

Leonardo Valderrama

**APLICAÇÃO DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA COM  
INTEGRAÇÃO DE TÉCNICAS DE MICROEXTRAÇÃO E  
DETECÇÃO ÓTICA PARA DETERMINAÇÃO DE  
MICROPOLUENTES EM MATRIZES COMPLEXAS**

Dissertação submetida ao Programa de  
Pós-Graduação em Química da  
Universidade Federal de Santa  
Catarina para a obtenção do Grau de  
Mestre em Química Analítica  
Orientador: Prof. Dr. Eduardo Carasek  
da Rocha

FLORIANÓPOLIS  
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Valderrama, Leonardo  
APLICAÇÃO DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA COM  
INTEGRAÇÃO DE TÉCNICAS DE MICROEXTRAÇÃO E DETECÇÃO  
ÓTICA PARA DETERMINAÇÃO DE MICROPOLUENTES EM  
MATRIZES COMPLEXAS / Leonardo Valderrama ;  
orientador, Eduardo Carasek da Rocha, 2018.  
97 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e  
Matemáticas, Programa de Pós-Graduação em Química,  
Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Química. 2. Preparo de Amostras. 3.  
Microextração em fase sólida por filme fino. 4.  
Extração em ponteira descartável. 5. Quimiometria.  
I. Rocha, Eduardo Carasek da. II. Universidade  
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação  
em Química. III. Título.

Leonardo Valderrama

**APLICAÇÃO DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA COM  
INTEGRAÇÃO DE TÉCNICAS DE MICROEXTRAÇÃO E  
DETECÇÃO ÓTICA PARA DETERMINAÇÃO DE  
MICROPOLUENTES EM MATRIZES COMPLEXAS**

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Química Analítica e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Química.

Florianópolis, 22 de fevereiro de 2018.

---

Prof. Dr. Vanderlei Gageiro Machado  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Química

**Banca Examinadora:**

---

Prof. Dr. Eduardo Carasek da Rocha  
Orientador  
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

---

Prof. Dr. Paulo Henrique Março  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tatiane de Andrade Maranhão  
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)



## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Osmar e Elizabeth, pelo apoio constante, incentivo, paciência, carinho e suporte em todos os momentos. Sempre desejando o meu melhor e me fazendo acreditar que seria possível.

A minha família que sempre foi o meu suporte para chegar até aqui, meu irmão Osmar e minha Irmã Patrícia, que além de irmã foi minha baba, professora, amiga e coorientadora. Também um agradecimento a meu cunhado Paulo, sempre prestativo e compreensivo.

Aos meus amigos do CroMaas, tanto pelas risadas e momento de descontração, como pelo apoio e contribuição no decorrer de todo este trabalho. São pessoas que tenho um carinho imenso e espero continuar mantendo contato no doutorado e na vida.

Ao meu professor e orientador Eduardo Carasek, pela oportunidade e pela paciência e prestatividade no decorrer do trabalho.

A UFSC e ao Programa de Pós-graduação em química pela oportunidade e pelo ensino público e de Qualidade.

A CAPES pela bolsa de estudos, que possibilitou a dedicação exclusiva ao programa.







## RESUMO

Este estudo traz a possibilidade de se utilizar técnicas de preparo de amostras em conjunto com a espectroscopia nas regiões do infravermelho próximo (NIR) e ultravioleta (UV) na quantificação de micropoluentes emergentes. A técnica de microextração em fase sólida por filme fino (TF-SPME), acoplado com ao sistema de placas de 96 poços e, em conjunto com a espectroscopia NIR, mostrou-se eficiente para o desenvolvimento de modelos de calibração pseudo-univariada, através do método de resolução multivariadas de curvas com mínimos quadrados alternantes (MCR-ALS), na quantificação dos micropoluentes bisfenol A (BFA), 3-(4-metilbenzilideno) cânfora (4-MBC), 2-ethylhexil-*p*-methoxycinnamate (EHMC), benzofenona (BF) e triclorocarban (TCC) em água. A quantificação dos analitos na concentração de 50, 75 e 100 ppb através das curvas de calibração pseudo-univariadas apresentou erros absolutos inferiores aos encontrados com a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para BF e TCC. Para BFA, 4-MBC e EHMC o erro absoluto foi inferior a 10 ppb. A técnica de extração em ponteiros descartáveis (DPX) em conjunto com a espectroscopia NIR, mesmo utilizando diferentes estratégias na organização dos dados experimentais, não permitiu a quantificação dos hormônios 17  $\beta$ -estradiol (betaEST), estrona (ETR), estriol (EST) e 17  $\alpha$ -etinilestradiol (17-EE) em águas. Entretanto, o preparo de amostra por DPX, juntamente com a espectroscopia na região do UV, utilizando a estratégia de matrizes aumentadas e a resolução espectral por MCR-ALS, auxiliada pela formação de complexo de inclusão com  $\beta$ -ciclodextrina, mostrou que a deficiência de rank relativa à semelhança espectral foi contornada. Por outro lado, a deficiência de rank relacionada à concentração semelhante de analitos nas amostras, bem como quando um sistema evolui na presença de uma contribuição constante, podem ser contornadas através do desenvolvimento de um modelo não linear, como a maquina de vetor de suporte (SVM) a partir dos perfis de concentração recuperados por MCR-ALS, possibilitando a quantificação dos hormônios beta EST, ETR, EST e 17-EE em amostras de águas com erros relativos inferiores a 10%. Na utilização de ambas as técnicas, TF-SPME e DPX, otimizações multivariadas foram empregadas para alcançar os melhores desempenhos no preparo das amostras.

**Palavras-chave:** TF-SPME, DPX, hormônios, MCR-ALS, SVM.



## ABSTRACT

In this study it was shown the possibility of using sample preparation techniques in conjunction with the near infrared (NIR) and ultraviolet (UV) spectroscopy in the quantification of emerging micropollutants. The thin-film solid phase microextraction technique (TF-SPME), coupled with the 96-well plate system and, together with NIR spectroscopy, proved to be efficient for the development of pseudo-univariate calibration models through (MCR-ALS), for the quantification of micropollutants bisphenol A (BFA), 3-(4-methylbenzylidene) camphor (4-MBC), 2-ethylhexyl-p-methoxycinnamate (EHMC), benzophenone (BF) and trichlorocarb (TCC) in water. The quantification of the analytes in the concentration of 50, 75 and 100 ppb through the pseudo-univariate calibration curves presented absolute errors lower than those found with the high performance liquid chromatography (HPLC) technique for BF and TCC. For BFA, 4-MBC and EHMC the absolute error was less than 10 ppb. The technique of extraction by disposable tips (DPX) in conjunction with NIR spectroscopy, even using different strategies in the organization of experimental data, did not allow the quantification of 17 $\beta$ -estradiol (betaEST), estrone (ETR), estriol (EST) and 17 $\alpha$ -ethinylestradiol (17-EE) in water. However, sample preparation by DPX along with UV spectroscopy using the augmented matrix strategy and the spectral resolution by MCR-ALS, aided by the formation of inclusion complex with  $\beta$ -cyclodextrin, showed that the deficiency of rank relative to the spectral similarity was bypassed. On the other hand, the rank deficiency related to the similar concentration of analytes in the samples, as well as when a system evolves in the presence of a constant contribution, can be circumvented by the development of a nonlinear SVM model using the concentration profiles recovered by MCR-ALS, allowing the quantification of beta EST, ETR, EST and 17-EE hormones in water samples with relative errors of less than 10%. In the use of both techniques, TF-SPME and DPX, multivariate optimizations were employed to achieve the best performance in sample preparation.

**Keywords:** TF-SPME, DPX, hormones, MCR-ALS, SVM.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representação do sistema endócrino humano.....	28
<b>Figura 2.</b> Amostrador, êmbolo, agulha, tubo hipodérmico e fibra exposta.....	35
<b>Figura 3.</b> Sistema semi-automático de 96 poços. (A) Sistema de agitação, (B) Pente com 12 pinos, (C) Sistema com 8 pentes.....	37
<b>Figura 4.</b> Esquema das etapas envolvidas na extração por DPX.....	38
<b>Figura 5.</b> Planejamento dorhlerl.....	42
<b>Figura 6.</b> Superfície triangular utilizada para otimizar mistura de três componentes.....	43
<b>Figura 7.</b> Espectros de NIR (A) após a preparação da amostra por TF-SPME acoplado com sistema de placas de 96 poços e (B) após a preparação da amostra por TF-SPME acoplado com sistema de placas de 96 poços e primeira derivada.....	50
<b>Figura 8.</b> Primeira derivada dos espectros NIR para os analitos padrão (espectros puros).....	51
<b>Figura 9.</b> Resultados do MCR-ALS. (A) Perfis espectrais recuperados - $S^T$ . (B) Perfis de concentração relativa - $C$ .....	52
<b>Figure 10.</b> Curvas de calibração pseudo-univariada. (A) BF, (B) BFA, (C) EHMC, (D) 4-MBC, (E) TCC.....	53
<b>Figura 11.</b> Resultados do MCR-ALS para espectros NIR sem preparo de amostra. (A) Perfis espectrais recuperados - $S^T$ . (B) Perfis de concentração - $C$ .....	57
<b>Figura 12.</b> Otimização do solvente de dessorção.....	63
<b>Figura 13.</b> Otimização da massa utilizada na DPX.....	64

<b>Figura 14.</b> Superfícies de resposta obtidas para condição de compromisso entre tempo e número de ciclos. (XA) extração e (XB) dessorção.....	65
<b>Figura 15.</b> Otimização do número de ciclos de limpeza.....	66
<b>Figura 16.</b> Efeito <i>salting out</i> .....	67
<b>Figura 17.</b> Cromatogramas sobrepostos do rio São Francisco sul sem fortificação e com $10 \mu\text{g L}^{-1}$ do mix de hormônio.....	69
<b>Figura 18.</b> Espectros dos hormônios complexados com a $\beta$ -ciclodextrina.....	73
<b>Figura 19.</b> Resultados da PCA. (A) Scores. (B) Loadings.....	74
<b>Figura 20.</b> Espectros UV. (A) Espectros mix. (B) Espectros puros. (C) Espectros amostras reais.....	75
<b>Figura 21.</b> Espectros NIR. (A) Espectros mix. (B) Espectros puros. (C) Espectros amostras reais.....	76
<b>Figura 22.</b> (A) Estratégia de matrizes aumentadas por colunas e deconvolução por MCR-ALS. (B) Estratégia para o modelo SVM. $\alpha$ são multiplicadores de Lagrange, K é a função Kernel e “e” é um bias (erro), $\sigma^2$ é o parâmetro de variância.....	78
<b>Figura 23.</b> Espectros UV dos hormônios na presença de cafeína. (A) BET. (B) EES. (C) ETI. (D) ETR.....	82
<b>Figura 24.</b> Ajuste dos modelos MCR-ALS/SVM. (A) BET. (B) EES. (C) ETI. (D) ETR. (●) amostras de calibração, (*) amostras de validação.....	83

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Estrutura, Log $K_{ow}$ e pKa dos alquís fenóis estudado.....	30
<b>Tabela 2.</b> Estrutura, Log $K_{ow}$ e pKa dos hormônios estrogênicos.....	31
<b>Tabela 3.</b> Resumo dos métodos analitos para quantificação de hormônios.....	33
<b>Tabela 4.</b> Comparação entre o método utilizando HPLC e NIR/MCR-ALS.....	55
<b>Tabela 5.</b> Proporção dos solventes de dessorção.....	61
<b>Tabela 6.</b> Parâmetros analíticos de mérito obtidos através de curva analítica em matriz (água de rio).....	67
<b>Tapela 7.</b> Repetibilidade interday e intraday.....	68
<b>Tabela 8.</b> Resultados de recuperação para água de três rios, realizados em dois níveis de fortificação.....	69
<b>Tabela 9.</b> Estratégias e principais resultados para contornar a deficiência de rank em C.....	77
<b>Tabela 10.</b> Validação do modelo SVM.....	79
<b>Tabela 11.</b> Resultados obtidos por UV/MCR-ALS/SVM para previsão da concentração de hormônios em amostras reais.....	80
<b>Tabela 12.</b> Validação do modelo MCR-ALS/SVM.....	84



## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- 4-MBC - 4-Metil benzilideno cânfora, do inglês *4-Methylbenzylidene camphor*
- 17-EE - 17 $\alpha$ -etinilestradiol, do inglês 17  $\alpha$ -ethinylestradiol
- betaETS - 17 $\beta$ -estradiol
- ACN – Acetonitrila, do inglês Acetonitrile
- ALS – Mínimos quadrados alternantes, do inglês Alternating least squares
- BPA - Bisfenol A, do inglês *Bisphenol A*
- BzP - Benzofenona, do inglês *Benzophenone*
- CS – Supercrítica, do inglês *Supercritical*
- DAD - Detector por arranjo de diodos, do inglês *Diode Array Detection*
- DI - Imersão direta, do inglês *Direct Imersion*
- D-SPE - extração em fase sólida dispersiva, do inglês *solid phase dispersive extraction*
- DPX – Extração com ponteira descartável, do inglês *disposable pipette extraction*
- EST – Estriol
- ETR – Estrona
- FL – Fluorescência, do inglês *Fluorescence*
- GC - Cromatografia gasosa, do inglês *Gas Chromatography*
- GC-MS – Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas, do inglês *Gas Chromatography – Mass Spectrometry*
- H<sub>2</sub>O U. P. - água ultrapura
- HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*
- HS - do inglês, *Headspace*
- EHMC - 2-Etilhexil-p-metoxicinamato, do inglês *2-Ethylhexyl-pmethoxycinnamate*.
- EDCs – Desreguladores endócrinos, do inglês *Endocrine Disruptor Compounds*.
- Ko/w – coeficiente de partição n-octanol/água
- LC – Cromatografia Líquida, do inglês *Liquid Chromatography*
- LC-FL - Cromatografia Líquida acoplado a Fluorescência, do inglês *Liquid Chromatography - Fluorescence*
- LC-MS – Cromatografia Líquida acoplada a espectrometria de massas, do inglês *Liquid Chromatography – Mass Spectrometry*
- LLE – extração líquido-líquido, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*
- LOD – Limite de detecção, do inglês *Limit of Detection*
- LOQ - Limite de quantificação, do inglês *Limit of Quantitation*

MCR – Resolução multivariada de curva, do inglês *Multivariate Curve Resolution*  
MeOH – Metanol, do inglês *Methanol*  
MS – Espectrometria de massa, do inglês *Mass Spectrometry*  
NIR – Infravermelho próximo, do inglês *Near Infrared*  
PAN - C18-poliacrilonitrilo  
R<sup>2</sup> - Coeficiente de determinação  
RP – Fase Reversa, do inglês *Reverse Phase*  
RSD – Precisão, do inglês *Relative Standard Deviation*  
RSM – Metodologia de superfície de resposta, do inglês *Response Surface Methodology*  
PDMS - Polidimetil siloxano  
PLS – Mínimos quadrados parciais, do inglês *Partial least squares*  
SPE – Extração em fase sólida, do inglês *Solid Phase Extraction*  
SPME – Microextração em fase sólida, do inglês *Solid Phase Microextraction*  
SVM – Máquina de vetor de suporte, do inglês *Support Vector Machine*  
TCC – Triclocarban, do inglês *Triclocarban*  
TF-SPME – Microextração em filme fino, do inglês *Thin-Film Microextraction*  
UV – Ultravioleta, do inglês *Ultraviolet*  
Vis – Visível, do inglês *Visible*

## Sumário

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>25</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA.....</b>	<b>27</b>
2.1 AMOSTRA .....	27
2.2 DESREGULADORES ENDÓCRINOS .....	27
2.3 PREPARO DE AMOSTRA .....	35
<b>2.3.1 Microextração em fase sólida por filme fino .....</b>	<b>36</b>
<b>2.3.2 Extração Com Ponteira Descartáveis .....</b>	<b>38</b>
2.4 QUIMIOMETRIA.....	41
<b>2.4.1 Planejamento e otimização de experimentos .....</b>	<b>41</b>
<b>2.4.2 Calibração multivariada.....</b>	<b>43</b>
<b>2.4.3 Método multivariado de resolução de curvas com mínimos quadrados alternantes.....</b>	<b>44</b>
<b>2.4.4 Modelos não lineares.....</b>	<b>45</b>
<b>2.4.5 Redes neurais artificiais.....</b>	<b>45</b>
<b>2.4.6 Maquina de vetor de suporte.....</b>	<b>46</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>48</b>
3.1. OBJETIVO GERAL .....	48
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	48
<b>4 DETERMINAÇÃO DE MICROPOLUENTES EMERGENTES POR NIR PELA TÉCNICA TF-SPME ACOPLADO COM O SISTEMA DE PLACAS DE 96 POÇOS E CALIBRAÇÃO PSEUDO-UNIVARIADA .....</b>	<b>49</b>
4.1 MATERIAIS E MÉTODOS .....	49
<b>4.1.1 Reagentes .....</b>	<b>49</b>
<b>4.1.2 Instrumentação.....</b>	<b>49</b>
4.2 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	50
4.3 CONCLUSÃO DO CAPÍTULO .....	58

<b>5 DETERMINAÇÃO DE HORMÔNIOS FEMININOS EM ÁGUA A PARTIR DE EXTRAÇÃO COM PONTEIRA DESCARTÁVEL COM DETECÇÃO POR HPLC-DAD-FL .....</b>	<b>59</b>
5.1 INSTRUMENTAÇÃO.....	59
5.2 REAGENTES .....	59
5.3 PROCEDIMENTOS .....	60
<b>5.3.1 Otimizações.....</b>	<b>60</b>
<b>5.3.2 Curva analítica e figuras de mérito .....</b>	<b>62</b>
<b>5.3.3 Análise estatística .....</b>	<b>62</b>
5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	62
<b>5.4.1 Otimização dos solventes de dessorção .....</b>	<b>62</b>
<b>5.4.2 Otimização massa DPX .....</b>	<b>63</b>
<b>5.4.3 Otimização multivariada.....</b>	<b>64</b>
<b>5.4.4 Otimização da etapa de limpeza .....</b>	<b>65</b>
<b>5.4.5 Efeito de sal.....</b>	<b>66</b>
<b>5.4.6 Parâmetros analíticos .....</b>	<b>67</b>
5.5 CONCLUSÃO DO CAPÍTULO.....	70
<b>6 QUANTIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DE ESTRÓGENOS EM ÁGUAS UTILIZANDO ESPECTROSCOPIA NIR E UV AUXILIADA POR MRC-ALS E CALIBRAÇÃO NÃO LINEAR. 71</b>	<b>71</b>
6.1 MATERIAIS E MÉTODOS .....	71
<b>6.1.1 Reagentes .....</b>	<b>71</b>
<b>6.1.2 Instrumentação .....</b>	<b>71</b>
<b>6.1.3 Procedimento.....</b>	<b>71</b>
6.2 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	72
6.3 CONCLUSÃO DO CAPÍTULO.....	80
<b>7 DETERMINAÇÃO INDIVIDUAL DOS HORMÔNIOS EM ÁGUA UTILIZANDO ESPECTROSCOPIA UV E SVM. ....</b>	<b>81</b>
7.1 MATERIAIS E MÉTODOS .....	81
<b>7.1.1 Reagentes .....</b>	<b>81</b>
<b>7.1.2 Instrumentação .....</b>	<b>81</b>

<b>7.1.3 Procedimento .....</b>	<b>81</b>
<b>7.2 RESULTADO E DISCUSSÃO.....</b>	<b>82</b>
<b>7.3 CONCLUSÕES DO CAPÍTULO.....</b>	<b>85</b>
<b>8 CONCLUSÃO GERAL .....</b>	<b>86</b>
<b>9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>87</b>







## 1 INTRODUÇÃO

Os micropoluentes, mesmo em concentrações muito baixas, causam efeitos adversos aos organismos a eles expostos. Dentre os micropoluentes estão os desreguladores endócrinos, (EDCs, do inglês *Endocrine Disruptor Compounds*), que podem ser de origem natural ou sintética, e são capazes de interferir no sistema endócrino (Otomo, 2010). Esta classe de poluentes é resistente ao sistema de tratamento convencional e continua presente na água. Como estes compostos normalmente se encontram em concentrações a nível traço, é preciso realizar um preparo de amostra utilizando técnicas sensíveis em uma etapa anterior à sua determinação/quantificação (Masters, 2001).

O preparo de amostra procura isolar e concentrar os analitos, bem como obter uma condição de limpeza, pois realizar análises em matrizes complexas de forma direta se torna inviável devido à presença de interferentes e incompatibilidade com a maioria dos equipamentos (Merib et al., 2013). Dentre as técnicas de preparo de amostra destaca-se a microextração em fase sólida (*SPME*, do inglês *Solid Phase Microextraction*), que apresenta uma série de vantagens como integração de extração e pré-concentração, não utilização de solvente e fácil acoplamento com cromatografia líquida e gasosa (Bruheim; Liu e Pawliszyn, 2003). No entanto, a SPME apresenta algumas limitações como longos tempos de extração, efeito de memória na fibra e custo relativamente alto frente algumas técnicas que estão surgindo (Oliveira et al., 2008). Neste contexto destacam-se as técnicas de extração em ponteira descartáveis (DPX, do inglês *disposable pipette extraction*) e a microextração em fase sólida por filme fino (TF-SPME, do inglês *Thin-Film Microextraction*) (Pinto e Queiroz, 2015).

A DPX utiliza baixos volumes de solvente orgânico em um processo de extração rápido e eficiente que proporciona resultados satisfatórios em termos de concentração dos analitos presentes (Pinto e Queiroz, 2015). A TF-SPME acoplado ao sistema de placas com 96 poços, possibilita o preparo de noventa e seis amostras simultaneamente.

As técnicas de preparo de amostras podem ter suas condições de extração/concentração dos analitos otimizadas através de planejamento e otimização de experimentos, uma das diversas frentes de pesquisa da quimiometria, definida como aplicação de métodos matemáticos e estatísticos a dados químicos com o intuito de extrair uma maior quantidade de informações relevantes, melhores resultados, possibilitar o trabalho com uma grande quantidade de dados de forma simultânea e

também pode ser utilizada na quantificação utilizando métodos ópticos (Bruns e Faigle, 1985).

A quimiometria foi dividida em diversas frentes de pesquisas e aplicações como o processamento de sinais analíticos, planejamento e otimização de experimentos, reconhecimento de padrões e classificação de dados, calibração multivariada e métodos de inteligência artificial (Otto, 1999). Dentre estas, neste trabalho de mestrado serão utilizados o planejamento e otimização de experimentos, com o intuito de obter um melhor rendimento com o menor consumo de reagentes na etapa de preparo das amostras. Também será utilizado o processamento de sinais analíticos e um método de inteligência artificial, com o objetivo de propor metodologias analíticas alternativas para determinação de hormônios em água utilizando espectroscopia molecular nas regiões do ultravioleta e visível (UV-Vis, do inglês *Ultraviolet-Visible*) e infravermelho próximo (NIR do inglês *Near Infrared*). Alguns micropoluentes foram determinados através do preparo de amostra e espectroscopia NIR empregando o processamento de sinais analíticos em calibração pseudo-univariada. As vantagens vinculadas a esta proposta incluem o custo inferior destes equipamentos analíticos, o tempo de análise reduzido significativamente e a não destruição das amostras.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 AMOSTRA

A água é um dos recursos mais utilizados pelos seres vivos. Com o aumento da população, das indústrias e produção agrícola esse consumo vem aumentando ainda mais e como recurso natural renovável sua qualidade vem sendo questionada. Em contrapartida, vem-se gerando mais resíduos e consumindo-se mais agrotóxicos, que muitas vezes são descartados de maneira irregular e sendo muito prejudiciais para o ecossistema mesmo em concentração muito baixas (Bila e Dezotti, 2007).

A água pode ser encontrada em diferentes estados físicos, mas apenas uma pequena porção do montante que existe na terra é considerada própria para uso. Este recurso, de fundamental importância para manutenção da vida está sendo um recurso cada vez mais limitado, fazendo-se necessário um grande cuidado com sua qualidade. A qualidade da água pode ser definida como sendo um conjunto das características físicas, químicas e biológicas, e atualmente é um dos tópicos mais relevantes na química ambiental (Merten e Minella, 2002).

Com o avanço da tecnologia e nas técnicas de análise, também aumentou a preocupação e a pesquisa com micropoluentes. Estes são encontrados no meio ambiente em concentrações da ordem de nanograma por litro e, apesar de estarem em concentrações muito baixa, podem produzir efeitos adversos aos organismos expostos, sendo muitos dos micropoluentes não totalmente biodegradáveis. Uma classe de compostos que se enquadra nesses aspectos são os EDCs (Bila e Dezotti, 2007).

### 2.2 DESREGULADORES ENDÓCRINOS

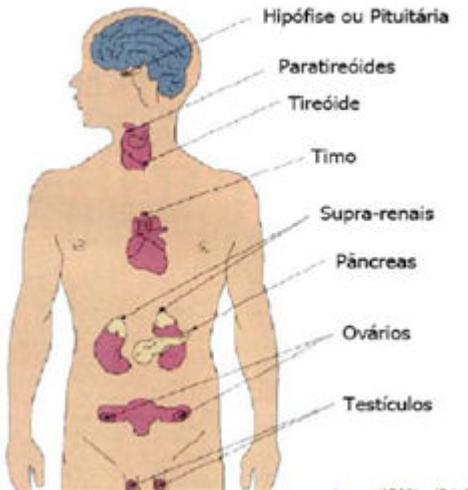
A origem da hipótese da ação dos EDCs teve início entre os anos de 1940 a 1970, observando o aparecimento de câncer no sistema reprodutivo de filhas de mulheres que utilizaram o dietilestilbestrol na gravidez. Nesse mesmo período de tempo observou-se anomalias no sistema reprodutivo de jacarés na Flórida e diminuição da qualidade do sêmen de homens na Dinamarca (Bila e Dezotti, 2007).

Os EDCs são conceituados pela Comissão Européia como qualquer composto ou agente exógeno que fomentam efeitos prejudiciais no sistema endócrino, podendo ser na síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação, no organismo contaminado ou suas futuras gerações (Billa e Dezzoti, 2007; Ghiselli e Jardim, 2007). Esses efeitos prejudiciais podem levar ao desenvolvimento de doenças como câncer,

desenvolvimento sexual anormal, como por exemplo, a redução da fertilidade masculina ou aumento nas chances de a mulher desenvolver ovário policístico. Essas substâncias também são prejudiciais ao desenvolvimento e reprodução de animais (Schiavini; Cardoso e Rodrigues, 2011).

As glândulas endócrinas, distribuídas em diferentes áreas do corpo conforme ilustrado na Figura 1, são responsáveis pela produção e excreção dos hormônios na corrente sanguínea. Esses hormônios podem estar na forma livre ou conjugada a proteínas, podendo se ligar a receptores específicos e alterar seu funcionamento. Os receptores podem então acarretar a produção de proteínas ou hormônios, podendo atuar no órgão em que foi criado ou em outro, dependendo da necessidade. Os hormônios atuam controlando níveis de composição no sangue, uso e armazenamento de energia, características sexuais, entre outras (Otomo, 2010).

**Figura 1.** Representação do sistema endócrino humano.



Fonte: Adaptação de Otomo 2010.

No corpo humano existem 50 tipos de hormônios, se diferenciando pelas suas estruturas (Schiavini; Cardoso e Rodrigues, 2011). Os estrógenos vêm sendo alvo de várias pesquisas pois são compostos extremamente ativos biologicamente e estão relacionados a vários tipos de cânceres. O estrógeno sintético  $17\ \alpha$ -etinilestradiol (17-EE) é

amplamente utilizado como método contraceptivo e em terapias de reposição hormonal, os naturais são produzidos pelo corpo humano e encontrados em rios e mananciais por meio da excreção da urina e fezes (Otomo, 2010).

Existem diversas classes de substâncias que podem ser classificadas como EDCs, podendo apresentar estruturas distintas, entre quais destacam-se os pesticidas, alquilfenóis, bifenilas policloradas e hormônios (Ghiselli e Jardim, 2007).

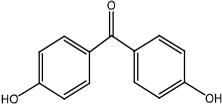
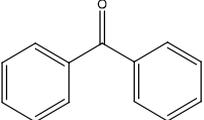
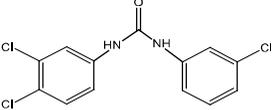
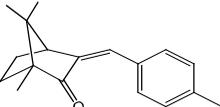
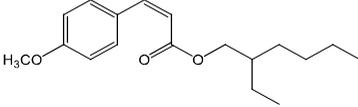
Dentre as bifenilas, uma substância muito utilizada é o bisfenol A (BFA), um monômero amplamente utilizado na fabricação de policarbonatos, embalagens em geral, resinas epóxi entre outras. A principal forma de contaminação humana por estes materiais é devido a não completa polimerização e fenômenos de lixiviação, fazendo com que o BFA seja liberado das embalagens para comida ou bebida. Também se encontra presente em efluentes e no esgoto domésticos devido sua grande utilização na indústria e por fazer parte de diversos utensílios domésticos. (Caballero-Casero; Lunar e Rubio, 2016; Ghiselli e Jardim, 2007).

Produtos químicos industriais como os filtros de ultravioleta (UV) também contém desreguladores endócrinos como benzofenona (BF), 4-metil benzilideno cânfora (4-MBC) e o etilhexil metoxicinamato (EHMC), estes podem chegar aos corpos de água de diferentes formas como efluentes industriais e esgoto doméstico. Por possuírem uma elevada estabilidade, tendem a ficar longos períodos no meio ambiente (Ekpeghere et al., 2016).

O antimicrobiano triclocarban (TCC) é amplamente utilizado em sabões, shampoos, cremes dentais e cremes em geral. No entanto, também é considerado um desregulador endócrino pois, constatou-se que alteraram o funcionamento do sistema reprodutor de ratos. Também é frequentemente detectado em rios e lagos, devido o descarte incorreto dos produtos de limpeza pessoal comumente utilizado no cotidiano (Guo et al., 2009).

A Tabela 1 apresenta as estruturas e respectivas constantes de dissociação referente aos analitos estudados neste trabalho para criação do método do Capítulo 4.

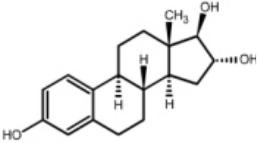
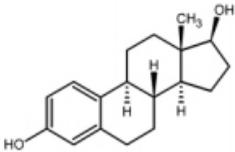
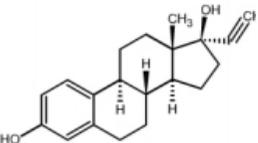
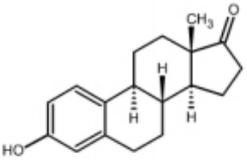
**Tabela 1** – Estrutura, Log  $K_{ow}$  e pKa dos analitos estudados.

Analitos	Estruturas	Log $k_{0/w}$	pKa
BPA		3,6	9,7
BF		3,2	
TCC		4,9	12,7
4-MBC		5,4	
EHMC		6,0	

Fonte: Adaptado de Kirschner (2017).

A persistência da atividade dos estrógenos em ambientes aquáticos é devido, na maioria dos casos, à disposição inadequada de esgoto sanitário e industrial, pelo déficit de infraestrutura em saneamento, coleta ou tratamento. A Tabela 2 mostra a estrutura química dos estrógenos e alguns parâmetros.

**Tabela 2** – Estrutura e constante de dissociação dos hormônios estrogênicos.

Analito	Fórmula estrutural	Log $K_{ow}$	pKa
EST		2,31	10,38
beta-EST		3,94	10,46
17-EE		4,12	10,40
ETR		3,43	10,34

Fonte: Autoria própria (2018).

Os estrógenos são usualmente analisados em água através das técnicas analíticas: cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD, do inglês *High Performance Liquid Chromatography - Diode Array Detection*), com detector de espectrometria de massas (LC-MS, do inglês *Liquid Chromatography - Mass Spectrometry*), com detector de fluorescência (LC-FL do inglês *Liquid Chromatography - Fluorescence*) e Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (GC-MS, do inglês *Gas Chromatography - Mass Spectrometry*). A Tabela 3, mostra essas e outras

técnicas menos usuais para a determinação de hormônios, juntamente com a técnica de preparo de amostra, tipo de amostra, faixa linear, recuperação e tempo de análise.

**Tabela 3** - Resumo dos métodos analíticos para quantificação de hormônios.

Pré Tratamento	Instrumentação	Estrogeno	Amostra	LOD (ng.L <sup>-1</sup> )	Recuperação (%)	Tempo de análise (min)	Referencia
Sucessivas extrações e clean-up, SPE (C18)	LC-MS/MS	beta-EST, EST, ETR e 17-EE	Lodo e sediment	50-200 e 100-500	15 - 87,9 e 48,1 - 96,7	10	(Chen et al., 2012)
SPE (C18)	UFLC – FLU	beta-EST, EST, ETR e 17-EE	Água do mar	2 - 23	88 – 103	10	(Lisboa et al., 2013)
DLLME	ELISA	betaEST e 17-EE	Rio e esgoto	0,22-1,2	77 – 120	70-75	(Lima et al., 2014)
HFLME	HPLC – DAD	beta-EST, EST, ETR e 17-EE	Ambiental e biológica	110-660	84,9 – 117,5	20	(Chen et al., 2013)
SPE(C18)	LC-LC-MS/MS	beta-EST, EST, ETR e 17-EE	Rio e esgoto	0,037-0,17 e 0,14-3,8	41 – 102	24,8	(Plotan et al., 2013)
No eletrodo	FIA-BDD amperométrico	ETR, betaEST e EST	Água de rio e torneira	270-27000	94 – 110	8,2 (com tratamento)	(Tapiero et al., 2002)
SPE (C18)	LVI-PTV-GC-MS	beta-EST, EST, ETR e 17-EE	Esgoto	1 para todos	94 – 120	15,5 - 25,5	(Ortiz Saraiba, 2007)
SPE (C18)	LC – DAD	E1, E2 e $\alpha$ -EE	Rio e torneira	50 - 170	75,5 – 92,5	15	(Collins et al., 2006)

SPE (C18)	LC – MS	beta-EST, EST, ETR e 17-EE	Rio e Esgoto	2-30 e 10-100	32 - 68 e 52 – 61	37	(Lanças, 2009)
SPE em linha (online)	HPLC – MS	beta-EST, EST, ETR e 17-EE	Rio	0,15-0,95	71,3 - 94,6	10	(Xiang et al., 2003)
SPE (C18)	HPLC – DAD	beta-EST, EST, ETR e 17-EE	Rio e esgoto	300-790	76,1 – 103,2	3	(Otomo, 2010)
DPX	HPLC – FL	beta-EST, EST, ETR e 17-EE	Rios	330 para todos	60,7- 89,9	20 com tratamento	Este trabalho
DPX	UV – NIR	Cada hormônio individual	Rios	30 - 2940	92,8 – 116,6	5 com tratamento	Este trabalho

Fonte: Adaptação Otomo (2010).

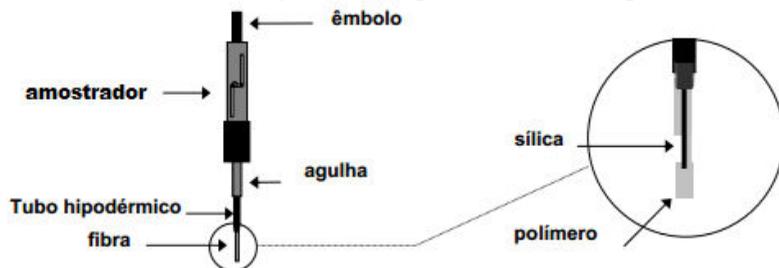
## 2.3 PREPARO DE AMOSTRA

A análise de amostras complexas é muito importante na química. No entanto, essas amostras apresentam interferências e incompatibilidades com a maioria dos instrumentos analíticos. Para solucionar este inconveniente é necessária uma etapa, antes de efetuar as análises, chamado de preparo de amostra, na qual se procura isolar, concentrar os analitos e obter uma condição de limpeza (Merib e Carasek, 2013).

Dentre as técnicas mais utilizadas para extração ou pré-concentração de compostos presentes em amostras complexas estão a extração líquido-líquido (LLE, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*) e a extração em fase sólida (SPE, do inglês *Solid Phase Extraction*). Entretanto, as novas tendências indicam a necessidade da utilização de menores quantidades de reagentes e solventes, gerando menos resíduos e diminuindo o custo do processo (Merib e Carasek, 2013). Tendo em vista este objetivo, vem sendo desenvolvidas diversas técnicas de preparo de amostras, dentre as quais pode-se destacar a microextração em fase sólida (SPME) (Oliveira et al., 2008).

Os processos de extração na técnica de SPME ocorrem através da distribuição dos analitos entre a fase extratora (fibra) e a matriz, quando a fase extratora é exposta à amostra para extrair os analitos. Quanto maior a afinidade do analito com a fase extratora em relação a matriz, maior será a quantidade extraída (Bagheri; Es'haghi e Mohammadkhani, 2013). A fibra conta com um suporte de sílica fundida acondicionada dentro de uma espécie de agulha em um suporte semelhante a uma seringa (Nawala et al., 2016), como representado na figura 2.

**Figura 2** - Amostrador, êmbolo, agulha, tubo hipodérmico e fibra exposta.



Fonte: Adaptado de Sigma-Aldrich (2018).

O processo de extração pode ser feito de maneira direta ou indireta. O modo direto, também conhecido como microextração em fase sólida por imersão direta (DI-SPME) é empregado para extração de analitos não voláteis em amostra menos complexas. O processo de extração indireto, denominado microextração em fase sólida no *headspace* (HS-SPME) é empregado para analitos voláteis, já que a fibra não entra em contato com a matriz. De um modo geral a SPME apresenta algumas desvantagens como longos tempos de extração e efeito de memória na fibra, fragilidade da fibra, pequena quantidade de fase extratora que pode ser utilizada para recobrir o suporte, e custo relativamente alto frente algumas técnicas que estão surgindo (Bagheri; Es'haghi e Mohammadkhani, 2013). Tais técnicas vêm sendo desenvolvidas visando a simplificação e a redução do uso de solventes orgânicos, gerando assim menores quantidades de resíduos. Dentre as técnicas destaca-se a técnica de extração em ponteiros descartáveis (Pinto e Queiroz, 2015). Além disso modificações foram propostas para aumentar a eficiência e seletividade da SPME, como por exemplo, apresentando-a em uma nova configuração chamada de filme fino (TF-SPME) (Mirnaghi et al., 2011).

### 2.3.1 Microextração em fase sólida por filme fino

Na TF-SPME a fase extratora está revestindo um filme fino e não uma haste como na forma tradicional, permitindo assim o aumento do seu volume e da relação área-volume, melhorando a eficiência de extração e sensibilidade da técnica (Bruheim; Liu e Pawliszyn, 2003). Esta técnica se fundamenta na teoria cinética da extração, como é mostrado na equação 1:

$$t_{95\%} = 3 \frac{\delta K_{es}(b-a)}{D} \quad (1)$$

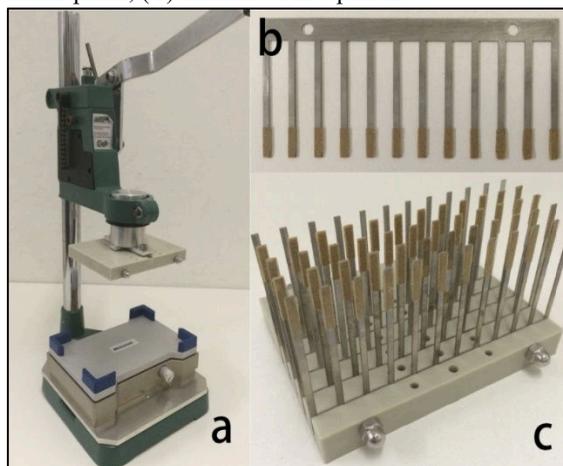
No qual  $K_{es}$  é o coeficiente de partição,  $t_{95\%}$  é o tempo de extração,  $b - a$  é a espessura da fase extratora,  $D$  é coeficiente de difusão e  $\delta$  é a espessura da camada limite. Quanto menor a espessura do filme empregado como fase extratora, menor será o tempo necessário para que ocorra o equilíbrio entre as fases. O aumento da área superficial possibilita um aumento na transferência de analito para o sorvente, como expressado na equação 2 (Jiang e Pawliszyn, 2012).

$$\frac{dn}{dt} = \left(\frac{DA}{\delta}\right) C_s \quad (2)$$

Onde  $dn/dt$  é a taxa de extração,  $DA$  é a área superficial da fase extratora e  $C_s$  é a concentração do analito na amostra.

Esta técnica pode ser usada em diversos formatos de amostragem, mas a mais interessante é a acoplada com um sistema de placas de 96 poços (96-Well plate), assim fornecendo a preparação simultânea de 96 amostras (Morés; Dias e Carasek, 2017).

**Figura 3** – Sistema semi-automático de 96 poços. (A) Sistema de agitação, (B) Pente com 12 pinos, (C) Sistema com 8 pentes.



Fonte: Adaptado de Mirnagui et al (2013).

A fase extratora escolhida para servir de revestimento deve ser analisada de acordo com o tipo de analito em questão, sendo a mais comumente relatada composta por polidimetilsiloxano (PDMS) e algumas fases misturadas (Chen et al., 2016). Encontra-se também relatos de uso de C18, C18-poliacrilonitrilo (PAN) entre outros (Morés; Dias e Carasek, 2017).

Contudo, diversos grupos de pesquisa vêm buscando o desenvolvimento de fase extratoras alternativas, com o intuito de aumentar a eficiência de extração, pois estes materiais podem ter uma melhor interação com os analitos que as fases comerciais e assim o custo de análise pode ser reduzido (Kirschner et al., 2017).

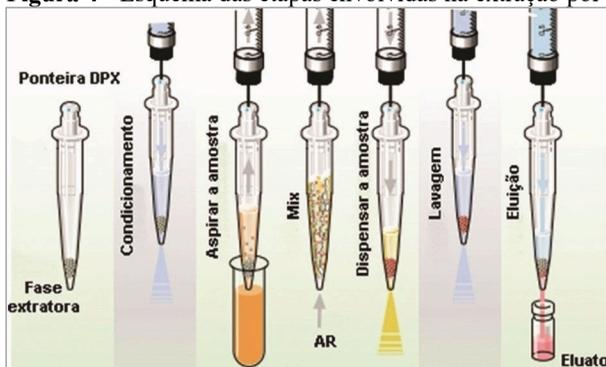
Alguns aspectos devem ser considerados, Na busca por novos sorventes, tais como a melhora na seletividade e a estabilidade térmica (Augusto e Carasek, 2010). Um dos materiais com potencial para aplicação como sorvente em técnicas de extração é a Terra diatomacia

(Kirschner et al., 2017). O preparo do filme fino pode ser feito de várias maneiras como imersão, espalhamento, pulverização, rotação e eletrocutamento (Jiang e Pawliszyn, 2012).

### 2.3.2 Extração Com Ponteira Descartáveis

A DPX pode ser considerada outra variação da técnica de extração em fase sólida (SPE) e da extração em fase sólida dispersiva (D-SPE). Entretanto, a DPX, em comparação com as referidas técnicas, permite a sorção e dessorção dos analitos requerendo menos massa de material sorvente, minimizando as etapas de condicionamento e acelerando o processo de preparo de amostra (Pinto e Queiroz, 2015).

**Figura 4** - Esquema das etapas envolvidas na extração por DPX



Fonte: Adaptado de Pinto e Queiroz (2015).

Para realização de uma extração por DPX, primeiro se deve condicionar a fase extratora para ativação dos sítios de ligações. Esta etapa deve ser otimizada pela escolha do solvente mais apropriado, visando sua maior eficiência. O solvente de lavagem é escolhido de acordo com a natureza química do sorvente, natureza do analito de interesse e nos possíveis interferentes. Em seguida, a escolha do solvente de eluição também deve ser feita levando em conta a natureza dos constituintes envolvidos em cada etapa. Em todas as etapas se devem aspirar ar subsequente ao material para que ocorra a mistura simultânea (Bordin et al., 2016).

Na técnica DPX o sorvente incluso na ponteira não é fixado; então, quando se aspira uma amostra juntamente com ar, ocorre uma mistura

dinâmica, fazendo com que se atinja o equilíbrio de sorção dos analitos rapidamente (Pinto e Queiroz, 2015).

### 2.3.2.1 Principais parâmetros a serem otimizados na extração por DPX

Além das características inerentes ao analito e fase extratora, alguns outros parâmetros devem ser considerados durante o desenvolvimento do método analítico de preparo de amostra empregando DPX, visando assim uma maior eficiência. Os principais parâmetros a serem otimizados são a quantidade de massa de fase extratora, solvente de dessorção, tempo, ciclos de extração, dessorção, limpeza, força iônica (Pinto e Queiroz, 2015).

#### 2.3.2.1.1 *Massa de fase extratora*

A relação entre a quantidade de fase extratora adicionada na ponteira de DPX está diretamente ligado a quantidade de analitos extraídos da amostra. Dessa forma, teoricamente, quanto maior a massa, maior será a quantidade de analitos extraídos. Entretanto, alguns parâmetros devem ser levados em conta, como, o volume da ponteira utilizada, para que se tenha espaço suficiente para a mistura dinâmica, e o volume de solvente de dessorção necessário para recobrir toda fase extratora (Corazza et al., 2017).

#### 2.3.2.1.2 *Solvente orgânico*

A escolha do solvente orgânico em um procedimento de DPX é uma etapa fundamental na otimização. O solvente selecionado deve possuir características como ser livre de interferentes, apresentar alta pureza, apresentar boa seletividade e alta eficiência de dessorção para os analitos de interesse, sendo assim capaz de retirar os analitos extraídos (Psillakis e Kalogerakis, 2003).

#### 2.3.2.1.3 *Tempo de extração, dessorção e limpeza*

O tempo de extração tem um papel fundamental, pois está ligado diretamente a frequência analítica do método, sendo usual se começar utilizando trinta segundos em cada etapa (Pinto e Queiroz, 2015). No entanto, este parâmetro precisa ser otimizado buscando a maior eficiência possível, considerando que o tempo para se atingir o equilíbrio é diferente

em cada etapa. Como nesta técnica ocorre a mistura dinâmica em cada etapa, devido a aspiração de ar, a mudança de poucos segundos pode provocar grandes diferenças (Pinto e Queiroz, 2015).

#### *2.3.2.1.4 Número de ciclos*

O número de ciclos é referente a quantidade de vezes que a amostra será aspirada para dentro da ponteira e descartada, sendo aplicada na extração, dessorção e limpeza. Na limpeza, em cada ciclo ocorre a sucção de uma nova alíquota com o intuito de retirar todos os analitos restante da dessorção para que não ocorra efeito de memória. Já na dessorção se utiliza a mesma alíquota para concentrar os analitos no eluente. Na extração pode-se utilizar tanto uma nova alíquota por ciclo ou a mesma, mudando apenas a quantidade de amostra utilizada e o fator de concentração (Corazza et al., 2017).

#### *2.3.2.1.5 Força iônica*

A variação da força iônica pode ser avaliada pela adição do cloreto de sódio em diversas concentrações. Este é um parâmetro importante para a extração por DPX, pois com o acréscimo de sal pode-se aumentar ou diminuir a quantidade extraída. Em analitos mais polares ocorre a diminuição da solubilidade destes na fase aquosa, aumentando portanto a eficiência de extração, devido ao efeito da adição de sal (Psillakis e kalogerakis, 2003). Isso ocorre pois acontece um mecanismo de competição entre as os analitos e os íons adicionados, pela hidratação da fase doadora (amostra), assim restando mais analitos livres em solução (Ulrich, 2000). Em contrapartida, em moléculas apolares a adição de sal pode causar um efeito negativo, pois aumenta a viscosidade da amostra, prejudicando a mobilidade dos analitos, e dificultando a difusão para a fase extratora. (Shen e Lee, 2002; Ugland; Krogh e Reubsæet, 2003).

#### *2.3.2.1.6 Ajuste de pH*

O pH é outro fator que pode influenciar a extração em técnicas de preparo de amostra. Somente espécies na forma não dissociada de um composto com caráter ácido ou básico podem ser extraídas pela fase extratora da DPX. Para isso, deve-se ajustar o pH em um valor de pelo menos 1,5 unidades menor em relação ao pKa para espécies ácidas e, em 1,5 unidades acima em caso de espécies básicas. (Esrafilí; Yamini e Shariati, 2007).

## 2.4 QUIMIOMETRIA

A quimiometria pode ser definida como a pesquisa e utilização de métodos matemáticos e estatísticos para o tratamento de dados químicos, de forma a extrair uma maior quantidade de informações e melhores resultados analíticos (Bruns e Faigle, 1985). Os métodos utilizados na quimiometria, a princípio, foram desenvolvidos em outras disciplinas, mas com a aplicação e pesquisas voltadas para o tratamento de dados químicos acabou dando origem a uma nova área, que inicialmente se incorporou à química analítica. Isso se deu após a segunda metade dos anos 60 com o surgimento de métodos instrumentais computadorizados para a análise química, que promoveu a geração de uma grande quantidade de dados (Bruns e Faigle, 1985).

Com o crescimento da quimiometria foram desenvolvidas novas ferramentas para tratamento de dados encontrando aplicações distintas conforme o objetivo do estudo como, por exemplo, a otimização de processos, a classificação de dados e as determinações quantitativas. Assim, a quimiometria foi dividida em diversas frentes de pesquisas e aplicações como o processamento de sinais analíticos, planejamento e otimização de experimentos, reconhecimento de padrões e classificação de dados, calibração multivariada e métodos de inteligência artificial (Otto, 1999).

### 2.4.1 Planejamento e otimização de experimentos

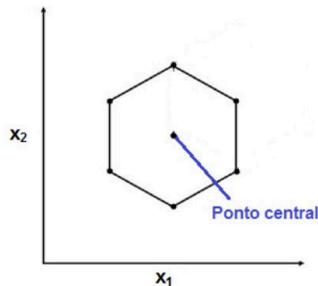
Estudos realizados de modo univariado avaliam apenas um parâmetro por vez e não levam em consideração a influência das interações entre as variáveis. (Bezerra et al., 2008). Com o intuito de superar este problema, vêm se utilizado métodos quimiométricos de planejamento e otimização de experimentos, onde é possível avaliar mais de um parâmetro simultaneamente. Entre os métodos quimiométricos de otimização multivariada, destaca-se a superfície de resposta (RSM, do inglês *Response Surface Methodology*).

A superfície de resposta tem como base o ajuste de uma equação polinomial aos dados experimentais, que possibilita descrever o comportamento desse conjunto de dados. Dessa forma, torna-se possível realizar previsões sobre a condição ótima a respeito dos parâmetros estudados, possibilitando a visualização da influência entre as variáveis (Bezerra et al., 2008).

A superfície de resposta pode ser construída utilizando diversos tipos de planejamentos multivariados, como planejamento composto central, planejamento fatorial, planejamento Box-Behnken e planejamento Doehlert.

O planejamento Doehlert pode ser utilizado para otimizar duas variáveis simultaneamente em diferentes níveis, onde a equação polinomial é gerada através de níveis situados nos vértices de um hexágono, sendo que uma variável pode, por exemplo, ser avaliada em 3 níveis ( $X_1$ ), e a outra em 5 níveis ( $X_2$ ), como demonstrado na figura 5 (Teófilo e Ferreira, 2006)

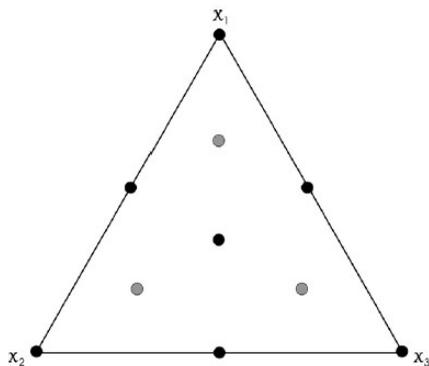
**Figura 5** - Planejamento Doehlert.



Fonte: Teófilo et al. (2006).

A superfície triangular pode ser utilizada para otimizar uma mistura de três componentes, Figura 6, para obter a superfície de resposta, onde cada vértice do triângulo representa um componente puro, ou seja, a proporção 1:0:0. No ponto situado entre os vértices ocorre uma mistura entre dois componentes na proporção de 1:1:0. No ponto central do triângulo tem-se a mistura de três componentes na proporção de 1:1:1.

**Figura – 6.** Superfície triangular utilizada para otimizar mistura de três componentes.



Fonte: Adaptado de Ferreira et al. (2007).

## 2.4.2 Calibração multivariada

O processo de calibração consiste em transformar os resultados registrados por determinado instrumento através de métodos matemáticos, em informação concreta, os modelos de calibração podem ser univariados ou multivariados. O primeiro é baseado em somente uma variável, e é usado quando existe uma variável seletiva que torna possível a previsão. Como este modelo requer ausência de interferentes, não pode ser utilizada para amostras complexas (Ferreira et al., 1999).

A calibração multivariada é baseada em mais de uma variável medida para cada amostra. Em calibrações de primeira ordem, por exemplo, um vetor de respostas instrumentais é obtido para cada amostra e seu uso é justificado quando não existe uma única variável seletiva (Ferreira et al., 1999; Pimentel e Barros, 1996). O método quimiométrico de calibração multivariada mais amplamente utilizado é o de mínimos quadrados parciais (PLS do inglês Partial least squares) (Geladi e Kowalski, 1986). Entretanto, para o emprego deste método é necessária uma grande quantidade de amostras e inclusão de todos os potenciais interferentes na etapa de calibração (Booksh e Kowalski, 1994). Os últimos anos vem sendo marcados pelo desenvolvimento de calibrações pseudo-univariadas, que torna possível a estratégia analítica de substituir a separação física das espécies pela separação quimiométrica de seus sinais analíticos. Dessa forma a quantidade de amostras necessária é semelhante à empregada em uma calibração univariada e os potenciais

interferentes não precisam estar presente na etapa de calibração uma vez que empregando-se métodos de resolução de sinais é possível isolar o sinal do analito de interesse na mistura de sinais obtidos (Ribeiro et al., 2017).

### 2.4.3 Método multivariado de resolução de curvas com mínimos quadrados alternantes

Um dos métodos mais difundido na área de resolução de sinais analíticos é o método de resolução de curvas com mínimos quadrados alternantes (MCR-ALS, do inglês *Multivariate Curve Resolution- Partial least squares*). Este é um método bilinear que assume que os espectros observados são uma combinação linear dos espectros dos componentes puros no sistema (Piqueiras et al., 2011). O modelo baseia-se numa matriz de espectros **D**, uma matriz **C** das quantidades ou concentrações relativas, uma matriz **S<sup>T</sup>** dos espectros puros e uma matriz **E** associada com ruído ou erro experimental (Juan e Tauler, 2003).

$$\mathbf{D} = \mathbf{C}\mathbf{S}^T + \mathbf{E} \quad (4)$$

O método quimiométrico MCR-ALS possibilita resolver misturas de sinais, recuperando valores de concentração relativa e os espectros puros. Para empregar o MCR-ALS em uma calibração pseudo-univariada, a matriz **C** é plotado contra os valores de concentração previamente conhecidos.

Este modelo baseia-se em métodos computacionais e estatísticos com o intuito de isolar as fontes de variação em conjuntos de dados experimentais. O cálculo realizado pelo mínimos quadrados alternados (ALS) busca o resultado que apresenta o melhor ajuste, ou seja, é realizado uma otimização que permite recuperar perfis de concentrações individuais e sinais das espécies que melhor explicam a divergência dos dados observados (Março et al., 2004).

Para a realização do processo de otimização de maneira mais eficiente é necessário o conhecimento dos sinais ou das concentrações dos componentes puros presente na matriz de dados. Porém muitas vezes não é possível se ter acesso as estas informações, então pode-se estimar tais fatores. Para isto diferentes estratégias podem ser aplicadas como o PCA (Análise de componentes principais) ou ICA (Análise de componentes independentes) que são consideradas análises exploratórias e possuem o intuito de conhecer quantas substâncias diferentes estão presentes (Março et al., 2004).

A deficiência de rank ocorre quando o número distinguível de contribuições é menor que o número total de componentes químicos no conjunto de dados (Juan et al., 2004). Considerando a equação geral para o MCR-ALS, onde a matriz de dados espectrais  $\mathbf{D}$  (que contém uma mistura de sinais com contribuição de todos os constituintes presentes na amostra) é decomposta iterativamente pelo algoritmo de mínimos quadrados alternantes (ALS) em um produto de duas matrizes: uma matriz  $\mathbf{C}$  correspondente aos perfis de concentração puros e uma matriz  $\mathbf{S}^T$  contendo os perfis espectrais puros dos constituintes presentes na mistura de sinais, equação  $\mathbf{X}$ , deficiências de rank podem estar relacionada a  $\mathbf{C}$  ou a  $\mathbf{S}^T$ . Quando os constituintes apresentam perfil espectral idêntico observa-se deficiência de rank relacionada a  $\mathbf{S}^T$  (Juan et al., 2004).

Algumas vantagens da calibração pseudo-univariada incluem possibilidade de quantificar o analito na presença de interferentes mesmo que estes interferentes não estejam presentes na etapa de calibração (Sena et al., 2007). Outra vantagem muito significativa é a possibilidade de utilizar uma quantidade reduzida de amostras na calibração. Além disso, o modelo é montado em uma forma matemática mais simples (Março et al., 2004).

O método quimiométrico MCR-ALS já foi empregado em calibrações pseudo-univariadas a partir de dados obtidos por espectroscopia Raman (Mamián-López; Poppi, 2013), HPLC (Rodríguez-Cuesta, 2005), espectroscopias UV-Vis e fluorescência de emissão (Goicoechea; Olivieri e Tauler, 2010).

#### **2.4.4 Modelos não lineares.**

Em calibrações univariadas e multivariadas através do método PLS e pseudo-univariadas através do método MCR-ALS, os modelos desenvolvidos são modelos lineares, ou seja, encontra-se uma função matemática linear que relacione as medidas realizadas por um instrumento ( $y$ ) com o parâmetro de interesse ( $x$ ).

Quando os resultados não se ajustam a uma função matemática linear, métodos como as máquinas de vetores de suporte (SVM) e redes neurais artificiais (AAN).

#### **2.4.5 Redes neurais artificiais**

As redes neurais são desenvolvidas para imitar o processamento de informação do cérebro humano, assim são consideradas um método

eficiente para calibração multivariada, pois são capazes de adquirir informações relevantes e formar modelos, mesmo diante de dados complexos, não-linearidade e contaminantes. (Zampronio; Rohwedder e Poppi, 2001).

O intuito das redes neurais é mapear um conjunto de padrões de entrada e correlacionar com o conjunto de padrões de saída. Esse mapeamento é realizado aprendendo com uma série de exemplos anteriores. A rede, então, aplica o que aprendeu a um novo padrão de entrada, assim possibilitando prever a saída apropriada (Zampronio; Rohwedder e Poppi, 2001).

Modelos matemáticos com grande capacidade de aproximação, como as redes neurais artificiais, ainda não possuem algoritmos de treinamento capazes de maximizar a capacidade de generalizar de uma forma sistemática, levando assim a um sobre-ajuste (López-López; Castellote-Bargalló e López-Sabater, 2001).

#### 2.4.6 Máquina de vetor de suporte

O SVM atuam na otimização de uma função quadrática que possui apenas um mínimo e isto permite, como principal vantagem em sua aplicação quando comparada às redes neurais (onde a função objetivo possui vários mínimos locais), elevada capacidade de generalização, o que se traduz em uma medida da eficiência na previsão de dados que não pertençam ao conjunto utilizado para a etapa de calibração. O modelo não linear obtido por SVM é descrito pela equação 5 (Ferrão et al., 2007):

$$y = \sum_{i=1}^N \alpha_i K(x_i x) + e \quad (5)$$

Em que,  $\alpha$  são multiplicadores de Lagrange,  $K$  é a função Kernel e “ $e$ ” é um bias (erro).

A função Kernel ( $K$ ) representa a relação entre o dado de entrada e a propriedade de saída a ser modelada (Thissen et al., 2004). A função Kernel mais comumente utilizada é a função radial de base (RBF) (Haykin, 2001):

$$K = \exp\left(-\|x_i - x\|^2 / 2\sigma^2\right) \quad (6)$$

O ajuste do parâmetro de variância ( $\sigma^2$ ) muda o grau da não linearidade que pode ser modelada. Conforme  $\sigma^2$  aumenta, a função Kernel força o modelo para uma solução mais linear (Cogdill e Dardenne, 2004).

Calibrações não lineares a partir do método quimiométrico SVM foram empregadas utilizando espectroscopia NIR, por exemplo, na quantificação de adulterantes em leite em pó (Borin et al., 2006), na avaliação da qualidade de acerolas (Malegori et al., 2017), na quantificação de clorofila em frutos de pinheiros (Li et al., 2011), na quantificação de nitrogênio total, carbono orgânico e umidade em solos (Morellos et al., 2016), na determinação da quantidade de biodiesel no diesel (Alves e Poppi, 2013), e na previsão de acidez em uvas (Chauchard et al., 2004). Na literatura científica foi encontrada uma única referência onde ocorre o emprego de um método quimiométrico de resolução de sinais em conjunto com o método não linear SVM na avaliação da doença de Alzheimer (Yang et al., 2011).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GERAL

Determinar desreguladores endócrinos em águas empregando técnicas de preparo de amostra TF-SPME e DPX com detecção por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência (HPLC-DAD-FL) e oferecer uma metodologia alternativa a partir de espectroscopia UV-Vis-NIR com auxílio de métodos quimiométricos.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Utilizar a técnica TF-SPME, previamente otimizada, para concentração dos desreguladores endócrinos bisfenol A (BFA), 3-(4-metilbenzilideno) cânfora (4-MBC), 2-ethylhexyl-*p*-methoxycinnamate (EHMC), benzofenona (BF) e triclorocarban (TCC) em água;
2. Propor uma metodologia analítica alternativa empregando espectroscopia NIR com auxílio do método de resolução de sinais MCR-ALS na quantificação de BFA, 4-MBC, EHMC, BF e TCC;
3. Desenvolver e otimizar uma metodologia para concentração dos hormônios desreguladores endócrinos estrona (ETR), 17  $\beta$ -estradiol (betaEST), estriol (EST) e 17 $\alpha$ -etinilestradiol (17-EE) em água utilizando a técnica de extração com ponteira descartáveis;
4. Utilizar otimização multivariada, a fim de obter superfícies de respostas que indiquem as melhores condições de trabalho;
5. Quantificar os hormônios utilizando HPLC-FL;
6. Determinação dos parâmetros analíticos de mérito para a metodologia proposta neste trabalho;
7. Propor uma metodologia analítica alternativa empregando espectroscopia UV-Vis e NIR com auxílio do método quimiométrico MCR-ALS e das máquinas de vetores de suporte (SVM) na quantificação dos hormônios.

## 4 DETERMINAÇÃO DE MICROPOLUENTES EMERGENTES POR NIR PELA TÉCNICA TF-SPME ACOPLADO COM O SISTEMA DE PLACAS DE 96 POÇOS E CALIBRAÇÃO PSEUDO-UNIVARIADA

Neste estudo está apresentado o desenvolvimento de um modelo de calibração pseudo-univariada para determinação dos micropoluentes emergentes bisfenol A (BFA), 3-(4-metilbenzilideno) cânfora (4-MBC), 2-ethylhexyl-*p*-methoxycinnamate (EHMC), benzofenona (BF) e triclorocarban (TCC) em água. Para tanto, foi utilizada a metodologia de preparo de amostra TF-SPME acoplada com o sistema semi-automático de 96 poços otimizado por (Kirscher et al., 2017). A partir do modelo pseudo-univariado desenvolvido, foi determinada a faixa linear de trabalho e os resultados de exatidão (recuperação) foram comparados com os resultados obtidos por HPLC-DAD.

### 4.1 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 4.1.1 Reagentes

Padrões Sigma- Aldrich. Acetonitrila (grau HPLC), Metanol (grau HPLC) e água U.P.. Amostrador automático 96 well-plate. Poços de extração de 1500  $\mu\text{L}$  e poços de dessorção de 300  $\mu\text{L}$ . Vials de 1500  $\mu\text{L}$ . Terra diatomácea reciclada. Cloreto de sódio P.A. (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil).

#### 4.1.2 Instrumentação

Os processos de otimização e preparo da amostra por TF-SPME foram feitos segundo Kirschner et al., (2017). Na análise cromatográfica foi empregado um cromatógrafo líquido da Shimadzu LC-20AT, com detector de arranjo de diodos e coluna Eclipse XDB – C18 da Agilent. Utilizou-se fluxo de 1 mL  $\text{min}^{-1}$ , volume de amostra injetada de 20  $\mu\text{L}$  e corrida com 22 min. As condições cromatográficas começam em uma proporção de 50/50, e a partir de 4 min, começa um gradiente de solventes, onde a acetonitrila passa para 90% da solução. Em 17 min é retomada a proporção 50/50 dos solventes. Os analitos bisfenol A (BFA), 3-(4-metilbenzilideno) cânfora (4-MBC), 2-ethylhexyl-*p*-methoxycinnamate (EHMC), benzofenona (BF) e triclorocarban (TCC)

foram monitorados nos seguintes comprimentos de onda: 226- 298- 307- 255- 265 nm, respectivamente.

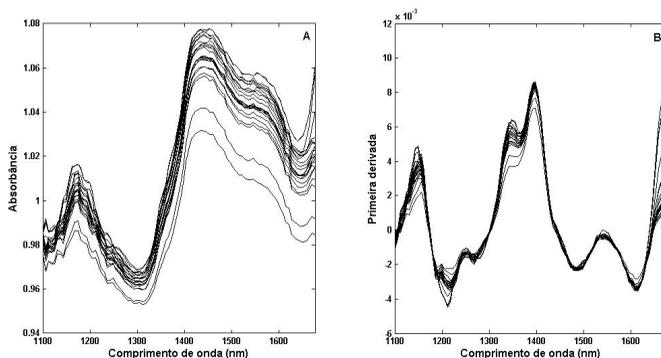
Os espectros NIR das amostras, antes e depois do preparo de amostra por meio da TF-SPME acoplado com o sistema de placas de 96 poços, foram adquiridos em um equipamentos JDSU MicroNIR® (UTFPR de Campo Mourão) na região de 1100-1662 nm usando uma cubeta de vidro. Para esta aplicação, o emprego da região espectral do UV tornou-se inviável tendo em vista o volume de amostra obtido após a etapa de seu preparo por TF-SPME.

Os espectros foram analisados usando o software MATLAB R2007b (The Mathworks Inc., MA, EUA) onde a calibração pseudo-univariada foi realizada pelo método MCR-ALS.

## 4.2 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os espectros NIR, após o preparo das amostras por TF-SPME acoplado com o sistema de placas de 96 poços e após a correção da linha de base espectral pelo algoritmo Savitsky-Golay (Savitzky e Golay, 1964; Ribeiro et al., 2017), através da primeira derivada (7 pontos e primeira ordem polinomial), são mostrados na Figura 7.

**Figura 7** - Espectros de NIR (A) após a preparação da amostra por TF-SPME acoplado com sistema de placas de 96 poços e (B) após a preparação da amostra por TF-SPME acoplado com sistema de placas de 96 poços e primeira derivada.



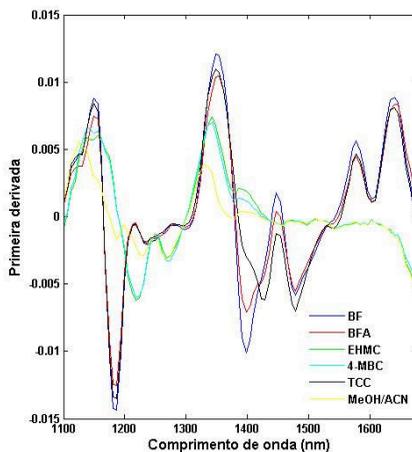
Fonte: Autoria própria (2018).

A partir dos dados espectrais após primeira derivada, estabeleceu-se o *rank* (número de espécies químicas diferentes presentes no sistema) igual a seis. Neste caso, o número de espécies químicas diferentes

presentes era conhecido e consistiu em BFA, 4-MBC, TCC, BF, EHMC e o solvente metanol/acetonitrila (MeOH/ACN).

Para a inicialização do método quimiométrico MCR-ALS uma estimativa inicial se faz necessária. Neste caso empregou-se como estimativa inicial uma matriz com os espectros puros das espécies químicas presentes no sistema, conforme Figura 8. Não foram aplicadas restrições durante o processo de resolução iterativa.

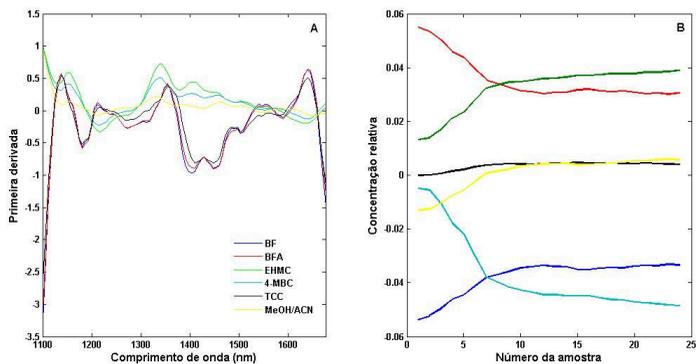
**Figura 8** - Primeira derivada dos espectros NIR para os analitos padrão (espectros puros).



Fonte: Autoria própria (2018).

Com a aplicação do MCR-ALS recuperou-se o perfil espectral puro dos constituintes do sistema e obteve-se um perfil de concentração relativa, como detalhado na Figura 9.

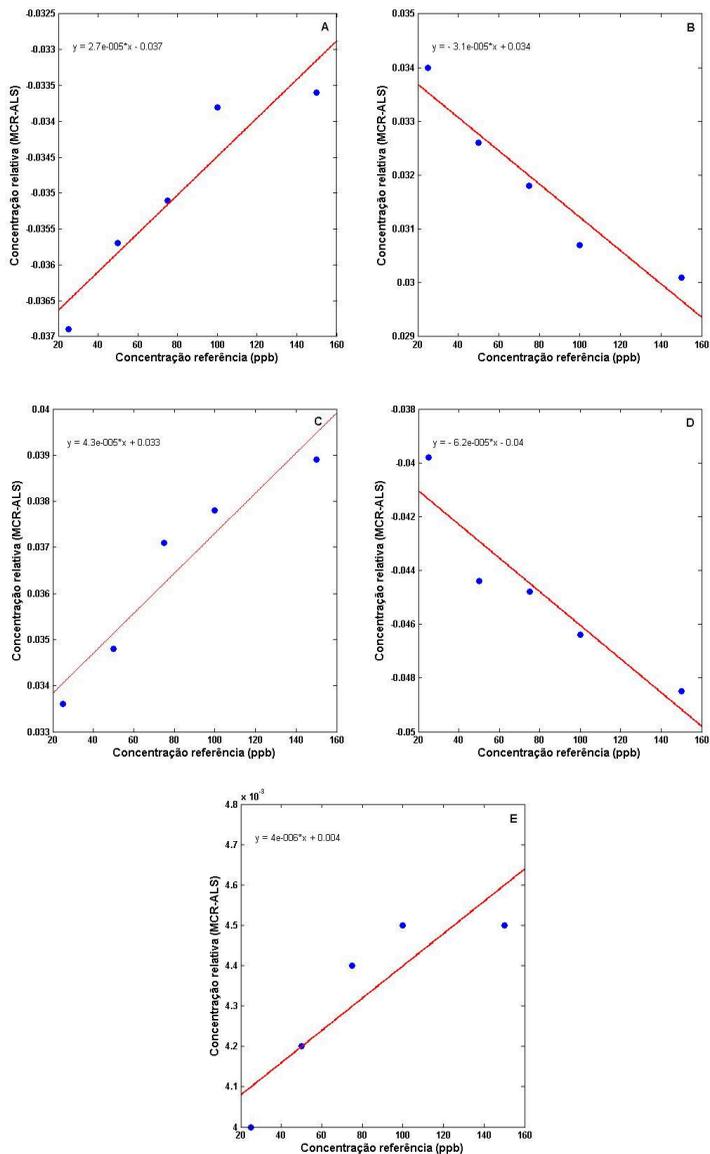
**Figura 9** - Resultados do MCR-ALS. (A) Perfis espectrais recuperados -  $S^T$ . (B) Perfis de concentração relativa -  $C$ .



Fonte: Autorial própria (2018).

O perfil de concentração relativa de cada um dos analitos foi utilizado para construir curvas de calibração pseudo-univariada Figura 10 através de uma regressão linear com a concentração de referência obtida por HPLC.

**Figure 10** - Curvas de calibração pseudo-univariada. (A) BF, (B) BFA, (C) EHMC, (D) 4-MBC, (E) TCC.



Fonte: Autoria própria (2018).

Na Figura 10 verifica-se um ajuste satisfatório nos modelos pseudo-univariados com coeficientes de correlação 0,8856; 0,9238; 0,9128; 0,8722 e 0,7872 para BF, BFA, EHMC, 4-MBC e TCC, respectivamente. Ao empregar esses modelos pseudo-univariados na determinação dos analitos na concentração de 50, 75 e 100 ppb, chegou-se a erros absolutos inferiores aos encontrados com a técnica de HPLC para BF e TCC. Para BFA, 4-MBC e EHMC, o erro absoluto foi inferior a 10 ppb. Estes resultados são apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4** - Comparação entre o método utilizando HPLC e NIR/MCR-ALS

<b>BF</b>								
Concentração de referência (ppb)	Área do pico	Modelo HPLC	Concentração adquirida por HPLC (ppb)	Erro absoluto	Concentração relativa	Modelo NIR/MCR-ALS	Concentração baseado no NIR/MCR-ALS (ppb)	Erro absoluto
50	9927,7	$y = 210,9 X + 5,2$	47,0	3,0	-0,03570	$y = 2,7 \times 10^{-5} X - 0,037$	48,1	1,9
75	13350		63,3	11,7	-0,03510		70,4	4,6
100	20526		97,3	2,7	-0,03430		100,0	0,0
<b>BFA</b>								
Concentração de referência (ppb)	Área do pico	Modelo HPLC	Concentração adquirida por HPLC (ppb)	Erro absoluto	Concentração relativa	Modelo NIR/MCR-ALS	Concentração baseado no NIR/MCR-ALS (ppb)	Erro absoluto
50	5610,3	$y = 165,2 X - 2007$	46,1	3,9	0,03260	$y = -3,1 \times 10^{-5} X + 0,034$	45,2	4,8
75	11031,7		78,9	3,9	0,03190		67,7	7,3
100	14964,3		102,7	2,7	0,03110		93,5	6,5
<b>EHMC</b>								
Concentração de referência (ppb)	Área do pico	Modelo HPLC	Concentração adquirida por HPLC (ppb)	Erro absoluto	Concentração relativa	Modelo NIR/MCR-ALS	Concentração baseado no NIR/MCR-ALS (ppb)	Erro absoluto
50	2986,2	$y = 66,65 X - 28,23$	45,2	4,8	0,03520	$y = 4,3 \times 10^{-5} X + 0,033$	51,2	1,2
75	5203,3		78,5	3,5	0,03650		81,4	6,4
100	7021,5		105,8	5,8	0,03770		109,3	9,3
<b>4-MBC</b>								

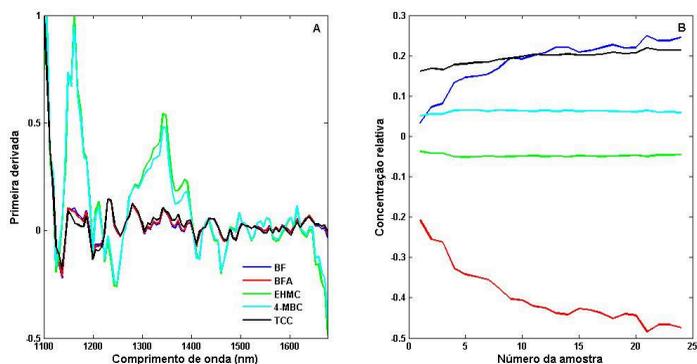
Concentração de referência (ppb)	Área do pico	Modelo HPLC	Concentração adquirida por HPLC (ppb)	Erro absoluto	Concentração relativa	Modelo NIR/MCR-ALS	Concentração baseado no NIR/MCR-ALS (ppb)	Erro absoluto
50	3110,8	$y = 97,21 X - 1749$	49,9	0,1	-0,04350	$y = -6,2 \times 10^{-5} X - 0,040$	56,4	6,4
75	4891,7		68,3	6,7	-0,04480		77,4	2,4
100	7377,8		93,9	6,1	-0,04630		101,6	1,6
<b>TCC</b>								
Concentração de referência (ppb)	Área do pico	Modelo HPLC	Concentração adquirida por HPLC (ppb)	Erro absoluto	Concentração relativa	Modelo NIR/MCR-ALS	Concentração baseado no NIR/MCR-ALS (ppb)	Erro absoluto
50	16030,0	$y = 286,6 X + 729,1$	53,4	3,4	0,00380	$y = 4,0 \times 10^{-6} X - 0,004$	50,0	0,0
75	22414,3		75,7	0,7	0,00430		75,0	0,0
100	27778,7		94,4	5,6	0,00441		102,5	2,5

Fonte: Autoria própria (2018).

Os resultados sugerem que a combinação da espectroscopia NIR, com o preparo de amostras por TF-SPME juntamente com sistema de placas de 96 poços, e MCR-ALS possibilita a quantificação de BF, BFA, EHMC, 4-MBC e TCC em amostras de água. A separação do sinal promovida pelo MCR-ALS permite que somente o sinal correspondente ao analito específico seja empregado na quantificação. Além disso, na quantificação destes micropoluentes por HPLC o preparo de amostra também se faz necessário. Portanto, empregando-se a técnica de espectroscopia NIR, foi necessária uma menor quantidade de solvente, portanto uma menor quantidade de resíduos foi gerada. Além disso, o tempo gasto para análise foi menor com a espectroscopia NIR em comparação com a técnica HPLC.

Para comprovar que o preparo de amostra era realmente importante para a quantificação de BF, BFA, EHMC, 4-MBC e TCC em amostras de água através da espectroscopia NIR, o conjunto de espectro NIR obtidos sem o preparo de amostra, foi submetido a primeira derivada e ao método quimiométrico MCR-ALS (nas mesmas condições, sem restrições, *rank* igual a seis). O perfil espectral recuperado pelo MCR-ALS mostrou algumas semelhanças apenas para EHMC e 4-MBC, Figura 11. No entanto, o perfil de concentração relativa para esses analitos mostrou-se constante, o que demonstra a impossibilidade de realizar a calibração pseudo-univariada sem o preparo de amostra para esses micronutrientes, neste intervalo de concentração.

**Figura 11** - Resultados do MCR-ALS para espectros NIR sem preparo de amostra. (A) Perfis espectrais recuperados -  $S^T$ . (B) Perfis de concentração -  $C$ .



Fonte: Autoria própria (2018).

### 4.3 CONCLUSÃO DO CAPÍTULO

Foi possível realizar a quantificação dos micropoluentes BF, BFA, EHMC, 4-MBC e TCC em amostras de água através da calibração pseudo-univariada com base no método quimiométrico de resolução de curvas MCR-ALS e na espectroscopia NIR, apenas quando a preparação das amostras foi realizada por TF-SPME acoplado com sistema de placas de 96 poços. A evolução da concentração relativa de cada micropoluente foi utilizada em uma regressão linear com a concentração de referência obtida pela técnica de HPLC-DAD. A quantificação dos analitos na concentração de 50, 75 e 100 ppb através das curvas de calibração pseudo-univariadas apresentou erros absolutos inferiores aos encontrados com a técnica de HPLC para BF e TCC. Para BFA, 4-MBC e EHMC o erro absoluto foi inferior a 10 ppb. Além disso, uma vez que a metodologia proposta utilizando-se NIR e MCR-ALS recuperou espectros puros e respectivas concentrações relativas para cada analito na mistura. É possível sugerir que esta metodologia pode fornecer a vantagem de segunda ordem (possibilidade de fazer previsões na presença de interferentes, mesmo que os possíveis interferentes não estejam presentes na etapa de calibração) com dados de primeira ordem gerados pela espectroscopia NIR.

## 5 DETERMINAÇÃO DE HORMÔNIOS FEMININOS EM ÁGUA A PARTIR DE EXTRAÇÃO COM PONTEIRA DESCARTÁVEL COM DETECÇÃO POR HPLC-DAD-FL

Este estudo traz a técnica de extração por ponteira descartável para o preparo de amostra visando a determinação de hormônios em amostras de água. O objetivo do estudo foi o desenvolvimento de uma metodologia para DPX que pudesse ser utilizados tanto no HPLC-FL quanto no UV e NIR. A otimização do procedimento de extração foi realizada por um planejamento multivariado composto central. As variáveis consideradas na extração foram massa da fase extratora, força iônica, tempo e número de ciclos de extração, processos de dessorção e limpeza. Na sequência, o método foi validado considerando alguns parâmetros analíticos e, por último, foi aplicado em amostras de água do rio São Francisco do Sul (RSFS) e lagoa do Peri (LP), localizados em Santa Catarina.

### 5.1 INSTRUMENTAÇÃO

As amostras foram analisadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (Prominence Shimadzu LC-20AT) com injetor manual (Rheodyne 7725i), sendo utilizado um detector de arranjo diodos (DAD) e Fluorescência (FL). A separação foi realizada empregando uma coluna em fase reversa sendo, a coluna de separação Phenomenex Kinetex C<sub>18</sub> (4.6 mm d.i x 25cm c x 5 µm d.p.) e a coluna de guarda analítica Phenomenex Kinetex C<sub>18</sub> (4mm d.i x 1,5 cm cx 5 µm d.p.). As condições cromatográficas utilizadas foram fase móvel gradiente com vazão de 1 mL min<sup>-1</sup> composta de água:acetonitrila (65:35, v/v), por 6 min, passando para (20:80, v/v) até 9 min, retornando então para condição inicial e finalizando a corrida em 15 min. O detector de fluorescência foi ajustado em comprimento de onda de excitação de 280 nm e comprimento de onda de emissão de 310 nm. Os dados cromatográficos foram analisados pelo software LC Solution (Shimadzu, Kyoto, Japan).

### 5.2 REAGENTES

Soluções estoque com concentrações de 1250, 1210, 1000 e 1000 mg L<sup>-1</sup> foram preparadas para cada um dos hormônios incluindo 17β-estradiol (betaEST), estrona (ETR), estriol (EST) e 17 α-etinilestradiol (17-EE) respectivamente. A partir destas soluções foi preparada uma solução de trabalho que incluía todos os hormônios, na concentração de 250 mgL<sup>-1</sup> em metanol (Sigma–Aldrich, St. Louis, USA), a qual foi

utilizada para fortificação das amostras aquosas nos experimentos de otimização e validação do método. Na avaliação da força iônica (*salting-out effect*) da amostra foi usado cloreto de sódio (Vetec, Rio de Janeiro, Brazil). Na adaptação das ponteiras (Technologies) de 1 mL, contendo 20 mg de RP (Estireno-divinilbenzeno), foram transferidas as 20 mg de FE da ponteira de 1 mL para a de 5 mL (Technologies).

### 5.3 PROCEDIMENTOS

A extração foi realizada injetando uma determinada mistura de solventes, extrator e dispersor, na matriz aquosa que contém os analitos a serem estudados. Os parâmetros analisados foram. Solvente extrator e dispersor, tempo de extração e dessorção, números de ciclos de extração, dessorção e limpeza, massa de solvente extrator e força iônica. Foram fixados alguns parâmetros antes das otimizações como volume de amostra para extração em 4 mL, volume de dessorção em 300  $\mu$ L.

#### 5.3.1 Otimizações

A fim de determinar a melhor condição para extração dos hormônios em água por DPX, foram realizadas otimizações univariadas e multivariadas. As otimizações univariadas foram utilizadas quando estudos anteriores apontaram que um determinado parâmetro influenciaria negativamente. Já as multivariadas tiveram como propósito analisar a influência de duas ou mais variáveis com o intuito de encontrar uma condição de compromisso.

1) **Otimização do solvente de dessorção:** foi realizada por meio da superfície ternária, na qual foram testados três solventes: água, acetonitrila e metanol. Esta otimização foi composta por 12 experimentos, nos quais são variadas as proporções de cada solvente, conforme Tabela 5. Os experimentos foram realizados em água ultra-pura a uma concentração de 250  $\mu\text{gL}^{-1}$  do mix dos hormônios e volume de 300  $\mu$ L de dessorção. Os dados experimentais foram processados usando o programa computacional Statsoft Statistica 8.0. Os dados foram plotados em função da desejabilidade e as respostas usadas foram as médias geométricas para cada experimento considerando as áreas cromatográficas dos quatro analitos. A Tabela 5 representa as proporções dos solventes de dessorção nos 12 experimentos.

**Tabela 5** - Volumes dos solventes de dessorção utilizados nos experimentos da superfície triangular.

<b>Experimentos</b>	<b>ACN (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>Metanol (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>Água (<math>\mu\text{L}</math>)</b>
1	300	0	0
2	0	300	0
3	0	0	300
4	150	150	0
5	150	0	150
6	0	150	150
7	200	50	50
8	50	200	50
9	50	50	200
10	100	100	100
11	100	100	100
12	100	100	100

Fonte: Autoria própria (2018).

2) **Massa de fase extratora:** A segunda otimização foi realizada de modo univariado, pois estudos préveis indicaram uma influência negativa. Para determinar a quantidade de fase extratora de estireno-divinilbenzeno a ser utilizada. Para este estudo foram testadas as massas de estireno-divinilbenzeno de 20 mg, 40mg e 60mg, pois cada ponteira comercial comporta 20 mg.

3) **Razão entre o tempo e o número de ciclos de extração:** Fixada a massa de fase extratora, foi realizada uma otimização multivariada para determinar a relação entre o tempo e o número de ciclos de extração. Nesta otimização utilizou-se um planejamento composto central do tipo Doehlert. Avaliou-se o número de ciclos em três níveis: (1, 2 e 3 ciclos) e o tempo de extração em cinco níveis, 15, 30, 60, 75 e 90 minutos.

4) **Razão entre o tempo e o número de ciclos de dessorção:** Outra otimização multivariada do tipo Doehlert foi realizada para determinação da razão do tempo e número de ciclos de dessorção. Os níveis avaliados para o tempo foram os mesmos da situação anterior. Já o número de ciclos foram avaliados em 1, 3 e 5 ciclos.

5) **Limpeza:** Para eliminar o efeito de memória, foi otimizados a etapa de limpeza do método. Foram utilizados o mesmo solvente, volume e tempo da etapa de dessorção, já que estes foram os mais eficientes para a retirada dos analitos da fase extratora. Nesta etapa foi realizada então a otimização univariada do número de ciclos necessário para limpeza, sendo testados 1, 3 e 5 ciclos.

6) **Efeito de sal:** Nesta etapa foi realizada uma otimização univariada da porcentagem de sal e seu efeito na eficiência da extração, foram testadas a adição de NaCl desde zero até 15%.

### 5.3.2 Curva analítica e figuras de mérito

A curva de calibração analítica foi construída, utilizando água de rio, fortificada com 8 diferentes concentrações dos analitos (betaEST, ETR, EST e 17-EE). A faixa de fortificação foi de 1-250  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Através da curva foi estudada a linearidade do método e determinada a faixa linear de trabalho. Os parâmetros analíticos de mérito estudados para validação do método foram limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ), precisão e exatidão.

Os LOD e LOQ foram calculados pelo primeiro ponto da curva e por meio da equação da reta. A exatidão do método foi verificada por meio de ensaios de recuperação (%) em dois níveis de concentração e todos os experimentos foram realizados em triplicata. O primeiro nível de fortificação foi de 5  $\mu\text{g L}^{-1}$  e o segundo nível de fortificação foi de 50  $\mu\text{g L}^{-1}$ , para todos os analitos estudados. Para os ensaios de precisão intradia (repetibilidade) foram realizados 3 níveis em triplicata. A precisão interdiária (interdia) foi verificada em 3 níveis em triplicata em três dias diferentes em uma amostra do rio São Francisco do Sul.

### 5.3.3 Análise estatística

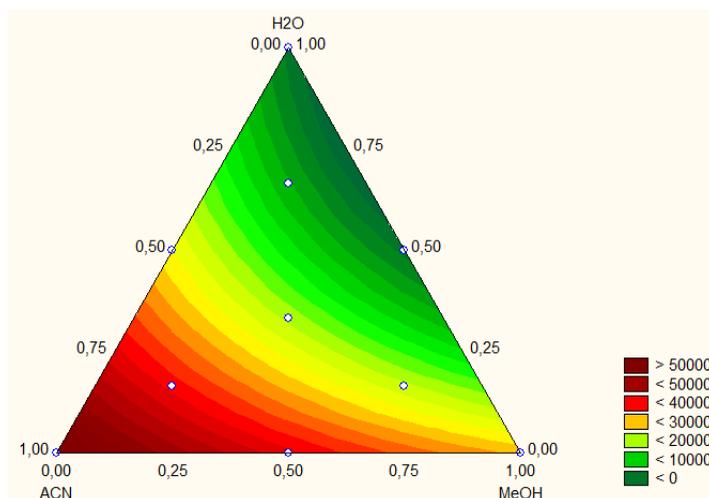
Os dados obtidos foram avaliados utilizando ferramentas estatísticas disponíveis nos software Statistica 8. Tais como o simplex centroid e a superfície de resposta Doehlert.

## 5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.4.1 Otimização dos solventes de dessorção

Os solventes estudados para dessorção foram escolhidos de acordo com a disponibilidade e estudos realizados anteriormente por (Nogueira e Almeida, 2015). Estes foram metanol, água e acetonitrila, e uma superfície de resposta triangular (simplex centroid) foi construída a partir dos dados obtidos quando utilizadas diferentes quantidades de cada solvente de dessorção (Figura 12).

**Figura 12** - Otimização dos solventes de dessorção

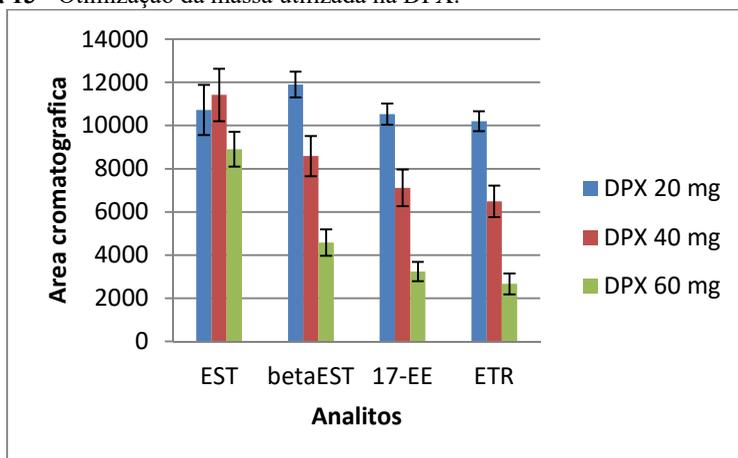


Fonte: Autoria própria (2018).

De acordo com a superfície triangular, pode-se perceber que um sistema unitário contendo apenas acetonitrila obteve a melhor resposta, sendo esta a condição escolhida.

#### 5.4.2 Otimização massa DPX

Nesta etapa foi realizada uma otimização univariada para determinar a quantidade de fase extratora a ser inserida na ponteira descartável de 5 mL. Os volumes empregados foram 20, 40 e 60 mg, avaliando-se então qual quantidade seria a mais efetiva para a extração dos hormônios.

**Figura 13** - Otimização da massa utilizada na DPX.

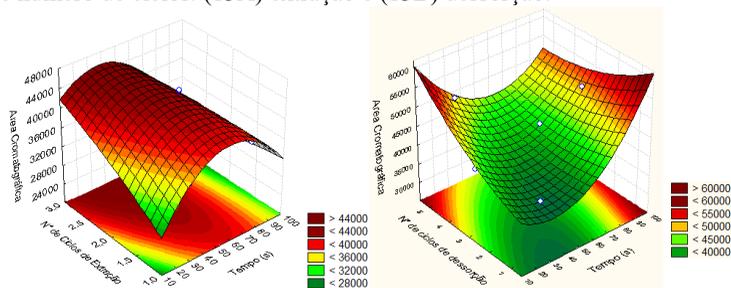
Fonte: Autoria própria (2018).

Esta otimização mostra que apenas o analito EST apresentou um melhor resultado com a massa de 40 mg, avaliando-se como resposta a área do pico cromatográfico. O restante apresentou como melhor condição a massa de 20 mg, sendo esta então escolhida. Uma possível justificativa para este resultado é que os analitos ficam muito adsorvidos na fase extratora, além do que, com maior massa extratora é necessária uma maior quantidade de solvente para dessorção, diminuindo assim o fator de concentração.

### 5.4.3 Otimização multivariada

Nesta etapa de otimização, buscou-se a condição ideal no que diz respeito ao tempo e ao número de ciclos de extração e dessorção. Para isso, foi empregado um planejamento multivariado composto central (em triplicata) do tipo Doehlert, assim obtendo-se duas superfícies de resposta, Figura 14.

**Figura 14** - Superfícies de resposta obtidas para condição de compromisso entre tempo e número de ciclos. (13A) extração e (13B) dessorção.



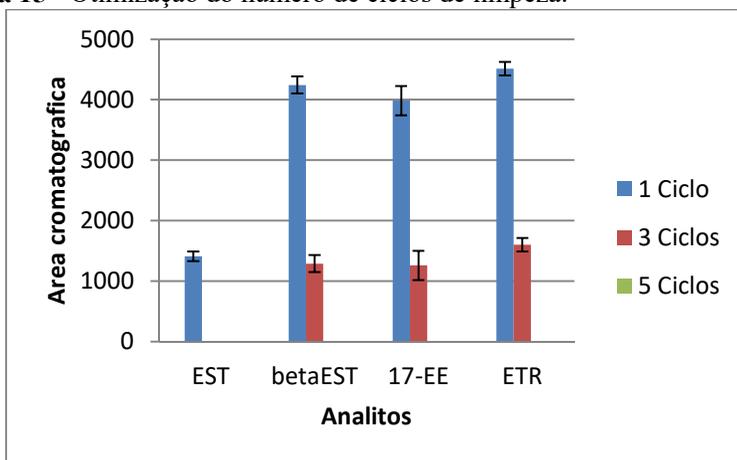
Fonte: Autoria própria (2018).

De acordo com os resultados obtidos a partir da construção das superfícies de resposta foi possível estabelecer as condições otimizadas para a extração dos hormônios EST, betaEST, 17-EE e ETR utilizando a técnica de DPX. A condição escolhida foi de 3 ciclos de 50 segundos, utilizando a mesma aliquota de amostra. No entanto a superfície de dessorção não apresentou uma situação de compromisso entre o tempo e o número de ciclos, 5 ciclos de 10 segundos ou 1 ciclo de 100 segundos.

A eficiência das duas condições são semelhantes, então, foi escolhida a condição de 5 ciclos de 10 segundos, por apresentar um menor tempo de análise e eficiência um pouco superior para todos os analitos.

#### 5.4.4 Otimização da etapa de limpeza

Para otimização da etapa de limpeza foi escolhido o mesmo solvente utilizado na dessorção, ou seja, acetonitrila. Este solvente foi escolhido por ter apresentado a maior eficiência para retirada dos analitos da fase extratora. Também foram utilizados o mesmo volume e tempo, restando saber quantos ciclos são necessários para que não ocorra efeito de memória. O resultado para a otimização relativo ao número de ciclos de limpeza é apresentado na Figura 15.

**Figura 15** - Otimização do número de ciclos de limpeza.

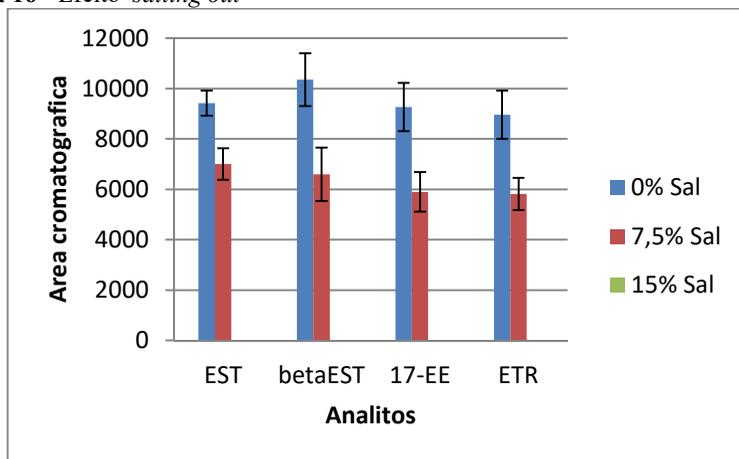
Fonte: Autoria própria (2018).

Como mostrado na figura 15, a utilização de 5 ciclos de limpeza foi suficiente para retirada de todos os analitos remanescentes da etapa de dessorção, não sobrando vestígios dos picos cromatográficos dos analitos.

#### 5.4.5 Efeito de sal

Nesta etapa foi testados a influencia do sal na eficiência de extração dos hormônios em água. Foram testadas a adição de NaCl desde zero até 15%. Os resultados são apresentados na Figura 16.

**Figura 16** - Efeito *salting out*



Fonte: Autoria própria (2018).

Como pode ser verificado, conforme aumenta a porcentagem de sal na amostra, menor é a eficiência de extração. Com 15% de sal a força iônica fez com que nenhum analito fosse extraído. Então, não foi acrescentado sal nesta metodologia.

#### 5.4.6 Parâmetros analíticos

Após a otimização dos parâmetros que afetam a técnica de DPX, as melhores condições adquiridas foram utilizadas para a determinação dos parâmetros analíticos, como, LOQ, LOD, fator de determinação ( $R^2$ ), equação da reta e faixa linear, como mostrado na Tabela 6.

**Tabela 6** – Figuras de mérito obtidos através de curva analítica em matriz real

Composto	Faixa Linear ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	$R^2$	Curva analítica	LOD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LOQ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
EST	1-250	0,9884	$y = 0285x + 103656$	0,3	1
betaEST	1-250	0,9932	$y = 6821x + 104295$	0,3	1
17-EE	1-250	0,9938	$y = 3064x + 85624$	0,3	1
ETR	1-250	0,9973	$y = 96,5x + 682,38$	0,3	1

Fonte: Autoria própria (2018).

Com base na Tabela 6, pode-se observar que o método atingiu valores para LOQs na ordem de  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Como a concentração dessas substâncias não apresentam legislação, busca-se atingir o menor valor possível. Com relação a faixa linear das curvas, pode ser considerada uma faixa ampla com bons fatores de determinação, variando entre 0,9884 a 0,9973, para EST e ETR, respectivamente. A repetibilidade, tanto interdia quanto intradia, apresentado na Tabela 7, foi avaliada em três níveis de fortificação, também em água de rio.

**Tabela 7** - Repetibilidade interdia e intradia.

Analitos	Níveis de Fortificação ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	RSD (Interdia) (%)	RSD (Intradia) (%)
EST	1	27,33	13,01
	10	14,78	1,06
	250	11,92	3,14
betaEST	1	16,55	13,76
	10	9,36	0,99
	250	11,36	3,57
17-EE	1	23,84	26,44
	10	9,91	1,41
	250	11,04	3,22
ETR	1	13,07	0,13
	10	14,11	12,50
	250	17,40	4,47

Fonte: Autoria própria (2018).

Analisando a Tabela 7, percebe-se que os maiores valores de RSD estão no primeiro nível de fortificação, que corresponde ao LOQ. Para os demais níveis, os valores se encontram em uma faixa aceitável (Ribani et al., 2004). A exatidão do método foi avaliada por meio da recuperação dos analitos relativamente aos valores obtidos na curva analítica. Assim foram fortificadas amostras de três rios diferentes em dois níveis de concentração, como é mostrado na Tabela 8.

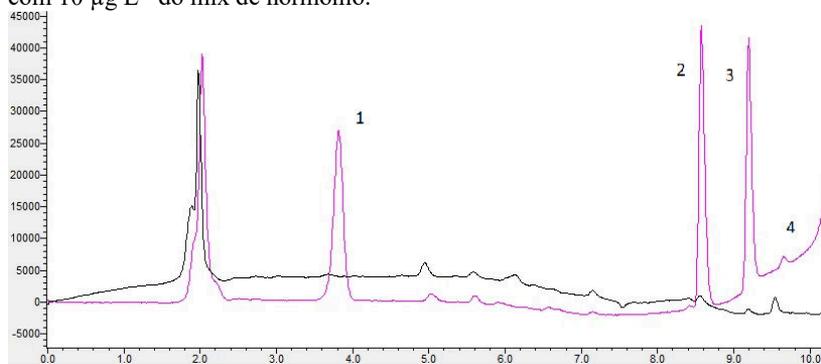
**Tabela 8** - Resultados de recuperação para água de três rios, realizados em dois níveis de fortificação.

Composto	RSFS1		LP 4		LP5	
	Rec. 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ (%)	Rec. 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ (%)	Rec. 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ (%)	Rec. 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ (%)	Rec. 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ (%)	Rec. 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ (%)
EST	82,8	64,6	64,2	63,7	78,8	67,2
$\beta$ -EST	84,1	61,3	65,0	61,3	81,7	65,3
17-EE	89,9	60,7	68,0	61,3	83,5	65,3
ETR	63,1	61,3	65,0	61,3	81,7	65,3

Fonte: Autoria própria (2018).

Na avaliação de recuperação, valores entre 60 e 120% são consideradas satisfatórias para análise de traços, assim todos os valores obtidos neste trabalho estão dentro da faixa de satisfatório (Ribani et al., 2004). A avaliação desses três rios sem utilização de fortificação, para determinar a quantidade real de hormônios presentes não foi possível, devido aos valores se encontrarem abaixo dos valores de LOD. A Figura 17 apresenta um cromatograma obtido da água de rio sem fortificação e outro fortificada a 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  do mix de hormônio.

**Figura 17** - Cromatogramas sobrepostos do rio São Francisco sul sem fortificação e com 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  do mix de hormônio.



Legenda (—) água do rio fortificada e (---) água sem fortificação. 1 EST, 2 betaEST, 3 17-EE, 4 ETR.

Fonte: Autoria própria.

Como pode ser observado no cromatograma sem fortificação, não há vestígios dos analitos estudados. O último pico, referente ao ETR, apresenta um pico próximo que era um interferente indeterminado.

## 5.5 CONCLUSÃO DO CAPÍTULO

Neste estudo foi possível desenvolver um método capaz de determinar simultaneamente quatro hormônios utilizando a técnica de DPX como preparo de amostra e o HPLC-FL como detecção. O método de preparo, além de simples, também mostrou uma frequência analítica satisfatório, pois todo o preparo leva apenas cerca de 8 minutos e a corrida cromatografica 15 minutos. Também apresenta como vantagens o baixo custo do material e a praticidade devido o uso da fase extratora comercial.

Quanto aos resultados obtidos, pode-se constatar que a menor concentração afeta negativamente a precisão do método. Assim nos valores de LOQs de  $1 \mu\text{g L}^{-1}$ , os valores de RSD foram um pouco superiores que 20 % enquanto que nos demais pontos da curva os valores foram inferiores a 20%. Uma possível explicação é que por ser um método com várias etapas manuais, o erro associado é relativamente alto, e quanto menores os valores de concentração, maior pode ser o erro. A exatidão do método se mostrou satisfatória variado entre 60,7 – 89,9. Os LODs foram de  $0,3 \mu\text{g L}^{-1}$  não sendo possível detectar os hormônios em amostras reais, sugerindo a inexistência dos hormônios estudados nas amostras escolhidas ou por se encontrarem em níveis inferiores.

Em comparação com outros trabalhos, como mostrado na Tabela 3, o tempo de análise foi inferior a maioria dos métodos, o LOD foi parecido para estudos que utilizaram equipamentos similares e foi possível detectar os quatro hormônios simultâneamente, enquanto alguns estudos não foram possível.

## **6 QUANTIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DE ESTRÓGENOS EM ÁGUAS UTILIZANDO ESPECTROSCOPIA NIR E UV AUXILIADA POR MRC-ALS E CALIBRAÇÃO NÃO LINEAR.**

Este estudo teve como objetivo o desenvolvimento de uma metodologia alternativa para determinação de estrógenos em água empregando-se a espectroscopia na região NIR e UV. Para tanto, foi utilizada a técnica de preparo de amostra DPX, cujas condições experimentais foram otimizadas no capítulo anterior, para limpeza e pré-concentração dos analitos. Os dados espectrais foram avaliados com o método de resolução de curvas MCR-ALS e, devido a deficiência de rank no sistema (espectros muito similares para os diferentes hormônios), este método não foi capaz de promover uma separação satisfatória entre os diferentes hormônios presente na amostra. Portanto, após a separação dos sinais por MCR-ALS utilizou-se o método não linear denominado maquina de vetores de suporte (SVM) para a etapa de calibração.

### **6.1 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **6.1.1 Reagentes**

Padrão de hormônios  $17\beta$ -estradiol (betaEST), estrona (ETR), estriol (EST) e  $17\alpha$ -etinilestradiol (17-EE) (Sigma-Aldrich). Acetonitrila (grau HPLC), Metanol (grau HPLC) e água U.P. Ponteira descartável de 1 e 5 mL contendo divinilbenzeno como fase extratora, cafeína (Growth supplements),  $\beta$ -ciclodextrina (Sigma-Aldrich).

#### **6.1.2 Instrumentação**

Os espectros foram adquiridos, após preparo das amostras por DPX, em equipamentos portáteis JDSU MicroNIR® (UTFPR Campo Mourão) (cubeta de vidro) e Ocean Optics UV-Vis (UTFPR Campo Mourão) (cubeta de quartzo com 1mm de caminho óptico).

Os espectros foram analisados usando a versão MATLAB R2007b (The Mathworks Inc., MA, EUA).

#### **6.1.3 Procedimento**

O procedimento de otimização do preparo de amostra por DPX foi realizado conforme descrito no capítulo 4. Em seguida as amostras foram

submetidas ao acréscimo de cafeína (CAF), considerando-se este um dos contaminantes emergentes mais comuns, considerado um marcador de poluição humana (Gonçalves; Rodrigues e Silva-Filho, 2016). A cafeína foi utilizada como interferente pra simular as condições reais dos rios, assim possibilitando alcançar vantagem de segunda ordem a partir de dados de primeira ordem.

Devido a deficiência de rank (espectros muito similares para os diferentes hormônios), empregou-se a  $\beta$ -ciclodextrina como um agente complexante objetivando realçar diferenças espectrais.

#### 6.1.3.1 Preparo de amostras com cafeína

Foi preparado uma solução estoque de cafeína  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ , da qual se acrescentou  $200 \mu\text{L}$  nas amostras ao longo da curva de calibração, nas concentrações de 1, 2, 5, 10, 25, 50, 100, 250 e  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  antes de passar pelo preparo de amostra (DPX) nas condições otimizadas estipuladas no Capítulo 5, sendo o mix de hormônios  $17\beta$ -estradiol (betaEST), estrona (ETR), estriol (EST) e  $17 \alpha$ -etinilestradiol (17-EE) solubilizado em metanol.

#### 6.1.3.2 Preparo de amostras com cafeína e $\beta$ -ciclodextrina

Nesta etapa, além da adição de cafeína também foi adicionado  $\beta$ -ciclodextrina como agente complexante. Uma solução estoque foi preparada na concentração de  $10 \text{mg L}^{-1}$  e um volume dessa solução foi adicionado em cada ponto da curva, após o preparo de amostra, de forma que a concentração de  $\beta$ -ciclodextrina adicionada fosse o dobro do fator de concentração em cada ponto da curva.

Na etapa de preparo de amostra foi realizada uma mudança quanto ao volume de dessorção, passando de 300 para  $100 \mu\text{L}$ , para que o volume final e o fator de concentração fosse o mesmo descrito no capítulo 5. Para todas as amostras, após DPX as dessorções foram realizadas com acetonitrila.

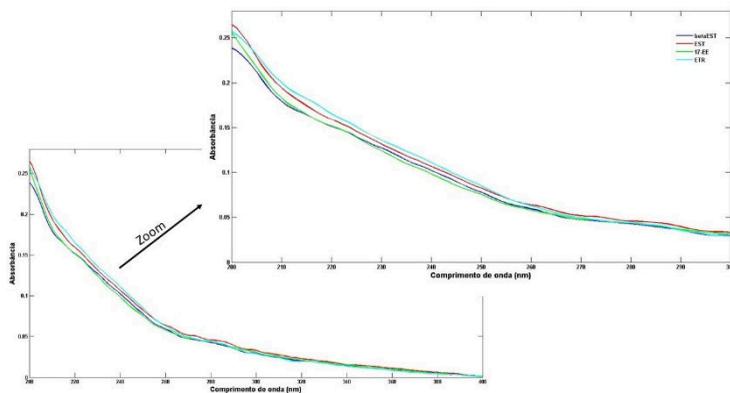
## 6.2 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Deficiência de rank foi contornada quando os hormônios foram complexados à  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD). A natureza hidrofóbica da cavidade interna da  $\beta$ -CD contribui para a formação de complexos por inclusão molecular. Moléculas de tamanho, forma e hidrofobicidade

adequada são capazes de interagir de forma não covalente (Szejtli, 1988). Desta interação resultam complexos de inclusão que são estabilizados por várias forças intermoleculares, tais como forças de Van der Waals e ligações de hidrogênio (Matioli et al., 2000). Esta abordagem vem sendo utilizada na distinção seletiva de enantiômeros por espectroscopias na região do UV (Valderrama et al., 2010) e NIR (Tran et al., 2004). De acordo com Valle (2004) e Wedig et al., (2002) a parte aromática será a porção que entrará na cavidade hidrofóbica da CD enquanto o grupo polar interage com as hidroxilas que cercam sua cavidade.

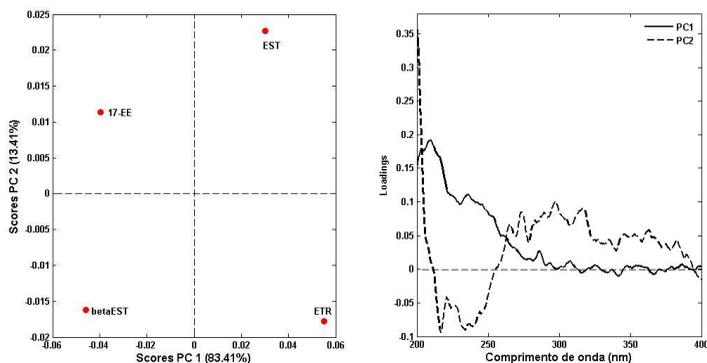
Conforme apresentado na Figura 18 os espectros na região UV apresentam uma discreta distinção entre si, o que pode ser confirmado através da análise de componentes principais (PCA), em que cada um dos hormônios encontram-se em um quadrante diferente no gráfico de *scores* da primeira componente principal (PC1) contra a PC2 Figura 19.

**Figura 18** - Espectros UV dos hormônios complexados com a  $\beta$ -ciclodextrina.



Fonte: Autoria própria (2018).

**Figura 19** - Resultados da PCA.

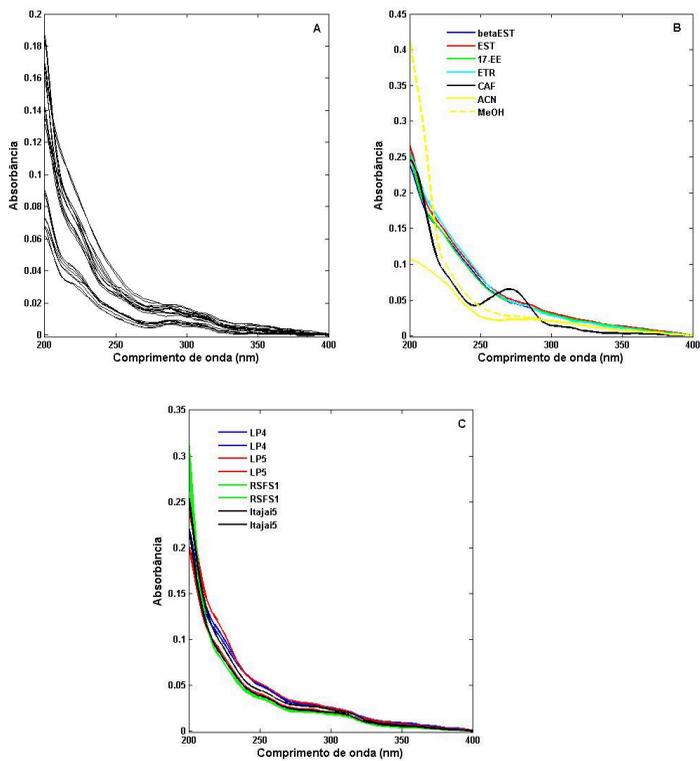


Fonte: Autoria própria (2018).

Através dos loadings da PCA, verifica-se que o complexo EST- $\beta$ -CD distingue-se dos demais hormônios complexados na parte positiva de PC1 (200 – 280 nm) e PC2 (260 – 395 nm). O complexo ETR- $\beta$ -CD encontra-se na parte positiva de PC1 (200 – 280 nm) e negativa de PC2 (210 – 255 nm). Na parte negativa de PC1 e PC2 encontra-se o complexo betaETS- $\beta$ -CD cuja diferença espectral em relação aos demais complexos pode ser observada na região entre 210 – 255 nm. Observa-se o complexo 17-EE- $\beta$ -CD localizado na parte positiva de PC2 e negativa de PC1, indicando que esse complexo se distingue dos demais na região espectral entre 260 – 395 nm.

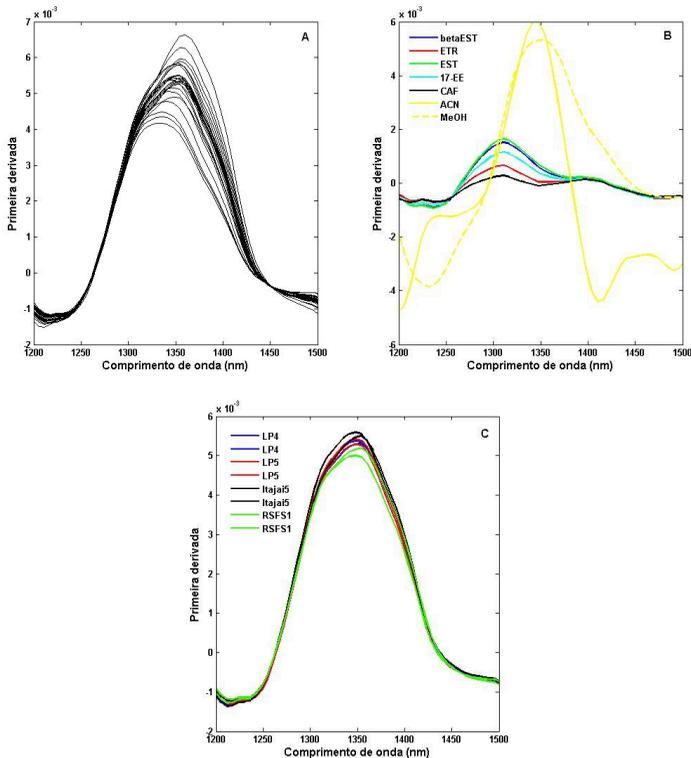
A partir dos espectros, para as amostras complexadas à  $\beta$ -CD, na região do UV ou na região do NIR (Figuras 20 e 21, respectivamente) o método MCR-ALS foi implementado utilizando rank igual ao número de espécies presentes (7) e como estimativa inicial os próprios espectros dos constituintes puros. Nesta aplicação, primeiramente avaliou-se trabalhar com toda a região do espectro NIR (900 – 1700 nm). Contudo resultados mais satisfatórios para a recuperação do perfil espectral foram obtidos empregando-se a região NIR entre 1200 – 1500 nm.

**Figura 20** - Espectros UV. (A) Espectros mix. (B) Espectros puros. (C) Espectros amostras reais.



Fonte: Autoria própria (2018).

**Figura 21** - Espectros NIR. (A) Espectros mix. (B) Espectros puros. (C) Espectros amostras reais.



Fonte: Autoria própria (2018).

Apesar da deficiência de rank para  $S^T$  ter sido contornada pela formação do complexo de inclusão com a  $\beta$ -CD os resultados obtidos não foram condizentes com o esperado, ou seja, o perfil espectral é recuperado perfeitamente porém o mesmo não se observa para o perfil de concentração. Como a concentração de cada um dos hormônios era fixa para cada espectro do mix obtido (1, 2, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 ppb), pode-se concluir que, neste caso, tem-se deficiência de rank para  $C$ , o que pode ser justificado pois nesse caso, o perfil de concentração real de cada constituinte na amostra é descrito como uma combinação linear de um reduzido número de perfis (Amrhein et al., 1996; Izquierdo-Ridorsa et al., 1997). Dessa forma, o perfil de concentração recuperado pelo MCR-ALS não permitiu a construção de modelos de calibração pseudo-univariado.

Na tentativa de contornar a deficiência de rank ainda presente nos dados, diferentes estratégias foram adotadas. A Tabela 9 ilustra essas estratégias e os principais resultados alcançados.

**Tabela 9** - Estratégias e principais resultados para contornar a deficiência de rank em C.

Estratégia	Resultados				
<p>Fusão de dados nas matrizes aumentadas</p> <table border="1" data-bbox="294 491 430 576"> <tr> <td>UV-NIR mix</td> </tr> <tr> <td>UV-NIR puros</td> </tr> </table>	UV-NIR mix	UV-NIR puros	<p>Recupera muito bem o sinal dos analitos – possibilita identificar os analitos.</p> <p>Produz curva de calibração pseudo-univariada linear.</p> <p>Não pode ser validada porque não consegue prever as amostras do mix na presença da cafeína.</p>		
UV-NIR mix					
UV-NIR puros					
<p>Matrizes aumentadas por linhas – inclusão do pka (procedimento realizado para espectros UV e NIR separadamente).</p> <table border="1" data-bbox="294 794 501 839"> <tr> <td>puros</td> <td>pka</td> <td>mix</td> </tr> </table>	puros	pka	mix	<p>Não recupera bem os perfis espectrais e de concentração.</p>	
puros	pka	mix			
<p>Matrizes aumentadas por colunas (procedimento realizado para espectros UV e NIR separadamente).</p> <table border="1" data-bbox="288 962 378 1098"> <tr> <td>mix</td> </tr> <tr> <td>mix + caf</td> </tr> <tr> <td>rios</td> </tr> <tr> <td>puros</td> </tr> </table>	mix	mix + caf	rios	puros	<p>Recupera muito bem o sinal dos analitos – possibilita identificar os analitos.</p> <p>Produz curva de calibração pseudo-univariada linear.</p> <p>Não pode ser validada porque não consegue prever as amostras do mix na presença da cafeína.</p>
mix					
mix + caf					
rios					
puros					
<p>Matrizes aumentadas por colunas (procedimento realizado para espectros UV e NIR separadamente).</p> <p>Uso do perfil de concentração recuperado por MCR-ALS para desenvolvimento de modelo não linear por SVM.</p> <table border="1" data-bbox="288 1331 378 1466"> <tr> <td>mix</td> </tr> <tr> <td>mix + caf</td> </tr> <tr> <td>rios</td> </tr> <tr> <td>puros</td> </tr> </table>	mix	mix + caf	rios	puros	<p>NIR: Recuperou muito bem o perfil espectral. Possibilita identificar os analitos. Perfil de concentração ficou constante – isso implica que o método linear e o método não linear não conseguem modelar.</p> <p>UV: Recuperou perfeitamente o perfil espectral. Possibilitou identificar os analitos. Perfil de concentração recuperado</p>
mix					
mix + caf					
rios					
puros					

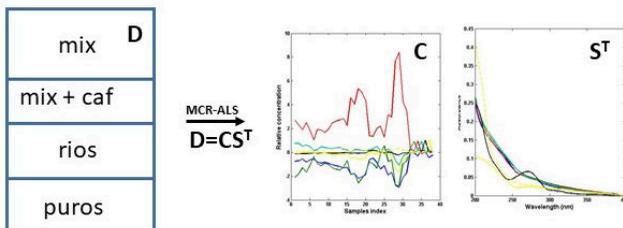
	por MCR-ALS foi empregado para desenvolvimento de modelo não linear por SVM com sucesso.
--	--

Fonte: Autoria própria (2018).

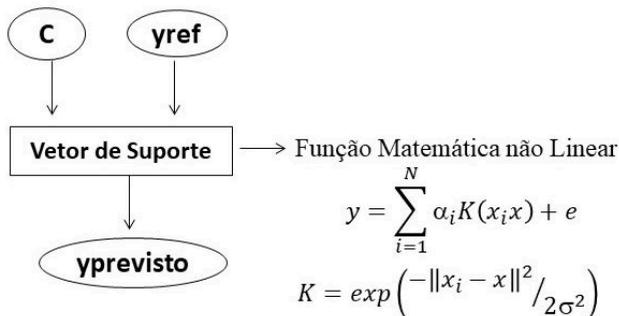
De acordo com a Tabela 9 verifica-se que a única estratégia que produziu resultados adequados foi a estratégia de matrizes aumentadas por colunas para os dados espectrais na região do UV. Os resultados de concentração relativa obtidos a partir do MCR-ALS para a matriz aumentada por coluna foram empregados para o desenvolvimento de um modelo não linear através do SVM, conforme esquema apresentado na Figura 22.

**Figura 22** - (A) Estratégia de matrizes aumentadas por colunas e deconvolução por MCR-ALS. (B) Estratégia para o modelo SVM.  $\alpha$  são multiplicadores de Lagrange,  $K$  é a função Kernel e “e” é um bias (erro),  $\sigma^2$  é o parâmetro de variância.

A



B



Fonte: Autoria própria (2018).

De acordo com a Figura 22B, a função Kernel (K) representa a relação entre o dado de entrada e a propriedade de saída a ser modelada e neste caso, é representada pela função radial de base (RBF). O ajuste do parâmetro de variância ( $\sigma^2$ ) muda o grau da não linearidade que pode ser modelado, ou seja, conforme  $\sigma^2$  aumenta, a função Kernel força o modelo para uma solução linear (Cogdill e Dardenne, 2004; Borin et al., 2006). Neste caso, verificou-se que o modelo desenvolvido foi realmente não linear pois o parâmetro de variância foi igual a 1 em todos os casos. A Tabela 10 apresenta os resultados alcançados na validação dos modelos desenvolvidos. Em todos os casos, uma amostra com concentração de 25 ppb foi empregada na validação.

**Tabela 10** - Validação do modelo SVM.

Analito	Yref ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Yprevisto ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Erro relativo (%)
betaEST	25	27,2	8,8
EST	25	27,6	10,4
17-EE	25	27,5	10
ETR	25	26,6	6,4

Fonte: Autoria própria (2018).

De posse do modelo validado, as amostras reais foram avaliadas e a Tabela 11 apresenta os resultados alcançados.

**Tabela 11** - Resultados obtidos por UV/MCR-ALS/SVM para previsão da concentração de hormônios em amostras reais.

Amostras	betaEST ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	EST ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	17-EE ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	ETR ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
LP4	2,16	2,07	2,07	2,07
LP4	2,11	2,07	2,06	2,06
LP5	2,13	2,06	2,08	2,07
LP5	2,16	2,06	2,07	2,07
RSFS1	2,09	2,07	2,07	2,06
RSFS1	2,09	2,07	2,07	2,06
Itajai 5	2,11	2,06	2,07	2,06
Itajai 5	2,15	2,06	2,08	2,07

Fonte: Autoria própria (2018).

Os resultados da Tabela 11 não estão de acordo com os resultados obtidos no capítulo anterior, no qual não foi possível quantificar os hormônios em amostras reais empregando HPLC-FL. Entretanto, uma possível suposição para os resultados pode ser atribuída à otimização da função quadrática com SVM que possui apenas um mínimo, o que permite a elevada capacidade de generalização e torna o modelo eficiente para previsão em dados que não pertenceram ao conjunto utilizado na etapa de calibração (Ferrão et al., 2007).

### 6.3 CONCLUSÃO DO CAPÍTULO

Os resultados alcançados sugerem a deficiência de rank relativa a semelhança espectral pode ser contornada pela formação de complexos de inclusão com a  $\beta$ -CD. Por outro lado, a deficiência de rank relacionada à concentração semelhante de analitos nas amostras pode ser contornada através do desenvolvimento de um modelo não linear SVM a partir dos perfis de concentração recuperados por MCR-ALS. Este tipo de abordagem, em que um resultado obtido a partir de um método de deconvolução é empregado no desenvolvimento de um modelo não linear SVM, já foi empregado no desenvolvimento de modelos qualitativos para avaliação da doença de Alzheimer a partir de imagens de ressonância magnética nuclear (Yang et al., 2011).

## **7 DETERMINAÇÃO INDIVIDUAL DOS HORMÔNIOS EM ÁGUA UTILIZANDO ESPECTROSCOPIA UV E SVM.**

Na tentativa de contornar os problemas de deficiência de rank relacionados à concentração, avaliou-se a possibilidade de quantificar os hormônios de forma independente. Neste caso, cada batelada de amostra foi preparada com um único hormônio de cada vez e adicionado cafeína em concentração constante de 100 ppb. Assim, foram preparadas amostras com concentrações do hormônio betaEST de 1, 5, 10, 50 e 250 ppb e em cada uma das amostras 100 ppb de cafeína foi adicionada. Esse procedimento foi repetido para os demais hormônios estudados, estrona (ETR), estriol (EST) e 17  $\alpha$ -etinilestradiol (17-EE).

### **7.1 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **7.1.1 Reagentes**

Padrões Sigma- Aldrich. Acetonitrila (grau HPLC), Metanol (grau HPLC) e água U.P. Ponteira descartável de 1 e 5 mL contendo estireno-divinilbenzeno como fase extratora, cafeína (Marca).

#### **7.1.2 Instrumentação**

Diante dos resultados alcançados no capítulo anterior em que a região espectral do UV promoveu resultados mais satisfatórios, nessa aplicação os espectros foram, adquiridos somente na região do UV (200 – 400 nm), em equipamento Ocean Optics modelo USB-650-UV-VIS (UTFPR Campo Mourão), empregando uma cubeta de quartzo com 1mm de caminho ótico.

Os dados experimentais foram processados utilizando o software MatLab R2007b com aplicação das ferramentas para a utilização do MCR-ALS (Jaumot et al. 2015). O modelo SVM foi desenvolvido a partir de rotinas escritas para o software MatLab.

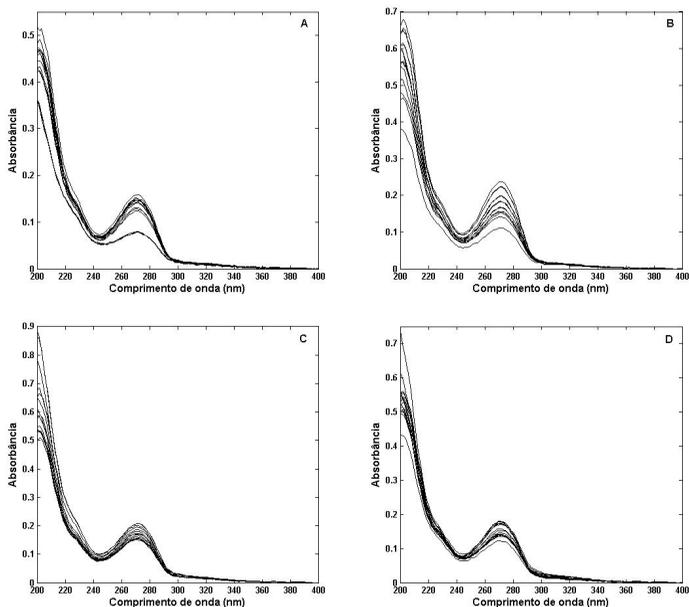
#### **7.1.3 Procedimento**

Foi utilizado a solução estoque de cafeína, conforme preparação descrita no capítulo anterior, adicionando-se 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  em cada ponto da curva, para cada hormônio individualmente. Estas amostras foram submetidas ao procedimento de preparo de amostra (DPX) descrito no capítulo 5.

## 7.2 RESULTADO E DISCUSSÃO

A Figura 23 mostra os espectros na região do UV para cada hormônio na presença da cafeína.

**Figura 23** - Espectros UV dos hormônios na presença de cafeína. (A) betaEST. (B) 17-EE. (C) EST. (D) ETR.



Fonte: Autoria própria (2018).

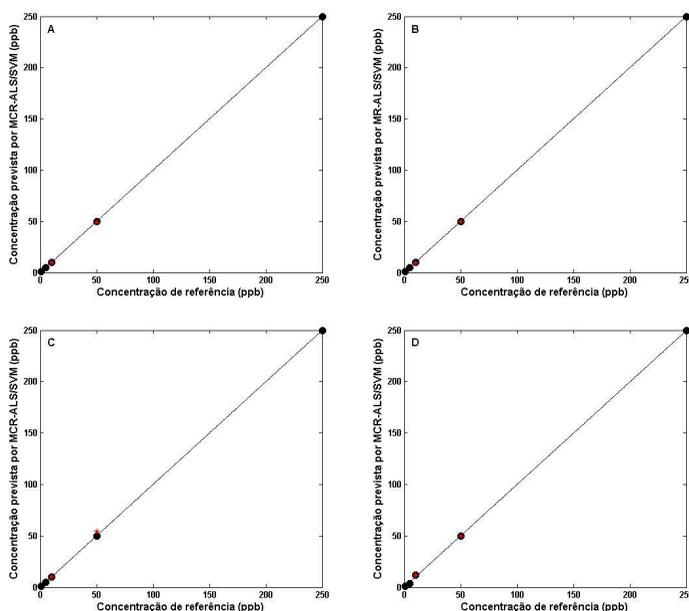
A partir de cada conjunto de espectros na região do UV o método MCR-ALS foi implementado utilizando rank igual ao número de espécies presentes (3 – hormônio, cafeína e acetonitrila). Na inicialização do algoritmo MCR-ALS utilizou-se o PURE, um método derivado do SIMPLISMA (do inglês, *SIMPL*e-to-use *InteractiveS* Mixture Analysis) para obtenção das estimativas iniciais de **S**. Não foram aplicadas restrições.

Nesta aplicação a deficiência de rank para **C** e **S** foi contornada pela utilização de um único hormônio em cada sistema em estudo. Entretanto, utilizou-se uma concentração fixa de cafeína e o resultado foi uma recuperação adequada para o perfil espectral dos constituintes na mistura, porém, os perfis de concentração totalmente em desacordo com

o esperado. Na busca de uma explicação para o ocorrido, verificou-se na literatura (Juan et al., 2004; Diewok et al., 2002) que quando um sistema evolui na presença de uma contribuição constante isto também constitui um problema de deficiência de rank. Dessa forma, na aplicação deste capítulo, o perfil de concentração recuperado pelo MCR-ALS não permitiu a construção de modelos de calibração pseudo-univariado.

A estratégia utilizada no capítulo anterior, onde os perfis de concentração relativa recuperados pelo MCR-ALS foram empregados para o desenvolvimento de modelos não lineares através do SVM foi considerada nesta aplicação na tentativa de contornar o problema de deficiência de rank identificado. A Figura 24 apresenta o ajuste para as amostras de calibração e validação empregadas no desenvolvimento de cada um dos modelos.

**Figura 24** - Ajuste dos modelos UV/MCR-ALS/SVM. (A) betaEST. (B) 17-EE. (C) EST. (D) ETR. (●) amostras de calibração, (\*) amostras de validação.



Fonte: Autoria própria (2018).

Na Tabela 12, os resultados alcançados na validação dos modelos MCR-ALS/SVM são apresentados. Em todos os casos, amostras com concentrações de 10 e 50 ppb foram empregadas na etapa de validação.

O parâmetro de variância ( $\sigma^2$ ) indica que o modelo está se desenvolvendo para uma solução não linear, uma vez que  $\sigma^2$  pode mudar o grau de não linearidade que pode ser modelado e, conforme  $\sigma^2$  aumenta o modelo é forçado para uma solução linear (Cogdill e Dardenne, 2004; Borin et al., 2006), o que não é verificado neste caso.

**Tabela 12** - Validação do modelo MCR-ALS/SVM.

Analito	$\delta^2$	Yref (ppb)	Yprevisto (ppb)	RMSEC	LD (ppb)	LQ (ppb)
betaEST	1	10,00	9,94	0,0483	0.14	0.48
		50,00	49,39			
17-EE	1	10,00	9,28	0,0113	0.03	0.11
		50,00	49,66			
EST	0,1	10,00	10,01	0,0132	0.04	0.13
		50,00	54,58			
ETR	1	10,00	11,66	0,9812	2.94	9.81
		50,00	50,10			

Fonte: Autoria própria (2018).

A exatidão dos modelos MCR-ALS/SVM foi representada pelo erro médio quadrático da calibração (RMSEC) calculado através da equação 7:

$$RMSEC = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n}} \quad (7)$$

Em que  $n$  corresponde ao número de amostras utilizadas na calibração,  $y_i$  corresponde à concentração de referência e  $\hat{y}_i$  corresponde à concentração prevista pelo modelo MCR-ALS/SVM.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram então calculados como três e dez vezes o valor de RMSEC, respectivamente (Workman, 2008). Os modelos MCR-ALS/SVM para a quantificação dos hormônios 17-EE e EST apresentaram os menores limites, enquanto que o modelo para a quantificação do hormônio ETR foi o que apresentou o maior limite de detecção e quantificação.

Os resultados alcançados sugerem que a deficiência de rank relativa quando um sistema evolui na presença de uma contribuição constante pode ser contornada através do desenvolvimento de um modelo não linear SVM a partir dos perfis de concentração recuperados por MCR-ALS. Este tipo de abordagem, em que um resultado obtido a partir de um método de deconvolução é empregado no desenvolvimento de um

modelo não linear SVM, já foi empregado no desenvolvimento de modelos qualitativos para avaliação da doença de Alzheimer a partir de imagens de ressonância magnética nuclear (Yang et al., 2011).

### 7.3 CONCLUSÕES DO CAPÍTULO

A utilização do preparo de amostra através da técnica DPX, aliada à espectroscopia na região do UV permitiu o desenvolvimento de modelos de calibração não lineares a partir da resolução espectral por MCR-ALS, na determinação de hormônios em amostras de águas. Os resultados alcançados sugeriram que a deficiência de rank relativa a semelhança espectral pode ser contornada pela formação de complexos de inclusão com a  $\beta$ -CD. Por outro lado, a deficiência de rank relacionada à concentração semelhante de analitos nas amostras, bem como quando um sistema evolui na presença de uma contribuição constante, podem ser contornadas através do desenvolvimento de um modelo não linear SVM a partir dos perfis de concentração recuperados por MCR-ALS.

## 8 CONCLUSÃO GERAL

Essa dissertação mostrou a possibilidade de utilizar técnicas de preparo de amostras em conjunto com as espectroscopias NIR e UV na quantificação de micropoluentes emergentes.

A técnica TF-SPME em conjunto com a espectroscopia NIR mostrou-se eficiente para o desenvolvimento de modelos de calibração pseudo-univariada, através do método de resolução MCR-ALS, na quantificação dos micropoluentes bisfenol A (BFA), 3-(4-metilbenzilideno) cânfora (4-MBC), 2-ethylhexyl-*p*-methoxycinnamate (EHMC), benzofenona (BF) e triclorocarban (TCC) em água.

A utilização da técnica de DPX em conjunto com o HPLC-FL, para determinação dos hormônios em água, se mostrou com uma boa frequência analítica, e atingiu limites de detecção e quantificação. A exatidão se manteve dentro da faixa aceitável e a precisão levemente acima, nos pontos inferiores. Apesar de não conseguir quantificar os hormônios em amostras reais, esta se mostrou uma técnica útil para limpeza e concentração das amostras.

A técnica DPX em conjunto com a espectroscopia NIR, mesmo utilizando diferentes estratégias na organização dos dados experimentais, não permitiu a quantificação dos hormônios 17  $\beta$ -estradiol (betaEST), estrona (ETR), estriol (EST) e 17 $\alpha$ -etinilestradiol (17-EE) em águas. Entretanto, o preparo de amostra por DPX, juntamente com a espectroscopia na região do UV, utilizando a estratégia de matrizes aumentadas e a resolução espectral por MCR-ALS, auxiliada pela formação de complexo de inclusão com  $\beta$ -ciclodextrina, mostrou que a deficiência de rank relativa à semelhança espectral foi contornada. Por outro lado, a deficiência de rank relacionada à concentração semelhante de analitos nas amostras, bem como quando um sistema evolui na presença de uma contribuição constante, podem ser contornadas através do desenvolvimento de um modelo não linear SVM a partir dos perfis de concentração recuperados por MCR-ALS.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVARES, J.C.; POPPI, R.J. Biodiesel contente determination in diesel fuel blends using near infrared (NIR) spectroscopy and support vector machines (SVM). **Talanta**, v. 104, p.155-161, 2013.

AMRHEIN, M.; SRINIVASAN, B.; BONVIN, D.; SHUMACHER, M.M. On the rank deficiency and rank augmentation of the spectral measurement matrix. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 33, p. 17-33, 1996.

AUGUSTO, F.; CARASEK, E.; SILVA, R.G.C.; TIVELLINO, S.R. New sorbents for extraction and microextraction techniques. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 2533-2543, 2010.

BAGHERI, H.; ES'HAGHI, A.; MOHAMMADKHANI, E. High-throughput micro-solid phase extraction on 96-well plate using dodecyl methacrylate-ethylen glycol dimethacrylate monolithic copolymer. **Analytical Chimica Acta**. v.792, p.59-65. 2013.

BEZERRA, M. A.; et al. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v. 76, p. 965– 977, 2008.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. **Química Nova**, v.30, p.3, 2007.

BOOKSH, K.S.; KOWALSKI, B.R.; Theory in analytical chemistry. **Analytical Chemistry**, v. 66, p. 782A-791A, 1994.

BORDIN, D. C.; ALVES, M. N.; CAMPOS, E. G.; MARTINS, B. S. Disposable pipette tips extraction: fundamentals, applications and state of the art. **Journal of separation Science**, v.39, p.1017-1212, 2016.

BORIN, A.; FERRÃO, M.F.; MELLO, C.; MARETTO, D.A.; POPPI, R.J. Least-squares support vector machines and near infrared spectroscopy for quantification of common adulterants in powdered milk. **Analytica Chimica Acta**, v. 579, p. 25-32, 2006.

BRASIL. Ministério das Cidades. Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental. **Plano Nacional de Saneamento Básico**, Brasília: SNSA, p.19, 2013.

BRUHEIM, I.; LIU, X.; PAWLISZYN, J. Thin-film microextraction. **Analytical Chemistry**, v.75, p.1002-1010, 2003.

BRUNS, R. E.; FAIGLE, J. F. G. Quimiometria. **Química nova**. Campinas, v.8, n.2, p.13, 1985.

CABALLERO-CASERO, N.; LUNAR L.; RUBIO, S. Analytical methods for the determination of mixtures of bisphenols and derivatives in human and environmental exposure sources and biological fluids. A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 908, p. 22-53, 2016.

CHAUCHAR, F.; COGDILL, R.; ROUSSEL, S.; ROGER, J.M, BELLON-MAUREL, V. Application of LS-SVM to non-linear phenomena in NIR spectroscopy: development of a robust and portable sensor for acidity prediction in grapes. **Chemometrics and Intelligent Laboratory systems**, v. 71, p. 141-150, 2004.

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

CHEN, D.; HU, Y.N.; HUSSAIN, D.; ZHU, G.T.; HUANG, Y.Q.; FENG, Y.Q. Electrospun fibrous thin film microextraction coupled with desorption corona beam ionization-mass spectrometry for rapid analysis of antidepressants in human plasma. **Talanta**, v. 152, p. 188-195, 2016.

CHEN, Q.; WU, W.; LIU, X.; ZHANG, Z. A new pretreatment and improved method for determination of selected estrogens in high matrix solid sewage samples by liquid chromatography mass spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 104, p. 49-55, 2012.

COGDILL, R.P.; DARDENNE, P. Least-squares support vector machines for chemometrics: an introduction and evaluation. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, v. 12, p. 93-100, 2004.

COLLINS, C.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. 5. ed. Campinas: Unicamp, p. 273-281, 2014.

CORAZZA, G.; MERIB, J.; MAGOSSO, H.A.; BITTENCOURT, O.R.; CARASEK, E. A hybrid material as a sorbent phase for the disposable pipette extraction technique enhances efficiency in the determination of phenolic endocrine-disrupting compounds. **Journal of Chromatography A**, v. 1513, P. 42-50, 2017.

CURTI, S.M.N.; RITTER, C.M.; SILVA, L.B.; VALDERRAMA, L.; CONSOLIN, M.F.B.; FILHO, N.C.; MEDEIROS, F.V.S.; MARÇO, P.H.; VALDERRAMA, P. On the Feasibility of Spectroscopy and Curve Resolution to Detection of Ethinylestradiol in Sewage – Preliminary studies. **Brazilian Journal of Analytical Chemistry**, v. 4, p. 35-39, 2017.

DIEWOK, J.; JUAN, A.; TAULER, R.; LENDL, B. Quantitation of Mixtures of Diprotic Organic Acids by FT-IR Flow Titrations and Multivariate Curve Resolution. **Applied Spectroscopy**, v. 56, p. 40-50, 2002.

EKPEGHERE, K. I.; et al. Distribution and seasonal occurrence of UV filters in rivers and wastewater treatment plants in Korea. **Science of the Total Environment**, v. 542, p. 121-128, 2016.

ESRAFILI, A.; YAMINI, Y.; SHARIATI, S. Hollow fiber-based liquid phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography for extraction and determination of some antidepressant drugs in biological fluids. **Analytica Chimica Acta**, v. 604, n. 2, p. 127-133, 2007.

FERRÃO, M.F.; MELLO, C.; BORIN, A.; MARETTO, D.A.; POPPI, R.J. LS-SVM: Uma nova ferramenta quimiométrica para regressão multivariada. Comparação de modelos de regressão LS-SVM e PLS na quantificação de adulterantes em leite em pó empregando NIR. **Química Nova**, v. 30, p. 852-859, 2007.

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

FERREIRA, S. L. C.; et al. Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, p. 2-14, 2007.

GELADI, P.; KOWALSKI, B.R. Partial least-squares regression: a tutorial. **Analytica Chimica Acta**, v. 185, p. 1-17, 1986.

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

GONÇALVES, E.S.; RODRIGUES, S.V.; SILVA-FILHO, E.V. The use of caffeine as a chemical marker of domestic wastewater contamination in surface waters: seasonal and spatial variations in Teresópolis, Brazil. **Revista Ambiente e Água**, v. 12, 2017.

GOICOECHEA, H.C.; OLIVIERI, A.C.; TAULER, R. Application of the correlation constrained multivariate curve resolution alternating least-squares method for analyte quantitation in the presence of unexpected interferences using first-order instrumental data. **Analyst**, v. 135, p. 636–642, 2010.

GUO, J.; et al. Determination of triclosan, triclocarban and methyltriclosan in aqueous samples by dispersive liquid–liquid microextraction combined with rapid liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 3038-3043, 2009.

HAYKIN, S.; *Redes Neurais – Princípios e prática*, Porto Alegre: Bookman, 2001.

IZQUIERDO-RIDORSA, A.; SAURINA, J.; HERNÁNDEZ-CASSOU, S.; TAULER, R. Second-order multivariate curve resolution applied to rank-deficient data obtained from acid-base spectrophotometric titrations of mixtures of nucleic bases. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 38, p. 183-196, 1997.

JAUMOT, J.; JUAN, A.; TAULER, R. MCR-ALS GUI 2.0: New features and applications. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 140, p. 1-12, 2015.

JIANG, R.; PAWLISZYN, J. Thin-film microextraction offers another geometry for solid-phase microextraction. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 39, p. 245-253, 2012.

JUAN, A.; NAVEA, S.; DIEWORK, J.; TAULER, R. Local rank exploratory analysis of evolving rank-deficient systems. **Chemometrics and Inteligente Laboratory systems**, v. 70, p. 11-21, 2004.

JUAN, A. ; TAULER, R. Chemometrics applied to unravel multicomponent processes and mixtures: Revisiting latest trends in multivariate resolution. **Analytica Chimica Acta**, v.500, p.195–210, 2003.

KIRSCHNER, N.; DIAS, A, N.; BUDZIAK, D.; SILVEIRA, C, B.; MERIB, J.; CARASEK, E. Novel approach to high-throughput determination of endocrine disruptors using recycled diatomaceous earth as a green sorbent phase for thin-film solid-phase microextraction combined with 96-well plate system. **Analytica Chimica Acta**, v.996, p. 29-37, 2017.

LANÇAS, F.M. Cromatografia líquida moderna: HPLC/CLAE. Editora Atomo, 2009.

LIMA, D.L.D.; SILVA, C.P.; SCHNEIDER, R.J.; OTERI, M.; ESTEVES, V.I. Application of dispersive liquid-liquid microextraction for estrogens' quantification by enzyme-linked immunosorbent assay. **Talanta**, v. 125, p. 102-106, 2014.

LI, Y.; ZHANG, Y.; JIANG, L. Modeling chlorophyll content of Korean pine needles with NIR and SVM. **Procedia Environmental Sciences**, v. 10, p. 222-227, 2011.

LISBOA, N.S.; FAHNING, C.S.; COTRIM, G.; ANJOS, J.P.; ANDRADE, J.B.; HATJE, V.; ROCHA, G.O. A simple and sensitive UFLC-fluorescence method for endocrine disruptors determination in marine Waters. **Talanta**, v. 117, p. 168-175, 2013.

LÓPEZ-LÓPEZ, A.; CASTELLOTE-BARGALLÓ, A. I.; LÓPEZ-SABATER, M. C, Comparison of two direct methods for the

determination of fatty acids in human milk, **Chromatographia**, v. 54, p. 743 -747, 2001.

MALEGORI, C.; MARQUES, E.J.N.; FREITAS, S.T.; PIMENTEL, M.F.; PASQUINI, C.; CASIRAGHI, ERNESTINA. Comparing the analytical performances of Micro-NIR and FT-NIR spectrometers in the evaluation of acerola fruit quality, using PLS and SVM regression algorithms. **Talanta**, v. 165, p. 112-116, 2017.

MAMIÁN-LÓPEZ, M.B.; POPPI, R.J. Standard addition method applied to the urinary quantification of nicotine in the presence of cotinine and anabasine using surface enhanced Raman spectroscopy and multivariate curve resolution, **Analytica Chimica Acta**, v. 760, p. 53–62, 2013.

MARÇO, P.H.; VALDERRAMA, P.; ALEXANDRINO, G.L.; POPPI, R.J.; TAULER, R. Resolução multivariada de curvas com mínimos quadrados alternantes: descrição, funcionamento e aplicações. *Quimica Nova*, v. 37, n. 9, p. 1525-1532, 2004.

MASTERS, B. Emerging Contaminants – Grugs on Tap. **Water & Wastewater international**, v. 16, p. 11-12, 2001.

MATIOLI, G.; MORAES, F.F.; ZANIN, G.M. Ciclodextrinas e suas aplicações em: **alimentos, fármacos, cosméticos, agricultura, biotecnologia, química analítica e produtos gerais**. 1a ed., Maringá-PR: Editora da UEM, 2000.

MELLO, C.; MARANGONI, A.; POPPI, R.; NODA, I. Fast determination of thyroid stimulating hormone in human blood serum without chemical preprocessing by using infrared spectroscopy and least squares support vector machines. **Analytica chimica acta**. v. 696, p.47-52, 2011.

MERIB, J.; CARASEK, E. Microextração em fase líquida suportada com fibra oca (HF-LPME): Fundamentos e aplicações recentes. **Scientia chromatographica**. v.5, n.3, p.249-262, 2013.

MERIB, J.; SIMÃO, V.; DIAS, A. N.; CARASEK, E. Simultaneous determination of trihalomethanes and organochlorine pesticides in water samples by direct immersion-headspace-solid phase microextraction. **Journal of Chromatography A**, v.1321, p.30-37, 2013.

MERTEN, G. H.; MINELLA, J. P. Qualidade da água em bacias hidrográficas rurais: um desafio atual para a sobrevivência futura. **Agroecol e Desenvol Rur Sustent.** v. 3, n. 4, p. 33-38, 2002.

MIRNAGHI, F.S.; CHEN, Y.; SIDISKY, L.M, PAWLISZYN, J. Optimization of the coating procedure for a high-throughput 96-blade solid phase microextraction system coupled with LC-MS/MS for analysis of complex samples. **Analytical Chemistry**, v. 83, p. 6018, 2011.

MIRNAGHI, F. S., MOUSAVI, F., ROCHA, S. M., PAWLISZYN, J. Automated determination of phenolic compounds in wine, berry, and grape samples using 96-blade solid phase microextraction system coupled with liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 2013. Vol. 1276, p. 12-19.

MORELLOS, A.; PANTAZI, X.E.; MOSHOU, D M.; ALEXANDRIDIS, T.; WHETTON, R.; TZIOTZIOS, G.; WIEBENSOHN, J.; BILL, R.; MOUAZEN, A.M. Machine learning based prediction of soil total nitrogen, organic carbon and moisture content by using VIS-NIR spectroscopy. **Biosystems Engineering**, v. 152, p. 104-116, 2016.

MORÉS, L.; DIAS, A.N.; CARASEK, E. Development of a high-throughput method based on thin-film microextraction using a 96well plate system with a cork coating for the extraction of emerging contaminants in river. **Journal of separation Science**, 2017

NAWALA, J.; CZUPRYNSKI, K.; POPIEL, S.; DZIEDZIC, D.; BELDOWSKI, J. Development of the HS-SPME-GC-MS/MS method for analysis of chemical warfare agent and their degradation products in environmental samples. **Anal. Chimica Acta.** p.1-14, 2016.

NETO, F, R A.; NUNES, D, S, S. **Cromatografia princípios básicos e técnicas afins.** 1. Ed. Rio de Janeiro: Interciência, p.23-25, 2003.

NOGUEIRA, J.M.F.; ALMEIDA, C. Determination of steroid sex hormones in real matrices by bar adsorptive microextraction (BA $\mu$ E). **Talanta**, v. 136, p. 145-154, 2015.

OLIVEIRA, A. R. M.; MAGALHÃES, I. R. S.; SANTANA, F. J. M.; BONATO, P. S. Microextração em fase líquida (lpme): fundamentos da

técnica e aplicações na análise de fármacos em fluidos biológicos. **Quimimica Nova**, v.31, n.3, p. 637-644, 2008.

ORTIZ, M.C.; SARABIA, L. Quantitative determination in chromatographic analysis based on n-way calibration strategies. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, p. 94-110, 2007.

OTOMO, J. I. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para a determinação de hormônios, considerados disruptores endócrinos, nas águas destinadas ao abastecimento público na região do Rio Paraíba do Sul, SP. Dissertação de mestrado, IPEN-CNEN-SP, São Paulo, 2010.

OTTO, M. **Chemometrics**. 1. ed. Weinheim: Wiley, 1999.

PIMENTEL, M. F.; BARROS, N, B. Calibração: Uma revisão para químicos analíticos, **Química Nova**, n.19, p.268-277,1996.

PINTO, M. A. L.; QUEIROZ, M. E. C. Extração em ponteiros descartáveis: fundamentos teóricos e aplicações. **Scientia Chromatographica**. v.7, p.101-108, 2015.

PIQUERAS, S. ; DUPONCHEL, L. ; TAULER, R. ; JUAN, A. Resolution and segmentation of hyperspectral biomedical images by multivariate curve resolution-alternating least squares. **Analytica Chimica Acta**, v.705, p.182–192, 2011.

PLOTAN, M.; FRIZZELL, C.; ROBINSON, V.; ELLIOTT, C.T.; CONNOLLY,L. Endocrine disruptor activity in bottles mineral and flavoured water. **Food chemistry**, v. 136, p. 1590-1596, 2013.

PSILLAKIS, E.; KALOGERAKIS, N. Developments in liquid-phase microextraction. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 9, p. 565-574, 2003.

RIBANI, Marcelo, Carla B. G. Bottoli, Carol H. Collins, Isabel C. S. F. Jardim e Lúcio F. C. Melo. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, out. 2004.

RIBEIRO, G.M.; MADIVADUA, D.A.; CURTI, S.M.M.; PANTEAN, L.P.; MARÇO, P.H.; VALDERRAMA, P. Pseudo-univariate calibration based on independent component analysis for determination of the

carbendazim concentration in Orange juice. **Microchemical Journal**, v. 134, p. 114-118, 2017.

RODRÍGUEZ-CUESTA, M.J.; BOQUÉ, R.; RIUS, F.X.; VIDAL, J.L.M.; FRENICH, A.G. Development and validation of a method for determining pesticides in groundwater from complex overlapped HPLC signals and multivariate curve resolution. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 77, p. 251-260, 2005.

SAVITZKY, A.; GOLAY, M.J.E. Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures. **Analytical Chemistry**, v. 36, p. 1627-1639, 1964.

SCHIAVINI, J. A.; CARDOSO, C. E.; RODRIGUES.; Desreguladores endócrinos no meio ambiente e o uso de potenciais bioindicadores. **Eletrônica**, v. 4, n.3, p. 33-48, 2011.

SENA, M. M.; FREITAS, C.B.; SILVA, L. C.; PÉREZ, C. N.; PAULA, Y. O. Determinação espectrofotométrica simultânea de paracetamol e ibuprofeno em formulação farmacêuticas usando calibração multivariada. **Química Nova**, v.30, p.75-79, 2007.

SHEN, G.; LEE, H. K. Hollow Fiber-Protected Liquid-Phase Microextraction of Triazine Herbicides. **Analytical Chemistry**, v. 74, n. 3, p. 648-654, 2002.

SIGMA-ALDRICH. **Bioanalysis with SPME**. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/reporter-us/bioanalysis-with-spme.html>>. Acesso em: 28 jan 2018.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J. **Fundamentos de Química Analítica**. Tradução da 8ª ed. Norte-Americana, Thomson Learning Ltda, 2006.

SZJTLLI, J.; **Cyclodextrin Technology**. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1988.

TAPIERO, H.; BA, G.N.; TEW, K.D. Estrogens and environmental estrogens. **Biomedical pharmacother**, v. 56, p. 36-44, 2002.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos. Experimentais, um tutorial. **Química nova**, v. 29, n. 2, p. 338-350, 2006.

THISSEN, U.; PEPERS, M.; ÜSTÜN, B.; MELSSSEN, W.J.; BUYDENS, L.M.C. Comparing support vector machines to PLS for spectral regression applications. **Chemometrics and Inteligente Laboratory systems**, v. 73, p. 169-179, 2004.

TRAN, C. D.; OLIVEIRA, D.; GRISHKO, V. I.; Determination of enantiomeric compositions of pharmaceutical products by near-infrared spectrometry. **Analytical Biochemistry**, n.2 v. 325, p. 206-214, 2004.

UGLAND, H. G.; KROGH, M.; REUBSAET, L. Three-phase liquid-phase microextraction of weakly basic drugs from whole blood. **Journal of Chromatography B**, v. 798, n. 1, p. 127-135, 2003. ISSN 1570-0232.

ULRICH, S. Solid-phase microextraction in biomedical analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 902, n. 1, p. 167-194, 2000.

VALDERRAMA, P.; ROMERO, A.L.; IMAMURA, P.M.; MAGALHÃES, I.R.S, BONATO, P.S.; POPPI, R.J. Quantification of chlorpheniramine maleate enantiomers by ultraviolet spectroscopy and chemometric methods. **Analytical Bioanal chemistry**, v. 397, n. 1, p. 181-188, 2010.

VALLE, E.M.M.D. Cyclodextrins and their uses: a review. **Process Biochemistry**, v. 39, n.9, p.1033-1046, 2004.

WEDIG, M.; LAUG, S.; CHRISTIANS, T.; THUNHORST, M.; HOLZGRABE, U. Do we know the mechanism of chiral recognition between cyclodextrin and analyte? **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 27, p.531-540, 2002.

WORKMAN, J.J.J.; **NIR spectroscopy calibration basics**. In: Handbook of Near-Infrared Analysis. Eds (D.A. Burns and E.W. Ciurczak). Third Edition, CRC Press, 2008, cap. 7.

XIANG, Y.; YAN, B.; MCNEFF, C.V.; CARR, P.W.; LEE, M.L. Elevated-temperature ultrahigh-pressure liquid chromatography using

very small polybutadiene-coated nonporous zirconia particles. **Journal of Chromatography A**, v. 983, p. 83-89, 2003.

YANG, W.; LUI, R.L.M.; GAO, J.; CHAN, T.F.; YAU, S.; SPERLING, R.A.; HUANG, X. Independent component analysis-based classification of alzheimer's disease MRI data. **Journal of Alzheimer's disease**, v. 24, p. 775-783, 2011.

YILMAZ, B.; KADIOGLU, Y. Determination of 17  $\beta$ -estradiol in pharmaceutical preparation by UV spectrophotometry and high performance liquid chromatography methods. **Arabian Journal of chemistry**, v. 10, p. 1422-1428, 2017.

ZAMPRONIO, C.G.; ROHWEDDER, J.J.R.; POPPI, R.J. Artificial neural network applied to potentiometric acid-base flow injection titrations. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 62, p. 17-24, 2002.