phase microextraction coupled with injection port-derivatization gas chromatography–mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, 19, 1-2, 163-169, 2004.

BASHEER, C.; PARTHIBAN, A.; JAYARAMAN, A.; LEE, H. K.; VALIYAVEETIL, S. Determination of alkylphenols and bisphenol-A: A comparative investigation of functional polymer-coated membranemicroextraction and solid-phase microextraction techniques. **J. Chromatogr. A**, 1087, 274-282, 2005.

BATTA, A. K.; SALEN, G.; SHEFER, S. Chromatographic separation of putative precursors of cholestanol. **Steroids**, 52, 109-122, 1988.

BEZERRA, M. A.; SANTELLI, R. E.; OLIVEIRA, E. P.; VILLAR, L. S.; ESCALEIRA, L. A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, 76, 965-977, 2008.

BIACHE, C.; PHILP, R. P. The use of sterol distributions combined with compound specific isotope analyses as a tool to identify the origin of fecal contamination in rivers. **Water Res.** 47, 1201-1208, 2013.

BIRK, J. J.; DIPPOLD, M.; WIESENBERG, G. L. B.; GLASER, B. Combined quantification of faecal sterols, stanol, stanones and bile acids in soil and terrestrial sediments by gas chromatography-mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, 1242, 2-10, 2012.

BRÜGGER, P. A ética profissional e o espírito do capitalismo: uma questão ambiental! **Revista de Ciências Humanas**, 14, 19, 45-53, 1996.

BULL, I. D.; SIMPSON, P. F.; BERGEN, P. F.; EVERSLED, R. P. Muck 'n' molecules: organic geochemical methods for detecting ancient manuring. **Antiquity**, 73, 86-96, 1999.

BULL, I. D.; ELHMMALI, M. M.; ROBERTS, D. J.; EVERSLED, R. P. The application of steroidal biomarkers to track the abandonment of a Roman wastewater course at the Agora (Athens, Greece). **Archaeometry**, 45, 1, 149-161, 2003.

CHAGAS, S. D.; IARIA, S. T.; CARVALHO, J. P. P. Bactérias indicadoras de poluição fecal em águas de irrigação de hortas que abastecem o município de Natal – Estado do Rio Grande do Norte (Brasil). **Rev. Saúde públ.** 15, 629-642, 1981.

COLLINS; C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2006. 453p.

CORDEIRO, L. G. M. S. **Esteróis como marcadores moleculares da contaminação no sistema estuarino Iguazu-Sarapuí, noroeste da Baía de Guanabara (RJ)**. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – PUC-Rio. Rio de Janeiro, 2006.

DERRIEN, M.; CABRERA, F. A.; TAVERA, N. L. V.; MANZANO, C. A. K.; VIZCAINO, S. C. Sources and distribution of organic matter along the Ring of Cenotes, Yucatan, Mexico: Sterol markers and statistical approaches. **Sci. Total Environ.** 511, 223-229, 2015.

DUFOUR, A.; BARTRAM, J.; BOS, R.; GANNON, V. **Animal waste, water quality and human health**. 1 ed. Londres: IWA, 2012. 489 p.

ELHMMALI, M. M.; ROBERTS, D. J.; EVERSLED, R. P. Bile acids as a new class of sewage pollution indicator. **Environ. Sci. Technol.** 31, 3663-3668, 1997.

ELIE, M. P.; BARON, M. G.; BIRKETT, J. W. Injection port silylation of g-hydroxybutyrate and trans-hydroxycrotonic acid: Conditions optimisation and characterisation of the di-tertbutyldimethylsilyl derivatives by GC-MS. **Analyst**, 137, 255-262, 2012.

ENEROTH, P.; HELLSTROM, K.; RYHAGE, R. Identification of two neutral metabolites of stigmasterol found in human feces. **Steroids**, 6, 6, 707-720, 1965.

ENGEL, M. H.; MACKO, S. A. **Organic Geochemistry: Principles and Application**. Nova York: Plenum Press, 1993. 860 p.

FANG, X.; WANG, J.; WANG, Y.; LI, X.; ZHOU, H.; ZHU, L. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of wedelolactone

and antioxidant polyphenols from *Eclipta prostrate* L using response surface methodology. **Sep. Purif. Technol.** 138, 55-64, 2014.

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

FERREIRA, S. L. C.; SANTOS, W. N. L.; QUINTELLA, C. M.; NETO, B. B.; BOSQUE-SENDRA, J. M. Doehlert matrix: a chemometric tool for analytical chemistry – review. **Talanta**, 63, 1061-1067, 2004.

FERREIRA, M. M. C.; ANTUNES, A. M.; MELGO, M. S.; VOLPE, P. L. O. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Quim. Nova**, 22, 5, 724-731, 1999.

FRANCY, D. D.; HELSEL, R. N. Occurrence and Distribution of Microbiological Indicators in Groundwater and Stream Water. **Water Environmental**, 72, 1, 152-161, 2000.

FRENA, M.; BATABLION, G. A.; TONIETTO, A. E.; EBERLIN, M. N.; ALEXANDRE, M. R.; MADUREIRA, L. A. S. Assessment of anthropogenic contamination with sterol markers in surface sediments of a tropical estuary (Itajaí-Açu, Brazil). **Sci. Total Environ.** 544, 432-438, 2016.

FUMES, B. H.; SILVA, M. R.; ANDRADE, F. N.; NAZARIO, C. E. D.; LANÇAS, F. M. Recent advances and future trends in new materials for sample preparation. **Trends Anal. Chem.** 71, 9-25, 2015.

GHOREISHI, S. M.; SAEIDINEJAD, F.; BEHPOUR, M.; MASOUM, S. Application of multivariate optimization to electrochemical determination of methyl dopa drug in the presence of diclofenac

at a nanostructured electrochemical sensor. **Sensor. Actuat. B Chem.** 221, 576-585, 2015.

GONZÁLEZ-OREJA, J. A.; SAIZ-SALINAS, J. I. Short-term spatio-temporal changes in urban pollution by means of faecal sterols analysis. **Mar. Poll. Bull.** 36, 22, 868-875, 1998.

GRILO, C. F.; NETO, R. R.; VICENTE, M. A.; CASTRO, E. V. R.; FIGUEIRA, R. C. L.; CARREIRA, R. S. Evaluation of the influence of urbanization processes using mangrove and fecal markers in recent organic matter in a tropical tidal flat estuary. **Appl. Geochem.** 38, 82-91, 2013.

GRIMALT, J. O.; FERNANDEZ, P.; BAYONA, J. M.; ALBALGES, J. Assessment of fecal sterols and ketones as indicators of urban sewage inputs to coastal waters. **Environ. Sci. Technol.** 24, 3, 357-363, 1990.

HSU, C.; DING, W. Determination of low-molecular-weight dicarboxylic acids in atmospheric aerosols by injection-port derivatization and gas chromatography-mass spectrometry. **Talanta**, 15, 2, 1025-1028, 2009.

IBAÑEZ, E.; BORRÓS, S.; COMELLAS, L. I. Quantification of sterols, 5 α - and 5 β -stanols in sewage sludge, manure and soils amended with these both potential fertilizers. **J. Anal. Chem.** 366, 102-105, 2000.

ISOBE, K. O.; TARAO, M.; ZAKARIA, M. P.; CHIEM, N. H.; MINH, L. Y. Quantitative Application of Fecal Sterols Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry To Investigate Fecal Pollution in Tropical Waters: Western Malaysia and Mekong Delta, Vietnam. **Environ. Sci. Technol.** 36, 21, 4497-4507, 2002.

LANÇAS, F. M. The role of separation sciences in the 21th century. **J. Braz. Chem. Soc.** 14, 2, 183-197, 2003.

LARA, P. C. P. **Aplicação de métodos quimiométricos na análise direta de constituintes inorgânicos em leite materno por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite.** Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2008.

LEITE, F. **Validação em análise química.** 4. ed. Campinas, SP: Átomo, 2002. 278 p.

LI, F.; JIN, J.; SUN, X.; WANG, X.; LI, Y.; SHAH, S. M.; CHEN, J. Gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry for the determination of atmospheric polychlorinated naphthalenes. **J. Hazard Mater.** 280, 111-117, 2014.

LIN, W.; CHEN, H.; DING, W. Determination of pharmaceutical residues in waters by solid-phase extraction and large-volume on-line derivatization with gas chromatography-mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, 18, 2, 279-285, 2005.

LIU, Y.; CHO, S. R.; DANIELSON, N. D. Solid-phase microextraction and on-line methylation gas chromatography for aliphatic carboxylic acids. **Anal. Bioanal. Chem.** 373, 64-69, 2002.

LIU, W.; KO, Y.; HWANG, B.; LI, Z.; YANG, T.; LEE, M. Determination of perfluorocarboxylic acids in water by ion-pair dispersive liquid-liquid microextraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry with injection port derivatization. **Anal. Chim. Acta**, 726, 28-34, 2012.

LONG, G. L.; WINEFORDNER, J. D. Limito f detection, a closer look at the IUPAC definition. **Anal. Chem.**, 55, 712-724 A, 1983.

LYONS, B.P.; DEVLIN, M. J.; HAMID, S. A. A.; AL-OTIABI, A. F.; AL-ENEZI, M.; MASSOUD, M. S.; AL-ZAIDAN, A. S.; SMITH, A. J.; MORRIS, S.; BERSUDER, P.; BARBER, J. L.; PAPACHLIMITZOU, A.; AL-SARAWI, H. A. Microbial water quality and sedimentary faecal sterols as markers of sewage contamination in Kuwait. **Mar. Poll. Bull.** 2015.

MALLETTE, J. R.; CASALE, J. F. Rapid determination of the isomeric truxillines in illicit cocaine via capillary gas chromatography/flame ionization detection and their use and implication in the determination of cocaine origin and trafficking routes. **J. Chromatogr. A**, 1364, 234-240, 2014.

MARTINS, C. C. **Avaliação da introdução de esteróis fecais e hidrocarbonetos marcadores geoquímicos em sedimentos da baía do almirantado, Península Antártica.** 130 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Instituto Oceanográfico. São Paulo, 2001.

MATIC, I.; GRUJIC, S.; JAUKOVIC, Z.; LAUSEVIC, M. Trace analysis of selected hormones and sterols in river sediments by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, 1364, 117-127, 2014.

MATTOS, M. SILVA, M. **Controle de qualidade microbiológica das águas de consumo na microbacia hidrográfica arroio passo do pilão.** Pelotas, RS: Embrapa, 2002. (Comunicado técnico 61).

MOCÁK, J.; BOND, A. M.; MITCHELL, S.; SCOLLARY, G. A statistical overview of standard (IUPAC and ACS) and new procedures for determining the limits of detection and quantification: application

to voltammetric and stripping techniques. **Pure & Appl. Chem.**, 69, 2, 297-328, 1991.

MONTE, M. J.; MARIN, J. J.; ANTELO, A.; VASQUEZ-TATO, J. Bile acids: Chemistry, physiology, and pathophysiology. **World J. Gastroenterol.** 15, 7, 804-816, 2009.

MOON, H.; YOON, S.; JUNG, R.; CHOI, M. Wastewater treatment plants (WWTPs) as a source of sediment contamination by toxic organic pollutants and fecal sterols in a semi-enclosed bay in Korea. **Chemosphere**, 73, 880-889, 2008.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos**. Campinas, SP: Unicamp, 2001. 412 p.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. 25 anos de quimiometria no Brasil. **Quim. Nova**, 29, 6, 1401-1406, 2006.

NGUYEN. D.; BRUCHET, A.; ARPINO, P. Determination of sterols in sewage sludge by combined *in situ* trimethylsilylation/supercritical fluid extraction and GC/MS. **Environ. Sci. Technol.** 29, 1686 – 1690, 1995.

ORATA, F. Derivatization Reactions and Reagents for Gas Chromatography Analysis. Advanced Gas Chromatography - Progress in Agricultural, Biomedical and Industrial Applications, ISBN: 978-953-51-0298-4, InTech. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/advanced-gaschromatography-progress-in-agricultural-biomedical-and-industrial-applications/derivatization-reactions-andreagents-for-gas-chromatography-analysis>>. Acesso em: 05 jan. 2016.

PINTO, M. S. **Desenvolvimento de metodologia analítica para a determinação de derivados fenólicos de lignina em sedimentos por SPME-GC/FID**. 84 p. Dissertação (Mestrado em

Química Analítica) - Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2015.

POOLE, C. F.; LENCA, N. Green sample-preparation methods using room-temperature ionic liquids for the chromatographic analysis of organic compounds. **Trends Anal. Chem.** 71, 144-156, 2015.

SAIM, N.; OSMAN, R.; SPIAN, D. R. S. A.; JAAFAR, M. Z.; JUAHIR, H.; ABDULLAH, M. P.; GHANI, F. A. Chemometric approach to validating faecal sterols as source tracer for faecal contamination in water. **Water Res.** 43, 5023-5030, 2009.

SANEZ, J. M.; HENSEL, F. A.; PARRON-VARGAS, L. M.; FROEHNER, S. J. **Guia prático para preparação de amostras sedimentares para análise de ácidos biliares e esteróis fecais por cromatografia gasosa-espectrometria de massa (GC-MS).** Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2014. 38p.

SIRÉN, H.; KAIJANEN, L.; KAARTINEN, S.; VÄRE, M.; RIIKONEN, P.; JERNSTRÖM, E. Determination of statins by gas chromatography – EI/MRM – Tandem mass spectrometry: Fermentation of pine samples with *Pleurotus ostreatus*. **J. Pharm. Biomed. Anal.** 94, 196-202, 2014.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de química analítica.** 9ª ed. São Paulo, SP: Cengage Learning, 2014. 1088 p.

SOJINU, S. O.; SONIBARE, O. O.; EKUNDAYO, O.; ZENG, E. Y. Assessing anthropogenic contamination in surface sediments of Niger Delta, Nigeria with fecal sterols and *n*-alkanes as indicators. **Sci. Total Environ.** 441, 89-96, 2012.

SULLIVAN, D.; BROOKS, P.; TINDALE, N.; CHAPMAN, S.; AHMED, W. Faecal sterols analysis for the identification of human faecal

pollution in a non-sewered catchment. **Water Sci. Technol.** 61, 5, 1355-1361, 2010.

TAVERNA, L. **Protocolo analítico em escala reduzida para determinação de *n*-alcanos, HPA e esteróis em sedimentos e diagnóstico ambiental preliminar.** 90p. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2011.

TEÓFILO, R.; FERREIRA, M. M. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Quim. Nova**, 29, 2, 338-350, 2006.

TOLEDANO, R. M.; CORTÉS, J. M.; ANDINI, J. C.; VÁSQUEZ, A.; VILLÉN, J. On-line derivatization with on-line coupled normal phase liquid chromatography–gas chromatography using the through oven transfer adsorption desorption interface: Application to the analysis of total sterols in edible oils. **J. Chromatogr. A**, 1256, 191-196, 2012.

TRAN, N. H. GIN, K. Y.; NGO, H. H. Fecal pollution source tracking toolbox for identification, evaluation and characterization of fecal contamination in receiving urban surface Waters and groundwater. **Sci. Total Environ.** 538, 38-57, 2015.

TRINDADE, A. S. N.; DANTAS, A. F.; LIMA, D. C.; FERREIRA, S. L. C.; TEIXEIRA, L. S. G. Multivariate optimization of ultrasound-assisted extraction for determination of Cu, Fe, Ni and Zn in vegetable oils by high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry. **Food Chem.** 185, 145-150, 2015.

TYAGI, P.; EDWARDS, D. R.; COYNE, M. S. Use of sterol and bile acid biomarkers to identify domesticated animal sources of fecal pollution. **Water Air Pollut.** 187, 263-274, 2008.

TZING, S.; GHULE, A.; LIU, J.; LING, Y. On-line derivatization gas chromatography with furan chemical ionization tandem mass spectrometry for screening of amphetamines in urine. **J. Chromatogr. A**, 22, 1, 76-83, 2006.

VANINI, G.; SOUZA, M. O.; CARNEIRO, M. T. W. D.; FILGUEIRAS, P. R.; BRUNS, R. E.; ROMÃO, W. Multivariate optimization of ICP OES instrumental parameters for Pb/Ba/Sb measurement in gunshot residues. **Microchem. J.** 120, 58-63, 2015.

WANG, J.; GUAN, Y.; NI, H.; LIU, G.; ZENG, E. Fecal steroids in riverine runoff of the Pearl River Delta, South China: Levels, potential sources and inputs to the coastal ocean. **J. Environ. Monit.** 12, 280-286, 2010.

WANG, Q.; MA, L.; YIN, C.; XU, L. Developments in injection port derivatization. **J. Chromatogr. A**, 1296, 25-35, 2013.

WHO. World Health Organization, 2003. **Guidelines for safe recreational water environments.** Disponível em: <<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/42591/1/9241545801.pdf>>. Acesso em: 28 dez. 2015.

WHO. World Health Organization, 2013. **Progress on sanitation and drinking-water.** Disponível em: <http://www.plaidoyercpu.org/documents/9789241505390_eng.pdf>. Acesso em: 27 dez. 2015.

WU, J.; HU, R.; YUE, J.; YANG, Z. ZHANG, L. Determinations of fecal sterols by gas chromatography-mass spectrometry with solid-phase extraction and injection-port derivatization. **J. Chromatogr. A**, 1216, 1053-1058, 2009.

WU, J.; LEE, H. K. Injection Port Derivatization Following Ion-Pair Hollow Fiber-Protected Liquid-Phase Microextraction for Determining Acidic Herbicides by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. **Anal. Chem.** 78, 7292-7301, 2006.

ZHOU, Y.; JIANG Q.; PENG, Q.; XUAN, D.; QU, W. Development of a solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry method for the determination of pentachlorophenol in human plasma using experimental desing. **Chemosphere**, 70, 256-262, 2007.