

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
REGIONAL CATALÃO
UNIDADE ACADÊMICA ESPECIAL FÍSICA E QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO POR PONTO NUVEM DOS
HORMÔNIOS NATURAIS E1 E E2 EM AMOSTRAS DE URINA E
DETERMINAÇÃO POR CLAE/EC UTILIZANDO ELETRODO DE
DIAMANTE DOPADO COM BORO**

Kamila Pereira de Amorim

Bolsista CAPES

Catalão – GO

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

REGIONAL CATALÃO

UNIDADE ACADÊMICA ESPECIAL FÍSICA E QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO POR PONTO NUVEM DOS
HORMÔNIOS NATURAIS E1 E E2 EM AMOSTRAS DE URINA E
DETERMINAÇÃO POR CLAE/EC UTILIZANDO ELETRODO DE
DIAMANTE DOPADO COM BORO**

Kamila Pereira de Amorim

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, área de concentração de Química dos materiais, da Universidade Federal de Goiás como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Santos Andrade

Catalão – GO

2015

Ficha catalográfica elaborada automaticamente
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob orientação do Sibi/UFG.

de Amorim, Kamila Pereira

DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO POR PONTO NUVEM DOS
HORMÔNIOS NATURAIS E1 E E2 EM AMOSTRAS DE URINA E
DETERMINAÇÃO POR CLAE/EC UTILIZANDO ELETRODO DE
DIAMANTE DOPADO COM BORO [manuscrito] / Kamila Pereira de
Amorim. - 2015.

vii, 56 f.

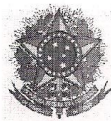
Orientador: Prof. Dr. Leonardo Santos Andrade.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Regional
Catalão, Catalão, Programa de Pós-Graduação em Química, Catalão,
2015.

Bibliografia.

Inclui abreviaturas, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Extração por ponto nuvem. 2. Eletrodo de diamante dopado com
boro. 3. Detecção eletroquímica. 4. Hormônios estrogênicos. 5. Urina. I.
Andrade, Leonardo Santos, orient. II. Título.



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Universidade Federal de Goiás – Regional Catalão
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química

Assinatura dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Kamila Pereira de Amorim realizada em 06 de agosto de 2015.

Prof. Dr. Leonardo Santos Andrade

Prof. Dr. Ricardo Francisco Brocenschi

Profa. Dra. Vanessa Nunes Alves

Dedico este trabalho:

Ao meu filho Pedro Manoel, meu marido Claudio Roberto e a meus pais José e Ilda.

Vocês são meus amores, minha inspiração!!!!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela força, amparo e suporte que senti durante a vida.

Ao Prof. Dr. Leonardo Santos Andrade, pela orientação, não apenas durante a realização deste trabalho, mas ao longo de mais de cinco anos, desde a graduação até aqui. Obrigada por sua imensa generosidade, apoio, paciência e compreensão.

Ao Prof. Dr. Mario Godinho Junior e ao Prof. Dr. Alberthmeiry Teixeira de Figueiredo, por no início da graduação terem me mostrado o “universo da pesquisa”, até então desconhecido por mim.

Agradeço a todos os professores que participaram de minha formação.

Aos membros da banca de qualificação, e também de defesa, pelas contribuições dadas.

A CAPES, pela bolsa concedida.

Ao meu esposo, agradeço principalmente por me mostrar que posso superar os desafios e minhas limitações.

A meu filho, Pedro Manoel, tão pequeno em idade e fonte tão grande de toda minha força.

Meus pais, José e Ilda, vocês são precursores da realização deste sonho, não tenho palavras para agradecê-los.

Ao Tio Dino, José Dionísio e Telma (padrinho e madrinha) pelo carinho e incentivo na busca dos meus objetivos.

À minha irmã Karina e meu “cunhado irmão” Enivaldo, obrigada pelo carinho e incentivo.

Aos meus avôs, Pedro Pereira Canêdo (*in memoriam*) e Maria Rodrigues Canêdo, obrigada pela torcida e apoio.

Ao meu sogro, José Claudio, e meus cunhados Nayara e Flavio Frederico, e em especial à Maria Cleonedes (Neide), minha sogra, por todo o apoio, principalmente em relação aos cuidados com meu filho.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório, Cida, Kellen, Maysa, Larissa, Márcia, Francielle, Murilo, Rafaela, Paula, Karol, Geisel, Jordana, Priscila, Lícia. Obrigada pelos momentos de descontração e apoio.

Ao casal Renata e Geraldo, pela acolhida e a Cida por me transportar nos primeiros anos de minha graduação.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Método de extração por ponto nuvem (EPN) foi usado para a determinação dos hormônios estrona (E1) e 17 β -estradiol (E2) em urina humana. A combinação entre as técnicas de detecção eletroquímica e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-EC) foi usada para a detecção e quantificação desses hormônios. Um eletrodo de diamante dopado com boro (DDB) pré-tratado catodicamente foi usado como material de eletrodo para todas as determinações eletroquímicas. Os parâmetros cromatográficos otimizados resultaram em uma composição de fase móvel de KH_2PO_4 (0,01 mol L⁻¹; pH 5,0) / ACN (72:28 V/V) vazão de 1,2 mL min⁻¹. Um potencial aplicado para a detecção eletroquímica de 1,0 V x Ag/AgCl (3 mol L⁻¹) foi selecionado a partir de voltamogramas hidrodinâmicos construídos para cada hormônio variando-se o potencial entre 0,3 V e 1,2 V x Ag/AgCl (3,0 mol L⁻¹). Limites de detecção ($S/R = 3$) de 500 ng mL⁻¹ e limites de quantificação de 800 ng mL⁻¹ foram obtidos para ambos os padrões dos hormônios E2 e E1 sem qualquer processo de extração. Amostras de urina em pH 5,0 e 7,0 foram investigadas quanto a influência do pH na eficiência do processo de extração, e o melhor resultado referente ao maior sinal de corrente dos hormônios foi obtido em pH 7,0. Os volumes de solvente extrator foram variados na faixa de 0,5-2,5 mL e o melhor resultado referente ao sinal de corrente dos hormônios foi obtido pelo uso de 1,0 mL de solução aquosa 10% do surfactante Tergitol TMN-6. A partir da equação da reta obtida das curvas analíticas, com e sem o procedimento de EPN, foi possível determinar o fator de pré-concentração (F_C) e todos os demais parâmetros envolvendo a eficiência do método de EPN. Uma comparação sobre a eficiência dos métodos de EPN com extração direta líquido-líquido com o solvente orgânico CCl_4 foi realizada e os resultados mostraram que método de EPN mostrou-se bastante superior a extração líquido-líquido. A validação do método foi feita a partir de ensaios de recuperação intra-dia e inter-dia, sendo avaliadas a exatidão, precisão e repetitividade. O método proposto foi aplicado em amostras individuais de urina de 1 homem, 1 mulher gestante, 1 mulher em idade fértil e 1 mulher lactante. Os valores dos coeficientes de variação das porcentagens de recuperação foram menores que 15%.

Palavras chave: Extração por ponto nuvem, eletrodo de diamante dopado com boro, detecção eletroquímica, hormônios estrogênios e urina.

ABSTRACT

Cloud point extraction method (CPE) was used for the determination of estrone (E1) and 17 β -estradiol (E2) hormones in human urine. The combination of the electrochemical detection techniques with high-performance liquid chromatography (HPLC-EC) was used for the detection and quantification of these hormones. A boron doped diamond electrode (BDD) pretreated cathodically was used as electrode material for all electrochemical measurements. The optimized chromatographic parameters resulted in a mobile phase composition of KH_2PO_4 (0.01 mol L⁻¹; pH 5.0) / ACN (72:28 V/V), flow 1.2 ml min⁻¹. An applied potential for electrochemical detection of 1.0 V x Ag/AgCl (3.0 mol L⁻¹) was selected from hydrodynamic voltammograms constructed for each hormone changing the potential between 0.3 V and 1.2 V x Ag/AgCl (3.0 mol L⁻¹). Limits of detection (S/N = 3) of 500 ng mL⁻¹ and limits of quantification of 800 ng mL⁻¹ were obtained for both E1 and E2 hormones without any extraction process. Urine samples at pH 5.0 and 7.0 were investigated aiming the influence of pH on the efficiency of the CPE process, and the optimum results for the most current signal of the hormones was obtained at pH 7.0. Extractor solvent volumes were changed in the 0.5-2.5 mL range, and the optimum results were obtained when using 1.0 mL of Tergitol TMN-6 surfactant (10% aqueous solution). From the equation of the calibration curves obtained with and without the CPE procedure it was possible to determine the pre-concentration factor (F_C) and all the other parameters involving the efficiency of CPE method. A comparison of the efficiency of CPE method with direct liquid-liquid extraction with the organic solvent CCl_4 was carried out and the results showed that the CPE method was quite superior to liquid-liquid extraction. The validation of the method was carried out from intra-day recovery experiments and inter-day and evaluated the accuracy, precision and repeatability. The proposed method was applied to individual samples of urine of 1 man, 1 pregnant woman, 1 woman in fertile age, and 1 woman in lactating stage. The values of the variation coefficients of the recovery percentages were lower than 15%.

Keywords: Cloud point extraction, boron doped diamond electrode, electrochemical detection, estrogen hormones and urine.

LISTAS DE FIGURAS

FIGURA 1.1 - Representação esquemática da extração por ponto nuvem (ROCHA, 2013. Adaptado de XIE <i>et al.</i> , 2010).....	3
FIGURA 1.2 - Representação esquemática da formação de um agregado micelar. (ROCHA, 2013. Adaptado de BEZZERRA <i>et al.</i> , 2005).....	6
FIGURA 1.3 - Estrutura química do 17 β -estradiol (ALMEIDA & NOGUEIRA, 2006).....	9
FIGURA 1.4 - Fórmula estrutural da estrona (ALMEIDA & NOGUEIRA, 2006).....	10
FIGURA 3.1 - Fotografia (I) e representação esquemática (II) da célula eletroquímica convencional de três eletrodos: eletrodo de referência (ER), contra-eletrodo (CE) e eletrodo de trabalho (ET).....	20
FIGURA 3.2 - Suporte de teflon para o eletrodo de trabalho (DDB): (a) suporte aberto mostrando o compartimento onde o eletrodo de trabalho é colocado (b) eletrodo de trabalho sendo colocado no suporte e (c) suporte fechado pronto para ser usado nas análises eletroquímicas..	20
FIGURA 3.3 - (I) Representação esquemática e (II) foto do sistema usado para a detecção e quantificação simultânea dos hormônios E2 e E1. W = Descarte; A e B = Frascos com fase móvel.....	22
FIGURA 3.4 - (I) Representação esquemática e (II) foto ilustrativo do sensor eletroquímico utilizado nas análises por CLAE-EC (ANDRADE <i>et al.</i> 2009).	23
FIGURA 3.5 - Representação esquemática do procedimento utilizado no processo de extração por ponto nuvem.....	26
FIGURA 3.6 - Metodologia resumida da extração líquido-líquido com CCl ₄	27
FIGURA 4.1-Voltamogramas cíclicos dos hormônios E2 e E1 (5,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) em eletrólito suporte de KH ₂ PO ₄ 0,01 mol L ⁻¹ , pH 5,0 e $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$, obtidos com o eletrodo de DDB (ET) e Pt (CE).....	29
FIGURA 4.2 - Cronoamperogramas obtidos para os hormônios E2 e E1(5,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) em diferentes composições de fase móvel e vazão. $E = 0,85 \text{ V x Ag/AgCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$; eletrodo de DDB pré-tratado catodicamente (ET) e aço inoxidável (CE). Volume de injeção = 20 μL	30
FIGURA 4.3 - Voltamograma hidrodinâmico obtido para (a) branco (solução TF 0,01 mol L ⁻¹ e ACN, 72:28, V/V) e (b) Voltamograma hidrodinâmico dos hormônios E2 e E1 (5,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Eletrodo de DDB pré-tratado catodicamente (ET) e aço inoxidável (CE). Eletrólito suporte: fase móvel 72:28 (V/V) de tampão fosfato (KH ₂ PO ₄ 0,01 mol L ⁻¹ em pH 5,0) e ACN a uma vazão de 1,2 mL min ⁻¹ . Volume de injeção = 20 μL	32

FIGURA 4.4 - Voltamogramas hidrodinâmicos dos hormônios E2 e E1 ($5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$), representados como a razão sinal/corrente de fundo. Eletrodo de DDB pré-tratado catodicamente (ET) e aço inoxidável (CE). Eletrólito suporte: fase móvel 72:28 (V/V) de tampão fosfato (KH_2PO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 5,0) e ACN a uma vazão de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$. Volume de injeção = $20 \mu\text{L}$33

FIGURA 4.5- Cronoamperograma obtido referente à determinação do limite de detecção dos hormônios E2 e E1. Eletrólito suporte: fase móvel 72:28 (V/V) de tampão fosfato (KH_2PO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 5,0) e ACN a uma vazão de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$. $E = 1,0 \text{ V x Ag/AgCl}$ ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$). Eletrodo de DDB pré-tratado catodicamente (ET) e aço inoxidável (CE). Volume de injeção = $20 \mu\text{L}$34

FIGURA 4.6 - Curvas analíticas obtidas sem o procedimento de EPN. Eletrólito suporte: fase móvel 72:28 (V/V) de tampão fosfato (KH_2PO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 5,0) e ACN a uma vazão de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$. $E = 1,0 \text{ V x Ag/AgCl}$ ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$). Eletrodo de DDB pré-tratado catodicamente (ET) e aço inoxidável (CE). Volume de injeção = $20 \mu\text{L}$35

FIGURA 4.7- Cronoamperogramas obtidos na determinação dos hormônios E1 e E2 (500 ng mL^{-1}) em diferentes pH de urina. Eletrólito suporte: fase móvel 72:28 (V/V) de tampão fosfato (KH_2PO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 5,0) e ACN a uma vazão de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$. $E = 1,0 \text{ V x Ag/AgCl}$ ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$). Eletrodo de DDB pré-tratado catodicamente (ET) e aço inoxidável (CE). Volume de injeção = $20 \mu\text{L}$36

FIGURA 4.8 - Variação do sinal de corrente obtido pela detecção eletroquímica dos hormônios E1 e E2 (500 ng mL^{-1}) em função de diferentes volumes de solvente extrator (Tergitol). Eletrólito suporte: fase móvel 72:28 (V/V) de tampão fosfato (KH_2PO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 5,0) e ACN a uma vazão de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$. $E = 1,0 \text{ V x Ag/AgCl}$ ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$) e $\text{pH}_{\text{urina}} 7,0$. Eletrodo de DDB pré-tratado catodicamente (ET) e aço inoxidável (CE). Volume de injeção = $20 \mu\text{L}$ 37

FIGURA 4.9 - Variação do sinal de corrente obtido pela detecção eletroquímica dos hormônios E1 e E2 (500 ng mL^{-1}) em função de diferentes volumes de CCl_4 . Eletrólito suporte: fase móvel 72:28 (V/V) de tampão fosfato (KH_2PO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 5,0) e ACN a uma vazão de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$. $E = 1,0 \text{ V x Ag/AgCl}$ ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$) e $\text{pH}_{\text{urina}} 7,0$. Eletrodo de DDB pré-tratado catodicamente (ET) e aço inoxidável (CE). Volume de injeção = $20 \mu\text{L}$38

FIGURA 4.10 - Cronoamperogramas obtidos para a amostra de urina do homem. Eletrólito suporte: fase móvel 72:28 (V/V) de tampão fosfato (KH_2PO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 5,0) e ACN a uma vazão de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$. $E = 1,0 \text{ V x Ag/AgCl}$ ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$) e $\text{pH}_{\text{urina}} 7,0$. Eletrodo de DDB pré-tratado catodicamente (ET) e aço inoxidável (CE). Volume de injeção = $20 \mu\text{L}$43

FIGURA 4.11 - Cronoamperogramas obtidos para a amostra de urina da mulher em idade fértil. Eletrólito suporte: fase móvel 72:28 (V/V) de tampão fosfato (KH_2PO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 5,0) e ACN a uma vazão de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$. $E = 1,0 \text{ V x Ag/AgCl}$ ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$) e $\text{pH}_{\text{urina}} 7,0$. Eletrodo de DDB pré-tratado catodicamente (ET) e aço inoxidável (CE). Volume de injeção = $20 \mu\text{L}$44

FIGURA 4.12 - Cronoamperogramas obtidos para a amostra de urina da mulher em lactação. Eletrólito suporte: fase móvel 72:28 (V/V) de tampão fosfato (KH_2PO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 5,0) e ACN a uma vazão de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$. $E = 1,0 \text{ V x Ag/AgCl}$ ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$) e $\text{pH}_{\text{urina}} 7,0$. Eletrodo de DDB pré-tratado catodicamente (ET) e aço inoxidável (CE). Volume de injeção = $20 \mu\text{L}$ 46

FIGURA 4.13 - Cronoamperogramas obtidos para a amostra de urina da mulher gestante. Eletrólito suporte: fase móvel 72:28 (V/V) de tampão fosfato (KH_2PO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 5,0) e ACN a uma vazão de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$. $E = 1,0 \text{ V x Ag/AgCl}$ ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$) e $\text{pH}_{\text{urina}} 7,0$. Eletrodo de DDB pré-tratado catodicamente (ET) e aço inoxidável (CE). Volume de injeção = $20 \mu\text{L}$47

LISTAS DE TABELAS

TABELA 1.1 - Parâmetros dos surfactantes não iônicos Tergitol utilizados em EPN. Adaptado pelo autor (WANG & DAI, 2010)	5
TABELA 1.2 - Excreção diária de E2 e E1 (PEREIRA, 2011)	9
TABELA 4.1 - Equações das retas e coeficientes de correlação obtidos para as curvas analíticas de calibração ($n = 3$) dos hormônios E2 e E1 com processo de EPN. Eletrólito suporte: fase móvel 72:28 (V/V) de tampão fosfato (KH_2PO_4 0,01 mol L^{-1} em pH 5,0) e ACN a uma vazão de 1,2 mL min^{-1} . $E = 1,0 \text{ V}$ x Ag/AgCl (3,0 mol L^{-1}) e $\text{pH}_{\text{urina}} 7,0$. Eletrodo de DDB pré-tratado catodicamente (ET) e aço inoxidável (CE). Volume de injeção = 20 μL	39
TABELA 4.2 - Limites de Detecção e Quantificação da Literatura para E2 e E1 em variadas matrizes e utilizando diferentes métodos de extração e análise.....	41
TABELA 4.3 - Eficiências de recuperação percentuais ($n = 5$), coeficientes de variação e t obtidos na determinação dos hormônios E2 e E1 em urina em três níveis de concentração. Eletrólito suporte: fase móvel 72:28 (V/V) de tampão fosfato (KH_2PO_4 0,01 mol L^{-1} em pH 5,0) e ACN a uma vazão de 1,2 mL min^{-1} . $E = 1,0 \text{ V}$ x Ag/AgCl (3,0 mol L^{-1}) e $\text{pH}_{\text{urina}} 7,0$. Eletrodo de DDB pré-tratado catodicamente (ET) e aço inoxidável (CE). Volume de injeção = 20 μL	42
TABELA 4.4 - Resultados obtidos pela aplicação do método ($n = 3$) por meio da análise dos hormônios E2 e E1 das amostras de urina de cada indivíduo. Eletrólito suporte: fase móvel 72:28 (V/V) de tampão fosfato (KH_2PO_4 0,01 mol L^{-1} em pH 5,0) e ACN a uma vazão de 1,2 mL min^{-1} . $E = 1,0 \text{ V}$ x Ag/AgCl (3,0 mol L^{-1}) e $\text{pH}_{\text{urina}} 7,0$. Eletrodo de DDB pré-tratado catodicamente (ET) e aço inoxidável (CE). Volume de injeção = 20 μL	48

LISTAS DE ABREVIATURAS

ACN:	Acetonitrila
CLAE-EC:	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção Eletroquímica
CMC:	Concentração Micelar Crítica
CV:	Coeficiente de Variação
DDB:	Diamante Dopado com Boro
E1:	Estrona
E2:	17 β -Estradiol
EE2:	17 α -etinilestradiol
EO:	Moléculas de Oxietileno
EPN:	Extração por Ponto Nuvem
F_C:	Fator de Pré-Concentração
F_D:	Fator de Diluição
HLB:	Hidrofílico-lipofílico
LD:	Limite de Detecção
LQ:	Limite de Quantificação
R%:	Recuperação percentual
TF:	Tampão Fosfato
TPN:	Temperatura de Ponto Nuvem

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 - ASPECTOS GERAIS	1
1.2 - EXTRAÇÃO POR PONTO NUVEM (EPN)	2
1.2.1 - SURFACTANTES	5
1.2.2 - FATOR DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO (F_c)	7
1.3 - HORMÔNIOS ESTROGÊNIOS NATURAIS E SUA DETECÇÃO	7
1.3.1 - 17β-ESTRADIOL E ESTRONA	9
1.4 - DETECÇÃO ELETROQUÍMICA DE HORMÔNIOS NATURAIS E SINTÉTICOS	11
1.5 - ELETRODO DE DIAMANTE DOPADO COM BORO	15
1.6 - CLAE-EC	17
CAPÍTULO 2 - OBJETIVOS	18
CAPÍTULO 3 - PARTE EXPERIMENTAL	19
3.1 - PRÉ-TRATAMENTO DO ELETRODO DE DDB	19
3.2 - VOLTAMETRIA CÍCLICA	19
3.3 - CLAE-EC	21
3.3.1 - OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS	21
3.3.2 - LIMITE DE DETECÇÃO	23
3.3.3 - LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO	23
3.3.4 - CURVA DE CALIBRAÇÃO (SEM EPN)	24
3.4 - EXTRAÇÃO POR PONTO NUVEM	24
3.4.1 - VARIAÇÃO DO pH DA URINA	25
3.4.2 - VARIAÇÃO DO VOLUME DO SOLVENTE EXTRATOR	26
3.4.4 - CURVA DE CALIBRAÇÃO (COM EPN): DETERMINAÇÃO DO FATOR DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO	27
3.4.5 - ESTUDO DE RECUPERAÇÃO: PRECISÃO E EXATIDÃO DO MÉTODO	28
3.5 - ANÁLISE INDIVIDUAL DAS URINAS DOS VOLUNTÁRIOS	28

CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1 - VOLTAMOGRAMA CÍCLICO	29
4.2 - CLAE-EC	30
4.2.1 - OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS	30
4.2.2 - VOLTAMOGRAMA HIDRODINÂMICO	31
4.2.3 - LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO (SEM PROCESSO DE EXTRAÇÃO)	34
4.2.3 - CURVA DE CALIBRAÇÃO (SEM PROCESSO DE EXTRAÇÃO)	35
4.3 - EXTRAÇÃO POR PONTO NUVEM	36
4.3.1 - VARIAÇÃO DO pH DA URINA	36
4.3.2 - VARIAÇÃO DO VOLUME DO SOLVENTE EXTRATOR	37
4.3.4 - CURVA DE CALIBRAÇÃO COM EPN: DETERMINAÇÃO DO FATOR DE PRÉ- CONCENTRAÇÃO	39
4.3.5 - ESTUDO DE RECUPERAÇÃO: DETERMINAÇÃO DA PRECISÃO E DA EXATIDÃO DO MÉTODO	41
4.4 - APLICAÇÃO DO MÉTODO: ANÁLISE INDIVIDUAL DAS URINAS DOS VOLUNTÁRIOS	43
CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES	49
REFERÊNCIAS	50

Introdução

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - ASPECTOS GERAIS

O desenvolvimento de doenças cardiovasculares causadas pela má circulação do sangue, tais como acidente vascular cerebral (AVC) e doença arterial coronária vêm sendo relacionados à baixa concentração de hormônios naturais no organismo, entre eles, o 17 β -Estradiol (E2) e a estrona (E1) (HU *et al.*, 1999; BRACAMONTE & MILLER, 2001). Além disso, pesquisadores têm relatado que apenas com a reposição hormonal é possível obter efeitos benéficos em pacientes portadores da doença de Alzheimer, sendo feito o acompanhamento da quantidade de hormônios ministrados e a quantidade de hormônios que foi excretada, obtendo, dessa forma, a quantidade de hormônio que realmente foi absorvida pelo organismo de cada paciente (FILLIT *et al.*, 1986; HONJO *et al.*, 1989; HONJO *et al.*, 2001).

Vários métodos analíticos têm sido desenvolvidos para determinação de estrogênios em fluidos biológicos, tendo como base ensaios biológicos ou técnicas cromatográficas. Os ensaios biológicos são bem acessíveis, de fácil manuseio e de elevado rendimento, e de baixo custo (SPIERTO *et al.*, 2001). Por outro lado, ensaios biológicos para determinação de estrogênios em urina possuem baixa reprodutibilidade (GEISE, 2003). Diferentes técnicas cromatográficas tais como cromatografia em fase gasosa (CG), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com diferentes detectores têm aplicações extensas para a determinação simultânea de vários estrogênios em urina (SHIMADA *et al.*, 2001).

Técnicas de preparo de amostra tais como extração líquido-líquido (ELL), extração em fase sólida (SPE) e microextração em fase sólida (SPME) são usadas para extrair e pré-concentrar as amostras de urina (ALMEIDA & NOGUEIRA, 2006). Entretanto, estas técnicas apresentam algumas desvantagens, como por exemplo, a necessidade de grandes volumes de amostra e também o uso de solventes orgânicos tóxicos.

Sendo assim, torna-se primordial o desenvolvimento de técnicas tanto de extração, quanto de detecção desses hormônios em matrizes biológicas tais como urina e sangue. Nesse sentido, o uso da técnica de extração por ponto nuvem (EPN) como etapa de extração e/ou pré-concentração do analito que antecede a análise cromatográfica de compostos orgânicos, tem se tornado foco de interesse de diversos ramos de pesquisa, sendo amplamente utilizada para extração e pré-concentração de íons metálicos em matriz de urina

Introdução

(ROCHA, 2013), Entretanto, até onde foi possível verificar, nenhum trabalho relativo à detecção eletroquímica de qualquer hormônio, utilizando a técnica de extração por ponto nuvem em urina foi encontrado na literatura. Além disso, estudos sistemáticos sobre a otimização desta técnica em determinações eletroanalíticas ainda são inexistentes.

Nesse sentido, estudos científicos sobre a determinação de hormônios com extração por ponto nuvem por métodos cromatográficos acoplados à sensores eletroquímicos e utilizando eletrodo de DDB tornam-se muito atrativos, especialmente em função da grande margem de exploração investigativa que é oferecida pelo tema.

1.2 - EXTRAÇÃO POR PONTO NUVEM (EPN)

Há diversas metodologias de preparo de amostra para análises por cromatografia líquida que são fundamentais para extrair, pré-concentrar e remover impurezas de amostras de modo a não danificar o sistema cromatográfico. Para baixar os limites de detecção e quantificação da técnica é de fundamental importância pré-concentrar a amostra quando os analitos estiverem em concentrações baixas, como é o caso dos hormônios em urina (SOCAS-RODRÍGUEZ *et al.*, 2013; ZOU *et al.*, 2012).

Dentre os procedimentos de preparo de amostras para cromatografia líquida existente para quantificação de hormônios naturais, destacam-se a extração líquido-líquido (SOCAS-RODRÍGUEZ *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2012), extração em fase sólida (SPE) (SOCAS-RODRÍGUEZ *et al.*, 2013; LISBOA *et al.*, 2013; GORGA *et al.*, 2013; FAYAD *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2012), a extração assistida por micro-ondas (ZULOAGA *et al.*, 2012) e, mais recentemente, a extração por ponto nuvem (ROCHA, 2013; ZOU *et al.*, 2012).

O método de EPN foi primeiramente adotado por WATANABE & TANAKA (1978) para a extração de íons metálicos e, desde então, tem sido extremamente investigado na pré-concentração e separação de íons metálicos, poluentes orgânicos, proteínas, hormônios e vírus (BEZERRA & FERREIRA, 2006; GORTZI *et al.*, 2008; SILVA, 2008; WU *et al.*, 2008; WANG & DAI, 2010).

A EPN é uma técnica que se baseia no uso de surfactantes como solvente extrator onde uma solução aquosa de um surfactante torna-se turva pela adição de uma substância apropriada ou por alteração de algumas de suas propriedades, tais como temperatura, força iônica do meio ou pressão. A turbidez da solução ocorre porque o surfactante atinge o chamado ponto nuvem. Assim, a solução separa-se em duas fases isotrópicas distintas: uma rica em surfactante contendo o analito orgânico ou inorgânico

Introdução

desejado e de pequeno volume, e outra fase pobre em surfactante, de grande volume, e com a concentração do surfactante próxima a sua concentração micelar crítica (BEZERRA & FERREIRA, 2006). A fase rica em surfactante tanto pode estar na parte inferior, quanto na parte superior, dependendo da densidade do surfactante, como mostra a FIGURA 1.1.

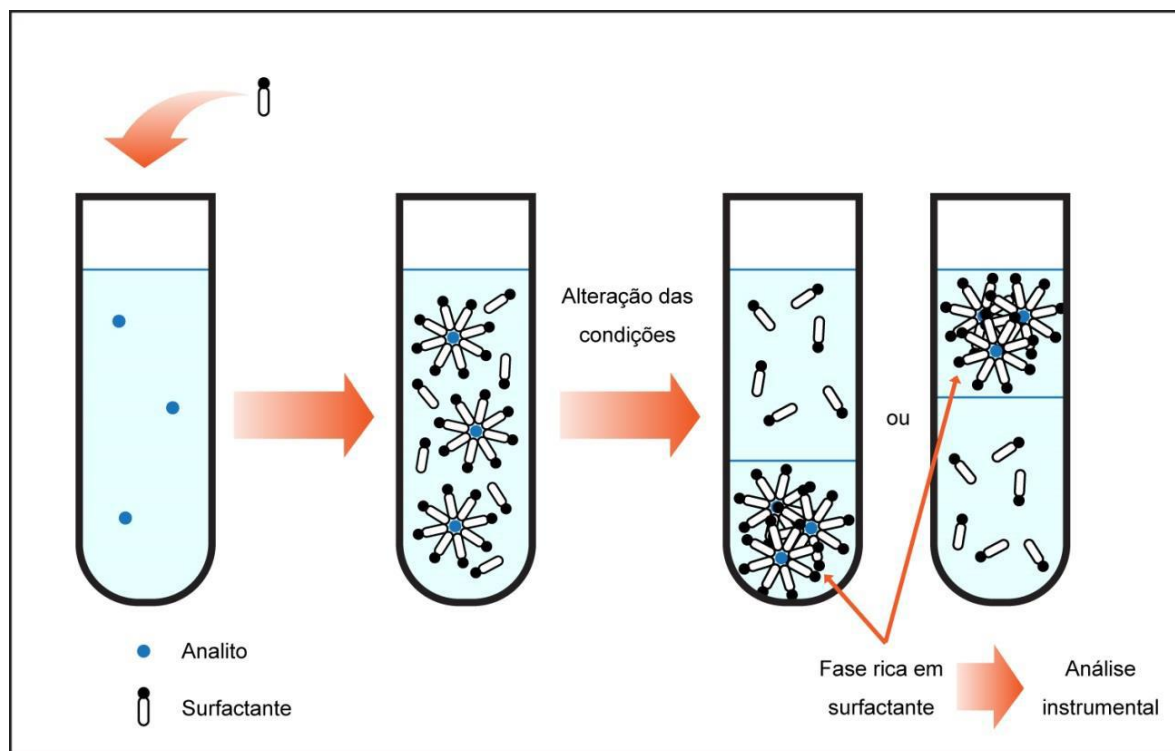


FIGURA 1.1 - Representação esquemática da extração por ponto nuvem (ROCHA, 2013. Adaptado de XIE *et al.*, 2010).

A EPN é uma técnica que está de acordo com os princípios da "Química Verde", já que é considerada uma "técnica limpa", pois utiliza como meio extrator soluções diluídas de surfactantes, contribuindo para uma pequena geração de resíduos de laboratório, de baixa toxicidade, são não-voláteis, e muito pouco inflamáveis. Essa técnica é considerada promissora, comparada com a extração líquido-líquido convencional ou SPE, que utilizam grandes volumes de solventes orgânicos (TOBISZEWSKI *et al.*, 2009).

A EPN possui a propriedade de "solubilizar" compostos orgânicos no núcleo micelar hidrofóbico. Portanto, é amplamente explorada para a extração/pré-concentração de compostos orgânicos oriundos de matrizes complexas, como amostras ambientais (solo, sedimentos, lamas, carvão, e cinzas de madeira), fluidos biológicos (urina, sangue e etc) e organismos (CARABIAS-MARTÍNEZ *et al.*, 2000; XIE *et al.*, 2010), sendo amplamente

Introdução

difundida em várias áreas de concentração da ciência, como por exemplo, indústria alimentícia e farmacêutica, química aplicada, química ambiental, biologia, medicina, entre outras (BEZZERRA *et al.*, 2005; LOPES, 2005; GORTZI *et al.*, 2008; TAECHEGAN *et al.*, 2009; MUKHERJEE *et al.*, 2011).

LIU *et al.* (2014) recentemente descreveram o processo de EPN e detecção por CLAE-UV para herbicidas da classe das triazinas em leite. O procedimento incluiu a aplicação de uma solução do surfactante não iônico Triton X-100 para a determinação de quatro triazinas (atrazina, cianazina, simazina, simetrina). Para isso, volumes de 10 mL de leite foram misturados com o agente tensoativo, ácido acético glacial e sulfato de sódio anidro, e diluídos até 15 mL com água pura. A solução obtida foi centrifugada e em seguida o sobrenadante foi filtrado através de uma membrana de 0,45 μm e ajustado a pH 5 com NaOH. Uma alíquota de 9 mL de sobrenadante foi incubado a 60 ° C durante 30 min para induzir a separação de fases. A fase rica em surfactante foi diluída para 2 mL com metanol, centrifugada novamente, filtrada através de uma membrana de 0,22 μm e então analisada por CLAE com um detector do tipo UV-vis. As curvas de calibração das quatro triazinas mostraram-se lineares na faixa de 50-2000 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os limites de detecção obtidos estiveram na faixa de 6,79-11,19 mg L^{-1} e as recuperações médias foram de 70,5-96,9%.

COSTA (2013) em sua dissertação de mestrado desenvolveu um procedimento altamente sensível e seletivo para determinação de As(V) e arsênio total em amostras de arroz por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite após extração por ponto nuvem. O procedimento é baseado na formação do complexo de íons As(V) com molibdato na presença de 50,0 mmol L^{-1} de ácido sulfúrico e 0,1 mmol L^{-1} de ácido ascórbico. O complexo As(V)-molibdato foi extraído para fase rica em surfactante da solução de 0,06 % m/v de Triton X-114. A curva de calibração foi linear na faixa de 0,03 – 10,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para íons As(V). Os limites de detecção e quantificação alcançados para As(V) foram 0,0099 e 0,0331 $\mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente, obtendo um fator de enriquecimento de 78,3 e valores de recuperação obtidos entre 90,85% à 113,10% para amostras fortificadas.

ZOU, *et al.* (2012), propuseram um método de EPN para determinação dos estrogênios 17 β -estradiol (E2), estrona (E1), e o dietilestilbestrol (DES) em urina humana diluída com água, afim de se obter uma solução de pH 7, por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD). Os autores usaram um surfactante não iônico (Tergitol TMN-6). Um ultra-som foi aplicado para melhorar a eficiência da extração e, sob condições otimizadas,

Introdução

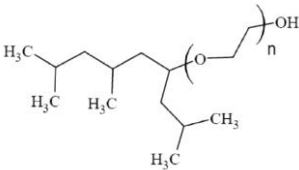
o intervalo linear para as curvas de E2, E1 e DES foi de 5,0-1000 ng mL⁻¹. Todos os coeficientes de correlação das curvas de calibração foram maiores ou iguais a 0,997. Os desvios-padrão relativo (*DPR*, $n = 5$) foram na faixa de 2,36%-5,27% e os limites de detecção (*LD*) foram 0,1 ng mL⁻¹, 0,2 ng mL⁻¹ e 0,1 ng mL⁻¹ para os hormônios E2, E1 e DES em urina humana, respectivamente.

A EPN pode também ser associada a outras tecnologias incluindo micro-ondas, ultrassom e agitação para a determinação eficaz de compostos orgânicos (YAO & YANG, 2008; XIE *et.al.*, 2010). Um problema inerente em EPN é a elevada viscosidade da fase rica em surfactante. Assim, em algumas aplicações, um volume relativamente pequeno de um solvente apropriado, como água, metanol, etanol, acetonitrila ou uma solução aquosa de outro surfactante, deve ser adicionado no sentido de suprir o problema de viscosidade (XIE *et.al.*, 2010).

1.2.1 - SURFACTANTES

Os surfactantes ou tensoativos são substâncias orgânicas anfipáticas que apresentam uma longa cadeia hidrofóbica e um pequeno grupo carregado ou polar hidrofílico. Nos surfactantes derivados de alcoóis secundários de alquilpolioxietileno, a parte hidrofóbica é formada por grupos alquila e a parte hidrofílica por cadeias de moléculas de oxietileno (EO) (WANG & DAI, 2010). A TABELA 1.1 mostra como o balanço hidrofílico-lipofílico (HLB) e a correspondente temperatura de ponto nuvem (TPN) aumentam com o número de unidades de oxietileno (EO).

TABELA 1.1 - Parâmetros dos surfactantes não iônicos Tergitol utilizados em EPN. Adaptado pelo autor (WANG & DAI, 2010).

<i>Surfactante</i>	<i>Estrutura química</i>	<i>Média de unidades de EO</i>	<i>HLB</i>	<i>TPN (°C)</i>
Tergitol TMN		3	8,1	-
Tergitol TMN-3		5	10,8	-
Tergitol TMN-5		6	13,1	36
Tergitol TMN-6		10	14,1	-
Tergitol TMN-10				

Introdução

A combinação de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos em uma única molécula confere aos surfactantes propriedades únicas de dissolução em água e outros solventes. Eles podem se organizar de diferentes formas, sendo elas micelas normais ou aquosas, as micelas reversas, microemulsões e vesículas (BALLESTEROS-GÓMEZ *et al.*, 2010).

As micelas são estruturas supramoleculares de dimensões coloidais, formadas a partir de moléculas de surfactantes que se agregam espontaneamente em solução aquosa quando estas atingem uma faixa específica de concentração denominada concentração micelar crítica (CMC). Abaixo da CMC, o surfactante está predominantemente na forma de monômeros não associados. Porém quando a CMC é ultrapassada, o processo de formação de agregados micelares é favorecido, dentro de uma dinâmica de equilíbrio com seus próprios monômeros, indicando que as micelas não são estruturas estáticas (ROCHA, 2013). A FIGURA 1.2 mostra uma representação da formação de um agregado micelar.

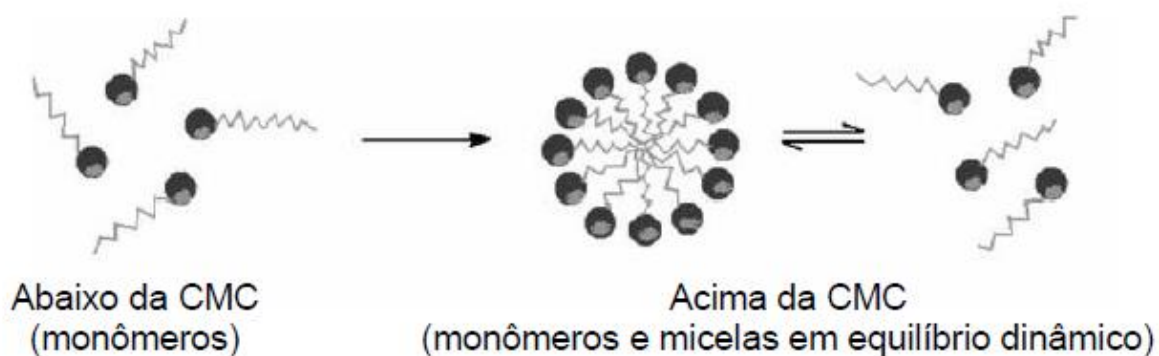


FIGURA 1.2 - Representação esquemática da formação de um agregado micelar. (ROCHA, 2013. Adaptado de BEZZERRA *et al.*, 2005).

Há uma estreita faixa de concentração do surfactante em que a separação das fases ocorre com maior facilidade, e na qual a eficiência de extração e, conseqüentemente, o sinal analítico são máximos. Acima dessa faixa, o sinal analítico é prejudicado devido ao aumento do volume final da fase micelar, afetando o fator de pré-concentração (F_C) e resultando, portanto, em efeitos de diluição. Entretanto, se a concentração de surfactante for menor do que a recomendada, a precisão e reprodutibilidade, provavelmente, serão afetadas devido à fase resultante rica em surfactante não ser suficiente para serem obtidas medidas reprodutíveis da extração e separação (PALEOLOGOS *et al.*, 2005).

A classificação dos surfactantes é baseada na sua natureza, sendo assim os surfactantes podem pertencer a uma das quatro categorias seguintes: não iônicos, catiônicos,

Introdução

aniônicos e anfóteros. A temperatura de ponto nuvem de soluções micelares pode ser alterada pela adição de sais, alcoóis, outros surfactantes de caráter iônico bem como de algumas substâncias orgânicas ou inorgânicas que provoquem o aumento (efeito “*salting-in*”) ou a diminuição (efeito “*salting-out*”) da solubilidade da fase micelar em água (COSTA, 2013).

Os sais caotrópicos, como os de ânions SCN^- , I^- e Br^- , levam ao efeito “*salting-in*”, ou seja, aumentam as temperaturas de ponto nuvem. Por outro lado, a adição de eletrólitos de caráter cosmotrópico, como os ânions F^- , Cl^- , SO_4^{2-} e CO_3^{2-} , promovem a redução de ligações de hidrogênio envolvendo a rede de moléculas da água, com consequente hidratação dos grupos oxietileno, reduzindo a solubilidade dos monômeros do surfactante, o que diminui a temperatura de ponto nuvem dos surfactantes, e a consequente separação de fases, principalmente se tratando dos surfactantes não iônicos como os da família dos Tergitois (COSTA, 2013; ROCHA, 2013).

1.2.2-FATOR DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO (F_C)

O fator de pré-concentração ou fator de enriquecimento é o parâmetro analisado para verificar a eficiência da extração e da pré-concentração. Quanto maior o seu valor, melhor a eficiência. O F_C é definido como sendo a razão entre o volume da solução usada e o volume da fase rica em surfactante (coacervato). Calculado dessa forma, admite-se uma transferência total do analito para a fase micelar (ESCALEIRA, 2005). A forma mais correta para determinar o F_C é construindo duas curvas de calibração: uma com procedimento de extração e a outra sem o procedimento de extração. O F_C é determinado pela razão entre os coeficientes angulares das curvas analíticas obtidas com e sem o procedimento de extração, vide Equação 1 (ESCALEIRA, 2005; COSTA, 2013).

$$F_C = a_1/a_2 \quad (\text{Equação 1})$$

onde, F_C é o fator de pré-concentração, a_1 é o coeficiente angular da curva de calibração com extração e a_2 é o coeficiente angular da curva de calibração sem extração.

1.3 - HORMÔNIOS ESTROGÊNIOS NATURAIS E SUA DETECÇÃO

Hormônios esteróides são um grupo de compostos biologicamente ativos que são sintetizados pelo organismo a partir do colesterol e têm em comum um anel ciclopentanoperidrofenantreno. Esteróides naturais são secretados pelo córtex supra-renal, testículos, ovários e na placenta em humanos e animais, e incluem progestogênios,

Introdução

glicocorticóides, mineralocorticóides, androgênios e estrogênios (SHIMADA *et al.*, 2001; YING *et al.*, 2002).

A determinação do papel dos estrogênios e seus metabólitos na regulação da reprodução de células tem sido objeto de estudos científicos diversos. Os estrogênios (estradiol, estrona e estriol) são predominantemente hormônios femininos, que são importantes para a manutenção da saúde reprodutiva dos tecidos, seios, pele e cérebro.

A fim de analisar os estrogênios, diferentes técnicas podem ser aplicadas como métodos imunológicos, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia gasosa (CG) em diferentes matrizes.

O método mais comum para determinação de hormônios em matrizes biológicas é o imunoenensaio enzimático. Existem duas versões do método imunológico disponíveis: imunoenensaio enzimático (EIA) (SU *et al.*, 2003) e radioimuno ensaio (RIA) (SPIERTO *et al.*, 2001). Apesar da EIA ser a técnica de menor custo financeiro, algumas desvantagens tais como rotina de execução muito trabalhosa e a não garantia de reprodutibilidade e sensibilidade são observadas. Por outro lado, o método RIA é sensível e reprodutível, entretanto, apresenta como desvantagem a utilização de radioisótopos e por isso há restrição ao usá-lo em função da manipulação com materiais radioativos (MONERRIS, 2015).

A CLAE é compatível com diferentes tipos de detectores tais como o eletroquímico (EC) (YAMADA *et al.*, 2002; ANDRADE *et al.*, 2009; PREECHAWORAPUN *et al.*, 2006), por arraste de díodo (DAD) (ALMEIDA & NOGUEIRA, 2006), ultravioleta (UV) (INGRAND *et al.*, 2003) ou espectrometria de massa (MS) (SHIMADA *et al.*, 2001). Já a cromatografia em fase gasosa permite a detecção por espectrometria de massa (MS) (SHIMADA *et al.*, 2001) e por captura de elétrons (DCE) (PINNELLA *et al.*, 2001).

Ao comparar as técnicas de detecção descritas acima, a mais sensível, precisa e de mais baixo custo é a CLAE. Dentre os detectores usados em CLAE citados, o eletroquímico (EC) é o que apresenta maior sensibilidade, e baixo custo. Através da aplicação de CLAE-EC é possível obter sensibilidade e precisão, mantendo ao mesmo tempo um custo de medida relativamente baixo.

Procedimentos que permitam análises de diagnóstico para interpretações médicas mais precisas e rápidas, sobre o nível de estrogênios biologicamente ativos, tais

Introdução

como E2 e o E1, são importantes para o controle da ação e mau funcionamento das glândulas endócrinas. As alterações nos níveis desses hormônios podem estar associadas a distúrbios do sistema endócrino que por sua vez, podem estar associados à doenças como câncer de mama, anorexia nervosa, e pseudo-hermafroditismo (ZOU *et al.*, 2012) ou para monitorar a terapia de reposição hormonal (TRH) e detectar a puberdade precoce (HOGERVORST *et al.*, 2003).

A TABELA 1.2 mostra os valores normais de excreção diária de E2 e E1. Pode-se observar que as mulheres excretam maiores quantidades desses hormônios em relação aos homens, podendo ainda variar suas quantidade excretadas de acordo com o período da vida sexual.

TABELA 1.2: Excreção diária de E2 e E1 (PEREIRA, 2011).

<i>Indivíduos</i>	<i>[E2]/$\mu\text{g dia}^{-1}$</i>	<i>[E1]/$\mu\text{g dia}^{-1}$</i>
Homens	1,6	3,9
Mulheres em idade fértil	3,5	8
Mulheres em menopausa	2,3	4
Mulheres em gestação	259	600

1.3.1 -17 β -ESTRADIOL E ESTRONA

O estrogênio natural 17 β -estradiol (E2), (FIGURA 1.3), é secretado através do ovário e considerado biologicamente como o estrogênio ovariano mais potente. É um hormônio predominantemente feminino e é responsável pela manutenção da reprodução das células dos seios, da pele e cérebro (MURUGANANTHAN *et al.*, 2008; YOSHIHARA & MURUGANANTHAN *et al.*, 2008; GUEDES, 2008; PEREIRA, 2011).

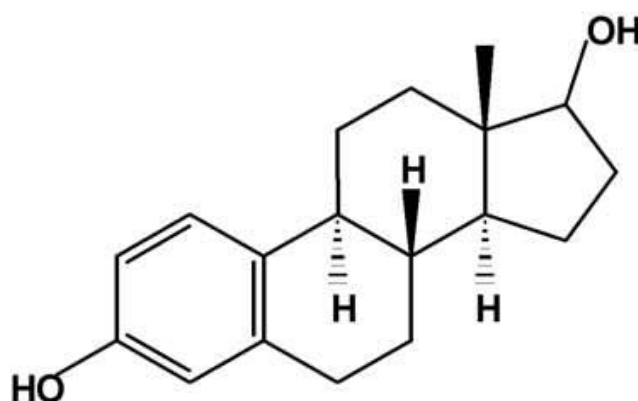


FIGURA 1.3 - Estrutura química do 17 β -estradiol (ALMEIDA & NOGUEIRA, 2006).

Introdução

A estrona (E1), FIGURA 1.4, é um metabólito do 17β -estradiol. Sua função no organismo humano ainda não está bem definida, porém, sua determinação, em mulheres, ajuda na avaliação de diagnósticos da menstruação pós-menopausa e, em homens, é importante na avaliação de ginecomastia (crescimento anormal da glândula mamária) ou detecção de tumores produtores de estrona (SANTOS *et al.*, 2010). É um componente estrogênico primário de várias formulações farmacêuticas, incluindo aquelas contendo estrógenos conjugados e esterificados. São excretados pela urina cerca do dobro da concentração da E1 em relação ao E2 (RONAN & MCHUGH, 2013).

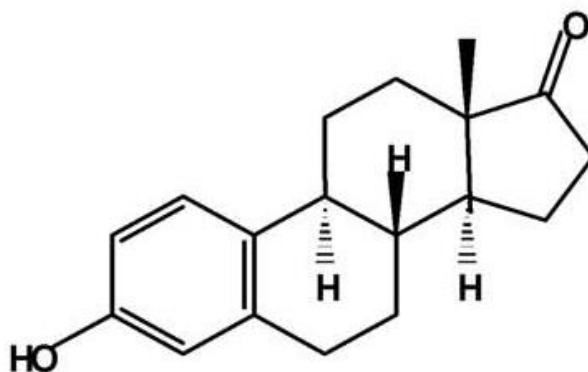


FIGURA 1.4 - Fórmula estrutural da estrona (ALMEIDA & NOGUEIRA, 2006).

Os estrogênios são produzidos pela teca interna e granulosa dos folículos ovários, pelo corpo amarelo, placenta e, em pequenas quantidades, pelo córtex da suprarrenal e pelo testículo. A biossíntese dos estrogênios inclui a sua formação a partir dos androgênios e a síntese por aromatização da androstenediona, na circulação (a aromatase é a enzima que catalisa a conversão de androstenediona a E1 e de testosterona a E2) (FERNANDES, *et al.*, 2015).

Segundo HEVIR-KENE & RIZNER (2015), mulheres pré-menopausa, a síntese de estrogênios E2 e E1 ocorre nos ovários e tecidos periféricos (tecido adiposo, osso, pele, fígado). Já em mulheres pós-menopausa, os estrogênios só podem ser produzidos em locais periféricos, que também inclui endométrio canceroso. E2 produção local pode ocorrer por duas vias: a via da aromatase, em que E2 é formado a partir da adrenal androgênios de hidroepiandrosterona (DHEA) e o DHEA-sulfato (DHEA-S), e a partir da androstenodiona adrenal ou androgênios ovários e testosterona; e a via da sulfatase, em que E2 é derivada a E1.

Introdução

Em gestantes, depois das primeiras 5 semanas de gravidez, a placenta torna-se o principal órgão de produção de estrogênios. Ela placenta é, contudo, um "órgão endócrino incompleto", uma vez que necessita de precursores formados pela mãe e pelo feto para sintetizar os estrogênios e a progesterona. O colesterol, necessário à síntese de progesterona, é fornecido pela circulação materna; os androgênios, necessários à síntese de estrogênios, são fornecidos pelo feto, pois a placenta carece de 17-hidroxilase e de 17,20-desmolase, imprescindíveis à síntese de androgênios. A placenta utiliza o DHEA-S produzido pelas supra-renais materna e fetal e sintetiza estradiol e estrona (FERNANDES, *et al.*, 2015).

1.4 - DETECÇÃO ELETROQUÍMICA DE HORMÔNIOS NATURAIS E SINTÉTICOS

Técnicas eletroquímicas vêm se mostrando bastantes promissoras para a determinação de uma extensa classe de compostos orgânicos, uma vez que o avanço tecnológico contribui para o desenvolvimento de sensores eletroquímicos que permitem a determinação de concentrações cada vez menores, além de apresentar baixo custo e permitir rapidez nas medidas (ANDRADE *et al.*, 2009; PIWOWARSKA *et al.*, 2010).

No trabalho de HU *et al.* (2002) foi descrito um método para a determinação dos estrogênios (estradiol, estrona e estriol) por redissolução. Estes estrogênios obtiveram picos de oxidação bem definidos, sendo usado como eletrodo de trabalho o carbono vítreo modificado por Nafion, na presença de cetiltrimetilamônio (CTAB). O limite de detecção foi de 1×10^{-9} mol L⁻¹ (sinal/ruído = 3) após a acumulação de 6 min utilizando a técnica de voltametria cíclica.

KIM *et al.*, 2007 descreveram a detecção eletroquímica do 17β-estradiol utilizando um chip de ouro com DNA aptâmero imobilizado. Aptâmeros de DNA se ligam especificamente ao 17β-estradiol. Eles foram selecionados pela SELEX (evolução sistemática de ligantes por enriquecimento exponencial) processo de uma biblioteca de DNA aleatoriamente, composto por cerca de $7,2 \times 10^{14}$ moléculas de DNA. Fitas de eletrodo de ouro foram utilizadas para avaliar os sinais eletroquímicos produzidos de interações entre os aptâmeros e as moléculas alvo. A imobilização do DNA aptâmero sobre o eletrodo de ouro foi baseada na interação amidina-biotina. A voltametria cíclica (VC) e valores de voltametria de onda quadrada foram medidos para avaliar a ligação química do DNA aptâmero. Quando 17β-estradiol interagiu com DNA aptâmero, a corrente diminuiu, devido à interferência do 17β-

Introdução

estradiol ligado em relação ao fluxo de elétrons produzido por uma reação redox entre ferrocianeto e ferricianeto.

No trabalho descrito por SONG *et al.* (2008) foi usado um eletrodo de carbono vítreo modificado pelo revestimento de uma película de poli (L-serina), para a determinação do 17 β -estradiol em soro sanguíneo usando a técnica de voltametria cíclica. Para isso, uma fina película de poli (L-serina) foi eletropolimerizada para a determinação de níveis vestigiais de estradiol. O comportamento eletroquímico de estradiol foi investigada. O potencial de oxidação de pico de estradiol deslocava negativamente no eletrodo de carbono vítreo (GCE) revestido pela película, em comparação com o GCE sem revestimento. Foi observado que, provavelmente, a película de poli (L-serina) possui atividade catalítica para a oxidação eletroquímica do 17 β -estradiol. Com base nisto, foi proposto um método eletroquímico sensível, simples e rápido para a determinação do 17 β -estradiol, com *LD* de $2,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹.

MARTÍNEZ *et al.* (2012) descrevem em seu trabalho o desenvolvimento de um método preciso, sensível e seletivo para captura, pré-concentração e determinação de EE2 (17 α -etinilestradiol) presentes em amostras de água usando: partículas magnéticas (MPs) como suporte para a captura e pré-concentração de EE2 por bioafinidade e um eletrodo de carbono vítreo modificado com múltiplas nanotubos de carbono (MWCNTs-walled/GCE) como sistema de detecção. O processo de captura foi baseado no princípio de imunoafinidade, o EE2 ser extraído a partir da amostra utilizando os anticorpos anti-EE2 (anti-EE2Ab), que foram previamente imobilizadas em MPs. Em seguida, a dessorção do analito foi realizada utilizando uma solução de ácido sulfúrico e a determinação do EE2 na solução pré-concentrada foi levada a cabo por voltametria de onda quadrada. Este método pôde ser utilizado para determinar o EE2 na faixa de 0,035-70 ng L⁻¹ com um limite de detecção (*LD*) de 0,01 ng L⁻¹. O método proposto foi aplicado com sucesso na determinação de EE2 em amostras de água e tem aplicações analíticas promissoras para a determinação direta de EE2 em quantidades vestigiais.

WEN *et al.* (2012) desenvolveram um sensor do tipo sanduíche de impressão molecular eletroquímico (MIES) com sensibilidade aumentada usando óxido de grafeno reduzido (rGO) combinada com nanopartículas de platina (PtNPs), para a análise do 17 β -estradiol. Monômeros funcionais foram escolhidas com o auxílio do software de Gauss 09. Com a formação da ligação Pt-S, ácido 6-mercaptopnicotínico (MNA) foi fabricado na

Introdução

superfície de compósitos PtNPs/rGO modificando o eletrodo de carbono vítreo (GCE). 17 β -estradiol (E2) foi montado pela formação de ligação de hidrogênio com MNA. As películas poliméricas foram formadas por eletropolimerização de MNA e as cavidades de reconhecimento específico foram formadas após a remoção de moldes. Usando a voltametria de pulso diferencial (DPV), o sensor resultante apresentou faixas lineares de 0,004-0,060 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 0,060-50 $\mu\text{mol L}^{-1}$. O limite de detecção (LD) de E2 foi de 0,002 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($S/R = 3$). Além disso, MIES foi utilizado com sucesso para a análise de E2 em maquiagem com boas recuperações ($> 91,9\%$) com RSD inferiores ($< 3,8\%$). Os resultados revelaram que a combinação de polímeros de impressão molecular (MIPs) com compósitos RGO / PtNPs poderia ser aplicada para a determinação sensível e seletivo de E2 no rastreamento de matriz complexa.

ZHU *et al.* (2013) desenvolveram um método de detecção sensível de células de câncer de mama humanas com base na estrutura sanduíche aptâmero - célula - aptâmero sobre a superfície do eletrodo. Neste método, uma mucina (MUC1) ligada ao aptâmero foi adotado para reconhecer células MCF-7 de cancro da mama humana, enquanto a marcação com enzima foi utilizada para produzir um sinal amplificado. O reconhecimento molecular e a amplificação do sinal foram elaborados e integrados pela estrutura sanduíche aptâmero - célula - aptâmero sobre a superfície do eletrodo. O método foi eficaz em termos de custos e convenientemente operado, implicando ajuda potencial para o desenvolvimento do diagnóstico precoce do câncer de mama.

KANSO *et al.* (2013) em seu trabalho descreveram o uso de um novo imunossensor eletroquímico para detecção do 17- β estradiol (E2) e do etinilestradiol (EE2). Eles utilizaram esferas magnéticas como suporte sólido (MBs) e eletrodos impressos como detectores. Quatro derivados de estrogênio sintético contendo um grupo carboxílico ou um grupo amina na posição C-3 foram sintetizados e ligados covalentemente a MBs funcionalizados com grupos amino ou carboxilo. O ensaio foi baseado na competição entre o estrogênio livre e imobilizado, nos sítios de ligação do anticorpo primário, com a revelação subsequente utilizando anticorpo secundário marcado com fosfatase alcalina. Testes colorimétricos preliminares foram realizados a fim de validar a aplicabilidade dos estrogênios sintéticos para o reconhecimento imunológico e para otimizar diferentes parâmetros experimentais. Num segundo passo, a detecção eletroquímica foi realizada por voltametria de onda quadrada. Sob as condições de trabalho otimizadas, os imunossensores eletroquímicos

Introdução

apresentaram uma resposta muito sensível à E2 e EE2, com os respectivos limites de detecção de 1 e 10 ng L⁻¹. Os dispositivos desenvolvidos foram aplicados com sucesso para a análise de amostras de água subterrânea e naturais.

No trabalho de KE *et al.* (2014) foi desenvolvido um aptasensor para a detecção de E2 de forma eficaz e rápida. A microestrutura dendrítica de ouro foi construída sobre a superfície de um eletrodo de diamante dopado com boro (DDB). O eletrodo de Au/DDB obtido possuía menor corrente de fundo, melhor desempenho eletroquímico e maior capacidade de biomoléculas imobilizadas. Os resultados mostraram que o aptasensor E2 construído exibiu uma ampla faixa linear de concentração de E2 com um limite de detecção de nível femtomolar de $5,0 \times 10^{-15}$ mol L⁻¹. Alta especificidade também foi evidenciada por experimentos de controle realizados com o aptasensor E2 em um sistema incluindo o estriol, bisfenol A, nonilfenol, dietilftalato, resorcinol.

SILVA *et al.* (2014) desenvolveram um eletrodo de carbono tipo diamante poroso (DCL) pela aplicação de um filme fino de DLC depositado sobre um substrato de Ti (10 mm x 10 mm x 0,5 mm) recoberto com uma camada de 10 nm de Ni. Esses eletrodos foram aplicados para a determinação dos neurotransmissores dopamina (DA) e epinefrina (EP) e do desregulador endócrino acetaminofeno (AC). Usando técnicas simples e de baixo custo, tal como voltametria cíclica, curvas analíticas na faixa de concentrações de 10 a 100 μmol L⁻¹ foram obtidas e os LD obtidos foram de 3,9 μmol L⁻¹, 4,5 μmol L⁻¹ e 2,3 μmol L⁻¹ para DA, EP, e AC, respectivamente.

No trabalho descrito por CINCOTTO *et al.* (2014) um novo material para a determinação eletroquímica de desreguladores endócrinos, utilizando um composto à base de óxido de grafeno modificado com pontos quânticos de telureto de cádmio foi avaliado. A morfologia, estrutura e eficácia eletroquímica dos eletrodos de compósitos foram caracterizadas por microscopia eletrônica de transmissão, dispersão dinâmica de luz, espectros de absorção de UV-visível, espectros de fluorescência, espectros de Raman e voltametria cíclica. A técnica de voltametria de pulso diferencial permitiu o desenvolvimento de um método para determinar níveis de 17β-estradiol na faixa de 0,2 a 4,0 μmol L⁻¹, com limite de detecção de 2,8 nmol L⁻¹ (0,76 μg L⁻¹).

CESARINO *et al.* (2015) modificaram o eletrodo de óxido de grafeno reduzido (RGO) com nanopartículas de antimônio (SbNPs), para determinação do estriol em água natural. O eletrodo RGO-SbNPs foi usado na voltametria de pulso diferencial, sendo obtidos

Introdução

os limites de detecção $0,5 \text{ nmol L}^{-1}$ ($0,14 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) para o hormônio estriol, que segundo o autor, é o menor *LD* para estriol relatado na literatura para este hormônio com o uso desta técnica em água natural.

MORAIS *et al.* (2015) desenvolveram um novo material para a determinação eletroquímica de 17β -estradiol utilizando um eletrodo baseado em óxido de grafeno reduzido e um metal complexo de porfirina, aplicado para o monitoramento ambiental. O perfil eletroquímico do eletrodo proposto foi analisado por voltametria de pulso diferencial, que mostrou uma mudança no potencial de pico de oxidação do 17β -estradiol em relação ao eletrodo de óxido de grafeno reduzido. Voltametrias de pulso diferencial foram realizadas em PBS a pH 7,0 para determinar 17β -estradiol, sem qualquer passo prévio de extração, limpeza ou derivatização, na faixa de $0,1-1,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ com *LD* de $5,3 \text{ nmol L}^{-1}$ ($1,4 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$). O sensor proposto foi aplicado com sucesso na determinação do 17β -estradiol em uma amostra de água de rio, sem qualquer passo de purificação e foi analisado pelo método de adição de padrão.

1.5-ELETRODO DE DIAMANTE DOPADO COM BORO

Devido às suas propriedades únicas, o diamante é um excelente candidato a material de eletrodo quando dopado apropriadamente para adquirir uma adequada condutividade, como é o caso dos filmes finos de DDB (HUPERT *et al.*, 2003; PLESKOV, 2000; SUFFREDINI *et al.*, 2004; ALFARO *et al.*, 2006). Para se obter condutividade elétrica suficiente para medidas eletroquímicas, filmes de diamante devem ser dopados com uma concentração mínima de átomos de dopante de $1,0 \times 10^{19} \text{ cm}^{-3}$, sendo que o boro atualmente é o dopante mais utilizado. A resistividade do diamante depende da concentração de boro no filme, sendo que suas propriedades variam sucessivamente, à medida que essa concentração aumenta, de material dielétrico a semicondutor, a semicondutor degenerado e finalmente, a semi-metal (PLESKOV, 2000).

Filmes finos de DDB possuem um importante número de propriedades eletroquímicas distinguíveis das de outras formas de carbono ligado por sp^2 comumente usadas como eletrodos, tais como carbono vítreo, grafite pirolítico e pasta de carbono. Entre essas propriedades destacam-se: (i) baixa e estável corrente de fundo; (ii) ampla janela de potencial em meios aquosos e não-aquosos; (iii) extraordinária estabilidade morfológica e microestrutural a altas densidades de corrente (por exemplo, $0,1-10 \text{ A/cm}^2$, em H_3PO_4 85%); (iv) boa resposta a alguns analitos aquosos e não-aquosos, após pré-tratamento convencional,

Introdução

e (v) estabilidade na resposta a longo prazo como por exemplo, após exposição ao ar durante meses (FUJISHIMA, 1999; ANDRADE, *et al.*, 2009 e PEREIRA, *et al.*, 2012).

As superfícies dos eletrodos de DDB recém-preparados são hidrofóbicas, muitas vezes sua superfície precisa ser modificada no sentido de permitir que medidas eletroquímicas sejam realizadas, ou seja, torná-los menos hidrofóbicos ou, até mesmo, hidrofílicos. Tais modificações podem ser feitas eletroquimicamente, tanto anodicamente, com terminações com oxigênio, como catodicamente, com terminações em hidrogênio (PLESKOV, 2002; HUPERT *et al.*, 2003; SALAZAR-BANDA *et al.*, 2006).

Pouquíssimos trabalhos têm sido encontrados na literatura relacionados à detecção de hormônios naturais utilizando eletrodo de DDB seja por quaisquer técnicas e/ou matrizes. Por exemplo, no trabalho desenvolvido por BROSCENSCHI *et al.* (2014), foi usada a análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica (FIA-EC) para a análise de três compostos estrogênicos: estrona (E1), 17 β -estradiol (E2) e estriol (E3). A detecção amperométrica foi realizada utilizando um eletrodo de DDB pré-tratado catodicamente. A faixa de concentrações testada foi de 0,10-3,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, o LD ($S/R = 3$) foi de 0,10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para injeções de 250 μL dos hormônios.

No trabalho desenvolvido por GAN *et al.*, (2013), os hormônios naturais 17 β -estradiol e estrona (além de outros hormônios sintéticos) foram determinados individualmente pela técnica de voltametria de onda quadrada utilizando eletrodo de DDB modificado com negro de carbono (terminações em oxigênio). Neste trabalho, limites de detecção de 5-100 nmol L^{-1} para os hormônios foram encontrados para o eletrodo de DDB modificado.

SANTOS *et al.* (2010) usaram o DDB para a detecção e quantificação eletroquímica do hormônio estriol, em um produto farmacêutico e uma amostra de urina recolhidas durante a gravidez, por voltametria de onda quadrada. As condições experimentais otimizadas foram: uma solução de eletrólito de suporte de NaOH a um pH 12, e uma frequência de 20 Hz, uma altura de pulso de 30 mV e um incremento de potencial de 2 mV (para os parâmetros de onda quadrada). A curva analítica foi linear no intervalo de concentração de $2,0 \times 10^{-7}$ a $2,0 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} ($r = 0,9994$), com um limite de detecção de $1,7 \times 10^{-7}$ mol L^{-1} e limite de quantificação de $8,5 \times 10^{-7}$ mol L^{-1} .

Introdução

1.6 - CLAE-EC

A combinação de detecção eletroquímica com a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) a torna ainda mais eficaz, pois além de sensível passa a ser seletiva, permitindo assim a análise simultânea de vários compostos (ANDRADE *et al.*, 2009; PIWOWARSKA *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2010; BROCCENSCHI *et al.*, 2014). A CLAE é uma técnica de separação fundamentada na distribuição dos componentes de uma mistura entre duas fases imiscíveis, a fase móvel, líquida, e a estacionária, contida em uma coluna por afinidade química, o que lhes confere seletividade (ANDRADE *et al.*, 2009; YAMADA *et al.*, 2002; PIWOWARSKA *et al.*, 2010).

No trabalho de PIWOWARSKA *et al.* (2010), a técnica de CLAE-EC permitiu determinar e avaliar o nível de estrogênios e seus metabolitos no soro de amostras de sangue de mulheres grávidas. O método proposto foi aplicado com sucesso na determinação dos seguintes estrogênios: estrona (E1), 17 β -estradiol (E2), estriol (E3) e seguintes metabolitos: 2-hidroxiestradiol (2-OHE2), 4-hidroxiestradiol (4-OHE2), 4-hidroxiestrona (4-OHE1), 2-metoxiestradiol (2-MOE2) e 2-metoxiestrona (2-MOE1). Um eletrodo de carbono vítreo foi usado como eletrodo de trabalho. Os estrogênios e seus metabolitos, E1, E2, E3, 2-OHE2, 4-OHE2, 4-OHE1, 2-MOE2 e 2-MOE1, atingiram baixos limites de detecção (LD de 0,18-0,30 ng mL⁻¹), de quantificação (LQ de 0,23-0,92 ng mL⁻¹) e faixa linear entre 0,6-8,0 ng mL⁻¹.

YAMADA *et al.* (2002) otimizaram o método de determinação do E2, usando CLAE-EC. O método foi aplicado para a determinação de estradiol no plasma de ratos e o limite de detecção obtido foi de 8 pg para a solução padrão e 24 pg para a amostra de plasma, que foi de cerca de 6-8 vezes mais sensíveis em comparação com os relatórios anteriores.

VEGA *et al.* (2007) utilizaram um eletrodo de carbono vítreo modificado por nanotubos de carbono (CNT-GCE) na detecção por CLAE-EC do bisfenol A (BPA), 2,3-dimetilfenol (DMP), 17 α -ethinilestradiol (EE2) e 4-tercbutilfenol (TPB). Otimizados os parâmetros cromatográficos e eletroquímicos, injeções sucessivas destes compostos demonstraram que não ocorreu incrustação deles na superfície do eletrodo. Foram obtidos limites de detecção que variam entre 98 e 340 nmol L⁻¹.

CAPÍTULO 2 – OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi desenvolver um método alternativo para detecção e determinação dos teores de hormônios naturais em amostras de urina humana no sentido de suprir as principais desvantagens encontradas em métodos convencionais de análise de rotina deste tipo de matriz biológica.

O objetivo específico deste trabalho refere-se à validação de um método para determinação simultânea dos hormônios naturais 17β -estradiol e estrona em urina a partir da técnica de extração por ponto nuvem por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção eletroquímica sobre eletrodo de diamante dopado com boro.

CAPÍTULO 3 - PARTE EXPERIMENTAL

3.1-PRÉ-TRATAMENTO DO ELETRODO DE DDB

O eletrodo de diamante dopado com boro (DDB) utilizado como eletrodo de trabalho foi preparado pela deposição de um filme de DDB sobre um dos lados de uma placa de p-silício (1,2 cm × 1,2 cm) no “Centre Suisse d’Électronique et d’Microtechnique”, Neuchâtel, Suíça. Sobre o outro lado, da placa de p-silício foi depositado um filme fino de ouro, para propiciar contato elétrico adequado. O filme de DDB foi sintetizado pela técnica de deposição de vapor químico assistida por filamento quente (HF-CVD), com a temperatura do filamento compreendida entre 2440 °C e 2560 °C. A fase gasosa consistia em metano (CH₄) com excesso de H₂, sendo o gás de dopagem o trimetil-boro. O teor nominal de dopagem do eletrodo utilizado foi de 8000 ppm de boro.

Antes de iniciar as medidas eletroquímicas utilizando o eletrodo de DDB, pré-tratamentos anódico e catódico sobre a superfície do eletrodo de DDB (área exposta de 0,32 cm²) foram realizados, sendo o primeiro anódico com duração de 30 s e o segundo catódico com duração de 150 s, ambos utilizando uma densidade de corrente de 1,0 A cm². Nesse procedimento a solução aquosa de H₂SO₄ - Synth (0,5 mol L⁻¹) foi utilizado como eletrólito suporte, uma placa de Pt como contra-eletrodo e uma fonte de tensão/corrente Instrutherm[®] para aplicação da corrente a qual foi monitorada com auxílio de um multímetro Minipa[®] ET-1002.

Após o pré-tratamento do eletrodo de DDB, um total de 50 varreduras (voltametria cíclica) do branco eram realizadas no eletrólito suporte escolhido para as medições eletroquímicas dos analitos (KH₂PO₄ 0,01 mol L⁻¹ em pH 5,0) para estabilização da corrente capacitiva (referente ao carregamento da dupla camada elétrica). Nessas medidas o intervalo de potencial foi de 0 V a 1,2 V x Ag/AgCl (3,0 mol L⁻¹) a uma velocidade de 100 mV s⁻¹. Todas as medidas eletroquímicas realizadas neste trabalho (exceto as de pré-tratamento do eletrodo de DDB) foram feitas utilizando um Potenciostato/Galvanostato modelo PGSTAT 128N da AUTOLAB sendo as variáveis eletroquímicas controladas a partir do software GPES.

3.2 - VOLTAMETRIA CÍCLICA

As medidas de voltametria cíclica foram feitas em modo batelada, utilizando célula eletroquímica do tipo convencional (3 eletrodos), tal como mostrado na FIGURA 3.1.

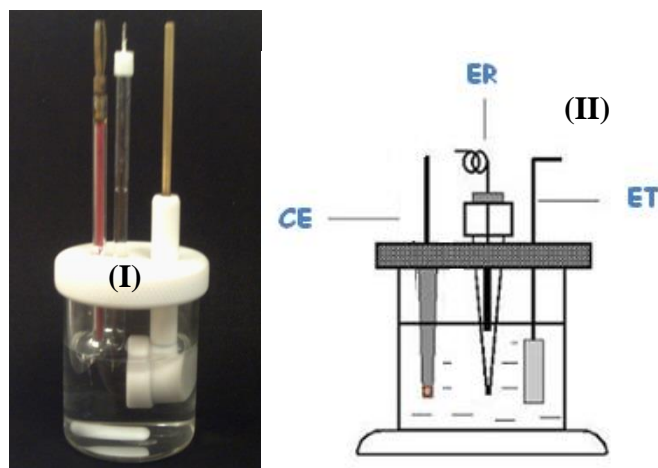


FIGURA 3.1 - Fotografia (I) e representação esquemática (II) da célula eletroquímica convencional de três eletrodos: eletrodo de referência (ER), contra-eletrodo (CE) e eletrodo de trabalho (ET).

O suporte para o eletrodo de trabalho utilizado, FIGURA 3.2, foi confeccionado em material de Teflon[®]. Uma placa de Pt foi utilizada como contra-eletrodo e um eletrodo de Ag/AgCl (3,0 mol L⁻¹) foi utilizado como eletrodo de referência. O eletrodo de referência foi preparado a partir da eletrodeposição de AgCl sobre um fio de Ag utilizando solução saturada de KCl (3,0 mol L⁻¹) e aplicando-se uma corrente anódica de 0,11 A por 30 s.

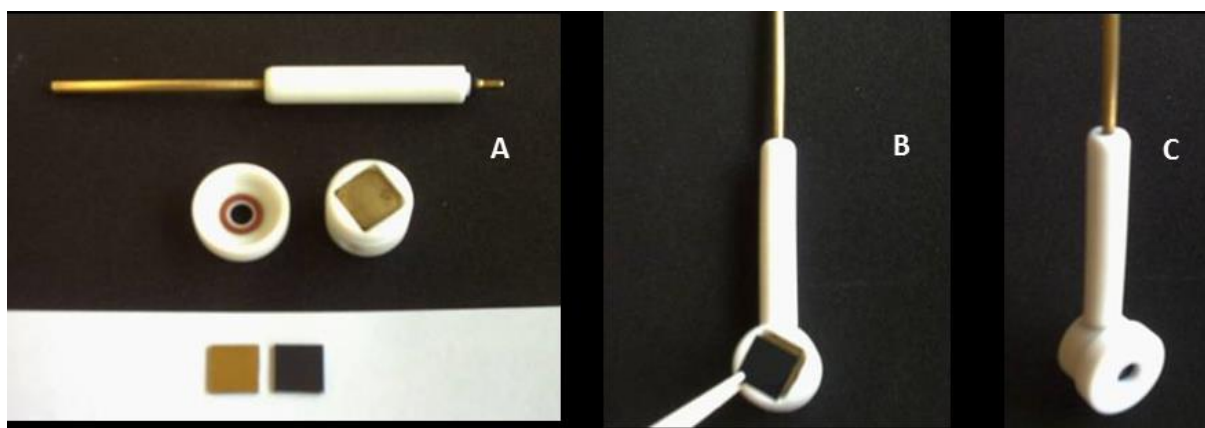


FIGURA 3.2 - Suporte de teflon para o eletrodo de trabalho (DDB): (a) suporte aberto mostrando o compartimento onde o eletrodo de trabalho é colocado (b) eletrodo de trabalho sendo colocado no suporte e (c) suporte fechado pronto para ser usado nas análises eletroquímicas.

O eletrólito suporte utilizado nas medidas voltamétricas foi uma solução tampão de fosfato (KH₂PO₄-Synth) na concentração de 0,01 mol L⁻¹ e pH 5. Sempre que

necessário, o pH do eletrólito suporte era ajustado com soluções de H_3PO_4 ou NaOH com auxílio de um pHmetro GEAKA PG1800.

Os perfis voltamétricos para os hormônios E2 e E1 foram obtidos no intervalo de potencial de 0 V a 1,2 V x Ag/AgCl (3 mol L^{-1}), a uma velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} . Primeiramente, antes da obtenção dos perfis voltamétricos dos hormônios, fazia-se uma varredura do branco (eletrólito suporte KH_2PO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 5,0), e posteriormente com auxílio de uma micropipeta, volumes de $400 \mu\text{L}$ da solução estoque de cada hormônio dissolvido em ACN eram adicionados à célula eletroquímica, resultando em uma solução de concentração analítica de $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ para ambos hormônios. A solução resultante era mantida sob agitação por 2 min para homogeneização. Após este procedimento as varreduras eram efetuadas obtendo-se assim os perfis voltamétricos dos analitos.

3.3-CLAE-EC

3.3.1 - OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

As análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram feitas em um aparelho Agilent Technologies 12200 Infinity LC (modelo G4288B). A coluna cromatográfica utilizada foi uma coluna C18 ($4,6 \text{ mm} \times 50 \text{ mm}$, Poroshell[®] $2,7 \mu\text{m}$) e $20 \mu\text{L}$ de cada um dos hormônios e também da mistura deles em várias concentrações foram injetados na coluna, a fim de obter condições que resultassem em sinais de corrente de detecção dos analitos (cronoamperogramas) com picos bem definidos e separados. A otimização das condições cromatográficas foi realizada em diferentes vazões e composições de fase móvel contendo ACN e tampão de fosfato (KH_2PO_4 -Synth) na concentração de $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 5. Para isso, o potencial aplicado foi fixado em $0,85 \text{ V x Ag/AgCl}$ ($3,0 \text{ mol/L}$). Uma vez determinada as melhores condições cromatográficas (composição da fase móvel e vazão) procedeu-se à otimização do parâmetro de potencial aplicado (voltamograma hidrodinâmico), variando-se os valores entre $0,30 \text{ V}$ e $1,2 \text{ V x Ag/AgCl}$ ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$).

Para a realização dessas análises por CLAE-EC, acoplou-se ao sistema cromatográfico (FIGURA 3.3) um sensor eletroquímico especialmente projetado e confeccionado para este fim (FIGURA 3.4). O sensor eletroquímico era controlado de forma paralela e independente por um potenciostato (PGSTAT 128N) e sua entrada era conectada diretamente à linha de saída do detector do cromatógrafo (UV-VIS). Dessa forma, os

cromatogramas e os cronoamperogramas para o E2 e E1 foram obtidos de forma individual e/ou simultânea.

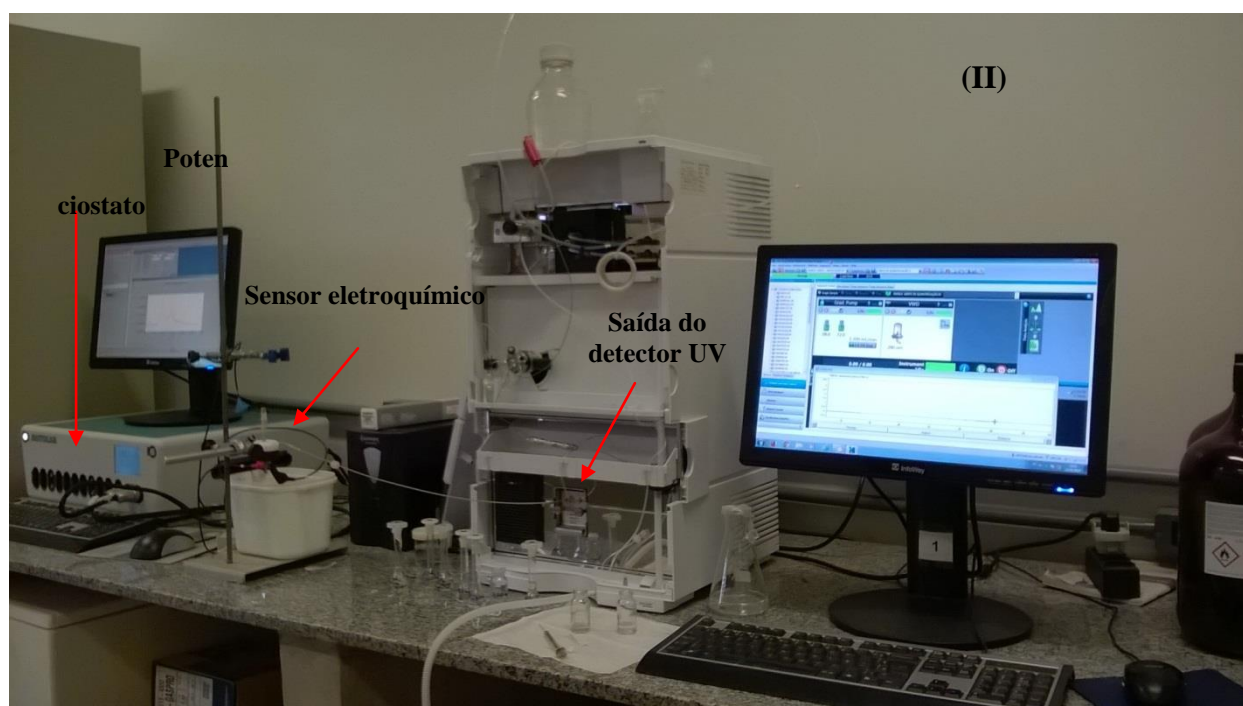
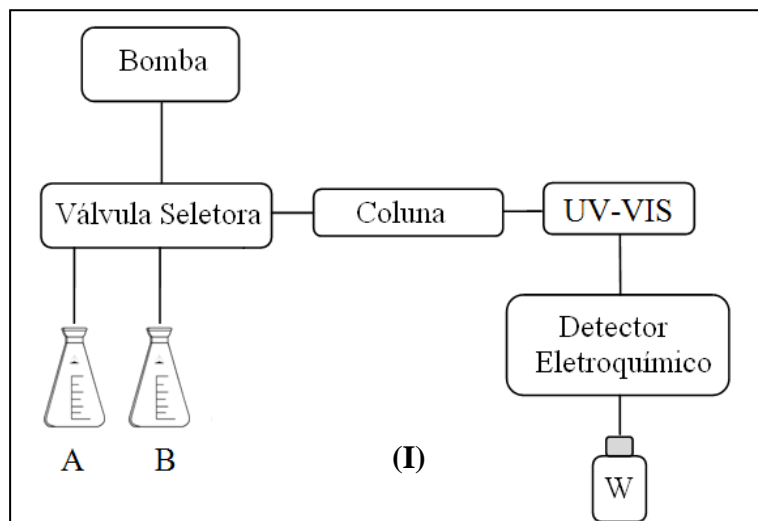


FIGURA 3.3 - (I) Representação esquemática e (II) foto do sistema usado para a detecção e quantificação simultânea dos hormônios E2 e E1. W = Descarte; A e B = Frascos com fase móvel.

O sensor eletroquímico (FIGURA 3.4) é constituído por dois blocos de Teflon[®], onde em um deles encontra-se o compartimento para o eletrodo de trabalho (f), de

referência (d) e o contra-eletrodo (c). Na parte inferior do detector um parafuso fixado tem a função de fazer o contato elétrico com o eletrodo de trabalho (g). Um anel a base de silicone (e) é responsável pela vedação do sensor, impedindo que a solução (fase móvel) escape através da junção existente entre os dois blocos de Teflon[®]. Um canal de entrada (a) conduz a solução à superfície do eletrodo de trabalho e posteriormente a mesma passa por um canal de saída (c) (tubo de aço inoxidável) o qual também é utilizado como contra eletrodo.

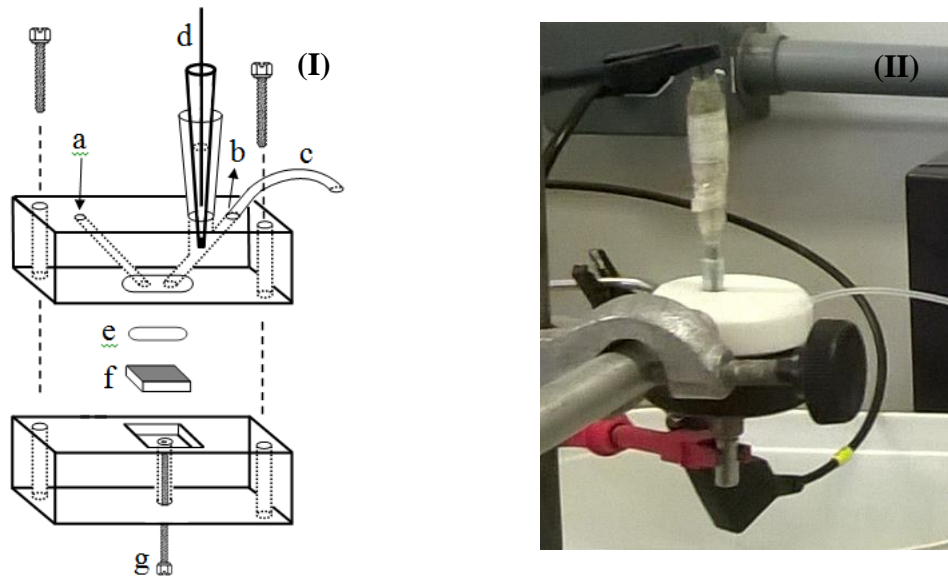


FIGURA 3.4 - (I) Representação esquemática e (II) foto ilustrativo do sensor eletroquímico utilizado nas análises por CLAE-EC (ANDRADE *et al.*, 2009).

3.3.2 - LIMITE DE DETECÇÃO

Os limites de detecção para os hormônios E2 e E1 foram obtidos por inspeção visual, considerando o sinal do pico de corrente como sendo, no mínimo, 3 vezes maior do que o sinal do ruído. Para isso, sucessivas injeções em triplicata foram feitas com diferentes concentrações da mistura dos padrões dos hormônios.

3.3.3-LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

Os limites de quantificação para os hormônios E2 e E1 foram obtidos considerando-se os menores sinais de pico de corrente registrados e com possibilidade de serem quantificados com reprodutibilidade de pelo menos 75%. Para isso, injeções sucessivas realizadas em triplicata foram feitas em diferentes concentrações da mistura dos padrões dos hormônios.

3.3.4-CURVA DE CALIBRAÇÃO (SEM EPN)

Para a obtenção da curva de calibração sem qualquer processo de extração, injeções da mistura dos padrões dos hormônios preparados em ACN foram realizadas nas seguintes concentrações: $0,80 \mu\text{g mL}^{-1}$; $1,25 \mu\text{g mL}^{-1}$; $2,50 \mu\text{g mL}^{-1}$; $5,00 \mu\text{g mL}^{-1}$; $7,50 \mu\text{g mL}^{-1}$; $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $20,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Todas as medidas foram realizadas em triplicata e cada ponto da curva foi obtido pela média aritmética do sinal de corrente registrado de cada injeção.

3.4-EXTRAÇÃO POR PONTO NUVEM

A metodologia utilizada na realização da extração por ponto nuvem (EPN) para determinação dos hormônios em urina humana, foi baseada no trabalho desenvolvido por ZOU *et al.* (2012), com algumas adequações e/ou modificações as quais estão descritas a seguir.

As amostras de urina humana foram coletadas, congeladas e então utilizadas posteriormente para análise dos hormônios naturais 17β -estadiol (E2) e estrona (E1). É importante ressaltar que, por se tratar de um trabalho de investigação que envolve seres humanos, este trabalho foi desenvolvido com a aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Goiás.

Em todos os parâmetros de investigação referentes à eficiência do método de EPN - pH da urina e volume de solvente extrator (surfactante não iônico 10% (v/v) de Tergitol TMN-6, Aldrich) - alíquotas de 10 mL de urina foram enriquecidas com diferentes volumes de solução padrão dos hormônios E2 e E1 ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$ em ACN) para obtenção das respectivas concentrações nominais adicionadas de cada hormônio (C_{ad}). Em seguida, volumes de 100 μL da fase rica em surfactante foram diluídos com 100 μL ACN e volumes de 20 μL de cada solução resultante foram injetados no sistema CLAE-EC. Define-se aqui, portanto, a C_{ad} como sendo a concentração dos hormônios na urina, antes da extração/pré-concentração em ponto nuvem, enriquecida com a adição dos padrões dos hormônios. Todas as concentrações nominais investigadas neste trabalho foram selecionadas respeitando-se os valores máximos de solubilidade em meio aquoso dos hormônios (YING *et al.*, 2002).

O fato da eficiência da EPN ser função de cada parâmetro de investigação faz com que a C_{ad} não seja necessariamente igual a concentração obtida (C_{ob}). Em outras palavras, a C_{ob} será diretamente dependente da eficiência dos processos de extração/pré-

concentração em ponto nuvem, os quais levam em conta fatores de diluição e de pré-concentração. Desta forma, define-se a C_{ob} como sendo:

$$C_{ob} = C_C \cdot F_D / F_C \quad (\text{Equação 2})$$

onde C_C é a concentração do analito determinada pela curva de calibração, obtida sem qualquer processo de extração, F_D é o fator de diluição ($F_D = 2$) e F_C o fator de pré-concentração (ver seção 1.2.2).

Uma vez determinados os valores das concentrações obtidas (C_{ob}), as eficiências de recuperação percentual (R%) dos hormônios em urina foram determinadas de acordo com a Equação 3.

$$R\% = (C_{ob} / C_{ad}) \times 100 \quad (\text{Equação 3})$$

Baseado nessas definições, os parâmetros de EPN investigados neste trabalho puderam ser determinados, e os procedimentos adotados para tais medições encontram-se descritos a seguir.

3.4.1-VARIAÇÃO DO pH DA URINA

A influência do parâmetro de concentração hidrogeniônica das amostras de urina foram investigados nos valores de pH 5 e pH 7. Para isso, o pH de volumes de 10 mL contendo a mistura de todas as urinas coletadas dos voluntários eram devidamente acertados com soluções de H_3PO_4 ou NaOH e, em seguida, enriquecidas com solução padrão dos hormônios ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$ em ACN) de tal forma a obter concentração nominal adicionada (C_{ad}) igual a 500 ng mL^{-1} para cada hormônio. Nestes estudos, o volume de solvente extrator (Tergitol TM6 10%) foi fixado em 0,5 mL, o potencial aplicado (e otimizado a partir dos voltamogramas hidrodinâmicos) para detecção eletroquímica foi de 1,0 V x Ag/AgCl ($3,0 \text{ mol/L}$). A fase móvel foi uma mistura contendo TF $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em pH = 5 e ACN na proporção 72:28 (v/v) e vazão de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$ (condições cromatográficas otimizadas).

Após a adição do solvente extrator em cada amostra de 10 mL de urina em pHs 5 e 7 e enriquecidas com os hormônios, elas foram deixadas em um banho termostático a 45°C por 45 min sendo, ao mesmo tempo, submetidas a uma radiação ultrassônica com frequência de 20 kHz. Em seguida, 0,2 g de NaCl foram adicionados em cada amostra e

finalmente as alíquotas foram centrifugadas a 4000 rpm por 3 min. Volumes de 100 μ L da fase rica em surfactante foram diluídos com 100 μ L ACN ($F_D = 2$) e volumes de 20 μ L de cada solução resultante foram injetados no sistema CLAE-EC.

3.4.2-VARIAÇÃO DO VOLUME DO SOLVENTE EXTRATOR

Uma vez otimizadas as condições cromatográficas (composição de fase móvel, vazão, potencial aplicado e pH da urina) a eficiência do processo de extração foi medida fixando-se as condições cromatográficas otimizadas e variando-se o volume de solvente extrator (Tergitol TMN-6, 10%) em 0,5 mL, 1,0 mL, 1,5 mL, 2,0 mL e 2,5 mL.

Após a adição de diferentes volumes de solvente extrator em cada amostra de 10 mL de urina enriquecida, elas foram deixadas em um banho termostático a 45°C por 45 min sendo, ao mesmo tempo, submetidas a uma radiação ultrassônica com frequência de 20 kHz. Em seguida, 0,2 g de NaCl foram adicionados em cada amostra e finalmente as alíquotas foram centrifugadas a 4000 rpm por 3 min. Volumes de 100 μ L da fase rica em surfactante foram diluídos com 100 μ L de ACN ($F_D = 2$) e volumes de 20 μ L de cada solução resultante foram injetados no sistema CLAE-EC. A FIGURA 3.5 sumariza de forma representativa a metodologia usada no processo de EPN descritos nas seções 3.4.1 e 3.4.2.

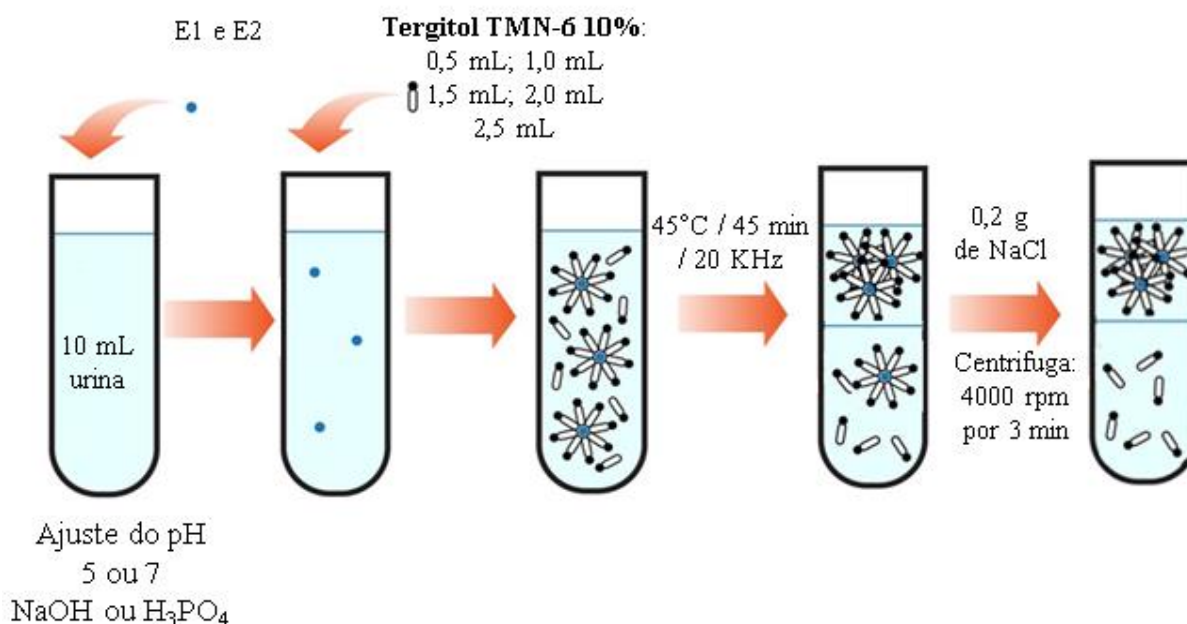


FIGURA 3.5 – Representação esquemática do procedimento utilizado no processo de extração por ponto nuvem.

3.4.3 –EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO COM SOLVENTE ORGÂNICO

Para efeitos de comparação de métodos de extração, o mesmo procedimento descrito na Seção 3.4.2 foi realizado utilizando-se como solvente extrator tetracloreto de carbono (CCl_4). Diferentemente do processo de EPN, neste caso não foi adicionado NaCl após o procedimento de aplicação de ultrassom. A FIGURA 3.6 ilustra de forma resumida o procedimento de extração líquido-líquido.

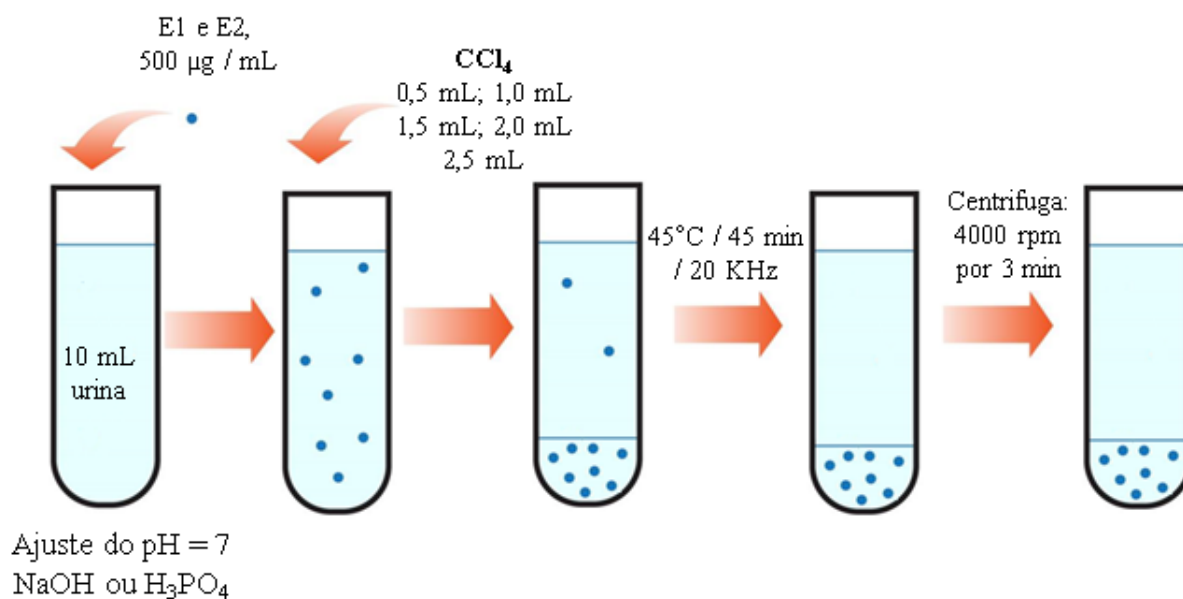


FIGURA 3.6 – Metodologia resumida da extração líquido-líquido com CCl_4 .

3.4.4 -CURVA DE CALIBRAÇÃO (COM EPN): DETERMINAÇÃO DO FATOR DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO

Para a determinação do fator de pré-concentração (F_C) - ver seção 1.2.2 - uma curva de calibração foi construída utilizando-se o processo de extração por ponto nuvem a partir do enriquecimento de alíquotas de 10 mL da mistura das urinas coletadas com solução padrão dos hormônios E2 e E1 em ACN, na faixa de concentração de 0,125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 0,50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Todas as medidas foram realizadas em triplicata e cada ponto da curva foi obtido pela média aritmética do sinal de corrente registrado de cada injeção. Para isso, foram usadas as condições otimizadas cromatográficas e de extração descritas nas seções 3.4.1 e 3.4.2.

3.4.5 -ESTUDO DE RECUPERAÇÃO: PRECISÃO E EXATIDÃO DO MÉTODO

Para o estudo de recuperação, as amostras (10 mL da mistura das urinas dos voluntários) foram submetidas à EPN nas condições otimizadas (seções 3.4.1 e 3.4.2) utilizando-se as amostras de controle de qualidade do método, analisadas em quintuplicata e em três níveis de concentrações: $0,16 \mu\text{g mL}^{-1}$, $0,50 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Os estudos de precisão e exatidão foram realizados em três dias consecutivos. A precisão do método foi expressa pelo coeficiente de variação percentual (CV%) das replicatas. A exatidão foi calculada por meio da razão da média das concentrações encontradas e o valor médio das concentrações nominais, e foi expressa em porcentagem.

3.5 -ANÁLISE INDIVIDUAL DAS URINAS DOS VOLUNTÁRIOS

Para a aplicação do método desenvolvido, amostras de 20 mL das urinas de cada voluntário foram divididas em duas partes de 10 mL em tubos de ensaios (devidamente identificados) e analisadas sob condições cromatográficas e de EPN otimizadas e validadas. A amostragem individual compreendia a análise da urina de 1 homem, 1 mulher gestante, 1 mulher em idade fértil e 1 mulher lactante. Uma das partes de 10 mL das amostras de urina de cada voluntário não enriquecida com os hormônios foi identificada como branco. Os outros 10 mL foram enriquecidos pela adição dos hormônios resultando em concentrações nominais de $0,50 \mu\text{g mL}^{-1}$ para ambos os hormônios.

CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - VOLTAMOGRAMA CÍCLICO

Os perfis voltamétricos dos hormônios E1 e E2 foram determinados utilizando como eletrólito suporte solução de KH_2PO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 5. A determinação do perfil voltamétrico mostra a resposta eletroquímica de cada hormônio em estudo, ou seja, o potencial e a corrente do pico de oxidação do composto e, caso ocorra, o potencial e a corrente pico de redução, além de demonstrar se o processo é reversível ou não. Ao aplicar-se potencial no intervalo de 0,0 à 1,2 V x Ag/AgCl ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$), foram obtidos os voltamogramas cíclicos dos hormônios E1 e E2, os quais estão apresentados na FIGURA 4.1.

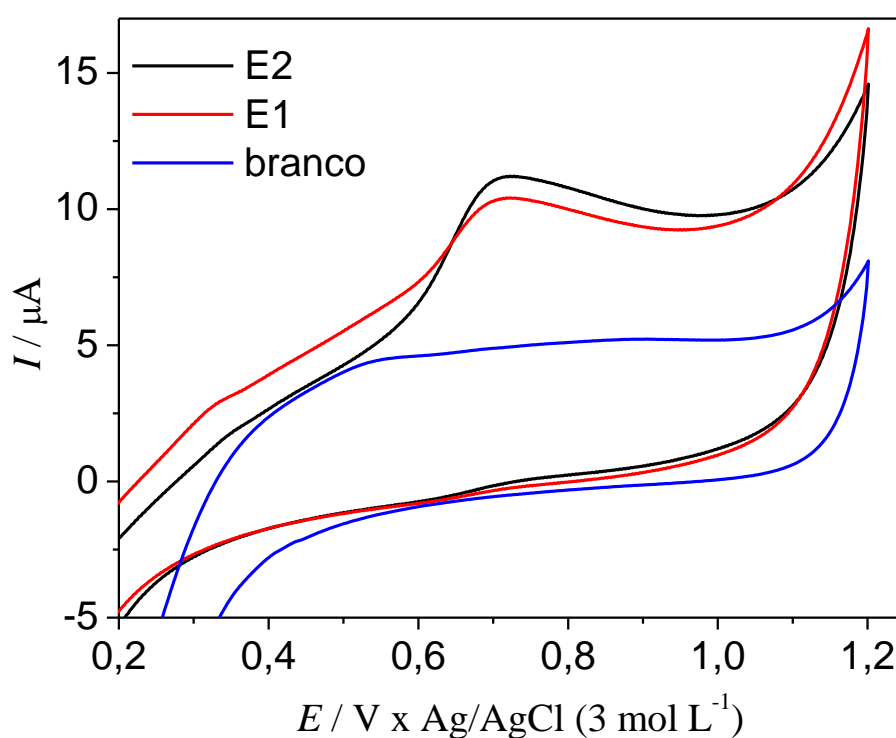


FIGURA 4.1 - Voltamogramas cíclicos dos hormônios E2 e E1 ($5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) em eletrólito suporte de KH_2PO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, pH 5,0 e $v = 100 \text{ mVs}^{-1}$, obtidos com o eletrodo de DDB (ET) e Pt (CE).

Conforme pode ser observado no voltamograma cíclico mostrado na FIGURA 4.1, os hormônios em estudo apresentam perfis voltamétricos irreversíveis, uma vez que nenhum pico de redução foi observado nas varreduras inversas, no intervalo de potencial investigado. Após a região de potencial dos picos de oxidação dos hormônios E1 e E2 (0,71 V

x Ag/AgCl 3,0 mol L⁻¹ para ambos), no intervalo de 0,3 V - 1,1 V x Ag/AgCl 3 mol L⁻¹, observa-se um aumento exponencial da corrente registrada, o qual é característico da reação de desprendimento de oxigênio (RDO) promovida pela oxidação eletroquímica da água.

4.2 - CLAE-EC

4.2.1 - OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

Primeiramente, injeções sucessivas da mistura dos hormônios E2 e E1 na concentração de 5,0 µg mL⁻¹ foram realizadas variando-se as condições cromatográficas de composição da fase móvel e vazão, a fim de se obter uma condição que resultasse em cronoamperogramas (perfis de corrente elétrica x tempo) com picos bem definidos, separados e com tempos de análise adequados. Estes estudos iniciais foram realizados sem qualquer tipo de extração. Os parâmetros cromatográficos investigados foram composição de fase móvel (TF:ACN) nas respectivas proporções volumétricas de 75:25, 73:27 e 72:28 (V/V) e vazão (1,0 mL min⁻¹ e 1,2 mL min⁻¹). O potencial de 0,85 V x Ag/AgCl foi aplicado por ser um valor um pouco superior ao potencial de pico observado nos voltamogramas cíclicos apresentados na FIGURA 4.1. Os resultados obtidos são mostrados pela FIGURA 4.2.

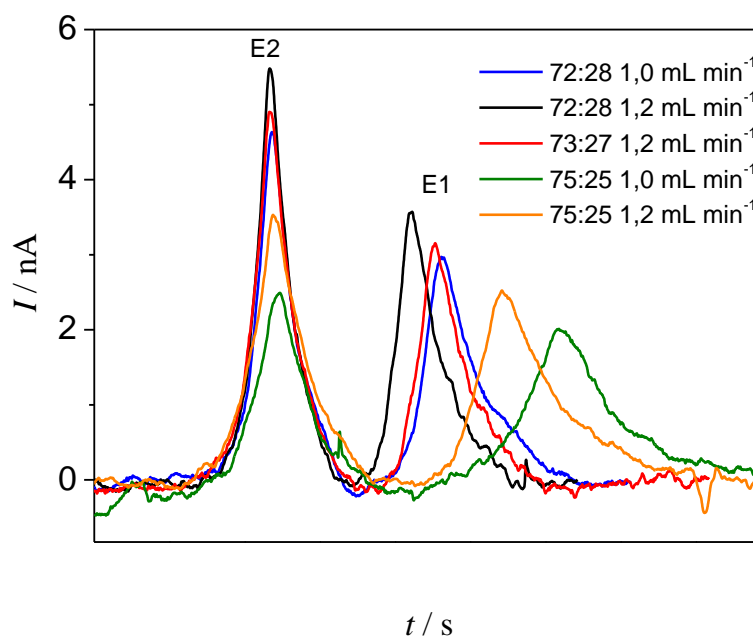


FIGURA 4.2 - Cronoamperogramas obtidos para os hormônios E2 e E1 (5,0 µg mL⁻¹) em diferentes composições de fase móvel e vazão. $E = 0,85$ V x Ag/AgCl 3,0 mol L⁻¹. Eletrodo de DDB pré-tratado catódicamente (ET) e aço inoxidável (CE). Volume de injeção = 20 µL.

As condições cromatográficas de composição de fase móvel de 75:25 (V/V) e vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ foram usadas inicialmente considerando-se que, em testes prévios, usando apenas CLAE-UV, esta foi a condição que resultou em cromatogramas com os picos de melhor resolução. Entretanto, como observado na FIGURA 4.2, nesta condição, apesar de ter apresentado boa separação, o pico referente ao hormônio E1 mostrou-se um pouco largo. Para resolver este problema, optou-se por aumentar a vazão para $1,2 \text{ mL min}^{-1}$ no sentido de estreitar a base do pico além de proporcionar o aumento no transporte de massa do analito em direção à superfície do eletrodo de DDB no sensor eletroquímico, podendo conferir, dessa maneira, maior sinal de corrente. Tais mudanças mostraram-se positivas, pois além de uma ligeira redução na base do pico do hormônio E1 os sinais de corrente foram aumentados e a boa separação dos picos foi mantida. Posteriormente, variou-se a composição da fase móvel diminuindo a proporção do tampão fosfato, a fim de aumentar a força da fase móvel. Empregando-se a condição de fase móvel 72:28 (V/V) de tampão fosfato (KH_2PO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 5,0) e ACN a uma vazão de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$, foi obtido o cronoamperograma que melhor atendeu aos critérios cromatográficos. A ordem de eluição dos hormônios foi verificada após injeções individuais dos hormônios, sendo que o E2 apresentou menor tempo de retenção em relação ao E1, tal como pode ser verificado na FIGURA 4.2. É importante ressaltar ainda que o eixo do tempo apresentado no cronoamperograma da FIGURA 4.2 não representa os tempos reais de retenção dos hormônios E1 e E2. Isso ocorre porque a medida utiliza dois instrumentos de forma simultânea e paralela (ver FIGURA 3.3), ou seja, como os equipamentos (CLAE e Potenciostato) não estão perfeitamente sincronizados, os tempos entre o início da injeção e o início da detecção eletroquímica podem ser diferentes. Os tempos reais de retenção dos hormônios E2 e E1 são de 6,3 min e 10,6 min, respectivamente.

4.2.2 - VOLTAMOGRAMA HIDRODINÂMICO

Uma vez otimizadas as condições cromatográficas e já definido o intervalo de potencial de oxidação dos hormônios E2 e E1 (FIGURA 4.1), curvas hidrodinâmicas com injeção simultânea dos hormônios foram construídas. Estes estudos também foram realizados sem qualquer tipo de extração. O objetivo dessas medidas é determinar qual o maior valor de potencial que pode ser aplicado na detecção eletroquímica dos hormônios para geração dos melhores sinais de corrente elétrica registrados. O intervalo de potencial aplicado foi de 0,3 - 1,2 V x Ag/AgCl ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$). Os resultados obtidos após subtrair os sinais de corrente de

pico obtidos na presença dos hormônios (I_{pico}) com os sinais de corrente de fundo obtidos da amostra do branco (I_{branco}), ambos no mesmo potencial, são mostrados pela FIGURA 4.3.

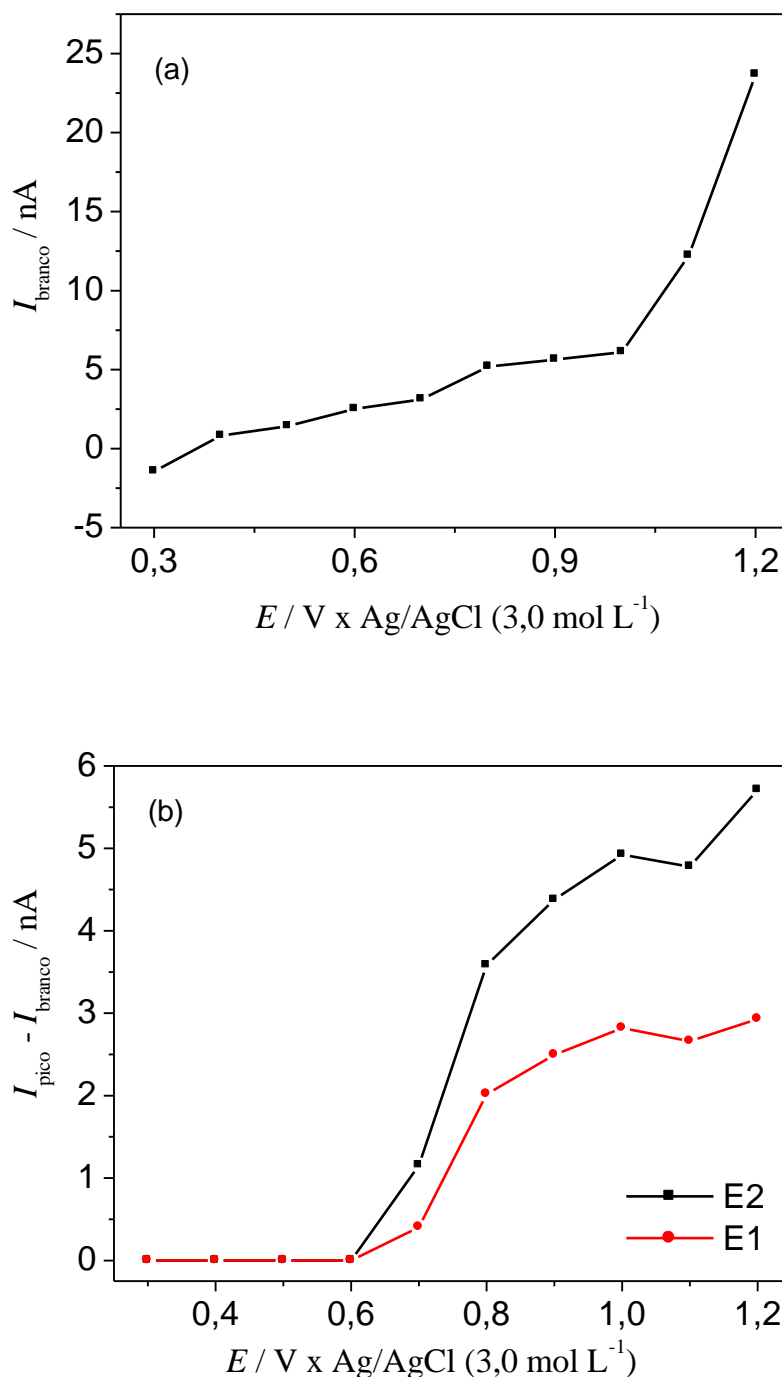


FIGURA 4.3 - Voltamograma hidrodinâmico obtido para (a) branco (solução TF $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ e ACN, 72:28, V/V) e (b) Voltamograma hidrodinâmico dos hormônios E2 e E1 ($5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$). Eletrodo de DDB pré-tratado catodicamente (ET) e aço inoxidável (CE). Eletrólito suporte: fase móvel de KH_2PO_4 ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$; pH 5,0) / ACN (72:28 V/V) vazão de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$. Volume de injeção = $20 \mu\text{L}$

De acordo com os voltamogramas hidrodinâmicos mostrados na FIGURA 4.3b, foi possível observar que a partir do potencial aplicado de 0,6 V x Ag/AgCl (3,0 mol L⁻¹) o sinal de corrente aumenta e tende a um patamar, possivelmente devido à limitações por transporte de massa. Para uma melhor análise dessas medidas, as respostas hidrodinâmicas para os hormônios foram representadas da mesma forma como em BROCENSCHI *et. al*, (2014), ou seja, como a razão entre o sinal/corrente de fundo em função do potencial aplicado, tal como mostrado na FIGURA 4.4. Dessa forma, é possível avaliar os sinais de corrente levando-se em conta somente os processos de oxidação (faradaicos), eliminando qualquer influência ou contribuição da corrente de fundo relacionada à oxidação do eletrólito suporte.

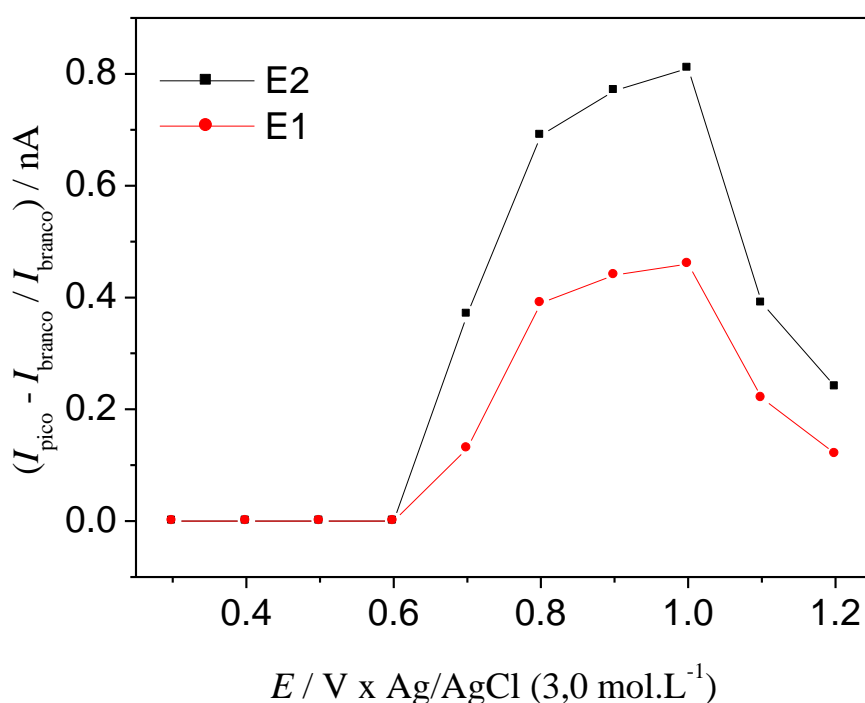


FIGURA 4.4 - Voltamogramas hidrodinâmicos dos hormônios E2 e E1 (5,0 µg mL⁻¹), representados como a razão sinal/corrente de fundo. Eletrodo de DDB pré-tratado catodicamente (ET) e aço inoxidável (CE). Eletrólito suporte: fase móvel de KH₂PO₄ (0,01 mol L⁻¹; pH 5,0) / ACN (72:28 V/V) vazão de 1,2 mL min⁻¹. Volume de injeção = 20 µL

Portanto, com base nos resultados mostrados na FIGURA 4.4, pode-se concluir que o potencial aplicado que apresentou a melhor resposta foi de 1,0 V x Ag/AgCl (3,0 mol L⁻¹) para ambos hormônios, E1 e E2, sendo esta condição utilizada nos experimentos posteriores.

4.2.3-LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO (SEM PROCESSO DE EXTRAÇÃO)

O limite de detecção (LD) foi definido como sendo a concentração correspondente ao sinal de detecção que é no mínimo 3 vezes maior que o sinal do ruído. O cronoamperograma obtido no qual foi determinado o LD está ilustrado na FIGURA 4.5 e seu valor foi de $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ para os dois hormônios ($1,83 \mu\text{mol L}^{-1}$ para o E2 e $1,85 \mu\text{mol L}^{-1}$ para o E1).

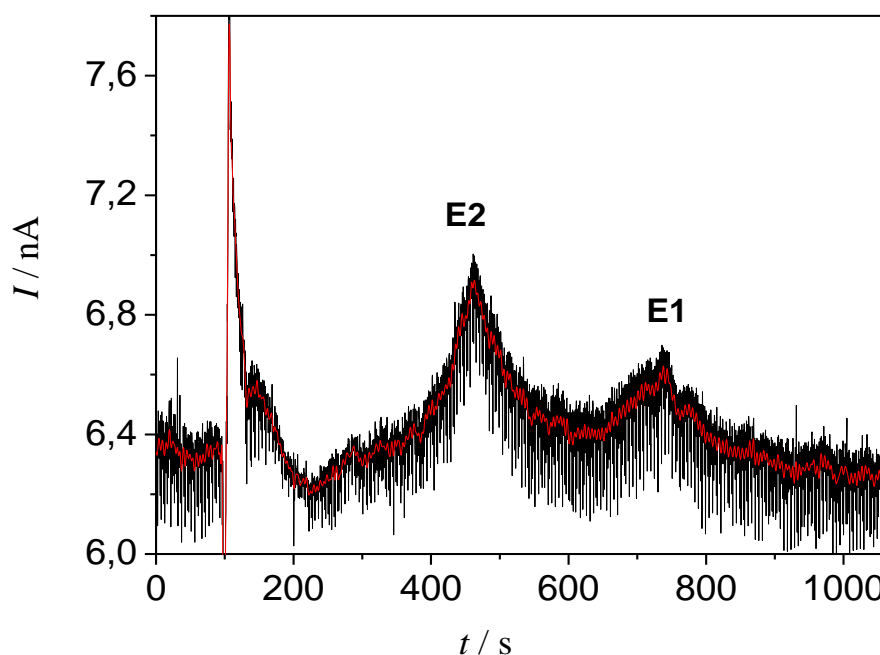


FIGURA 4.5 - Cronoamperograma obtido referente à determinação do limite de detecção dos hormônios E2 e E1. Eletrólito suporte: fase móvel de KH_2PO_4 ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$, pH 5,0) / ACN (72:28 V/V) vazão de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$. $E = 1,0 \text{ V x Ag/AgCl}$ ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$). Eletrodo de DDB pré-tratado catódicamente (ET) e aço inoxidável (CE). Volume de injeção = $20 \mu\text{L}$

O limite quantificação (LQ) foi definido como a menor concentração da espécie analítica que pode ser determinada com uma boa reprodutibilidade ($\geq 75\%$), ou seja, com coeficiente de variação menor que 15% entre os resultados das injeções em triplicata. Sendo assim, o valor de LQ obtido para ambos os hormônios E2 e E1 foi de $0,80 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($2,94 \mu\text{mol L}^{-1}$ para o E2 e $2,96 \mu\text{mol L}^{-1}$ para o E1), com coeficientes de variação de 7,45% e 2,47% e erro relativo de 3,75% e 0,33%, respectivamente. É importante enfatizar que os limites de detecção e quantificação obtidos para os hormônios E1 e E2 mostrados nesta seção

referem-se àqueles obtidos sem qualquer processo de extração, ou seja, fatores de pré-concentração não foram levados em conta aqui.

4.2.3-CURVA DE CALIBRAÇÃO (SEM PROCESSO DE EXTRAÇÃO)

Uma vez determinado os LQ dos hormônios E1 e E2 (ambos $0,80 \mu\text{g mL}^{-1}$), partiu-se dessa concentração para construção das curvas analíticas sem qualquer tipo de extração. Este tipo de medida é necessário para que o fator de pré-concentração (F_C) possa ser determinado (ver Seção 3.4). Para isso, a média dos sinais das alturas dos picos de corrente obtidas a partir de injeções feitas em triplicata foram lançadas em gráfico em função das respectivas concentrações nominais. A FIGURA 4.6 mostra a curva analítica obtida no intervalo de concentração de $0,80 \mu\text{g mL}^{-1}$ à $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ para as soluções dos padrões de E1 e E2.

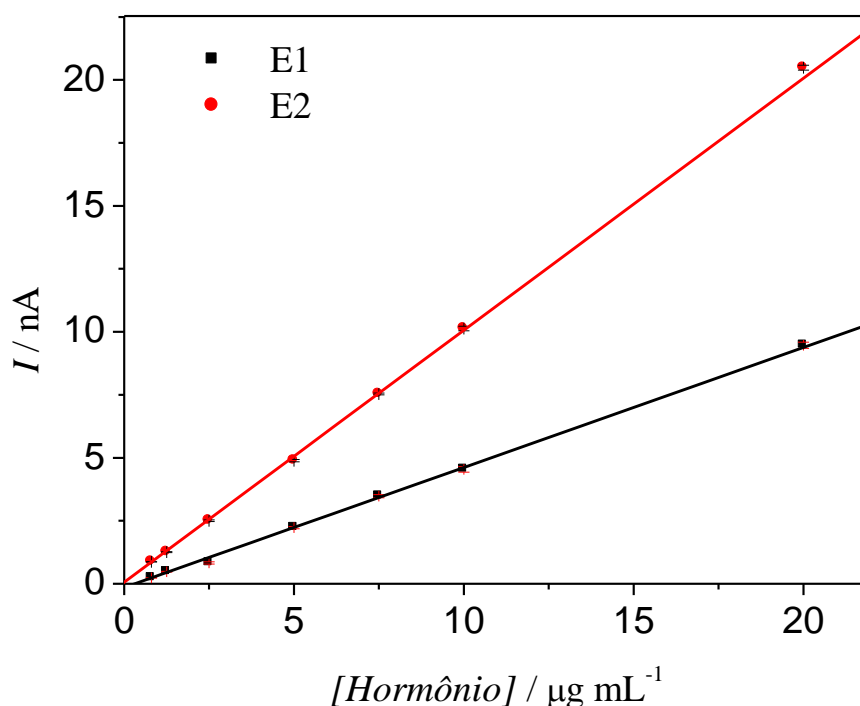


FIGURA 4.6 - Curvas analíticas obtidas sem o procedimento de EPN. Eletrólito suporte: fase móvel de KH_2PO_4 ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$; pH 5,0) / ACN (72:28 V/V) vazão de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$. $E = 1,0 \text{ V}$ x Ag/AgCl ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$). Eletrodo de DDB pré-tratado catodicamente (ET) e aço inoxidável (CE). Volume de injeção = $20 \mu\text{L}$

De acordo com as curvas analíticas obtidas para a determinação simultânea de E1 e E2, mostradas na FIGURA 4.6, pode-se observar que as curvas apresentam excelente linearidade na faixa estudada, com coeficientes de correlação iguais a 1 para ambos os

hormônios, nos intervalos de concentração investigados. As equações de reta obtidas pela regressão linear do conjunto de pontos mostrados na FIGURA 4.6 estão mostradas abaixo:

$$I/nA = - 0,0742 nA + 1,02 nA/\mu g mL^{-1} [E2/\mu g mL^{-1}] \quad \text{Equação 4}$$

$$I/nA = - 0,208 nA + 0,483 nA/\mu g mL^{-1} [E1/\mu g mL^{-1}] \quad \text{Equação 5}$$

4.3 - EXTRAÇÃO POR PONTO NUVEM

4.3.1 - VARIAÇÃO DO pH DA URINA

Sabendo-se que a eficiência do processo de extração e de pré-concentração em ponto nuvem pode ser alterado pelos tipos e concentração dos surfactantes e aditivos, pH da amostra, temperatura, tempo de equilíbrio e condições de centrifugação (ROCHA, 2013), a variação do pH da urina coletada dos voluntários foi investigada. Os valores de pH = 5,0 e pH = 7,0 foram investigados por se tratar do pH natural da urina e por ter sido o melhor resultado para a EPN de hormônios em urina encontrado na literatura (ZOU *et. al.*, 2012), respectivamente. A FIGURA 4.7 mostra os cronoamperogramas obtidos nos dois pHs investigados.

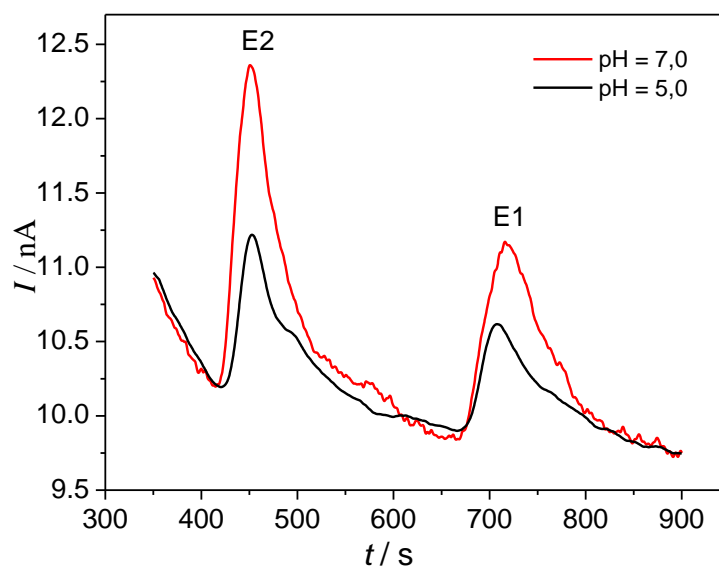


FIGURA 4.7 - Cronoamperogramas obtidos na determinação dos hormônios E1 e E2 (500 ng mL^{-1}) em diferentes pH de urina. Eletrólito suporte: fase móvel de KH_2PO_4 ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$; pH 5,0) / ACN (72:28 V/V) vazão de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$. $E = 1,0 \text{ V}$ x Ag/AgCl ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$). Eletrodo de DDB pré-tratado catodicamente (ET) e aço inoxidável (CE). Volume de injeção = $20 \mu\text{L}$.

Com base nos resultados mostrados na FIGURA 4.7 fica evidente que as amostras de urina enriquecidas com E2 e E1, nas mesmas concentrações, apresentaram

melhor intensidades de sinal obtido para as amostras de urina em pH 7,0. Provavelmente esse aumento da corrente de pico ocorre porque a quantidade de íons no meio pode interferir no processo de EPN, alterando a solubilidade da fase micelar em água, como já mencionado. A presença de eletrólitos favorece a separação entre a fase rica em surfactante e a fase pobre e, dessa forma, quanto mais cargas, mais rápida ocorre a separação e, conseqüentemente, as micelas tem menos tempo para carregar consigo os compostos orgânicos (ROCHA, 2013). Dessa forma, todos os ensaios posteriores foram realizados acertando-se o pH das amostras de urina para o valor 7,0.

4.3.2- VARIAÇÃO DO VOLUME DO SOLVENTE EXTRATOR

Conforme já especificado, há uma estreita faixa de concentração do surfactante (solvente extrator) em que a eficiência do processo de extração e, conseqüentemente, do sinal analítico, são máximos. Acima dessa faixa, o sinal analítico é prejudicado devido ao aumento do volume final da fase micelar (efeito de diluição), afetando o fator de pré-concentração (F_C). Entretanto, se a quantidade de surfactante é menor do que a necessária, a fase resultante rica em surfactante não é suficiente para extrair as quantidades máximas possíveis dos hormônios, o que resulta em menores valores de recuperação. O sinal de corrente obtido para os hormônios E2 e E1 em função do volume de solvente extrator é mostrado na FIGURA 4.8.

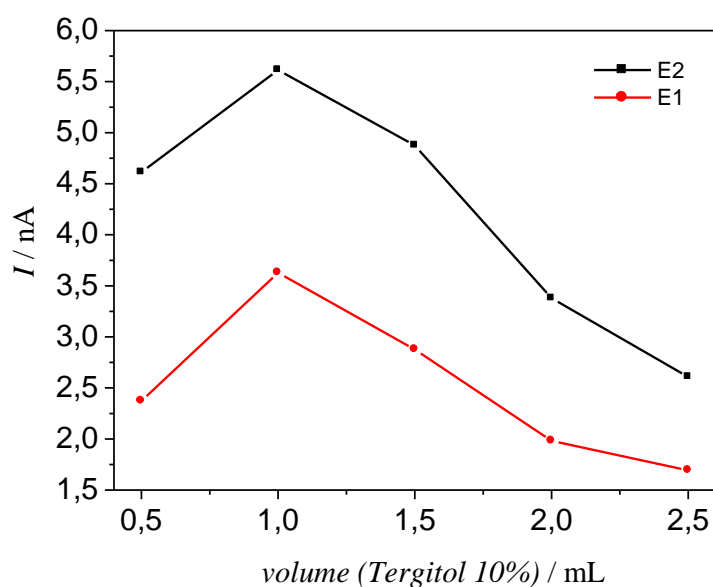


FIGURA 4.8 - Variação do sinal de corrente obtido pela detecção eletroquímica dos hormônios E1 e E2 (500 ng mL^{-1}) em função de diferentes volumes de solvente extrator (Tergitol®). Eletrólito suporte: fase móvel de KH_2PO_4 ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$; pH 5,0) / ACN (72:28 V/V) vazão de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$. $E = 1,0 \text{ V}$ x Ag/AgCl ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$) e $\text{pH}_{\text{urina}} = 7,0$. Eletrodo de DDB pré-tratado catodicamente (ET) e aço inoxidável (CE). Volume de injeção = $20 \text{ }\mu\text{L}$.

A FIGURA 4.8 mostra que a extração feita com volumes de 0,5 mL de Tergitol[®] está ainda abaixo da capacidade de extração máxima dos hormônios E1 e E2 de amostras de urina, uma vez que foram observados aumentos significativos do sinal de corrente quando o volume do Tergitol[®] foi duplicado para 1,0 mL. Acima de 1,0 mL, houve uma diminuição do sinal de corrente para ambos os hormônios, o que demonstra que está havendo diluição por excesso de solvente extrator. Sendo assim, o melhor volume de Tergitol[®] para a EPN determinado foi considerado como sendo de 1,0 mL.

4.3.3 – EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO COM SOLVENTE ORGÂNICO

A eficiência do processo de EPN foi comparada com o método de extração direta líquido-líquido, com tetracloreto de carbono (CCl_4) com diferentes volumes de solvente. Os valores de sinal de corrente obtidos para essas medidas estão mostrados na FIGURA 4.9.

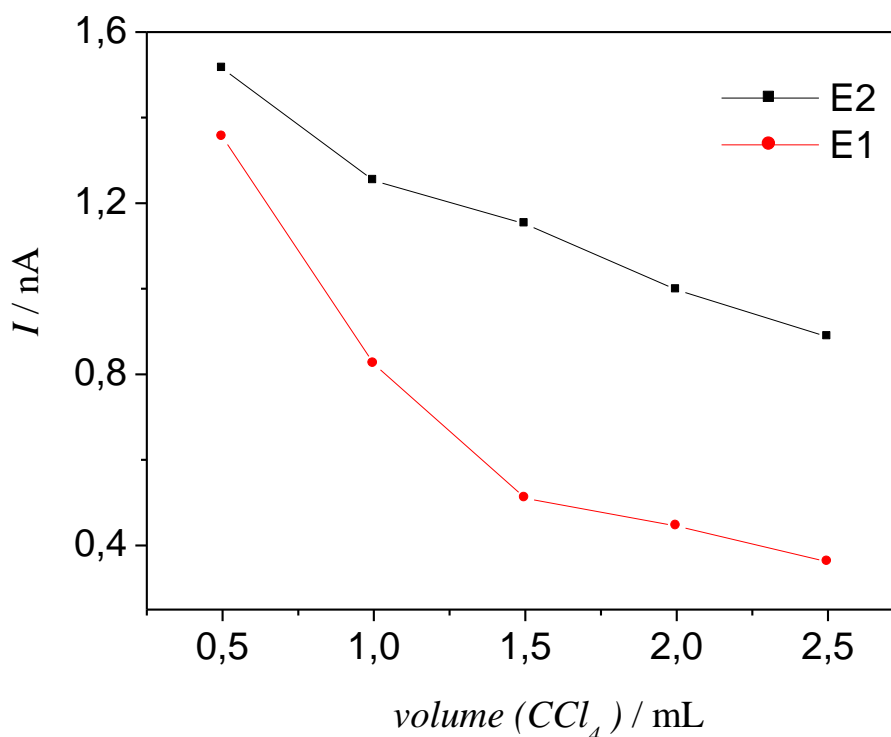


FIGURA 4.9 - Variação do sinal de corrente obtido pela detecção eletroquímica dos hormônios E1 e E2 (500 ng mL^{-1}) em função de diferentes volumes de CCl_4 . Eletrólito suporte: fase móvel de KH_2PO_4 ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$; pH 5,0) / ACN (72:28 V/V) vazão de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$. $E = 1,0 \text{ V}$ x Ag/AgCl ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$) e $\text{pH}_{\text{urina}} = 7,0$. Eletrodo de DDB pré-tratado catodicamente (ET) e aço inoxidável (CE). Volume de injeção = $20 \text{ }\mu\text{L}$.

A FIGURA 4.9 mostra que em volumes de 0,5 mL de CCl_4 pode-se obter a capacidade máxima de extração dos hormônios E1 e E2 de amostras de urina, dado os maiores sinais de corrente obtidos para ambos os hormônios nessa condição. É importante ressaltar que a extração dos hormônios com volumes menores do que 0,5 mL de CCl_4 torna-se inviável devido à dificuldades técnicas quando da retirada da fase orgânica para análises. A partir do aumento desse volume, pode-se observar a diminuição do sinal de corrente para ambos os hormônios, o que demonstra que está havendo diluição por excesso de solvente extrator.

Dessa forma, comparando-se os sinais de corrente obtidos nas melhores condições para os dois tipos de extrações investigadas, o sinal de corrente obtido para os hormônios E1 e E2 foram cerca de 3 e 4 vezes maiores, respectivamente, pelo uso do Tergitol (EPN). Estes resultados demonstram, portanto, que a técnica de EPN desenvolvida neste trabalho apresentou-se muito mais eficiente do que a extração direta líquido-líquido com o solvente CCl_4 .

4.3.4 - CURVA DE CALIBRAÇÃO COM EPN: DETERMINAÇÃO DO FATOR DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO

O fator de pré-concentração (F_C) foi determinado por meio da razão entre os coeficientes angulares das curvas analíticas de calibração obtidas com os hormônios E1 e E2 sem processo de extração (Seção 4.2.3 – Equações 4 e 5) e com processo de EPN. As curvas analíticas de calibração obtidas com os hormônios E1 e E2 com processo de EPN foram construídas na faixa de concentração de $0,125 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $0,500 \mu\text{g mL}^{-1}$. É importante ressaltar que como o F_C ainda era desconhecido partiu-se da concentração nominal de $0,125 \mu\text{g mL}^{-1}$ em urina por este valor ter mostrado reprodutibilidade de 75% nos sinais de corrente registrados em injeções feitas em triplicata. As equações das retas, bem como os coeficientes de correlação para as curvas são mostrados na TABELA 4.1.

TABELA 4.1– Equações das retas e coeficientes de correlação obtidos para as curvas analíticas de calibração ($n = 3$) dos hormônios E2 e E1 com processo de EPN. Eletrólito suporte: fase móvel 72:28 (V/V) de tampão fosfato (KH_2PO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 5,0) e ACN a uma vazão de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$. $E = 1,0 \text{ V}$ x Ag/AgCl ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$) e $\text{pH}_{\text{urina}} 7,0$. Eletrodo de DDB pré-tratado catodicamente (ET) e aço inoxidável (CE). Volume de injeção = $20 \mu\text{L}$

<i>Hormônio</i>	<i>Equação da reta</i>	<i>R²</i>
E2	$I/nA = -0,601 + 19,1 [E2/\mu\text{g mL}^{-1}]$	0,994
E1	$I/nA = -0,397 + 8,44 [E1/\mu\text{g mL}^{-1}]$	0,995

Os valores dos coeficientes angulares das curvas de calibração para o hormônio E2 obtidos com e sem o procedimento de EPN foram de 19,1 nA mL μg^{-1} e 1,02 nA mL μg^{-1} , respectivamente. Para o hormônio E1, os coeficientes angulares das curvas de calibração com e sem o procedimento de extração foram de 8,44 nA mL μg^{-1} e 0,483 nA mL μg^{-1} , respectivamente. Desta forma, o fator de enriquecimento calculado (Equação 1) para os hormônios E2 foi de 18,7 e para o hormônio E1 de 17,5. A grande semelhança entre os valores de F_C obtidos para ambos os hormônios indica, que a presença dos dois hormônios nas amostras de urina praticamente não altera suas eficiências individuais no processo de EPN. Em outras palavras, considerando-se que o processo de extração é feito na presença dos dois hormônios, não há indicativos de competição entre os hormônios investigados pelas moléculas do surfactante durante o processo de EPN. Além disso, da mesma forma como observado nas curvas analíticas obtidas para os hormônios sem qualquer processo de extração, os coeficientes de correlação obtidos com EPN mostrados na TABELA 4.1 demonstram a excelente linearidade do método.

Uma vez determinados os valores de F_C para os hormônios E1 e E2, os valores dos limites de detecção e quantificação dos hormônios nas amostras de urina foram convertidos usando-se a Equação 2 (Seção 3.4). Neste caso define-se C_{ob} como sendo os LD ou LQ com processo de EPN, C_C como sendo os LD ou LQ obtidos sem processo de extração (Seção 4.2.3) e o F_D como sendo igual a 2. Portanto, os valores de limite de detecção dos hormônios em urina convertidos foram de 53,4 ng mL⁻¹ (0,196 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e 57,1 ng mL⁻¹ (0,211 $\mu\text{mol L}^{-1}$) para os hormônios E2 e E1, respectivamente, e os valores de limite de quantificação de 85,6 ng mL⁻¹ (0,314 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e 91,4 ng mL⁻¹ (0,338 $\mu\text{mol L}^{-1}$) para os hormônios E2 e E1, na mesma ordem.

Uma comparação entre os limites de detecção obtidos, com aqueles encontrados na literatura (TABELA 4.2), mostrou que os limites de detecção apresentados neste trabalho estão acima dos valores descritos. Entretanto, vale ressaltar que, até onde foi possível verificar, este trabalho é o único que utiliza a matriz urina humana, sem qualquer diluição prévia ao método de extração. Fato este que justifica a não detecção na amostra do branco desses trabalhos, apesar dos baixos limites de detecção relatados.

TABELA 4.2 - Limites de detecção e quantificação da literatura para E2 e E1 em variadas matrizes e utilizando diferentes métodos de extração e análise.

<i>Hormônio</i>	<i>Matriz</i>	<i>Método de extração</i>	<i>Método analítico</i>	<i>LD</i>	<i>LQ</i>	<i>Referência</i>
E1, E2	Efluente (200 mL)	SPE	LC-MS-MS	0,1-0,3 ng L ⁻¹	0,6-0,9 ng L ⁻¹	GUNATILAK <i>et al.</i> , 2013
E1, E2	Sedimento de rio (2 g)	PLE	TFC-LC-MS/MS	0,031-0,069 ng g ⁻¹	0,1-0,23 ng g ⁻¹	GORGA <i>et al.</i> , 2013
E1, E2	Lodo de esgoto (1g)	PLE	TFC-LC-MS/MS	2,2-38 ng g ⁻¹	7,4-25 ng g ⁻¹	GORGA <i>et al.</i> , 2013
E2	Urina (10 mL de urina diluída)	FPSE	HPLC-FLD	0,020 ng mL ⁻¹	0,066 ng mL ⁻¹	KUMAR <i>et al.</i> , 2014
E1, E2	Efluente	-	ELISA	0,2-5 ng L ⁻¹	5,0 ng L ⁻¹	MANICKUM & JOHN, 2015
E1, E2	Água de rio (250 mL)	SPE	LC-DAD	3,0-13 ng L ⁻¹	-	PÉREZ & ESCANDAR, 2014
E2	soro sanguíneo	-	Voltametria cíclica			
E2	soro sanguíneo	-	GCE modificado com película de poli (L-serina)	2,0 x 10 ⁻⁸ mol L ⁻¹	-	SONG <i>et al.</i> , 2008
E1, E2	Urina humana diluída	EPN	CLAE-DAD	0,1-0,2 ng mL ⁻¹	-	ZOU, <i>et al.</i> , 2012
E1, E2	Urina humana	EPN	CLAE-EC	0,196-0,211 μmol L ⁻¹	0,314-0,338 μmol L ⁻¹	Este trabalho

4.3.5 - ESTUDO DE RECUPERAÇÃO: DETERMINAÇÃO DA PRECISÃO E DA EXATIDÃO DO MÉTODO

A precisão e a exatidão do método foram determinadas a partir de ensaios de recuperação. A recuperação está relacionada com a exatidão, pois reflete a quantidade de um determinado analito que pode ser recuperado em um processo de extração em relação à quantidade real presente na amostra. Além disso, em estudos de recuperação podem ser feitos

testes de significância, utilizando o teste de *Student* mostrado na Equação 6 (OLIVEIRA, 2012).

$$t = [(R\%_{\text{m}} - 100) / DP_{\text{rec}}] / n^{1/2} \quad \text{Equação 6}$$

onde, t é o valor do teste de *Student*, $R\%_{\text{médio}}$ é a porcentagem de recuperação média obtida para n repetições, 100 é a recuperação percentual desejada, n é o número de determinações e DP_{rec} é o desvio padrão das recuperações.

Se o valor obtido de t for menor ou igual ao valor tabelado ($t_{\text{crítico}}$), para $(n - 1)$ graus de liberdade em um dado nível de significância, o método é considerado exato, ou seja, não há diferenças significativas entre a porcentagem de recuperação obtida e o valor desejável (100%).

Para que o método seja considerado preciso, os valores dos coeficientes de variação (CV) podem ser de até 15% (OLIVEIRA, 2012). A precisão das medidas foi avaliada como coeficientes de variação percentual ($CV\%$), sendo as análises realizadas em quintuplicata ($n = 5$) e executadas sequencialmente no mesmo dia (precisão intra-dia) e em três dias diferentes (precisão inter-dia). A exatidão foi avaliada segundo o desvio padrão das medidas (DP) e o teste de *Student* foi aplicado utilizando-se as porcentagens de recuperação dos hormônios E2 e E1 em três níveis de concentração ($0,16 \mu\text{g mL}^{-1}$, $0,50 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) adicionadas a uma mistura de amostras de urina de quatro voluntários. As eficiências de recuperação percentuais foram determinadas conforme especificado na Seção 3.4 e os demais parâmetros descritos encontram-se sumarizados na TABELA 4.3.

TABELA 4.3 - Eficiências de recuperação percentuais ($n = 5$), coeficientes de variação e t obtidos na determinação de E2 e E1 em urina em 3 níveis de concentração. Eletrólito suporte: fase móvel 72:28 (V/V) de tampão fosfato (KH_2PO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 5,0) e ACN a uma vazão de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$. $E = 1,0 \text{ V x Ag/AgCl}$ ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$) e $\text{pH}_{\text{urina}} 7,0$. Eletrodo de DDB pré-tratado catodicamente (ET) e aço inoxidável (CE). Volume de injeção = $20 \mu\text{L}$.

	1° dia			2° dia			3° dia			Exatidão e precisão inter-dia		
	C_{ad} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	$R\%_{\text{médio}} \pm DP_{\text{rec}}$	CV (%)	t	$R\%_{\text{médio}} \pm DP_{\text{rec}}$	CV (%)	t	$R\%_{\text{médio}} \pm DP_{\text{rec}}$	CV (%)	t	$R\%_{\text{médio}} \pm DP_{\text{rec}}$	CV (%)
E1	0,16	94 \pm 2	2,12	-1,34	97 \pm 1	1,34	-0,22	99 \pm 2	2,12	-0,22	97 \pm 2	2,06
	0,5	111 \pm 4	3,60	1,23	63 \pm 7	11	1,50	99 \pm 10	10,1	-0,04	91 \pm 7	7,69
	1,0	112 \pm 4	3,57	1,34	124 \pm 8	6,45	1,34	109 \pm 10	9,20	0,40	115 \pm 7	6,09
E2	0,16	112 \pm 3	2,68	1,78	98 \pm 1	1,02	-0,89	113 \pm 3	2,65	1,94	108 \pm 2	1,85
	0,5	81 \pm 4	4,94	-2,12	60 \pm 5	8,33	-3,57	97 \pm 7	7,22	-0,19	79 \pm 5	6,33
	1,0	107 \pm 2	1,87	1,56	115 \pm 4	1,68	1,34	103 \pm 1	0,97	1,34	108 \pm 2	1,85

De acordo dos dados apresentados na TABELA 4.3, os valores dos coeficientes de variação calculados foram todos menores do que 15%. As recuperações médias dos três dias variaram entre 91% e 115% para o hormônio E1 e entre 79% e 108% para o hormônio E2, para as 3 concentrações nominais. Esses resultados indicam que não há interferência da matriz nas amostras analisadas na determinação dos hormônios E1 e E2 pelo procedimento analítico desenvolvido.

Com relação ao teste de *Student*, com 95% de confiança e $(n - 1)$ graus de liberdade, os valores de t calculados apresentaram valores menores que o valor crítico tabelado ($t_{95\%} = 2,78$), para todos os níveis de concentração e nos três dias investigados. Portanto, o método desenvolvido pode ser considerado preciso, com boa repetitividade e reprodutibilidade.

4.4 - APLICAÇÃO DO MÉTODO: ANÁLISE INDIVIDUAL DAS URINAS DOS VOLUNTÁRIOS

O método desenvolvido e validado foi aplicado na determinação dos hormônios E1 e E2 nas amostras individuais de cada voluntário (ver Seção 3.5). A FIGURA 4.10 mostra os cronoamperogramas obtidos para a amostra de urina do homem.

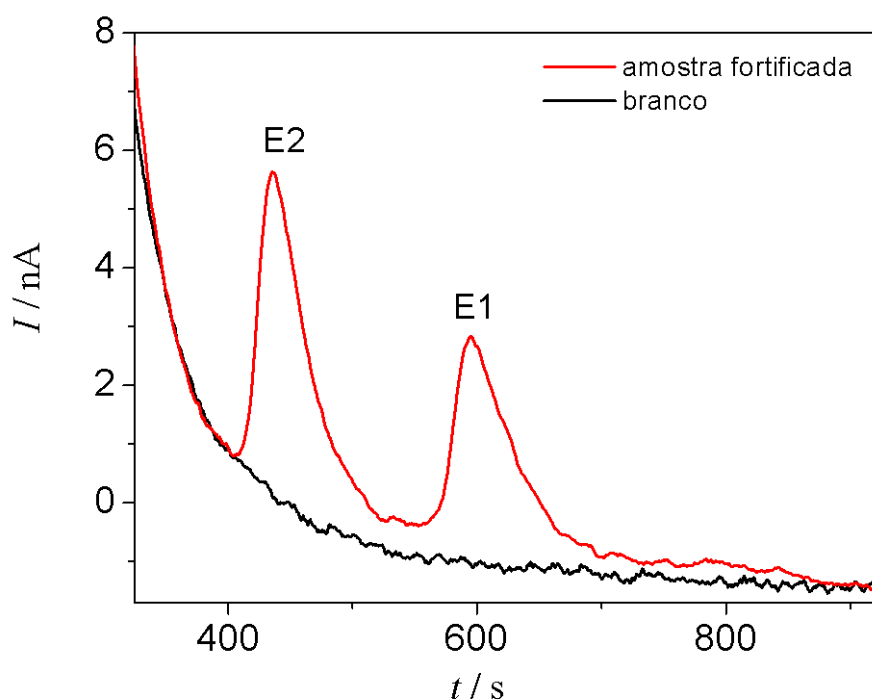


FIGURA 4.10 - Cronoamperogramas obtidos para a amostra de urina do homem. Eletrólito suporte: fase móvel de KH_2PO_4 ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$; pH 5,0) / ACN (72:28 V/V) vazão de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$. $E = 1,0 \text{ V}$ x Ag/AgCl ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$) e $\text{pH}_{\text{urina}} = 7,0$. Eletrodo de DDB pré-tratado catodicamente (ET) e aço inoxidável (CE). Volume de injeção = $20 \mu\text{L}$.

Como esperado, na FIGURA 4.10 mostra que na leitura da amostra de urina do homem não fortificada com os hormônios (branco) não foram detectados os hormônios em estudo. Os hormônios E2 e E1 são hormônios predominantemente femininos e encontrados em menor quantidade em espécies do sexo masculinos. Nesta análise, em específico, a ausência dos hormônios E1 e E2 na urina do homem pode ser diagnosticada em função dos limites de detecção atingidos pela técnica ($53,4 \text{ ng mL}^{-1}$ para o hormônio E2 e $57,1 \text{ ng mL}^{-1}$ para o hormônio E1).

A coleta da urina da mulher voluntária em idade fértil foi feita durante o final da fase folicular e início da fase ovulatória, no 12º dia do ciclo menstrual. Nesta fase de coleta (fase folicular) o hormônio E2 atinge seu nível máximo de produção. Outra informação relevante informada pela voluntária e que ela faz uso de um anticoncepcional que tem em sua formulação os hormônios sintéticos etinilestradiol (EE2) e a drospirenona (um hormônio sintético que corresponde ao efeito da progesterona). Os resultados obtidos da análise da urina coletada desta voluntária estão mostrados pela FIGURA 4.11.

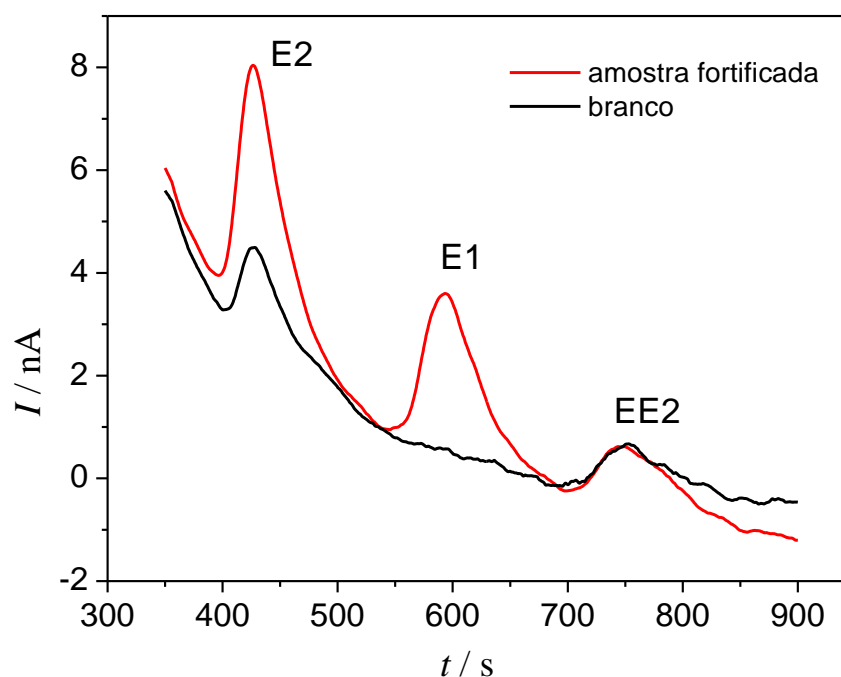


FIGURA 4.11 - Cronoamperogramas obtidos para a amostra de urina da mulher em idade fértil. Eletrólito suporte: fase móvel de KH_2PO_4 ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$; pH 5,0) / ACN (72:28 V/V) vazão de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$. $E = 1,0 \text{ V}$ x Ag/AgCl ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$) e $\text{pH}_{\text{urina}} = 7,0$. Eletrodo de DDB pré-tratado catodicamente (ET) e aço inoxidável (CE). Volume de injeção = $20 \mu\text{L}$.

Ainda de acordo com informações fornecidas pela voluntária, ela faz uso deste anticoncepcional há pelo menos 5 anos. Portanto, poderia ser esperado que em sua amostra de

urina do branco fosse detectada a presença do EE2, como de fato ocorreu. O pico referente ao hormônio sintético EE2 foi identificado pelo tempo de retenção obtido a partir da injeção de uma solução padrão contendo EE2. Este composto poderia ser um potencial interferente nas medidas para a detecção dos hormônios E2 e E1, já que em quase todas as formulações de anticoncepcionais existentes no mercado o EE2 está presente (FERREIRA *et. al.*, 2000). Entretanto, conforme pode ser verificado no cronoamperograma mostrado na FIGURA 4.11 sua presença não interferiu no procedimento de extração e de análise, uma vez que seu pico de retenção não se sobrepôs aos picos dos hormônios E1 e E2. Além disso, as porcentagens de recuperação obtidas para os hormônios E2 e E1 foram satisfatórias (108% e 119%, respectivamente). No período do ciclo menstrual em que a voluntária se encontrava o nível de E2 é o mais elevado, sendo possível sua detecção até mesmo no branco. A porcentagem de recuperação do E2 foi calculada levando-se em conta a contribuição do E2 na amostra do branco (método de adição de padrão).

Para a voluntária em período de lactação, a amostra de urina foi coletada quando já haviam sido passados dez meses da data do parto. Segundo informações da voluntária, a mesma fazia uso no período da coleta do anticoncepcional a base de do hormônio sintético desogestrel. Segundo a bula do medicamento informado pela voluntária, o principal efeito contraceptivo dele é a inibição da ovulação o que leva a uma redução dos níveis de estradiol a níveis correspondentes aos da fase folicular inicial. A FIGURA 4.12 mostra os cronoamperogramas obtidos para a amostra de urina da mulher em período de lactação.

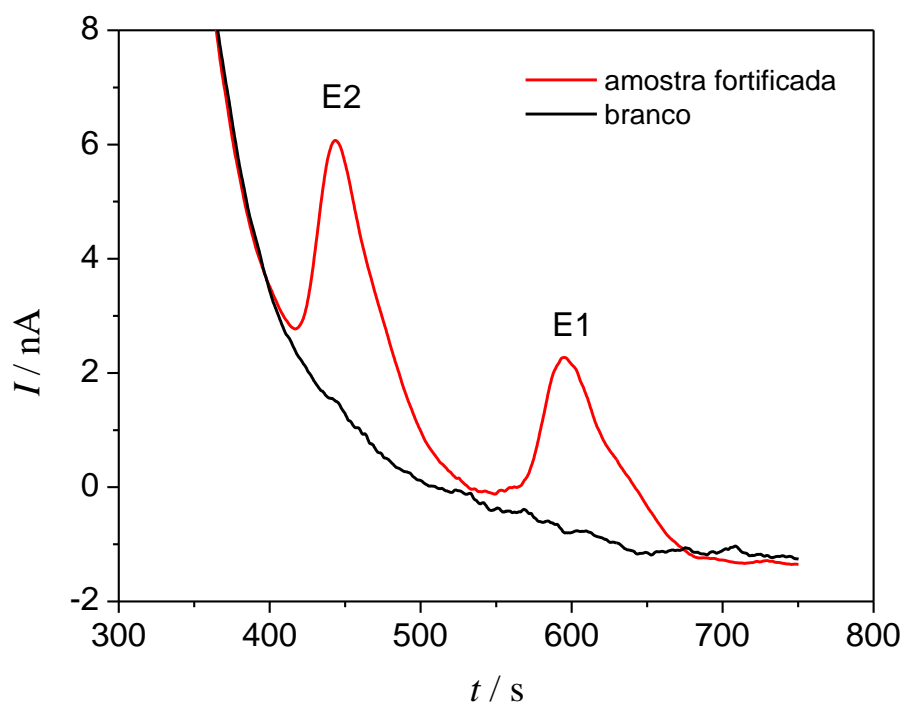


FIGURA 4.12 - Cronoamperogramas obtidos para a amostra de urina da mulher em lactação. Eletrólito suporte: fase móvel de KH_2PO_4 ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$; pH 5,0) / ACN (72:28 V/V) vazão de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$. $E = 1,0 \text{ V x Ag/AgCl}$ ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$) e $\text{pH}_{\text{urina}} 7,0$. Eletrodo de DDB pré-tratado catodicamente (ET) e aço inoxidável (CE). Volume de injeção = $20 \mu\text{L}$.

Como esperado, a leitura do branco da amostra de urina da voluntária lactante mostrada na FIGURA 4.12 não apresentou picos referentes a nenhum dos hormônios investigados. Isso porque durante o período em que a mulher está amamentando, nas primeiras semanas após o parto, os níveis dos hormônios responsáveis pelo crescimento das mamas, principalmente a estrona (E1), ainda estão muito elevados. Como a coleta da urina desta voluntária foi feita 10 meses após o parto, os níveis de E1 no organismo podem voltar a atingir níveis mais baixos.

A análise da amostra de urina da voluntária gestante foi coletada na 34ª semana de gestação. Nesta fase, os níveis dos hormônios E2 e E1 são muito elevados. A FIGURA 4.13 mostra os cronoamperogramas obtidos para a amostra de urina da mulher gestante.

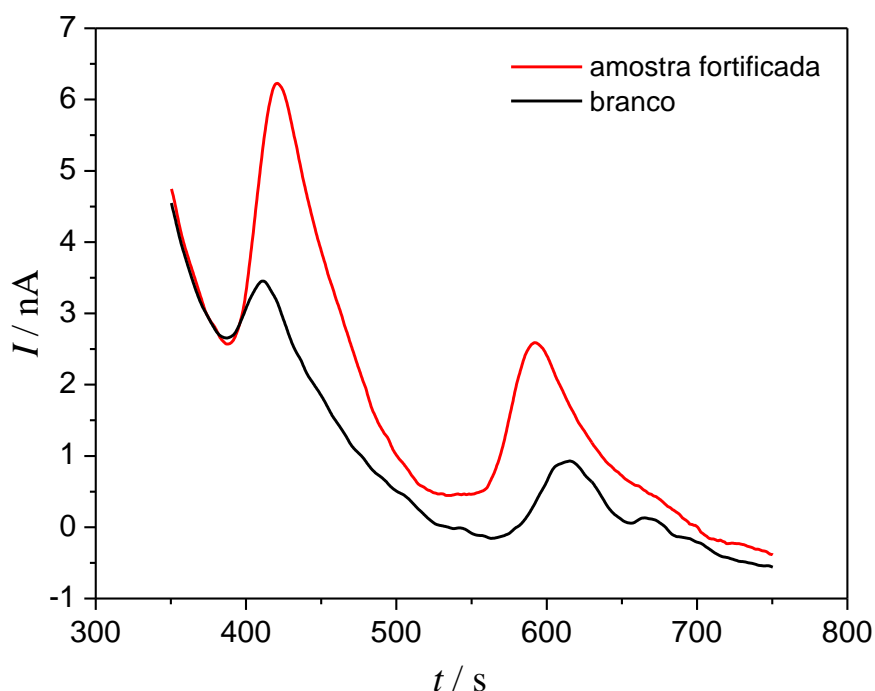


FIGURA 4.13 - Cronoamperogramas obtidos para a amostra de urina da mulher gestante. Eletrólito suporte: fase móvel 72:28 (v/v) de tampão fosfato (KH_2PO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 5,0) e ACN a uma vazão de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$. $E = 1,0 \text{ V x Ag/AgCl}$ ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$) e $\text{pH}_{\text{urina}} 7,0$. Eletrodo de DDB pré-tratado catodicamente (ET) e aço inoxidável (CE). Volume de injeção = $20 \mu\text{L}$.

Depois das primeiras 5 semanas de gravidez, a placenta torna-se o principal órgão de produção de estrogênios, sendo que esses níveis aumentam gradualmente durante a toda a gestação. A concentração plasmática de estrogênios eleva-se cerca de 100 vezes em relação aos níveis do início da gravidez e conseqüentemente, esse aumento é percebido pela excreção na urina. Além disso, quando o aumento no nível dos hormônios durante a gestação não ocorre de forma gradual, isso é um indicativo de doenças gestacionais, e problemas como a deficiência de sulfatase placentária ou sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEA-S). A placenta utiliza o DHEA-S, produzido pelas supra-renais materna e fetal e sintetiza estradiol e estrona. Dessa forma, o acompanhamento dos níveis desses hormônios torna-se imprescindível para a realização de um bom pré-natal (FERNANDES, *et al.*, 2015). Portanto, tal como esperado, a leitura do branco da amostra de urina da voluntária gestante mostrada na FIGURA 4.13 apresentou picos referentes aos hormônios investigados. Os resultados obtidos referentes à aplicação do método pela análise individual das urinas de todos os voluntários encontram-se sumarizados na TABELA 4.4.

TABELA 4.4 - Resultados obtidos pela aplicação do método ($n = 3$) por meio da análise dos hormônios E2 e E1 das amostras de urina de cada indivíduo. Eletrólito suporte: fase móvel 72:28 (V/V) de tampão fosfato (KH_2PO_4 0,01 mol L^{-1} em pH 5,0) e ACN a uma vazão de 1,2 mL min^{-1} . $E = 1,0$ V x Ag/AgCl (3,0 mol L^{-1}) e $\text{pH}_{\text{urina}} 7,0$. Eletrodo de DDB pré-tratado catodicamente (ET) e aço inoxidável (CE). Volume de injeção = 20 μL .

	Homem	Mulher			
		<i>Em idade fértil</i>	<i>Lactante</i>	<i>Gestante</i>	
E2	C_{ad} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,500	0,500	0,500	0,500
	C_{ob} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,518	0,537	0,401	0,350
	Branco ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	-	0,104	-	0,159
	$R\%_{\text{médio}}(\pm \text{DP}_{\text{rec}})$	104 \pm 1	108 \pm 1	80 \pm 4	70 \pm 13
	CV%	0,96	0,93	5,0	19
E1	C_{ad} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,500	0,500	0,500	0,500
	C_{ob} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,569	0,599	0,638	0,531
	Branco ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	-	-	-	0,113
	$R\%_{\text{médio}}(\pm \text{DP}_{\text{rec}})$	114 \pm 3	119 \pm 3	128 \pm 3	106 \pm 13
	CV%	2,63	2,52	2,34	12,3

De um modo geral, a TABELA 4.4 mostra que a aplicação do método foi precisa, com boa repetitividade e reprodutibilidade para todas as amostras, com exceção apenas para a amostra da urina da voluntária gestante cuja eficiência de recuperação ($R\%_{\text{médio}}$) do hormônio E2 foi de 70%.

CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES

O método desenvolvido neste trabalho, foi validado dentro dos critérios de aceitação em fluidos biológicos (INMETRO, 2010), para determinação simultânea dos hormônios naturais 17β -estradiol e estrona em urina humana, a partir da técnica de extração por ponto nuvem, por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção eletroquímica, utilizando eletrodo de diamante dopado com boro pré-tratado catodicamente.

As condições cromatográficas foram devidamente otimizadas e resultaram em uma composição de fase móvel 72:28 (V/V) de tampão fosfato (KH_2PO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 5,0) e ACN a uma vazão de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$. $E = 1,0 \text{ V x Ag/AgCl}$ ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$) e $\text{pH}_{\text{urina}} 7,0$. Eletrodo de DDB pré-tratado catodicamente (ET) e aço inoxidável (CE). Volume de injeção = $20 \mu\text{L}$. A partir do voltamograma hidrodinâmico, o potencial aplicado que apresentou a melhor resposta foi de $1,0 \text{ V x Ag/AgCl}$ ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$).

Os estudos referentes à recuperação, precisão intra- e inter- dia e exatidão, realizados com amostras controle de qualidade preparadas em quintuplicata e em três diferentes concentrações (baixa, média e alta), em relação às concentrações da curva de calibração mostraram-se dentro dos critérios de aceitação de métodos para fluidos biológicos (INMETRO, 2007).

A aplicação do método feita por meio da análise individual das urinas coletadas dos indivíduos voluntários mostrou-se precisa, com boa repetitividade e reprodutibilidade. Destas análises, foi possível identificar e determinar a presença do hormônio sintético 17α -etinilestradiol na amostra do branco de um dos voluntários que fazia uso contínuo de um anticoncepcional, sem qualquer interferência deste hormônio sintético no procedimento de extração e determinação cromatográfica com detecção eletroquímica. Além disso, foi possível também detectar a presença dos hormônios E2 e E1 na amostra do branco da voluntária gestante.

Portanto, os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que a utilização do sensor eletroquímico com eletrodo de DDB para a determinação simultânea dos hormônios naturais E1 e E2 em amostras de urina pode servir de forma adequada como um método eficaz e alternativo para diagnósticos patológicos envolvendo a análise destes hormônios em matrizes biológicas de urina humana.

REFERÊNCIAS

- ALFARO, M. A. Q.; FERRO, S.; MARTÍNEZ-HUITLE, C. A. & VONG, Y. M. "Boron doped diamond electrode for the wastewater treatment". *J. Braz. Chem. Soc.* 17: 227, **2006**.
- ALMEIDA, C. & NOQUEIRA, J. M. F. "Determination of steroid sex hormones in water and Urine matrices by stir bar sorptive extraction and liquid chromatography with diode array detection". *J. Pharmaceut. Biomed.* 41: 1303-1311, **2006**.
- ANDRADE, L. S.; MORAES, M. C. de; ROCHA FILHO, R. C.; FATIBELLO-FILHO, O.; CASS, Q. B. "A multidimensional high performance liquid chromatography method coupled with amperometric detection using a boron-doped diamond electrode for the simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim in bovine milk". *Anal. Chim. Acta*, 654: 127-132, **2009**.
- BALLESTEROS-GÓMEZ, A.; SICILIA, M. D. & RUBIO, S. "Supramolecular solvents in the extraction of organic compounds. A review". *Anal. Chim. Acta*, 677: 108-120, **2010**.
- BEZERRA, M. de A.; ARRUDA, M. A. Z.; FERREIRA, S. L. C. "Cloud Point Extraction as a Procedure of Separation and Pre-Concentration for Metal Determination Using Spectroanalytical Techniques: A Review". *Appl. Spectrosc. Rev.* 40: 269-299, **2005**.
- BEZERRA, M. A. & FERREIRA, S. L. "Extração por ponto nuvem: Princípios e aplicações em química Analítica." Vitória da Conquista - UESB 2006, 165p.
- BRACAMONTE, M. P. & MILLER, V. M. "Vascular effects of estrogens: arterial protection versus venous thrombotic risk". *Trends Endocrin. Met.* 12: 204- 209, **2001**.
- BROCENSCHI, R. F.; ROCHA-FLHO, R. C.; DURAN, B. & SWAIN, G. M. "The analysis of estrogenic compounds by flow injection analysis with amperometric detection using a boron-doped diamond electrode". *Talanta*, 126: 12-19, **2014**.
- CARABIAS-MARTINEZ, R.; RODRIGUEZ-GONZALO, E.; MRENO-CORDERO, B.; PÉREZ-PAVÓN, J. L.; GACIA-PINTO, C. & LAESPADA, E. F. "Sufactant cloud point extraction and preconcentration of organic compounds prior to chromatography and capillary electrophoresis". *J. Chromatogr. A*, 902: 251-265, **2000**.
- CESARINO, I.; CINCOTTOB, F. H. & MACHADO, S. A. S. "A synergistic combination of reduced graphene oxide and antimony nanoparticles for estriol hormone detection". *Sensor Actuat. B-Chem.*, 210:453-459, **2015**.
- CHEN, Q.; SHI, J.; 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". *Microchem. J.*, 104: 49-55, **2012**.

CINCOTTO, F. H.; MORAES, F. C. & MACHADO, S. A. S. "Graphene nanosheets and quantum dots: a smart material for electrochemical applications". *Chem-Eur. J.*, 20:4746-4753, **2014**.

COSTA, B. E. S. "Extração Seletiva por Ponto Nuvem Para Pré-Concentração e Especificação de Arsênio Inorgânico em Matriz Alimentícia Empregando Espectrometria de Absorção Atômica Eletrotérmica em Forno de Grafite". Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Goiás, Catalão, 2013, 103p.

ESCALEIRA, L. A. "Extração e pré-concentração do ponto nuvem para a determinação de metais em águas salinas por espectrometria de emissão ótica com fonte de plasma indutivamente acoplado". Dissertação de mestrado, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2005, 101p.

FAYAD, P. B.; PRÉVOST, M. & SAUVÉ, S. "On-line solid-phase extraction coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry optimized for the analysis of steroid hormones in urban wastewaters". *Talanta*, 115: 349-360, **2013**.

FERREIRA, A. C.P.; MONTES, M. B.A.; FRANCESCHINI, S. A. & TOLOI, M. R.T. "Efeitos do contraceptivo oral contendo 20 µg de etinilestradiol e 150 µg de desogestrel sobre os sistemas de coagulação e fibrinólise". *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 22: 77-87, **2000**.

FILLIT, H.; WEINREF, H.; CHOLST, I.; LUINE, V.; MCEWEN, B.; AMADOR, R. & ZABRISKIE, J. "Observations in a preliminary open trial of estradiol therapy for senile dementia-Alzheimer's type". *Psychoneuroendocrinology*, 11: 337- 345, **1986**.

FUJISHIMA, A.; RAO, T. N.; POPA, E.; SARADA, B. V.; YAGI, I.; TRYK, D. A. "Electroanalysis of dopamine and NADH at conductive diamond electrodes". *J. Electroanal. Chem.* 473: 179-185, **1999**.

GAN, P.; COMPTON, R.G.; FOORD, J.S. "The voltammetry and electroanalysis of some estrogenic compounds at modified diamond electrodes". *Electroanalysis*, 25:2423-2434, 2013.

GORGA, M.; PETROVIC, M. & BARCELÓ, D. "Multi-residue analytical method for the determination of endocrine disruptors and related compounds in river and waste water using dual column liquid chromatography switching system coupled to mass spectrometry". *J Chromatogr. A*, 1295: 57-66, **2013**.

GORGA, M.; INSA, S.; PETROVIC, M. & BARCELÓ, D. "Analysis of endocrine disruptors and related compounds in sediments and sewage sludge using on-line turbulent flow chromatography–liquid chromatography–tandem mass spectrometry". *J. Chromatogr. A*, 1352:29-37, **2014**.

GORTZI, O.; LALAS, S.; CHATZILAZAROU, A.; KATSOYANNOS, E.; PAPACONSTANDINO, S.; DOURTOGLOU, E. "Recovery of natural antioxidants from olive mill wastewater using Genapol-X080". *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 85: 133–140, **2008**.

GUEDES, M. M. F. "Remoção da atividade estrogênica de 17 β -estradiol e de 17 α -etinilestradiol pelos processos de ozonização e O₃/H₂O₂". Tese de doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE-UFRJ, Rio de Janeiro, 2008.

GUNATILAKE, S. R.; CRAVER, S.; KWON, J-W.; XIA, K.; ARMBRUST, K.; RODRIGUEZ, J. M. & MLSNA, T. E. "Analysis of estrogens in wastewater using solid-phase extraction, QuEChERS cleanup, and liquid chromatography/tandem mass spectrometry". *J. AOAC Int.*, 96: 1440-1447, **2013**.

HEVIR-KENE, N. & RIZNER, T. L. "The endometrial cancer cell lines Ishikawa and HEC-1A, and the control cell line HIEEC, differ in expression of estrogen biosynthetic and metabolic genes, and in androstenedione and estrone-sulfate metabolism". *Chem-Biol Interact*, 234: 309-319, **2015**.

HOGERVORST, E.; WILLIAMS, J.; COMBRINCK, M. & SMITH, A. D. "Measuring serum estradiol in women with Alzheimer's disease: the importance of the sensitivity of the assay method". *Eur. J. Endocrinol.*, 148: 67-72, **2003**.

HONJO, H.; KIKUCHI, N.; HOSODA, T.; KARIYA, K.; KINOSHITA, Y.; IWASA, K.; OHKUBO, T.; TANAKA, K.; TAMURA, T.; URABE, M. KAWATA, M. "Alzheimer's disease and estrogen". *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 76: 227-230, **2001**.

HONJO, H.; OGINO, Y.; NAITOH, K. URABE, M.; KITAWAKI, J.; YASUDA, J.; YAMAMOTO, T.; ISHIHARA, S.; OKADA, H.; YONEZAWA, T.; HAYASHI, K. & NAMBARA, T. "In vivo effects by estrone sulfate on the central nervous system-senile dementia (Alzheimer's type)". *J. Steroid Biochem.*, 34: 521-525, **1989**.

HU, F.B.; GRODSTEIN, F.; HENNEKENS, C. H.; COLDITZ, G. A.; JOHNSON, M.; MANSON, J. E.; ROSNER, B. & STAMPFER, M. J. "Age at natural menopause and risk of cardiovascular disease". *Arch. Intern. Med.* 159: 1061-1066, **1999**.

HU, S.; WU, K.; YI, H. & CUI, D. "Voltammetric behavior and determination of estrogens at Nafion-modified glassy carbon electrode in the presence of cetyltrimethylammonium bromide". *Anal. Chim. Acta*, 464: 209-216, **2002**.

HUPERT, M.; MUCK, A.; WANG, J.; STOPPER, J.; CVAKOVA, Z.; HAYMOND, S.; SHOW, Y. & SWAIN, G. M. "Conductive diamond thin-films in electrochemistry". *Diam. Relat. Mater.* 12: 1940-1949, **2003**.

INGRAND, V.; HERRY, G.; BEAUSSE, J. & ROUBIN, M. "Analysis of steroid hormones in effluents of wastewater treatment plants by liquid chromatography-tandem mass spectrometry". *J. Chromatogr. A.* 1020: 99, **2003**.

INMETRO. Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos -DOQ- CGCRE-008. Rev.03. **2010**.

KANSO, H.; BARTHELMEBS, L.; INGUIMBERT N. & NOGUER, T. “Immunosensors for estradiol and ethinylestradiol based on new synthetic estrogen derivatives: application to wastewater analysis”. *Anal. Chem.*, 85: 2397-2404, **2013**.

KE, H.; LIU, M.; ZHUANG, L.; LI, Z.; FAN, L. & ZHAO, G. “A femtomolar level 17 β -estradiol electrochemical aptasensor constructed on hierarchical dendritic gold modified boron-doped diamond electrode”. *Electrochim. Acta*, 137: 146–153, **2014**.

KIM, Y. S.; JUNG, H. S.; MATSUURA, T.; LEE, H. Y.; KAWAI, T. & GU, M. B. “Electrochemical detection of 17 β -estradiol using DNA aptamer immobilized gold electrode chip”. *Biosens. Bioelectron.*, 22: 2525-2531, **2007**.

KUMAR, R.; GAURAV; HEENA; MALIK, A.K.; KABIR, A. & FURTON, K.G. “Efficient analysis of selected estrogens using fabric phase sorptive extraction and high performance liquid chromatography-fluorescence detection”. *J. Chromatogr. A*, 1359: 16-25, **2014**.

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 disrupters determination in marine waters.” *Talanta*, 117: 168-175, **2013**.

LOPES, E. da L. “Estudo e determinação das condições experimentais da reação de silição utilizada na análise multirresíduo de anti-inflamatórios não-esteróides em matrizes aquosas ambientais por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massa”. Monografia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, **2011**, 75p.

MANICKUM, T. & JOHN, W. “The current preference for the immuno-analytical ELISA method for quantitation of steroid hormones (endocrine disruptor compounds) in wastewater in South Africa”. *Anal. Bioanal. Chem.*, 407: 4949-4970, **2015**.

MARTÍNEZ, N. A.; PEREIRA, S. V.; BERTOLINO, F. A.; SCHNEIDER, R. J.; MESSINA, G. A. & RABA, J. “Electrochemical detection of a powerful estrogenic endocrine disruptor: Ethinylestradiol in water samples through bioseparation procedure”. *Anal. Chim. Acta*, 723: 27-32, **2012**.

MONERRIS, M. J.; ARÉVALO, F. J.; FERNÁNDEZ, H.; ZON, M. A. & MOLINA, P. G. “Development of a very sensitive electrochemical immunosensor for the determination of 17 β -estradiol in bovine serum samples”. *Sensor Actuat. B-Chem.*, 208: 525-531, **2015**.

MORAES, F. C.; ROSSI, B.; DONATONI, M. C.; DE OLIVEIRA, K.T & PEREIRA, E. C. “Sensitive determination of 17 β -estradiol in river water using a graphene based electrochemical sensor”. *Anal. Chim. Acta*, 881: 37-43, **2015**.

MUKHERJEE, P.; PADHAN, S. K.; DASH, S.; PATEL, S. & MISHRA, B. K. “Clouding behavior in surfactant systems”. *Adv. Colloid Interfac.*, 162: 59–79, **2011**.

MURUGANANTHAN, M.; YOSHIHARA, S.; RAKUMA, T.; UEHARA, N. & SHIRAKASHI, T.; “Electrochemical degradation of 17 β -estradiol (E2) at boron-doped diamond (Si/BDD) thin film electrode”. *Electrochim. Acta*, 52: 3242-3249, **2006**.

OLIVEIRA, C. L. “Estudo de esteróis como marcadores químicos em águas destinadas ao abastecimento público na região do Rio Paraíba do Sul, SP. Desenvolvimento e validação da metodologia analítica”. Dissertação (Mestrado em ciências, área de concentração Tecnologia Nuclear – Materiais), Universidade de São Paulo-IPEN, São Paulo, **2012**, 189p.

PALEOLOGOS, E. K.; GIOKAS, D. L. & KARAYANNIS, M. I. “Micelle-mediated separation and cloud-point extraction”. *Trac-Trend. Anal. Chem.*, 24: 426-436, **2005**.

PEREIRA, G. F.; ROCHA-FILHO, R. C.; BOCCHI, N.; BIAGGIO, S. R. “Electrochemical degradation of bisphenol A using a flow reactor with a boron-doped diamond anode”. *Chem. Eng. J.*, 198: 282-288, **2012**.

PEREIRA, R. O. “Formação de subprodutos do estrona e 17 β -estradiol na oxidação utilizando cloro e ozônio em água”. Tese de doutorado em Ciências– Universidade de São Paulo – Escola de Engenharia de São Carlos, São Carlos, **2011**. 192p.

PÉREZ, R. L. & ESCANDAR G. M. “Liquid chromatography with diode array detection and multivariate curve resolution for the selective and sensitive quantification of estrogens in natural waters”. *Anal. Chim. Acta*, 835:19-28, **2014**.

PINNELLA, B.; GRANMER, K.; TESSARI, J. D.; COSMA, G. N. & RAO VEERAMACHANENI, D. N. “Gas chromatographic determination of catecholestrogens following isolation by solid-phase extraction”. *J. Chromatogr. B.*, 758: 145-152, **2001**.

PIWOWARSKA, J.; RADOWICKI, S. & PACHECKA, J. “Simultaneous determination of eight estrogens and their metabolites in serum using liquid chromatography with electrochemical detection”. *Talanta*, 81: 275-280, **2010**.

PLESKOV, Y. V. “Synthetic diamond, a new electrode material for electroanalysis”. *J. Anal. Chem.*, 55: 1045, **2000**.

PREECHAWORAPUN, A.; CHUANUWATANAKUL, S.; EINAGA, Y.; GRUDPAN, K.; MOTOMIZU, S. & CHAILAPAKUL, O. “Electroanalysis of sulfonamides by flow injection system/high-performance liquid chromatography coupled with amperometric detection using boron-doped diamond electrode”. *Talanta*, 68: 1726-1731, **2006**.

ROCHA, S. A. N. “Extração em ponto nuvem com derivatização do surfactante: uma alternativa para a determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em águas naturais por cromatografia gasosa”. Salvador. Programa de Pós-Graduação em química- UFB, **2013**. Tese de Doutorado, 101p,

- RONAN, J. M. & MCHUGH, B. “A sensitive liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the determination of natural and synthetic steroid estrogens in seawater and marine biota, with a focus on proposed Water Framework Directive Environmental Quality Standards”. *Rapid Commun. Mass Sp.*, 27: 738–746, **2013**.
- SANTOS, K. D.; BRAGA, O. C.; VIEIRA, I. C.; SPINELLI, A. “Electroanalytical determination of estriol hormone using a boron-doped diamond electrode”. *Talanta*, 80: 1999-2006, **2010**.
- SHIMADA, K.; MITAMURA, K. & HIGASHI, T. “Gas chromatography and high-performance liquid chromatography of natural steroids”. *J. Chromatogr. A*, 935: 141-172, **2001**.
- SILVA, S. G. “Desenvolvimento de procedimentos limpos para extração de íons metálicos em ponto nuvem”. Dissertação de Mestrado Universidade de São Paulo, São Paulo, **2008**, 83p.
- SILVA, T. A.; ZANIN, H.; MAY, P. W.; CORAT, E. J. & FATIBELLO-FILHO, O. “Electrochemical performance of porous diamond-like carbon electrodes for sensing hormones, neurotransmitters, and endocrine disruptors”. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 6: 21086-21092, **2014**.
- SOCAS-RODRÍGUEZ, B.; ASENSIO-RAMOS, M.; HERNÁNDEZ-BORGES, J.; HERRERA-HERRERA, A.V. & RODRÍGUEZ-DELGADO, M.A. “Chromatographic analysis of natural and synthetic estrogens in milk and dairy products.” *Trac-Trend. Anal. Chem*, 44: 58-77, **2013**.
- SONG, J.; YANG, J. & HU, X. “Electrochemical determination of estradiol using a poly(L-serine) film-modified electrode”. *J. Appl. Electrochem.*, 38: 833-836, **2008**.
- SPIERTO, F.W.; GARNER, F.; SMITH, S. J. “Evaluation of an EIA method for measuring serum levels of the estrogen metabolite 2-hydroxyestrone in adults”. *Steroids*, 66: 59-62, **2001**.
- SU, P.; ZHANG, X. X.; WANG, Y. C. & CHANG, W. B. “Direct immunoassay of estriol in pregnancy serum by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detector.” *Talanta*, 60: 969-975, **2003**.
- SUFFREDINI, H. B.; PEDROSA, V. A.; CODOGNOTO, L.; MACHADO, S. A. S.; ROCHA-FILHO, R. C. & AVACA, L. A. “Enhanced electrochemical response of boron-doped diamond electrodes brought on by a cathodic surface pre-treatment”. *Electrochim. Acta*, 49: 4021-4026, **2004**.
- TONISZEWSKI, M.; MECHLIN`SKA, A.; ZYGMUNT, B. & NAMIES`NIK, J. “Green analytical chemistry in sample preparation for determination of trace organic pollutants.” *Trac-Trend. Anal. Chem.*, 28: 943-951, **2009**.

- WANG, Z. & DAI, Z. “Extractive microbial fermentation in cloud point system”. *Enz. Microb. Tech.*, 46: 407-418, **2010**.
- WATANABE, H. & TANAKA, H. “A non-ionic surfactant as a new solvent for liquid-liquid extraction of zinc (II) with 1-(2-pyridylazo)-2-naphtos”. *Talanta*, 25: 585-589, **1978**.
- WEN, T.; XUE, C.; LI, Y.; WANG, Y.; WANG, R.; HONG, J.; ZHOU, X. & JIANG, H. “Reduced graphene oxide-platinum nanoparticles composites based imprinting sensor for sensitively electrochemical analysis of 17 β -estradiol”. *J. Electroanal. Chem.*, 682: 121–127, **2012**.
- WU, Y-W.; JIANG, Y-Y.; LIU, J-F. & XIONG, K. “Cloud point extraction combined with micellar electrokinetic capillary chromatography determination of benzophenones in cosmetic matrix.” *Electrophoresis*, 29: 819-826, **2008**.
- XIE, S.; PAAU, M. C.; LI, C. F.; XIAO, D. & CHOI, M. M. F. “Separation and preconcentration of persistent organic pollutants by cloud point extraction”. *J. Chromatogr. A*, 1217: 2306-2317, **2010**.
- YAMADA, H.; YOSHIZAWA, K. & HAYASE, T. “Sensitive determination method of estradiol in plasma using high performance liquid chromatography with electrochemical detection”. *J. Chromatogr. B*. 775: 309-213, **2002**.
- YAO, B. J. & YANG, L. “Ultrasonic assisted cloud point extraction of polyaromatic hydrocarbons.” *Separ. Sci. Technol.*, 42: 1843-1858, **2007**.
- YING, G. G.; KOKANA, R. S. & RU, Y. J. “Occurrence and fate of hormone steroids in the environment”. *Environ. Int.*, 28: 545-551, **2002**.
- YOSHIHARA, S. & MURUGANANTHAN, M.; “Decomposition of various endocrine-disrupting chemicals at boron-doped diamond electrode”. *Electrochim. Acta*, 54: 2031-2038, **2008**.
- ZHU, X.; YANG, J.; LIU, M.; WU, Y.; SHEN, Z. & LI, G. “Sensitive detection of human breast cancer cells based on aptamer–cell–aptamer sandwich architecture”. *Anal. Chim. Acta*, 764: 59-63, **2013**.
- ZOU, Y.; LI, Y.; JIN, H.; TANG, H.; ZOU, D.; LIU, M. & YANG, Y. “Determination of estrogens in human urine by high-performance liquid chromatography/diode array detection with ultrasound-assisted cloud-point extraction.” *Anal. Biochem.*, 421: 378- 384, **2012**.
- ZULOAGA, O.; NAVARRO, P.; BIZKARGUENAGA, E.; IPARRAGUIRRE, A.; VALLEJO, A.; OLIVARES, M. & PRIETO, A. “Overview of extraction, clean-up and detection techniques for the determination of organic pollutants in sewage sludge: A review”. *Anal. Chim. Acta*, 736: 7-29, **2012**.