

**OTIMIZAÇÃO DE UMA METODOLOGIA
ELETROANALÍTICA PARA DETERMINAR
METILTESTOSTERONA EM AMOSTRAS
AMBIENTAIS**

GUARAPUAVA

2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE, UNICENTRO-PR

**OTIMIZAÇÃO DE UMA METODOLOGIA
ELETROANALÍTICA PARA DETERMINAR
METILTESTOSTERONA EM AMOSTRAS
AMBIENTAIS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

LUCIANE MIRANDA

GUARAPUAVA-PR

2012

LUCIANE MIRANDA

**OTIMIZAÇÃO DE UMA METODOLOGIA ELETROANALÍTICA PARA
DETERMINAR METILTESTOSTERONA EM AMOSTRAS AMBIENTAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada, área de concentração em Metodologias Analíticas e Aplicações para a obtenção do título de Mestre.

Profa. Dra. Sueli Pércio Quináia

Orientadora

Dra. Andressa Galli

Co-orientadora

GUARAPUAVA-PR

2012

Miranda, Luciane
M672o Otimização de uma metodologia eletroanalítica para determinar metiltestosterona em amostras ambientais / Luciane Miranda. -- Guarapuava, 2012
xv, 73 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada, área de concentração em Metodologias analíticas e aplicações, 2012

Orientadora: Sueli Pércio Quináia

Co-orientadora: Andressa Galli

Banca examinadora:

Bibliografia

1. 17a-metiltestosterona. 2. Voltametria de onda quadrada. 3. Eletrodo de gota pendente de mercúrio. 4. Hormônios. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada.

CDD 547.734

AGRADECIMENTOS

À Deus que me dá força na caminhada de cada dia. “Confie a Deus o que você faz , e seus projetos se realizarão”. (Provérbios: 16-2)

À minha família pela força e por entender a minha ausência em tantas ocasiões, ao longo da carreira acadêmica.

À profa. Dra. Sueli Pércio Quináia pela orientação e dedicação na realização deste trabalho e também pela amizade e compreensão.

À Dra. Andressa Galli pela co-orientação e dedicação na realização do trabalho.

Ao professor Dr. Edgard Moreira Ganzarolli pela ajuda com o polarógrafo.

Ao professor Dr. Mauro Chierici Lopes e à Dra. Vanessa Egéia pelas sugestões e críticas para a melhoria deste trabalho.

Aos colegas do curso, especialmente Simone, Hércio e Ivonete, pela amizade e colaboração.

À UNICENTRO por meio do Departamento de Química pela oportunidade de realização deste curso e às agências de fomento que financiaram a infra-estrutura disponível.

À CAPES pela bolsa concedida.

Aos proprietários dos tanques de piscicultura que gentilmente autorizaram a coleta de amostras para análise.

Às secretárias da pós-graduação, Neuza e Larissa por colaborarem prestando-nos as informações necessárias durante o curso.

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ΔE_s	Incremento de varredura de potencial
T_{dep}	Tempo de deposição
E_{dep}	Potencial de deposição
f	frequência de aplicação de pulsos de potencial
a	amplitude de aplicação de pulsos de potencial
<i>HMDE</i>	<i>Hanging Mercury Drop Electrode</i>
<i>VC</i>	Voltametria Cíclica
<i>SWV</i>	Voltametria de Onda Quadrada
<i>CV</i>	Coefficiente de Variação
<i>AH</i>	Ácido Húmico
<i>EGM</i>	Eletrodo Gotejante de Mercúrio
<i>DME</i>	<i>dropping mercury electrode</i>
<i>SMDE</i>	<i>static mercury dropping electrode</i>
<i>DPV</i>	Voltametria de Pulso Diferencial
<i>POP</i>	Poluentes Orgânicos Persistentes
<i>EDCs</i>	<i>Endocrine Disrupting Chemicals</i>
<i>pH</i>	Potencial hidrogeniônico
<i>LD</i>	Limite de Detecção
<i>LQ</i>	Limite de Quantificação
<i>IUPAC</i>	International Union of Pure and Applied Chemistry
<i>ETE</i>	Estação de Tratamento de Efluentes
<i>VTG</i>	Proteína vitelogenina
i_d	Corrente de difusão
<i>DPV</i>	Voltametria de pulso diferencial
S_1	Corrente antes do pulso
S_2	Corrente após o pulso
I_r	Corrente resultante
I_d	Corrente direta

LISTA DE FIGURAS

Figura1. Representação esquemática da principal via de entrada de disruptores endócrinos hormonais em sistemas aquáticos.....	6
Figura 2. Estrutura química da molécula da molécula do hormônio 17 α -metiltestosterona.....	7
Figura 3. Representação esquemática de uma célula polarográfica/ voltamétrica com três eletrodos.....	13
Figura 4. Esquema da célula polarográfica/ voltamétrica de três eletrodos conectada a um sistema potenciostático.....	13
Figura 5. Um eletrodo de gota pendente de mercúrio (HMDE).....	15
Figura 6. a) Sinal de excitação em uma medida de voltametria cíclica b) Voltamograma cíclico típico de um processo redox reversível (O + ne \leftrightarrow R).....	16
Figura 7. Esquema representando a aplicação de potencial em função do tempo em polarografia de pulso diferencial. A corrente é amostrada em S ₁ e S ₂ e a diferença entre elas é registrada: I = I _{S2} - I _{S1}	17
Figura 8. Voltamograma de pulso diferencial.....	17
Figura 9. Variação da corrente faradaica (I _f) e corrente capacitiva (I _c) com o tempo na SWV.....	19
Figura 10. Forma de aplicação do potencial na voltametria de onda quadrada.....	20
Figura 11. Voltamogramas de onda quadrada esquemáticos para um sistema reversível (1) e para um sistema irreversível (2).....	21
Figura 12. Cella voltamétrica do analisador polarográfico 757 VA Computrace mostrando os eletrodos de trabalho, auxiliar e de referência e o agitador.....	23
Figura 13. Mapa de Guarapuava-PR mostrando a ampliação dos pontos de coleta. (1) Tanques Palmeirinha, (2) Tanques de criação de peixe Alto da XV (Morro Alto), (3) Arroio Carro Quebrado (Vila Carli) e (4) Tanques (Vale do Jordão).....	25
Figura 14. Imagem aérea de tanques de piscicultura (Vale do Jordão).....	26
Figura 15. (a) Estrutura química básica de hormônios esteróides e (b) Estrutura química do hormônio 17 α -metiltestosterona.....	28
Figura 16. Voltamogramas cíclicos obtidos na determinação do hormônio 17 α -metiltestosterona com uso da VC e HMDE. Condições: (C _{MT} = 6,62 \times 10 ⁻⁸ mol L ⁻¹ ,	

em solução de NaOH, pH = 9,0), potencial de varredura de (-0,9 a -1,7 V) E_{dep} (-0,8) e T_{dep} (120 s).....	29
Figura 17. Dependência da Intensidade de corrente de pico com a velocidade de varredura para o 17 α -metiltestosterona empregando VC e HMDE e T_{dep} = 120 s.....	30
Figura 18. Dependência da intensidade da corrente de pico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura na determinação de 17 α -metiltestosterona usando HMDE e T_{dep} = 120 s.....	31
Figura 19. Relação entre o logaritmo da intensidade de corrente de pico e o logaritmo da velocidade de varredura para medidas do 17 α -metiltestosterona por VC e HMDE e T_{dep} = 120 s.....	32
Figura 20. Voltamograma de onda quadrada obtido para o hormônio 17 α -metiltestosterona com uso de HMDE. Condições: C_{MT} = $1,96 \times 10^{-7}$ mol L ⁻¹ , em solução de NaOH em pH 9,0, potencial de varredura de (- 1,0 a -1,7 V) E_{dep} (-0,8), a (50 mV), ΔE_s (2 mV), T_{dep} (120 s).....	33
Figura 21. Variação da intensidade de corrente de pico em função do tempo pré-concentração do hormônio 17 α -metiltestosterona empregando SWV com uso de HMDE. Condições: C_{MT} = $4,65 \times 10^{-8}$ mol L ⁻¹ , em solução de NaOH, pH = 9,0, tempo de pré-concentração (30, 60, 90, 120, 150, 180, 200 e 230 s).....	34
Figura 22. Voltamogramas de onda quadrada para a 17 α -metiltestosterona ($1,0 \times 10^{-7}$ mol L ⁻¹) em solução de Na ₂ SO ₄ (0,1 mol L ⁻¹), em pH 5 e 9. Parâmetros Voltamétricos utilizados: E_{dep} = -0,8 V; $E_{inicial}$ = -1,0; E_{final} = -1,6 V; a = 50 mV; f = 100 Hz; ΔE_s = 2 mV; T_{dep} = 120 s.....	35
Figura 23. Voltamogramas de onda quadrada para a 17 α -metiltestosterona ($1,0 \times 10^{-7}$ mol L ⁻¹) obtidos com voltametria de onda quadrada em diferentes condições experimentais. Solução de NaH ₂ PO ₄ (0,1 mol L ⁻¹), pH 5 e 9,0. Parâmetros Voltamétricos utilizados: E_{dep} = -0,8 V; $E_{inicial}$ = -1,0; E_{final} = -1,6 V; a = 50 mV; f = 100 Hz; ΔE_s = 2 mV; T_{dep} = 120 s.....	36
Figura 24. Voltamograma de onda quadrada para a 17 α -metiltestosterona ($1,0 \times 10^{-7}$ mol L ⁻¹) obtidos com voltametria de onda quadrada, em solução de NaOH $5,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ , em pH 9. Parâmetros Voltamétricos utilizados: E_{dep} = -0,8 V; $E_{inicial}$ = -1,0; E_{final} = -1,7 V a = 50 mV; f = 100 Hz; ΔE_s = 2 mV; T_{dep} = 120 s.....	37
Figura 25. Voltamograma de onda quadrada para a 17 α -metiltestosterona ($1,0 \times 10^{-7}$	37

mol L ⁻¹) obtidos com voltametria de onda quadrada, em solução tampão BR, em pH 9. Parâmetros utilizados: E _{dep} = -0,8 V; E _{inicial} = -1,0; E _{final} = -1,7 V a = 50 mV; f = 100 Hz; ΔE _s = 2 mV; T _{dep} = 120 s.....	
Figura 26. Voltamograma de onda quadrada para a 17α-metiltestosterona (1,0×10 ⁻⁷ mol L ⁻¹) obtidos com voltametria de onda quadrada em soluções em pH ajustado 9,0: solução de Na ₂ SO ₄ 0,1 mol L ⁻¹ (___); NaH ₂ PO ₄ 0,1 mol L ⁻¹ (___); NaOH 5,0×10 ⁻³ mol L ⁻¹ (___); Solução Tampão BR (___). Parâmetros utilizados: E _{dep} = -0,8 V; E _{inicial} = -1,0; E _{final} = -1,7 V a = 50 mV; f = 100 Hz; ΔE _s = 2 mV; T _{dep} = 120 s.....	38
Figura 27. Voltamograma de onda quadrada para a 17α-metiltestosterona (1,0×10 ⁻⁷ mol L ⁻¹) obtidos com voltametria de onda quadrada em soluções de NaOH 5,0×10 ⁻³ mol L ⁻¹ em pH 7,5, 8, 8,5, 9, 10 e 11. Parâmetros utilizados: E _{dep} = -0,8 V; E _{inicial} = -1,0; E _{final} = -1,7 V a = 50 mV; f = 100 Hz; ΔE _s = 2 mV; T _{dep} = 120 s.....	39
Figura 28. Relação entre os valores de pH e a intensidade de corrente de pico para as soluções de NaOH 5,0×10 ⁻³ mol L ⁻¹ , nos diferentes valores de 7,5 a 11.....	39
Figura 29. Influência da variação da frequência da onda quadrada nos voltamogramas do hormônio 17α-metiltestosterona obtidos com voltametria de onda quadrada HMDE (1,0×10 ⁻⁷ mol L ⁻¹ , NaOH 5,0×10 ⁻³ mol L ⁻¹ pH = 9,0, a = 50 mV ΔE _s = 2 mV. Frequências: (a) 30, (b) 50, (c) 70, (d) 90, (e) 100 e (f) 140 Hz.....	41
Figura 30. Dependência da corrente de pico para o 17α-metiltestosterona, em função da frequência.....	42
Figura 31. Dependência da corrente de pico para o 17α-metiltestosterona, em função da raiz quadrada da frequência.....	42
Figura 32. Influência da variação da amplitude de pulso de potencial com voltametria de onda quadrada nos voltamogramas do hormônio 17α-metiltestosterona (1,0×10 ⁻⁷ mol L ⁻¹ , NaOH 5,0×10 ⁻³ mol L ⁻¹ pH = 9,0, f = 100 Hz, ΔE _s = 2 mV). Amplitudes: 10 (—), 15 (—), 20 (—), 25 (—), 30 (—), 35 (—), 50 (—), 65 (—), 85 (—), mV.....	43
Figura 33. Dependência da corrente de pico para o 17α-metiltestosterona em função da variação de amplitude de pulso de potencial, nas medidas por SWV.....	44
Figura 34. Influência da variação do incremento de varredura de potencial da onda quadrada nos voltamogramas do hormônio 17α-metiltestosterona obtido com SWV e HMDE (1,0×10 ⁻⁷ mol L ⁻¹), NaOH 5,0×10 ⁻³ mol L ⁻¹ pH = 9,0, f = 100 Hz, ΔE _s = 2	45

mV). Incremento: 2 (—), 4 (—), 6 (—), 8 (—), 10 (—), mV.....	
Figura 35. Dependência da intensidade de corrente de pico para o 17 α -metiltestosterona em função da variação de incremento de varredura.....	46
Figura 36. Voltamogramas de onda quadrada para o 17 α -metiltestosterona ($1,0 \times 10^{-7}$ mol L $^{-1}$) empregando HMDE, NaOH $5,0 \times 10^{-3}$ mol L $^{-1}$ pH = 9,0. Ensaio 1 ($I_p = -442,89$ nA), Ensaio 2 ($-259,78$ nA) e ensaio 16 ($I_p = -18,64$ nA).....	48
Figura 37. Distribuição de Pareto para os 18 ensaios com o hormônio 17 α -metiltestosterona, $1,0 \times 10^{-7}$ mol L $^{-1}$ empregando SWV e HMDE, em NaOH $5,0 \times 10^{-3}$ mol L $^{-1}$ pH= 9. Fator 1 representa o tempo de deposição; 2: a Freqüência; 3 o Incremento de varredura e 4 a Amplitude. Valor de p = 0,05.....	48
Figura 38. Voltamogramas de onda quadrada e obtidos com SWV e HMDE com adição de padrão do com $f = 140$ Hz, $a = 50$ mV, $\Delta E_s = 2$ mV, NaOH $5,0 \times 10^{-3}$ mol L $^{-1}$ pH = 9,0. Concentração: (—) 0, (—) $9,99 \times 10^{-9}$, (—) $2,99 \times 10^{-8}$, (—) $6,29 \times 10^{-8}$, (—) $1,09 \times 10^{-7}$, (—) $1,67 \times 10^{-7}$, (—) $2,31 \times 10^{-7}$, (—) $4,18 \times 10^{-7}$, (—) $5,98 \times 10^{-7}$, (—) $1,10 \times 10^{-6}$, (—) $1,87 \times 10^{-6}$ mol L $^{-1}$	50
Figura 39. Curva de adição de padrão do hormônio 17 α -metiltestosterona sobre HMDE em diferentes concentrações.....	50
Figura 40. Voltamogramas do hormônio 17 α -metiltestosterona obtido com voltametria de onda quadrada e HMDE, com $f = 140$ Hz, $a = 50$ mV, $\Delta E_s = 2$ mV, NaOH $5,0 \times 10^{-3}$ mol L $^{-1}$ em pH 9,0. (—) Amostra, (—) Adição de $7,94 \times 10^{-8}$ mol L $^{-1}$, (—) Adição de $1,38 \times 10^{-7}$ mol L $^{-1}$, (—) Adição de $2,02 \times 10^{-7}$ mol L $^{-1}$	53
Figura 41. Curva de adição de padrão utilizada na recuperação do hormônio 17 α -metiltestosterona em água ultrapura.....	53
Figura 42. voltamogramas do estudo de interferência do ácido húmico (AH) sobre 17 α -metiltestosterona ($1,96 \times 10^{-7}$ mol L $^{-1}$). Adição de AH $4,9 \times 10^{-7}$ a $2,3 \times 10^{-5}$ % m/V. Em meio de NaOH $5,0 \times 10^{-3}$ mol L $^{-1}$ pH 9, com $a = 50$ mV, $f = 140$ s $^{-1}$ e $\Delta E_s = 2$ mV.....	55
Figura 43. Voltamogramas do estudo de interferência do ácido húmico (AH) sobre 17 α -metiltestosterona ($1,96 \times 10^{-7}$ mol L $^{-1}$). Adição AH $4,9 \times 10^{-4}$ a $9,7 \times 10^{-4}$ % m/V. Em meio de NaOH $5,0 \times 10^{-3}$ mol L $^{-1}$ pH 9, com $a = 50$ mV, $f = 140$ s $^{-1}$ e $\Delta E_s = 2$ mV.	55
Figura 44. Voltamogramas do estudo de interferência do ácido húmico (AH) sobre	

17 α -metiltestosterona ($1,96 \times 10^{-7}$ mol L ⁻¹), voltamogramas mostrando as adições: (c) AH $1,76 \times 10^{-6}$ a $6,9 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹ . Em meio de NaOH $5,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ pH 9, com $a = 50$ mV, $f = 140$ s ⁻¹ e $\Delta E_s = 2$ mV.....	56
Figura 45. Relação entre a intensidade de corrente de pico e a concentração de 17 α -metiltestosterona em relação à matriz, em água ultrapura (___) e água de tanque de piscicultura (___). Nas concentrações ($4,6 \times 10^{-8}$ a $4,2 \times 10^{-7}$ mol L ⁻¹).....	57
Figura 46. Voltamogramas do hormônio progesterona obtidos com SWV e HMDE. Concentração: 0 (___), adição de PG $3,32 \times 10^{-8}$ (___) adição de PG $6,62 \times 10^{-8}$ (___). Em meio de NaOH $5,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ em pH 9, com $a = 50$ mV, $f = 140$ s ⁻¹ e $\Delta E_s = 2$ mV, $E_{dep} = -0,8$ V; $E_{inicial} = -1,0$; $E_{final} = -1,6$ V; $T_{dep} = 120$ s.....	58
Figura 47. Voltamogramas do hormônio 17 α -metiltestosterona e progesterona, obtidos com SWV e HMDE. 17 α -metiltestosterona $9,9 \times 10^{-8}$ mol L ⁻¹ (___), adições de progesterona $3,3 \times 10^{-8}$ mol L ⁻¹ (___) e $5,3 \times 10^{-8}$ mol L ⁻¹ (___). Em meio de NaOH $5,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ em pH 9, com $a = 50$ mV, $f = 140$ s ⁻¹ e $\Delta E_s = 2$ mV, $E_{dep} = -0,8$ V; $E_{inicial} = -1,0$; $E_{final} = -1,6$ V; $T_{dep} = 120$ s.....	59
Figura 48. Voltamogramas do hormônio 17 α -metiltestosterona obtido com voltametria de onda quadrada e HMDE, amostra do tanque 02, com $f = 140$ Hz, $a = 50$ mV, $\Delta E_s = 2$ mV, NaOH $5,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ em pH 9,0. (a) Amostra, (b) Adição de $4,65 \times 10^{-8}$ mol L ⁻¹ , (c) Adição de $1,06 \times 10^{-7}$ mol L ⁻¹ , (d) Adição de $1,83 \times 10^{-7}$ mol L ⁻¹	61
Figura 49. Curva de adição de padrão utilizada na quantificação do hormônio 17 α -metiltestosterona em amostra real (tanque 02).....	61
Figura 50. Regressão linear entre as replicatas para a quantificação de 17 α -metiltestosterona na amostra do Tanque 02. (___) Regressão, (---) Intervalo de confiança (95%), R-Sq (coeficiente de correlação linear) e R-Sq (adj.) (coeficiente de correlação linear ajustado).....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Propriedades físicas do hormônio 17α -metiltestosterona.....	7
Tabela 2: Valores encontrados na literatura para hormônios estrogênicos analisados com técnicas cromatográficas.....	10
Tabela 3. Localização dos pontos de coleta de amostras de água utilizadas na determinação de 17α -metiltestosterona.....	24
Tabela 4. Eletrólitos suporte, concentrações e pH na otimização da determinação de 17α -metiltestosterona.....	27
Tabela 5. Fatores, níveis e coeficientes de contraste para o planejamento fatorial 2^4	46
Tabela 6. Resultado do planejamento fatorial 2^4 contendo os fatores, coeficientes de contraste e resposta (intensidade de corrente de pico, medida em nA).....	47
Tabela 7. Adição e recuperação de 17α -metiltestosterona em amostras reais.....	54
Tabela 8. Potencial de pico de redução dos hormônios 17α -metiltestosterona e progesterona.....	58
Tabela 9. Temperatura e pH das amostras de águas naturais avaliadas.....	60
Tabela 10. Determinação do hormônio 17α -metiltestosterona em amostras de águas naturais.....	63

RESUMO

Neste trabalho descreve-se o desenvolvimento uma metodologia eletroanalítica para a determinação do hormônio 17α -metiltestosterona em amostras ambientais, empregando o eletrodo de gota pendente de mercúrio (HMDE). Inicialmente, foram realizados estudos por voltametria cíclica, quais mostraram que o 17α -metiltestosterona possui apenas um pico de redução em $-1,35\text{ V vs Ag/AgCl}$, em meio de KCl ($3,0\text{ mol L}^{-1}$), com características irreversíveis e processo controlado pela adsorção das espécies na superfície do eletrodo. Parâmetros como eletrólito suporte, concentração hidrogeniônica do meio bem como, os parâmetros da técnica de voltametria de onda quadrada (SWV) como frequência de aplicação de pulsos de potencial (f), amplitude dos pulsos de potencial (a) e incremento de varredura (ΔE_s) foram avaliados e otimizados. Estabelecidas as melhores condições, curvas de trabalho por meio do método de adição padrão de 17α -metiltestosterona, foram obtidas e os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) calculados foram de $3,07\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ e $10,78\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

A metodologia otimizada para o hormônio 17α -metiltestosterona foi aplicada em águas ultrapura e naturais para avaliar recuperação e quantificar o analito nessas matrizes. As curvas de recuperação obtidas pela técnica de adição de padrão, possibilitaram determinar quantidades adicionadas em amostras fortificadas. Os valores de recuperação de 17α -metiltestosterona em água ultrapura foram de $100,38\%$ e, em águas naturais de $108,79\%$ e $115,0\%$. Efeitos de interferência de matriz foram observados em amostras reais e, com a diluição das amostras este efeito foi minimizado, permitindo boas recuperações ao nível de análise de traços. O analito foi quantificado em amostras de tanques de peixe em valores de até $228,7\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$. O estudo de repetibilidade apresentou coeficiente de variação (CV) de $2,85\%$ e a reprodutibilidade o CV de $14,91\%$, estes valores se mostraram adequados para análises de traços.

Palavras-Chave: 17α -metiltestosterona, voltametria de onda quadrada, eletrodo de gota pendente de mercúrio.

ABSTRACT

This work describes the development of an electroanalytical methodology for determining the hormone 17 α -methyltestosterone in environmental samples, using the electrode hanging mercury drop (HMDE). Initially, studies were performed by cyclic voltammetry, which showed that 17 α -methyltestosterone, has only a reduction peak at -1.35 V vs. Ag/AgCl, (in KCl 3.0 mol L⁻¹), with features irreversible process and controlled by adsorption of species on the electrode surface. Parameters such as supporting electrolyte, hydrogen ion concentration of the medium, as well as, the parameters of the technique of square wave voltammetry (SWV) and frequency of application of potential pulses (f), amplitude of pulses of potential (a) and scan increment (ΔE_s) were evaluated. Established the best conditions, working curves by the method of standard addition of 17 α -methyltestosterone were obtained and the limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) values were 3.07 $\mu\text{g L}^{-1}$ and 10.78 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively.

The optimized methodology for the 17 α -methyltestosterone was applied in purified water and natural to evaluate the presence of 17 α -methyltestosterone in these matrices. The recovery curves obtained by standard addition technique, it was possible to determine amounts of 17 α -methyltestosterone added in spiked samples. The recovering in purified water were 100.38%, and natural waters from 108.79% to 115.0%. The effects of matrices Interference were observed in natural water and with dilution of sample this effect was eliminated, allowing good recoveries at the level of trace analysis. The compound was quantified in samples of fish ponds in amounts up to 206.9 mg L⁻¹. The study showed repeatability coefficient of variation (CV) of 2.85% and reproducibility CV of 14.91%, adequate in analysis of traces.

Keywords: 17 α -methyltestosterone, square wave voltammetry, hanging mercury drop electrode.

SUMÁRIO

Lista de símbolos e abreviaturas	i
Lista de figuras	ii
Lista de tabelas	viii
Resumo	ix
Abstract	x
1. Introdução	1
2. Objetivos	3
3. Referencial Teórico	4
3.1. Os hormônios no contexto dos desreguladores endócrinos	4
3.2. O hormônio 17 α -metiltestosterona.....	7
3.3. As técnicas eletroanalíticas	11
3.3.1 O eletrodo de trabalho	14
3.3.2 As técnicas de pulso	16
3.3.3 Voltametria de onda quadrada (SWV)	17
4. Materiais e Métodos	23
4.1. Locais de amostragem.....	24
4.2. Solução padrão de hormônio 17 α -metiltestosterona.....	26
4.3. Solução padrão do hormônio progesterona.....	26
4.4. Estudo de pH e eletrólitos	26
4.5. Coleta de amostras.....	27
5. Resultados e Discussão	28
5.1. Voltametria cíclica.....	28
5.2. Avaliação dos fatores que influenciam na determinação do hormônio 17 α -metiltestosterona empregando Voltametria de Onda Quadrada (SWV).....	32
5.2.1 Estudo do tempo de deposição (T_{dep}).....	33
5.2.2. Estudo do eletrólito suporte e variação da concentração hidrogeniônica do meio.....	34
5.2.3 Efeito da frequência (f) nos voltamogramas do hormônio 17 α -metiltestosterona obtidos com SWV.....	40
5.2.4. Efeito da amplitude de onda quadrada (a)	43
5.2.5. Efeito do incremento de varredura de potencial (ΔE_s).....	44
5.2.6. Planejamento fatorial.....	46
5.3. Curva de adição de padrão para a determinação de hormônio 17 α -metiltestosterona.....	49
5.4. Estudo de recuperação do 17 α -metiltestosterona em águas ultrapura e naturais	52
5.5. Estudo de interferentes.....	54
5.6. Quantificação do hormônio 17 α -metiltestosterona em águas naturais	59
5.7. Estudo de repetibilidade e reprodutibilidade.....	63
6. Considerações Finais	64

7. Referências Bibliográficas.....	65
---	-----------

INTRODUÇÃO

Um amplo grupo de compostos orgânicos, incluindo os hormônios, tem sido considerado pelos seus efeitos como interferentes endócrinos em animais, incluindo os seres humanos, sejam estes compostos naturais ou sintéticos. Estudos têm investigado os efeitos dos hormônios sobre a vida aquática (REIS FILHO et al., 2006; RIVERA-ARCE et al, 2006; BILA & DEZOTTI, 2007; LOPES et al., 2010).

Os hormônios são moléculas produzidas pelo sistema endócrino (glândulas e hormônios), com funções biológicas específicas de comunicação, regulação e de manutenção do equilíbrio do metabolismo (REIS FILHO et al. 2006). Os hormônios esteróides naturais são sintetizados a partir do colesterol nos tecidos endócrinos e transportados pela corrente sanguínea até o local de ação. Entre os esteróides estão incluídos os hormônios secretados pelas glândulas supra-renais, e os hormônios sexuais produzidos pelos ovários (estrógenos), testículos (andrógenos) e placenta (hormônios da gravidez) ou progestógenos (NELSON & COX, 2002; REIS FILHO et al. 2006). Entre os estrogênios naturais estão a Estrona, 17 β -Estradiol e Estriol (LOPES et al., 2010).

Todavia, o foco neste trabalho foi o composto 17 α -metiltestosterona, um hormônio masculino sintético derivado da progesterona (SILVA et al., 2002; GONZALO-LUMBRELAS & IZQUIERDO-HORNILLOS, 2003; HOMKLIN et al., 2011), uma vez que este hormônio é empregado em diversas atividades entre elas na reversão sexual de peixes como a tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (BOMBARDELLI & HAYASHI, 2005; BARRY et al., 2007; DIAS-KOBERSTEIN et al., 2007) e Truta, *Salmo gairdner* (SCHMELZING & GALL, 1991).

A piscicultura corresponde ao cultivo de diversas espécies de peixes em espaços confinados. O grau de intervenção nesta atividade é variável de acordo com a perspectiva de produtividade. Nos sistemas de produção intensiva, há um alto grau de controle e uso de insumos (OLIVEIRA, 2009).

No contexto atual, a piscicultura apresenta alguns desafios, entre eles estão a disponibilidade de espaço físico e de água e o posterior destino desse recurso após seu uso (OLIVEIRA, 2009). Os efluentes de piscicultura são compostos, frequentemente de amônia, sólidos fecais, matéria orgânica dissolvida na água, ração não consumida, além disso, pode lançar produtos químicos empregados na desinfecção e hormônios para induzir a reprodução e inversão sexual (BOYD & QUEIROZ, 1997).

Os resíduos desse hormônio masculinizante podem acumular-se nos tanques de

psicultura e lentamente ser liberado para outros ecossistemas aquáticos, ou quando a água contendo resíduos de 17α -metiltestosterona é escoada para a limpeza destes reservatórios. (HOMKLIN et al., 2011). No meio ambiente este composto pode ser encontrado em nível de parte por milhão (ppm). A atividade da psicultura é uma das principais fontes de lançamento efluentes contendo essa substância (FALONE, 2007; OLIVEIRA, 2009). Assim, justifica-se a necessidade de monitorar os corpos hídricos quanto à presença de substâncias hormonalmente ativas, como o 17α -metiltestosterona.

Outro fator importante a ser considerado em relação ao estudo de hormônios em meio aquoso, é a possibilidade de bioacumulação. Os microrganismos planctônicos podem acumular quantidades significativas de compostos presentes no meio aquoso e retê-los em seus tecidos, afetando outros organismos que se alimentem destes (McFARLAND & CLARK, 1989). Se o organismo que absorveu o hormônio apresentar uma baixa velocidade de excreção desse composto, ou não metabolizá-lo, sua concentração final poderá ser superior a que esteve exposto (BOYD & QUEIROZ, 1997).

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi otimizar uma metodologia eletroanalítica para a determinação do hormônio 17 α -metiltestosterona em águas naturais empregando o eletrodo de gota pendente de mercúrio e a voltametria de onda quadrada.

Objetivos específicos

- Determinar a eletroatividade do hormônio 17 α -metiltestosterona em diferentes meios empregando o eletrodo de mercúrio;
- Otimizar uma metodologia eletroanalítica para a quantificação do hormônio 17 α -metiltestosterona em amostras de águas naturais;
- Avaliar a metodologia proposta por meio dos resultados obtidos nas curvas de calibração, curvas de recuperação e também nos experimentos de repetibilidade e reprodutibilidade;
- Analisar a influência de interferentes presentes nas amostras, na sensibilidade e na seletividade da técnica.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

A água é considerada a mais abundante das substâncias encontradas na crosta terrestre. Calcula-se que cerca de 70% da superfície da Terra encontra-se coberta de água e, deste total, 97% são águas oceânicas, 2,47% água doce, entretanto 1,7% desta fração se encontram nas geleiras e calotas, restando 0,77% de água doce presente em rios, lagos e subterrânea. (GRASSI, 2001; LIBÂNIO, 2005).

A deterioração da qualidade da água no planeta é um tema bastante discutido, principalmente com o advento da industrialização intensificada após a Segunda Guerra Mundial, quando se observou o aumento da urbanização. Um grande desenvolvimento tecnológico que permitiu avanços nos processos de mineração, fabricação de produtos, na agricultura, entre outros, teve como consequência à poluição do ar, do solo e dos ecossistemas aquáticos (GRASSI, 2001).

As fontes, ou substâncias causadoras de poluição podem ser classificadas pela legislação ambiental, de acordo com o grau de abrangência. As fontes pontuais abrangem as descargas de efluentes industriais e estações de tratamento de esgoto e, são consideradas de fácil identificação, monitoramento e regulamentação. Enquanto as fontes difusas podem abranger extensas áreas e serem de difícil identificação (incluem o escoamento superficial urbano, descargas de áreas agrícolas e deposições de materiais secos ou úmidos no solo) (VON-SPERLING, 1996; GRASSI, 2001).

3.1. Os hormônios e seu impacto sobre os recursos hídricos

Uma classe de poluentes tem sido relevante ao abordar aspectos relacionados ao meio ambiente e à qualidade da água. São os micropoluentes, considerados como poluentes encontrados no meio ambiente em níveis da ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ e ng L^{-1} . Entre esses compostos pode-se identificar os fármacos, desreguladores ou disruptores endócrinos (EDCs) e poluentes orgânicos persistentes (POP), os quais podem produzir efeitos adversos aos organismos expostos, mesmo em concentrações muito baixas (REIS FILHO et al. 2006; BILA & DEZZOTI, 2007; LOPES et al., 2010).

Os EDCs são classificados como substâncias poluentes ambientais que interferem nas funções do sistema endócrino capazes de mimetizar ou interromper a ação de hormônios no organismo de diversos animais (pássaros, mamíferos marinhos, peixes, répteis). O estudo destes compostos pode fornecer ferramentas para monitorar impactos causados sobre os

ecossistemas aquáticos (REIS FILHO et al. 2006; BILA & DEZZOTI, 2007; TÖLGYESI et al., 2010).

Os esteróides naturais são hormônios biossintetizados a partir do colesterol nas glândulas supra-renais, ovários e testículos e, em seguida modificados por uma série de reações químicas, até estarem prontos para sua ação no organismo. Esses hormônios podem ser classificados em três grupos principais: hormônios sexuais femininos, ou estrógenos; hormônios sexuais masculinos, ou andrógenos e, hormônios da gravidez, ou progestógenos (ZANINI, 1994; NELSON & COX, 2002; REIS FILHO et al. 2006). Os esteróides anabólicos incluem a testosterona e seus derivados (SILVA et al., 2002).

As substâncias hormonalmente ativas quando lançadas em corpos hídricos, mesmo em baixas concentrações, podem causar sérios danos sobre o ecossistema aquático e, até mesmo aos seres humanos ao consumirem a água destes ambientes (REIS FILHO et al., 2006). Bila e Dezzoti (2003) em um trabalho de revisão abordam os compostos considerados desreguladores endócrinos, entre eles os hormônios estrogênicos naturais (estrona, 17 β -estradiol) e sintético (17 α -etinilestradiol) encontrados em águas superficiais em diversos países. Esses autores citam que em esgoto doméstico, os compostos 17 β -estradiol e estrona foram encontrados em concentrações de 0,021 e 0,04 g L⁻¹, respectivamente.

Ternes et al. (1999) realizaram um estudo de estrogênios naturais e do contraceptivo sintético, 17 α -etinilestradiol, na estação de tratamento de esgoto (ETE da Penha/RJ). O nível de remoção de estrona observado para o efluente tratado com filtro biológico foi de 67%, enquanto que o efluente tratado pelo processo de lodos ativados foi 83%. Para o 17 β -estradiol, estas taxas foram de 92 e 99,9% para os sistemas de tratamento considerados, respectivamente. Para o estrogênio contraceptivo 17 α -etinilestradiol, as taxas de remoção na ETE foram de 64 e 78%.

Os hormônios produzidos e as doses de hormônios sintéticos ministradas às pessoas são parcialmente metabolizados, sendo uma parte desses compostos lançados no ambiente. A dinâmica da distribuição dos hormônios nos diversos ambientes envolve processos ligados às características físicas e químicas e as propriedades do ambiente receptor. Algumas das variáveis que influenciam no processo são: temperatura, turbidez, pH, oxigênio dissolvido, entre outras (REIS FILHO et al. 2006).

O esquema na Figura 1 mostra os possíveis caminhos pelos quais os hormônios e os compostos derivados podem seguir para os corpos de água. Embora grande parte dos estrógenos seja metabolizada e excretada na forma inativa, através da ação de enzimas produzidas por bactérias presentes nas áreas de despejo de efluentes atuam os

biotransformando em compostos biologicamente ativos e passíveis de desencadear efeitos negativos (REIS FILHO et al. 2006).

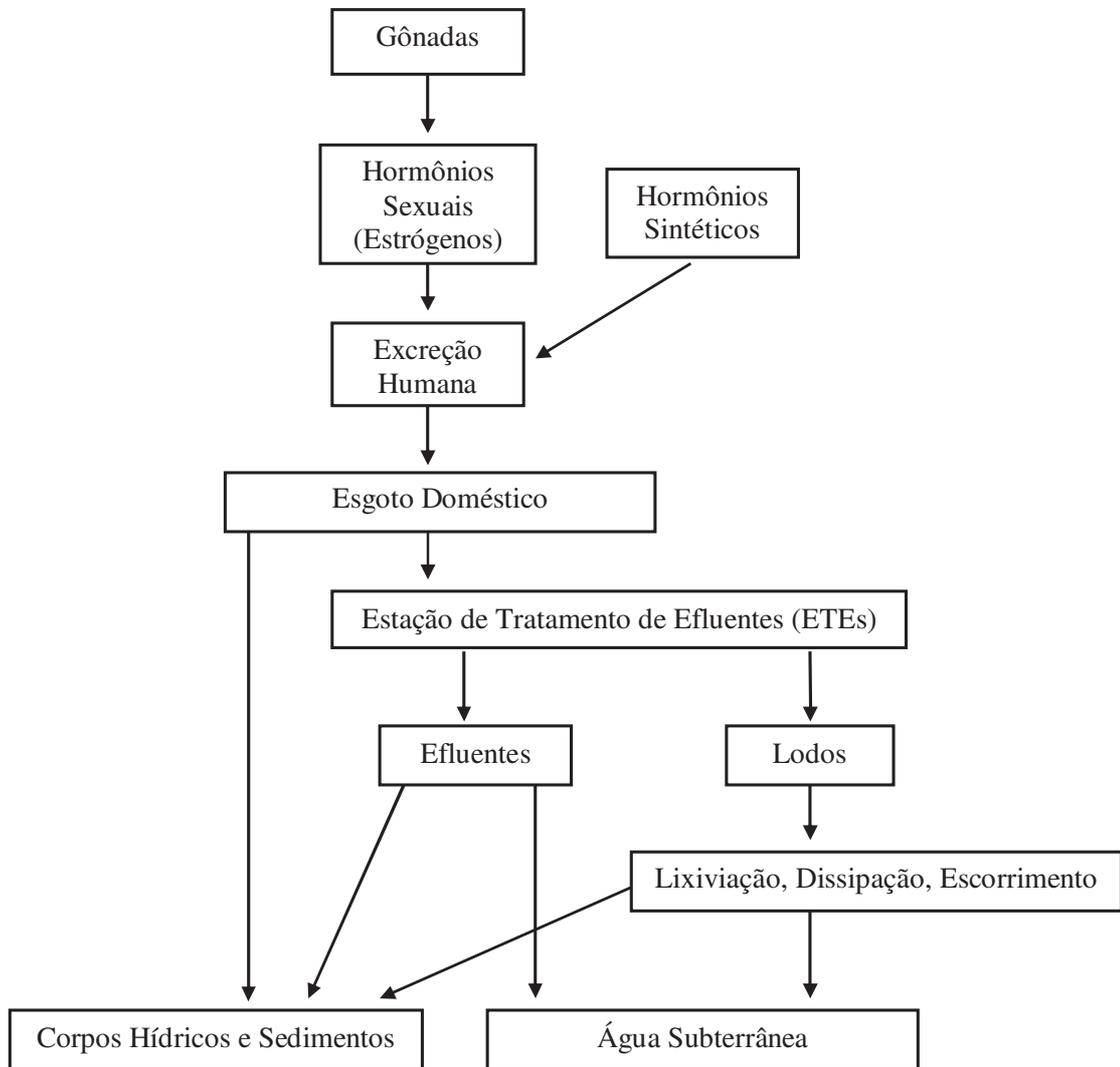


Figura1. Representação esquemática da principal via de entrada de disruptores endócrinos hormonais em sistemas aquáticos. Adaptado de REIS FILHO et al. 2006.

3.2. O hormônio 17 α -metiltestosterona

O hormônio 17 α -metiltestosterona é um derivado sintético da testosterona e pertence ao grupo de hormônios esteróides anabólicos androgênicos que inclui a testosterona e seus derivados (SILVA et al., 2002; GONZALO-LUMBRELAS & IZQUIERDO-HORNILLOS,

2003; HOMKLIN et al., 2011).

A fórmula molecular do composto 17 α -metiltestosterona é C₂₀H₃₀O₂. A figura 2 mostra a estrutura química da molécula.

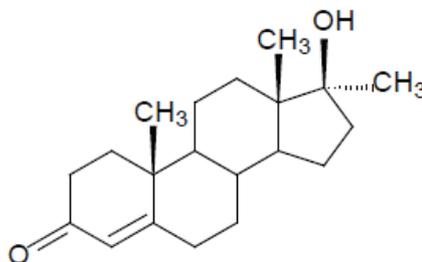


Figura 2. Estrutura química da molécula do hormônio 17 α -metiltestosterona.

Na Tabela 1 encontram-se algumas propriedades deste composto, o qual é um sólido pulverizado de cor branca.

Tabela 1. Propriedades físicas do hormônio 17 α -metiltestosterona.

<i>Propriedades Físicas</i>	<i>Características</i>
Aparência	O hormônio 17 α -metiltestosterona é um sólido branco
Nomenclatura (IUPAC)	17 β -hidroxi-17 α -metilandrosta-4-en-3-ona
Massa Molecular	302,45 g mol ⁻¹
Solubilidade em Água	Praticamente Insolúvel
Solubilidade em Solventes	Álcool etílico, éter e outros solventes orgânicos
Ponto de fusão	161–166 °C

O hormônio 17 α -metiltestosterona pertence a um grupo de compostos chamados anabólicos-androgênicos, originalmente designados para uso médico, para estimular o início da puberdade, e no tratamento de pacientes com baixa atividade androgênica e infertilidade, ou em casos de perda gradativa de massa e força muscular, bem como para tratar certos tipos de câncer, tais como, carcinomas de mama em mulheres (RIVERA-ARCE, 2006; FALONE, 2007).

Entretanto, estes compostos estão se tornando drogas pelo uso alarmante entre jovens que desejam um melhorar seu desempenho esportivo e a imagem corporal (JOHNSON, 1990). Nos esportes, é usado para promover o aumento de força física e, juntamente com narcóticos e outras substâncias estimulantes compõem as substâncias proibidas (*doping*), combatido pelos comitês esportivos oficiais (SILVA et al., 2002; DE-ROSE et al., 2004).

Dentre os hormônios esteróides sintéticos uma das aplicações do 17 α -

metiltestosterona é aplicado na aquicultura para a reversão sexual em camarões, como o gigante da Malásia, *Macrobrachium rosenbergii* (BAGHEL, et al., 2004), e em peixes de corte como a tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, (BOMBARDELLI & HAYASHI, 2005; DIAS-KOBERSTEIN, 2007; ZANARDI, et al., 2011; HOMKLIN et al., 2011;), Truta, *Salmo gairdneri*, (SCHMELZING & GALL, 1991); peixes ornamentais, como o peixe paulistinha, *Danio rerio* (ANDERSEN, 2006) e o beta, *Betta splendens* (KIM, 2007).

A determinação genotípica do sexo em peixes é definida no momento da formação do embrião, mas a diferenciação fenotípica ocorre em etapas posteriores (PANDIAN et al., 1994). As gônadas primordiais possuem caráter bipotencial e os fatores ambientais podem afetar o destino de células somáticas e germinativas, incluindo a ação de fatores genéticos, ambientais (temperatura, por exemplo), comportamentais e fatores fisiológicos. Os esteróides sexuais exógenos administrados na fase de determinação do sexo podem influenciar o curso da diferenciação sexual em peixes, sugerindo que eles desempenham um papel fundamental na determinação gonadal, bem como as diferenciações subsequentes (DEVLIN & NAGAHAMA, 2002; ANDERSEN et al, 2003).

A labilidade dos sistemas de determinação do sexo em peixes faz com que algumas espécies sensíveis aos poluentes ambientais capazes de mimetizar, ou interromper as ações de hormônios sexuais. Tais observações fornecem informação importante sobre os impactos potenciais dos desreguladores endócrinos, e pode fornecer ferramentas de monitoramento úteis para impactos sobre os ambientes aquáticos (DEVLIN & NAGAHAMA, 2002).

Andersen et al. (2006), medindo os níveis da proteína vitelogenina (VTG), como biomarcador, demonstraram que a exposição a curto prazo de machos de peixe paulistinha, *Danio rerio*, a baixas concentrações de androgênio sintético 17 α -metiltestosterona pode afetar componentes do sistema endócrino reprodutivo desses animais, isto pode causar danos sobre a fisiologia reprodutiva em peixes, por exemplo, a espermatogênese (origem as células germinativas) e interferir no comportamento reprodutivo dessa espécie.

As metodologias empregadas nos processos de reversão sexual em peixes com o hormônio 17 α -metiltestosterona, são por meio de adição do hormônio na ração, no caso de tilápias, podendo produzir até 98% de machos, ou utilizando-se ração suplementada com 60 mg kg⁻¹ do hormônio por um período de 30 dias, desde o início da alimentação das larvas. Outra maneira é por meio de banhos de imersão de larvas, em solução contendo 17 α -metiltestosterona, resultando em populações com até 83 % de machos (ZANARDI et al., 2011). O uso dessa técnica permite aos aquicultores obter em seus tanques, preferencialmente peixes do sexo masculino, com isto haverá o aumento da produção e de rentabilidade

(BOMBARDELLI & HAYASHI, 2005; MARWAH et al., 2005; BARRY et al., 2007).

Entretanto, Os resíduos de 17 α -metiltestosterona na ração suplementada podem acumular-se nos tanques e sendo liberados lentamente para os corpos receptores de água, ou quando os tanques são limpos. Portanto o uso indiscriminado de hormônios pode levar à contaminação de rios, lagos e mananciais, liberando resíduos e metabólitos no meio ambiente (HOMKLIN et al., 2011).

Em relação aos processos de degradação do hormônio, MARWAH et al., (2005) observaram, em pH neutro uma taxa de recuperação de 98 % de 17 α -metiltestosterona presente em ração de peixes. Em pH ácido, o produto de degradação presente em maior quantidade foi o 17-dehidro-testosterona. No pH básico, foi um composto muito polar oxigenado, muito possivelmente o 7-ceto-testosterona.

Algumas referências de trabalhos abordam os hormônios em diferentes matrizes determinados com técnicas de cromatografia (gasosa, líquida e líquida de alta eficiência), em matrizes tais como, sedimentos (PETROVIC et al., 2003; URBATZKA et al., 2007), águas de abastecimento (TERNES et al., 1999; PETROVIC et al., 2003; LOPES et al., 2010), água de rios (PETROVIC et al., 2003; TÖLGYESI et al., 2010; URBATZKA et al., 2007), tanques de piscicultura (FALONE, 2007), medicamentos e alimentos veterinários (MARWAH et al., 2005; LE BIZEC et al., 2009). A Tabela 2 mostra alguns exemplos desses hormônios quantificados em diferentes matrizes por meio de técnicas cromatográficas.

Tabela 2: Valores encontrados na literatura para hormônios estrogênicos analisados com técnicas cromatográficas.

<i>Composto</i>	<i>Matriz</i>	<i>Concentração</i>	<i>Referência</i>
17 α -metiltestosterona	Rio Danúbio (Budapeste)	<0,30 ng L ⁻¹	TÖLGYESI et al, 2010.
Progesterona	Rio Danúbio (Budapeste)	<0,20 ng L ⁻¹ <0,37 ng L ⁻¹ <0,16 ng L ⁻¹	TÖLGYESI et al, 2010.
17 β -Estradiol	Água tratada, Jaboticabal -SP	6,8 ng L ⁻¹	LOPES et al, 2010.
17 β -Estradiol	Água de manancial, Jaboticabal-SP	30,6 ng L ⁻¹	LOPES et al, 2010.
Estrógenos naturais e sintéticos	Água de Abastecimento (Alemanha)	< 0,1-2,1 ng L ⁻¹	PETROVIC et al, 2003.
Estrógenos sintéticos/ progestógenos	Água de Abastecimento (Reino Unido)	< 1-10 ng L ⁻¹	PETROVIC et al, 2003.
Estrógenos e progestógenos	Água de rios (Espanha)	0,2-71,1 ng L ⁻¹	PETROVIC et al, 2003.
Esteróides e Hormônios	Água de rios (Estados Unidos)	5-2000 ng L ⁻¹	PETROVIC et al, 2003.
Estrógenos	Lodo Ativado e digerido (Alemanha)	19-64 ng L ⁻¹	PETROVIC et al, 2003.
Estrógenos naturais e sintéticos	Truta arco-íris (Suécia)	< 0,1-2,5 μ g/g	PETROVIC et al, 2003.
17 α -metiltestosterona	Sedimentos de tanques de piscicultura (Jan/ 2006) – Socorro-SP	Entrada/ Saída (μ g L ⁻¹) 203,5/ 168,0 218,5/ 273,0 313,0/ 237,5	FALONE, 2007.
	Sedimentos de tanques de piscicultura (Abril/ 2006 - Socorro-SP)	Entrada/ Saída (μ g L ⁻¹) 172,0/ 215,5 101,5/ 153,0 293,0/ 216,0	FALONE, 2007.
	Água de tanques de piscicultura - Socorro-SP	Abaixo do LD (11,7 μ g L ⁻¹)	FALONE, 2007

Conforme o descrito, as metodologias normalmente empregadas para a análise de hormônios e de seus resíduos em matrizes naturais envolvem a quantificação dos analitos por diferentes técnicas cromatográficas. (REIS FILHO et al. 2006; SANTOS et al., 2010; LOPES et al., 2010; PIWOWARSKA et al, 2010). Contudo, estes são métodos que dependem de longas etapas de preparação das amostras e a instrumentação geralmente é de custo elevado. Por isso, há um grande interesse em métodos sensíveis e de menor custo para a determinação de hormônios e moléculas correlatas (SANTOS et al., 2010).

Dentro deste contexto, as técnicas eletroanalíticas, que compreendem um conjunto de técnicas voltamétricas de análise, estão sendo cada vez mais utilizadas para a análise de diferentes compostos em matrizes complexas, por diversos grupos de pesquisas (HERNANDEZ-OLMOS et al., 2000). As vantagens inerentes a estas técnicas estão relacionadas com o baixo custo das análises, bem como a possibilidade de se monitorar compostos diretamente na própria matriz (RUPP & ZUMAN, 1992; SZCZEPANIAK et al. 1995; SOUZA & MACHADO, 2003). As técnicas voltamétricas de redissolução têm sido bastante empregadas em amostras de interesse ambiental (SKOOG et al, 2006).

Dessa forma, é possível avaliar os potenciais da voltametria em diferentes aplicações, na determinação de compostos de interesse em matrizes complexas, bem como, em estudos que visem à determinação dos mecanismos de redução ou oxidação eletroquímica de compostos orgânicos incluindo os hormônios e moléculas correlatas (SANTOS et al., 2010). Nestes casos, a rapidez da análise, a sensibilidade e a seletividade das técnicas eletroanalíticas são parâmetros importantes e devem ser otimizados antes da aplicação da técnica proposta (HERNANDEZ-OLMOS et al., 2000; OLIVEIRA & MACHADO, 2004).

Para o estudo de hormônios, resultados prévios indicam a possibilidade de reduzi-los eletroquimicamente (WANG et al., 1985; SANTOS, et al., 2010). Assim, neste trabalho, foram analisadas as condições para a observação dos picos de redução da molécula do hormônio 17α -metiltestosterona. Experimentos de voltametria cíclica e de onda quadrada (SWV) foram executados em meio aquoso. Os parâmetros como a concentração hidrogeniônica do meio e os parâmetros da onda quadrada (frequência (f), amplitude de aplicação de pulsos (a) e incremento de varredura de potencial (ΔE_s) foram variados para se obter um pico voltamétrico do composto 17α -metiltestosterona. Também foram avaliados o tempo de pré-concentração do analito, parâmetros de repetibilidade, reprodutibilidade e recuperação de 17α -metiltestosterona em amostras de água de rio e tanques de piscicultura.

3.3. As técnicas eletroanalíticas

Entre as características mais importantes das técnicas eletroanalíticas está a relação entre a concentração do analito com alguma das propriedades elétricas que pode ser, a corrente, o potencial, a condutividade, a resistência ou a carga (SOUZA et. al., 2003).

A voltametria abrange um conjunto de técnicas eletroquímicas que fornecem informações qualitativas e quantitativas de uma espécie química, a partir do registro de curvas de corrente-potencial, obtidas a partir da eletrólise da espécie no interior de uma cela

eletroquímica, as quais são registradas a partir de curvas de corrente em função do potencial aplicado entre dois eletrodos, realizando-se uma varredura a uma velocidade constante em função do tempo. A curva resultante da corrente em função do potencial é denominada voltamograma (ALEIXO, 2003).

A corrente resultante do processo no eletrodo é denominada corrente de difusão, representada por i_d , obtida a partir da diferença entre a corrente residual e a corrente limite. A relação entre a corrente de difusão (corrente faradaica gerada por uma reação da espécie química sobre o eletrodo) e a concentração da espécie eletroativa em solução é dada pela equação de Ilkovic (1):

$$i_d = 607nD^{1/2}m^{2/3}t^{1/6}C \quad (1)$$

Onde: i_d = corrente de difusão (μA); n = quantidade de matéria; m = velocidade da vazão de mercúrio através do capilar de vidro (mg/s); t = tempo de gota (s) e C = concentração em mmol L^{-1} .

Outros dois processos de transferência de massa entre a solução e a superfície do eletrodo também podem ocorrer, além da difusão. O processo de migração de partículas carregadas presentes na solução em função do campo elétrico. O outro é a convecção, um processo mecânico, que ocorre devido à movimentação da solução (usando-se um agitador magnético e uma barra magnética, por exemplo). O processo de migração em um campo elétrico é minimizado pela adição de um eletrólito inerte (eletrólito de suporte) à solução em uma concentração pelo menos 100 vezes maior do que a substância eletroativa. O processo de convecção é minimizado mantendo-se a solução em repouso, sem agitação. Assim, apenas o processo de difusão será responsável pelo transporte de massa, e a corrente medida, (i_d) pode ser efetivamente expressa como corrente de difusão (ALEIXO, 2003; AGOSTINHO et al., 2004).

As células voltamétricas (Figura 3), empregadas na voltametria utilizam três eletrodos, sendo o de trabalho, o qual se polarizará, o eletrodo de referência que mantém o potencial constante e o auxiliar, ou contra-eletrodo, podendo ser de platina, ouro, carbono vítreo, etc. O eletrodo auxiliar assegura o sistema potenciostático (ALEIXO, 2003).

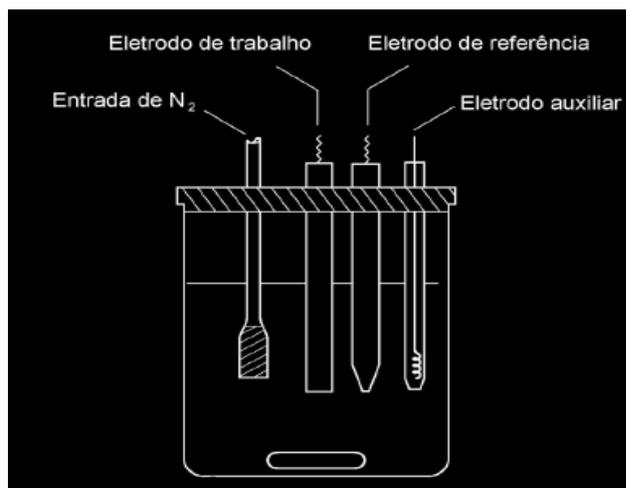


Figura 3. Representação esquemática de uma célula polarográfica/ voltamétrica com três eletrodos.

Na montagem desta célula, os eletrodos são conectados a um amplificador operacional. Quando a tensão for variada entre o eletrodo de trabalho e o contra eletrodo, o amplificador atuará fazendo com que a resistência do eletrodo de referência aumente e a do eletrodo auxiliar diminua (Figura 4). Assim a corrente passará entre o eletrodo de trabalho e o auxiliar, evitando que ocorram distúrbios (como eletrólise, por exemplo) no eletrodo de referência. Com este recurso o eletrodo de referência realizará o seu papel sem interferências, que é o de manter o seu potencial constante durante as medidas. (WANG, 2000).

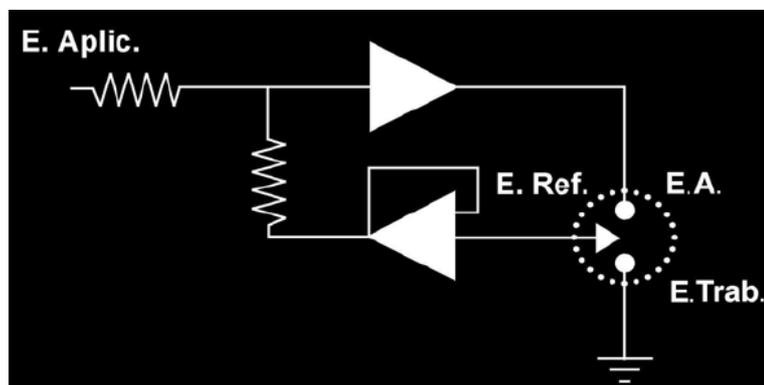


Figura 4. Esquema da célula polarográfica/ voltamétrica de três eletrodos conectada a um sistema potenciostático.

3.3.1 O eletrodo de trabalho

A voltametria se desenvolveu a partir da polarografia (OSTERYOUNG & O'DEA,

1982), na qual um eletrodo gotejante de mercúrio (EGM) é empregado como eletrodo de trabalho (SKOOG et al., 2006).

O eletrodo de trabalho amplamente empregado em voltametria ainda é o eletrodo de mercúrio, o qual pode ser usado como gotejante ou estático (SKOOG et al, 2006). No modo estático, a gota de mercúrio permanece na ponta de um tubo capilar até que as medidas sejam realizadas e o voltamograma registrado. O eletrodo de mercúrio também pode ser usado na forma de um filme depositado eletroquimicamente em superfície sólida, como platina e carbono vítreo (ALEIXO, 2003). O eletrodo de mercúrio é amplamente empregado na voltametria, porque pode ser usado numa ampla região de potenciais negativos, além disso, muitos íons metálicos são reduzidos reversivelmente formando amálgamas (ligas líquidas), na superfície do eletrodo de mercúrio. No modo gotejante do eletrodo de mercúrio, uma nova superfície é formada a cada nova gota, evitando problemas de envenenamentos superficiais (SKOOG et al, 2006).

São diversas as formas de emprego de eletrodo de mercúrio, podendo ser usado no modo gotejante (DME, do inglês, *dropping mercury electrode*), no modo gota estática (SMDE do inglês, *static mercury dropping electrode*), ou como no modo de gota pendente (HMDE do inglês, *hanging mercury dropping electrode*).

Um eletrodo de mercúrio (Figura 5) consiste em um tubo capilar muito fino conectado a um reservatório de mercúrio, o metal passa através de um capilar de vidro contendo um arranjo controlado por um pistão que permite a formação de gotas com diâmetros de 0,5 a 1 mm, com áreas superficiais bastante reprodutíveis. O tempo da gota é controlado por um martetele mecânico que desprende-a, após um tempo fixo de sua formação (SKOOG et al., 2006).

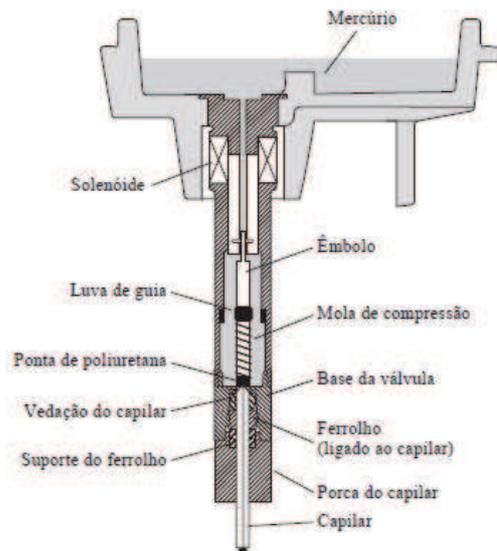


Figura 5. Um eletrodo de gota pendente de mercúrio (HMDE).

A voltametria se encontra dividida, em voltametria cíclica, voltametria de pulsos e a voltametria linear.

A voltametria cíclica (VC) é um método de varredura de potencial que permite estudar os processos do eletrodo e, assim obter informações qualitativas sobre as reações eletroquímicas, diagnóstico do mecanismo de reações na identificação de espécies e intermediários e na análise semi-quantitativa de velocidade de reações (WANG, 2000; SKOOG et al., 2006). Porém, a VC não é normalmente usada na análise quantitativa de compostos, já que não promove baixos limites de detecção.

O potencial aplicado ao eletrodo na VC varia em função do tempo na forma triangular (Figura 6 a), partindo do potencial E_i , até o pré-definido, E_v . Quando atinge o potencial E_v , a direção da varredura se inverte e um caminho inverso é percorrido até atingir E_f . O sinal de corrente em função do potencial aplicado é registrado e dá origem ao voltamograma, como mostrado na Figura 6 b, um voltamograma cíclico característico de um processo irreversível, mostrando os picos direto e reverso (WANG, 2000; SKOOG et al., 2006).

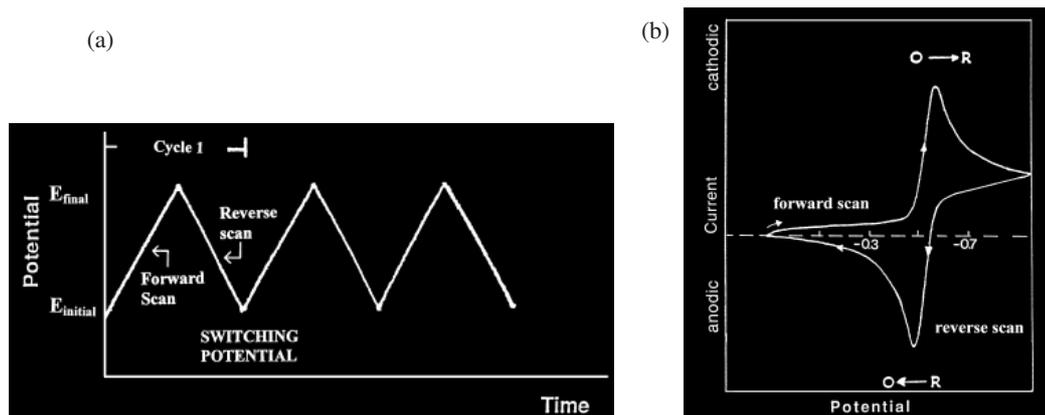


Figura 6. a) Sinal de excitação em uma medida de voltametria cíclica b) Voltamograma cíclico típico de um processo redox reversível ($O + ne \leftrightarrow R$).

3.3.2 As técnicas de pulso

As técnicas de pulso se baseiam na medida da corrente em função do tempo de aplicação de um pulso de potencial e, as correntes medidas correspondem tanto a largura de pulso quanto ao degrau de potencial aplicado no eletrodo para promover o processo faradaico (SKOOG et al, 2006).

A voltametria de pulsos pode ser dividida em: voltametria de pulso normal, voltametria de pulso diferencial (DPV) e voltametria de onda quadrada (SWV).

Na voltametria de pulso normal as medidas de corrente são resultantes de uma seqüência de aplicação de pulsos em função do tempo de duração constante e amplitude crescente, sobreposta a um potencial de base constante, no qual não há processos faradaicos. Uma corrente residual é gerada pela presença de oxigênio dissolvido ou outras impurezas eletroativas. Durante a aplicação do pulso a corrente capacitiva é praticamente nula. O potencial aplicado sobre o eletrodo oxida e/ou reduz o analito gerando uma corrente difusional. A aplicação de pulsos leva ao aumento de potencial do eletrodo, as correntes geradas são coletadas na forma de uma onda sigmoideal, a qual é dependente da concentração do analito em solução (SOUZA et al., 2003).

A voltametria de pulso diferencial possibilitou uma melhoria de sensibilidade em relação a de pulso normal, porque a contribuição da corrente faradaica é maior do que a capacitiva.

A figura 7 mostra a forma de aplicação de potencial, onde os pulsos de potencial encontram-se sobrepostos em uma rampa de potencial em forma de degraus e a amostragem de corrente é realizada no início antes da aplicação do pulso (S_1) e no final de cada pulso (S_2).

A diferença de correntes amostradas em (S_1) e (S_2) é plotada em função do potencial aplicado. No voltamograma resultante (Figura 8), a área de pico é diretamente proporcional à concentração do analito (SKOOG et al., 1998).

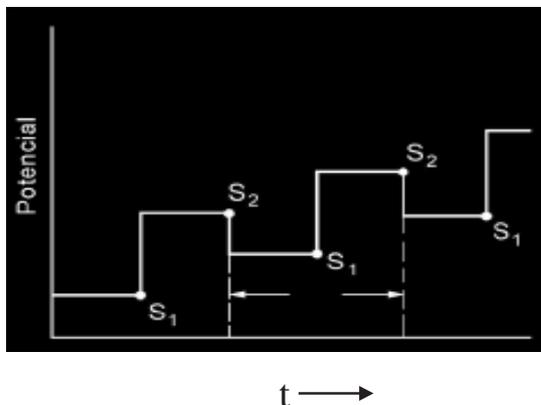


Figura 7. Esquema representando a aplicação de potencial em função do tempo em polarografia de pulso diferencial. A corrente é amostrada em S_1 e S_2 e a diferença entre elas é registrada: $I = I_{S_2} - I_{S_1}$.

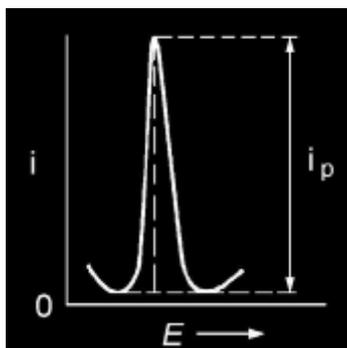


Figura 8. Voltamograma de pulso diferencial.

3.3.3 Voltametria de onda quadrada (SWV)

Entre as técnicas de pulso, a voltametria de onda quadrada (SWV do inglês, *Square Wave Voltametry*) é considerada como uma das mais rápidas e sensíveis. Além disso, a SWV é empregada em estudos sobre o comportamento redox do sistema e avaliação da cinética e mecanismos do processo eletrodico (SOUZA et al., 2003).

O desenvolvimento da SWV iniciou-se a partir na década de 50, por meio dos estudos de Baker (OSTERYOUNG & O'DEA, 1982). Na busca de uma forma de minimizar a corrente capacitiva residual gerada nas análises polarográficas. Assim, o eletrodo de trabalho

era perturbado aplicando pulsos de potencial em forma de uma onda simétrica sobreposta a uma rampa de potenciais de variação lenta, e a medida da corrente capacitiva era realizada pouco antes da queda da gota, empregando um eletrodo gotejante de mercúrio (DME do inglês, *dropping mercury electrode*). Desta forma desenvolvendo-se a polarografia de onda quadrada. Mas foi a partir dos anos 80, com o desenvolvimento da tecnologia analógica e digital, que esta técnica alcançou sensibilidade semelhante e até superior à alcançada pela técnica de pulso diferencial de modo bem mais rápido (MIRCESKI et al., 2007).

Durante um período de quinze anos após o desenvolvimento da polarografia por Baker e colaboradores (OSTERYOUNG & O'DEA, 1982), esta técnica foi pouco utilizada, devido às limitações que apresentava. Em 1969 Ramaley e Krause (RAMALEY & KRAUSE-Jr.; 1969 a; RAMALEY & KRAUSE-Jr., 1969 b), com base no trabalho de Baker, desenvolveram a teoria para a voltametria de onda quadrada. Para eliminar os ruídos causados pelo capilar foram utilizados eletrodos estacionários, além disso, o potencial em forma de rampa linear foi substituído por uma rampa de potencial em forma de escada.

No entanto, havia ainda algumas limitações na técnica, uma vez que era realizada em baixas velocidades de varredura. Em 1977, os pesquisadores Christie, Turner e Osteryoung (CHRISTIE et al., 1977) realizaram um estudo e propuseram um modelo de SWV, no qual a medida de corrente é realizada ao final dos pulsos de potenciais possibilitando que varreduras de corrente em função do potencial a velocidades superiores a 100 mV s^{-1} . Fazendo-se as medidas de corrente no final do pulso de potencial permitiram minimizar a corrente capacitiva (SOUSA et al., 2003).

As técnicas de pulso incluindo a SWV apresentam como vantagem a diminuição e até eliminação do efeito de interferência gerado pela corrente capacitiva. Nessa técnica, como a corrente capacitiva é proporcional a $e^{-t/RC}$, onde t é o tempo, R a resistência da solução e C a capacitância da dupla camada, e a corrente faradaica é aproximadamente proporcional a $t^{-1/2}$, a queda da corrente capacitiva é mais acentuada que a corrente faradaica. Assim, as medidas de corrente são realizadas após a contribuição da corrente capacitiva ter se minimizado, melhorando os resultados. A Figura 9 apresenta a variação da corrente faradaica e capacitiva em função ao tempo e o ponto da medida de corrente é registrada (SOUSA et al., 2003).

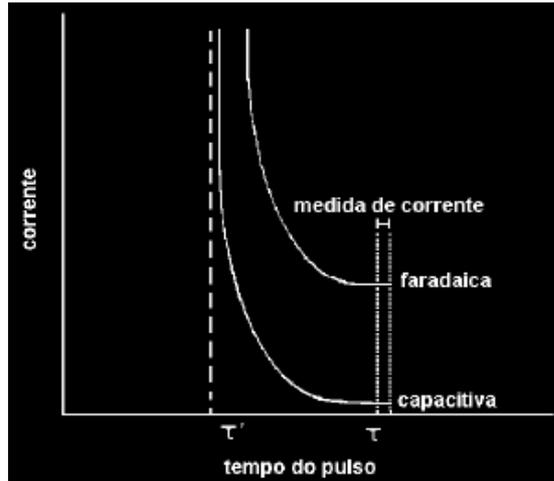


Figura 9. Variação da corrente faradaica (I_f) e corrente capacitiva (I_c) com o tempo na SWV.

Na SWV atual as formas de onda consistem de uma onda quadrada simétrica (amplitude, α) sobreposta a uma “escada de potenciais” (incremento de varredura ΔE_s), sendo que um período completo de onda quadrada ocorre para cada período (t) da “escada de potenciais”. A largura do pulso, ou $t/2$, é denominada tp e a frequência de aplicação dos pulsos, $1/t$, é caracterizada por f (RAMALEY & KRAUSE-Jr., 1969 a ; RAMALEY & KRAUSE-Jr., 1969 b).

A medida da corrente na SWV é feita no início e ao final dos pulsos diretos (I_d) e reversos (I_r) e o sinal registrado como é definido como corrente resultante (ΔI) em forma diferencial com elevada sensibilidade rejeição das correntes capacitivas. A corrente resultante é dada por $\Delta I = I_r - I_d$. A medida apresenta um tempo inicial (t_i), etapa em que o eletro é polarizado a um potencial onde não ocorrem reações de oxidação ou redução. A Figura 10 apresenta os detalhes da forma de aplicação do potencial típica da SWV (SOUZA et al., 2003).

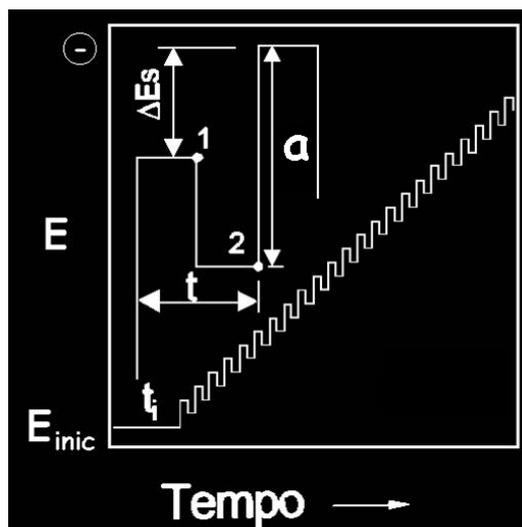


Figura 10. Forma de aplicação do potencial na voltametria de onda quadrada.

O desenvolvimento dos estudos empregando a SWV por dois grupos de pesquisas, o grupo de Janet Osteryoung, e o grupo de Milivoj Lovric, foi possível utilizando espécies eletroativas (reduzem ou oxidam) como modelo, aliadas aos recursos de programas computacionais, capazes de fornecer informações sobre a reversibilidade, bem como o número de elétrons envolvidos no processo redox. (SOUZA et al., 2003).

A Figura 11 apresenta os voltamogramas teóricos que podem ser obtidos em um sistema reversível (1) e um sistema irreversível (2)

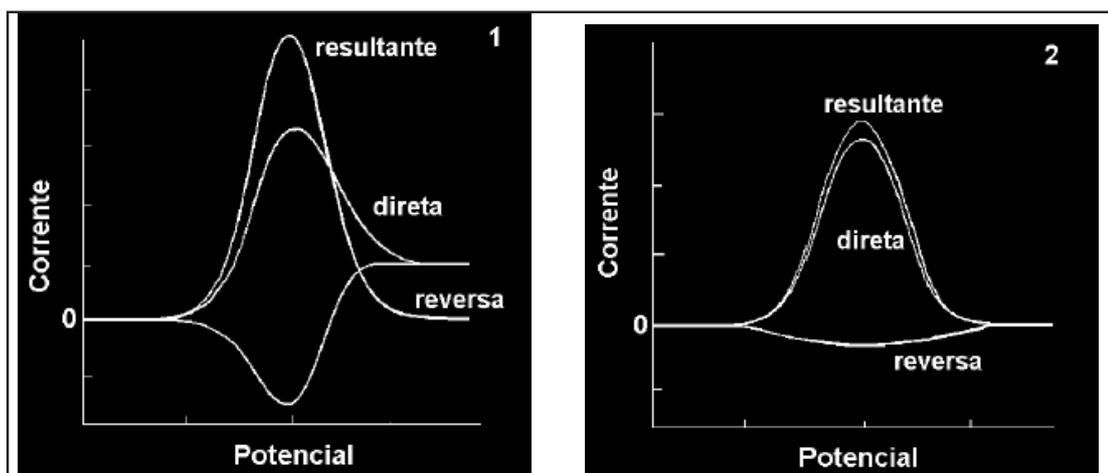


Figura 11. Voltamogramas de onda quadrada esquemáticos para um sistema reversível (1) e para um sistema irreversível (2).

Atualmente na SWV o eletrodo utilizado é o de mercúrio de gota pendente (HMDE, do inglês, *hanging mercury dropping electrode*). Neste modelo de eletrodo a gota é formada e permanece de tamanho constante durante o tempo gasto para a medida experimental, deste modo, não apresenta problemas de área superficial que ocorrem com o eletrodo gotejante de mercúrio (ALEIXO, 2003).

A principal vantagem das medidas voltamétricas é a possibilidade da medida ser feita diretamente na amostra sem separações prévias. E mais, ainda é possível a análise de amostras contendo partículas sólidas dispersas (RUPP & ZUMAN, 1992). Estas vantagens, aliadas ao curto tempo na realização das análises, ao baixo custo da instrumentação em relação aos métodos cromatográficos, espectroscópicos, espectrométricos, dentre outros, fez com que as técnicas eletroanalíticas se tornassem cada vez mais promissoras, para a determinação de diferentes compostos, em diversas matrizes de interesse. Dentre as vantagens das técnicas eletroquímicas, pode-se citar, principalmente, a seletividade em relação à presença de interferentes, promovendo a análise em matrizes complexas, tais como águas naturais (SOUZA & MACHADO, 2003), solo (SZCZEPANIAK et al. 1995), alimentos (HERNÁNDEZ et al., 1997; GALLI et al., 2006, GALLI, et al, 2011), fluidos biológicos (GHONEIM et al., 2006; GOYAL et al., 2009; GOYAL et al., 2010 a), formulações farmacêuticas (WANG et al., 1985; ALGHAMDI et al., 2006; GHONEIM et al., 2006; GOYAL et al., 2010 b; SANTOS et al., 2010).

A sensibilidade atual das técnicas eletroanalíticas é comparada à de qualquer técnica de detecção cromatográfica e outras técnicas. Esta comparação é possível graças à evolução tecnológica, a qual possibilitou o desenvolvimento da instrumentação eletroanalítica, contribuindo intensamente na melhoria da sensibilidade destes métodos (SOUZA et al., 2003). Quando se utiliza técnicas de pulso e de redissolução, os limites de detecção são semelhantes àqueles obtidos por métodos cromatográficos (VAZ et al, 1996).

Os limites de detecção reportados para a SWV são da ordem de 10^{-7} a 10^{-8} mol L⁻¹ (SKOOG et al., 1998). Alguns trabalhos citam LDs até menores, utilizando a SWV, com etapas de pré-concentração. GHONEIM et al (2006), empregando o eletrodo de mercúrio (HMDE), determinaram o estrogênio etinilestradiol, usado como contraceptivo, em formulações farmacêuticas, soro e plasma humano. Os LDs determinados por estes autores foram $8,7 \times 10^{-10}$ mol L⁻¹; 3×10^{-9} mol L⁻¹ e 1×10^{-8} mol L⁻¹, respectivamente. Santos et al. (2010), utilizando o eletrodo de diamante dopado com boro, determinaram o hormônio estriol em urina de mulheres grávidas, com base no LD de $4,1 \times 10^{-9}$ Mol L⁻¹. Goyal et al (2010 c) determinaram os isômeros testosterona e epitestosterona em urina humana, com LD de $2,8 \times 10^{-9}$ e $4,1 \times 10^{-9}$ Mol L⁻¹, respectivamente, utilizando o eletrodo de nanotubos de carbono.

Em relação ao hormônio 17 α -metiltestosterona não há um limite estabelecido pela legislação. A portaria 518 de 25/03/2004 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2004) que define os padrões para água potável e a resolução 357 do CONAMA de 17/03/2005 que fornece critérios para a classificação das águas e trata da qualidade desse recurso, mas não estabelece os hormônios como contaminantes que devem ter limites máximos permitidos. Como não há limites máximos estabelecidos justifica-se a necessidade de monitoramento desse composto em locais de piscicultura.

Este trabalho serviu como parâmetro para avaliar a presença do hormônio 17 α -metiltestosterona em ambientes aquáticos. Conforme descrito, diversos trabalhos abordam os hormônios. No entanto, poucas referências estão relacionados com o hormônio 17 α -metiltestosterona, e por meio de métodos voltamétricos, não foram encontrados estudos relacionados com esse hormônio em matrizes ambientais.

Assim, visando otimizar uma metodologia de monitoramento com instrumentação mais simples de operar e, mais acessível, tanto aos interessados na aplicação de hormônios quanto aos órgãos de controle, as técnicas eletroanalíticas representam uma boa opção, justificando-se a execução deste trabalho.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os reagentes utilizados para o desenvolvimento do método foram de grau analítico (PA).

As vidrarias (béqueres e balões volumétricos) foram previamente lavadas com detergente neutro e água e, em seguida ficaram imersas em solução de HNO_3 10 % v/v, sendo em seguida enxaguadas com água destilada e com água ultrapura obtida com sistema de purificação Mili-Q (Human UP-90).

Para correção do pH nas soluções utilizou-se um pH-metro digital Labmeter, modelo pH2 – PHf – 3B. Na filtragem das amostras foi utilizada a bomba de vácuo Primatec, modelo 131B Primatec.

As medidas voltamétricas foram executadas em um polarógrafo Methrom 757 VA Computrace, acoplado por uma interface a um micromputador, operando com o *software* VA Computrace para obtenção, armazenamento e tratamento dos dados obtidos. Como eletrodo de trabalho utilizou-se o eletrodo de gota pendente de mercúrio HMDE, o eletrodo de referência foi o de Ag/AgCl em KCl 3,0 mol L^{-1} como eletrodo auxiliar um fio de platina (Figura 12).

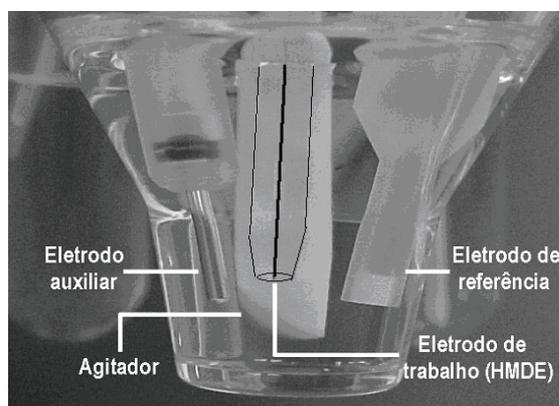


Figura 12. Cella voltamétrica do analisador polarográfico 757 VA Computrace mostrando os eletrodos de trabalho, auxiliar, de referência e o agitador.

O potencial de deposição aplicado para todas as etapas deste trabalho foi -0,8 V, e a varredura de potencial foi de -1,0 a -1,7 V, ambos baseados na literatura (WANG et al., 1985). A remoção do oxigênio atmosférico dissolvido nas soluções foi realizada pela passagem de gás inerte (N_2) isento de O_2 nas soluções de medida. A limpeza do N_2 foi feita

com uma solução redutora contendo vanádio em meio ácido, na presença de amálgama de zinco. Neste trabalho foi empregado antes de cada análise uma etapa de purga de 4 min, e mais 30 s a cada nova adição de solução padrão de 17 α -metiltestosterona.

4.1. Locais de amostragem

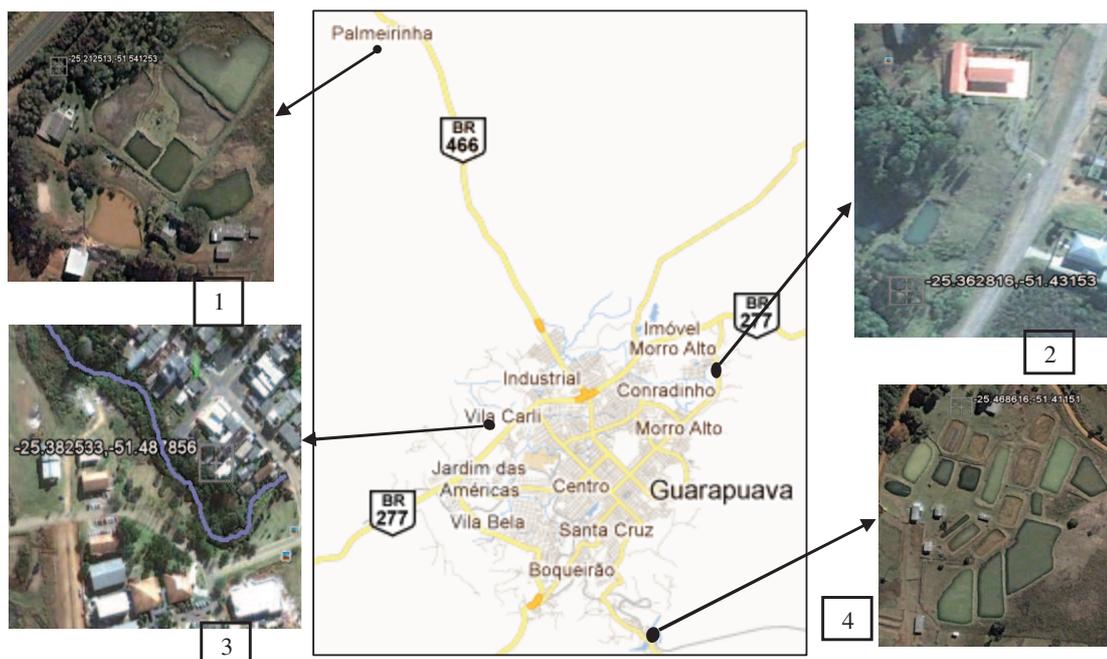
Coletaram-se amostras de água de rio e de tanques de criação de peixes para comercialização e de tanques de pesque-pague, todos localizados na cidade de Guarapuava-PR. A Tabela 3 mostra a localização dos pontos de coleta.

Tabela 3. Localização dos pontos de coleta de amostras de água utilizadas na determinação de 17 α -metiltestosterona.

Amostra/ Local	Localização*
Arroio Carro Quebrado - Vila Carli	-25.382533,-51.487856
Tanques de criação de alevinos - Vale Jordão	-25.468616,-51.41151
Tanque de pesque-pague 1 - Palmeirinha	-25.212513,-51.541253
Tanque de pesque-pague 2 - Alto da XV	-25.362816,-51.43153

*Fonte: GOOGLE EARTH

A Figura 13 apresenta o mapa do município de Guarapuava e os locais de coleta das amostras de água.



Fonte: GOOGLE EARTH

Figura 13. Mapa de Guarapuava-PR mostrando a ampliação dos pontos de coleta. (1) Tanques Palmeirinha, (2) Tanques de criação de peixe Alto da XV (Morro Alto), (3) Arroio Carro Quebrado (Vila Carli) e (4) Tanques (Vale do Jordão).

O ponto (1) localiza-se no distrito de Palmeirinha com tanques de peixes na fase adulta (sistema de pesque-pague). O ambiente (2) são tanques de propriedade particular sem fins comerciais. O ambiente (3) refere-se a um riacho que percorre alguns bairros do município de Guarapuava, passando próximo ao Campus CEDETEG onde coletaram-se as amostras .

A figura 14 apresenta o ponto de coleta (4) com tanques de piscicultura de bagre americano, com as matrizes (peixes na fase adulta para criação de alevinos para venda).



Figura 14. Imagem aérea de tanques de piscicultura (Vale do Jordão). Foto: AEROARTE

4.2. Solução padrão de hormônio 17 α -metiltestosterona

A solução padrão $9,985 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de hormônio 17 α -metiltestosterona foi preparada diariamente, pesando-se 0,0151 g do reagente (DEG Reagent Coporation, 99,0 %) em um balão volumétrico de 5 mL, dissolvendo-a em etanol 99,3 % v/v. As adições de padrão foram feitas a partir de diluições apropriadas da solução padrão.

4.3. Solução padrão do hormônio progesterona

Uma solução padrão de hormônio progesterona também foi preparada para o estudo de interferentes. Em um balão volumétrico de 10 mL foi adicionado 0,0315 g de progesterona (DEG Reagent Coporation, 98,8 %) e, dissolvido em etanol 99,3 % v/v, para a concentração final de $9,98 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

4.4. Estudo de pH e eletrólitos

Os eletrólitos foram avaliados em diferentes valores de pH. Uma alíquota de solução padrão de 17 α -metiltestosterona foi adicionada na cela em cada medida, para a concentração final de $1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$.

Os eletrólitos estudados foram o fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4), sulfato de sódio (Na_2SO_4), hidróxido de sódio (NaOH) e solução tampão Britton-Robinson (BR) (BRITTON & ROBINSON, 1931). As soluções foram preparadas nas concentrações conforme mostrado na Tabela 4. Para ajustar o pH das soluções foi utilizada uma solução de

fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. No preparo da solução tampão-BR utilizou-se soluções de perclorato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, ácido fosfórico $0,04 \text{ mol L}^{-1}$, ácido bórico $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ e ácido acético $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (GALLI et al., 2006) .

Tabela 4. Eletrólitos suporte, concentrações e pH na otimização da determinação de 17α -metiltestosterona.

Eletrólito	Concentração (mol L^{-1})	pH avaliado
NaH_2PO_4	0,1	5 e 9
Na_2SO_4	0,1	5 e 9
Tampão Britton-Robinson (BR)	0,1	9

4.5. Coleta de amostras

As amostras de água de rio e tanque de piscicultura foram coletadas utilizando-se frascos de vidro de 250 mL previamente descontaminados por meio de uma solução de HNO_3 10 % v/v, e enxaguadas com água destilada e ultrapura. Antes de coletar as amostras os frascos foram enxaguados com água do local da coleta (rio ou tanque). Em seguida as amostras foram levadas ao laboratório e armazenadas sob refrigeração. Antes da análise as amostras foram previamente filtradas (em filtro quantitativo e membrana $0,45 \mu\text{m}$, sob vácuo). Com as amostras previamente filtradas preparou-se a solução de $\text{NaOH } 5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em pH ajustado para 9,0 utilizando uma solução de NaH_2PO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A molécula do hormônio 17α -metiltestosterona pode ser analisada diretamente por voltametria, pois a mesma é eletroativa, ou seja, sofre oxi-redução na superfície do eletrodo de mercúrio com a aplicação de potencial. Por isso, não foi necessário utilizar um agente complexante ou fazer derivatização para realizar estudos empregando técnicas voltaméticas. A Figura 15 apresenta a estrutura da molécula de 17α -metiltestosterona. A literatura sugere que o mecanismo de redução no comportamento dos hormônios esteróides, derivados da testosterona envolve a dupla ligação conjugada da carbonila (WANG et al., 1985).

As possibilidades avaliadas neste trabalho é que a redução do composto 17α -metiltestosterona ocorra na carbonila no carbono 3, resultando na formação de um álcool secundário.

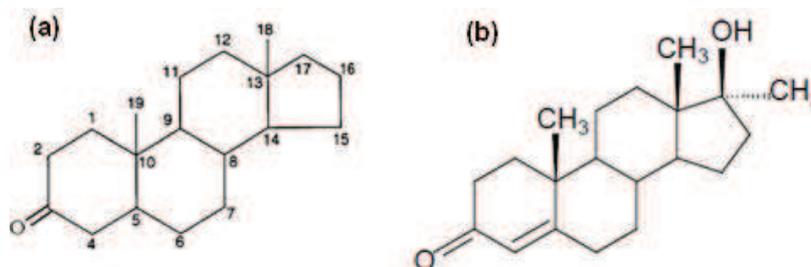


Figura 15. (a) Estrutura química básica de hormônios esteróides (TÖLGYESI et al.,2010) e (b) Estrutura química do hormônio 17α -metiltestosterona.

Os resultados obtidos com a aplicação da voltametria de onda quadrada no estudo da redução eletroquímica do hormônio 17α -metiltestosterona serão descritos e discutidos na sequência.

5.1. Voltametria cíclica

O estudo da reação de redução eletroquímica do hormônio 17α -metiltestosterona com uso do eletrodo de mercúrio HMDE, foi iniciado com a aplicação da voltametria cíclica (VC). Os experimentos caracterizaram-se pela variação da velocidade de varredura. Alguns critérios da técnica de voltametria cíclica foram utilizados para adquirir informações qualitativas no estudo dos processos eletroquímicos envolvidos nas medidas do hormônio 17α -metiltestosterona. A exploração dos parâmetros obtidos permitiu avaliar o grau de

reversibilidade da reação de redução deste hormônio.

Os experimentos de voltametria cíclica foram realizados adicionando-se uma concentração de $6,6 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ de 17α -metiltestosterona na cela eletroquímica contendo 15 mL da solução de NaOH $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em pH 9.

Os voltamogramas cíclicos obtidos para o hormônio 17α -metiltestosterona em função da velocidade de varredura podem ser observados na Figura 16.

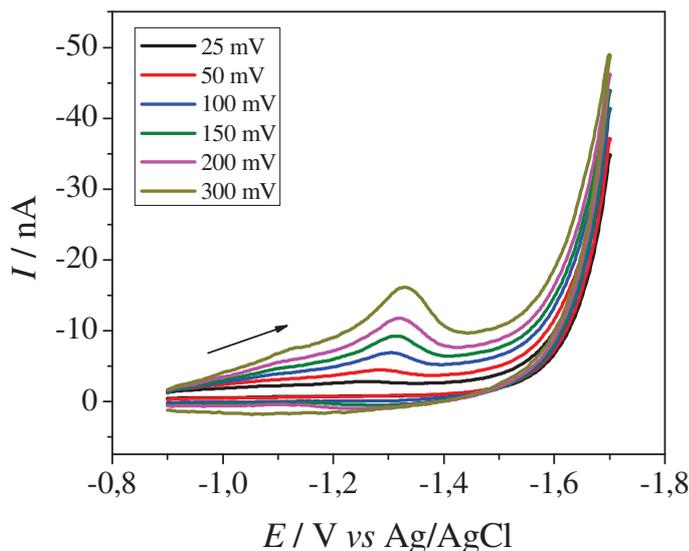


Figura 16. Voltamogramas cíclicos completos obtidos na determinação do hormônio 17α -metiltestosterona com uso da VC e HMDE. Condições: ($C_{MT} = 6,62 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$, em solução de NaOH, pH = 9,0), potencial de varredura de (-0,9 a -1,7 V) E_{dep} (-0,8) e T_{dep} (120 s).

Verifica-se que o 17α -metiltestosterona apresentou um único pico de redução com características de processo irreversível, pois não há presença de pico reverso. Adicionalmente, com o aumento da velocidade de varredura ocorreu um deslocamento dos potenciais de pico para regiões mais negativas, sendo este fato característico de processos irreversíveis (GOSSER-Jr, 1993).

A reversibilidade de um processo eletroquímico está relacionada com as velocidades direta e inversa. Para um processo, tal como $\mathbf{A} + n\mathbf{e}^- \leftrightarrow \mathbf{P}$, se a equação de Nernst foi obedecida sob condições experimentais, se caracteriza um processo reversível. Em um sistema irreversível a reação direta ou inversa ocorre tão lentamente que pode ser considerada desprezível (SKOOG et al, 2006).

A corrente de pico variou linearmente com a velocidade de varredura, no intervalo de

25 a 300 mV s^{-1} , como mostra a Figura 17. Este comportamento é um indicativo de que o processo é controlado pela adsorção e não pela difusão das espécies à superfície do eletrodo (SCHELLENBEG et al., 1984).

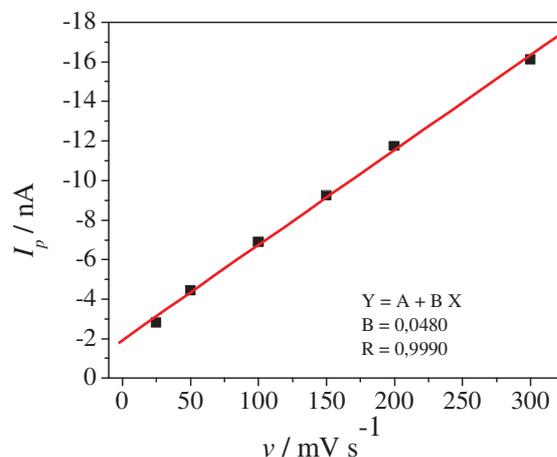


Figura 17. Dependência da Intensidade de corrente de pico com a velocidade de varredura para o 17 α -metiltestosterona empregando VC e HMDE e $T_{\text{dep}} = 120$ s.

A relação da intensidade de corrente de pico com a raiz quadrada da velocidade de varredura no intervalo de 25 a 300 mV s^{-1} apresentou comportamento não-linear, como é mostrado na Figura 18. indicando que a velocidade do processo é controlado pela adsorção das espécies sobre a superfície eletródica.

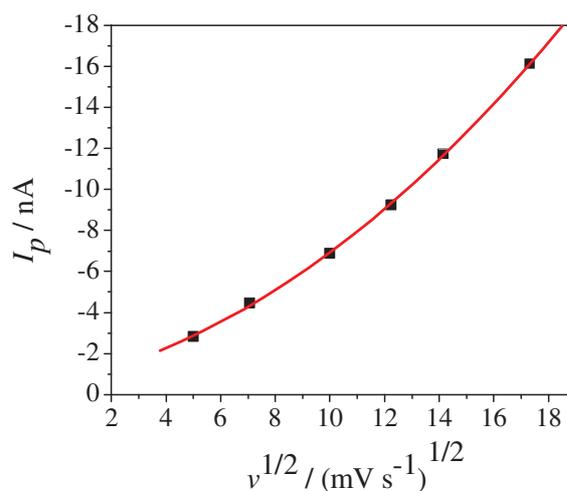


Figura 18. Dependência da intensidade da corrente de pico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura na determinação de 17 α -metiltestosterona usando HMDE e , $T_{\text{dep}} = 120$ s.

O gráfico de logaritmo da intensidade de corrente de pico em função do logaritmo da velocidade de varredura (Figura 19) apresentou comportamento linear com inclinação de 0,69. O valor encontrado está entre os dois valores previstos pela literatura, qual prevê valor da inclinação para próximo ou igual a 1,0, como sendo indicativo de sistemas controlados pela adsorção das espécies e uma inclinação de 0,5 para sistemas irreversíveis controlados pela difusão das espécies. Com base no valor do coeficiente angular 0,69 pode-se sugerir que o processo envolvido é misto, difusional seguido de adsorção da espécie sobre a superfície do eletrodo de mercúrio (GOSSER-Jr, 1993).

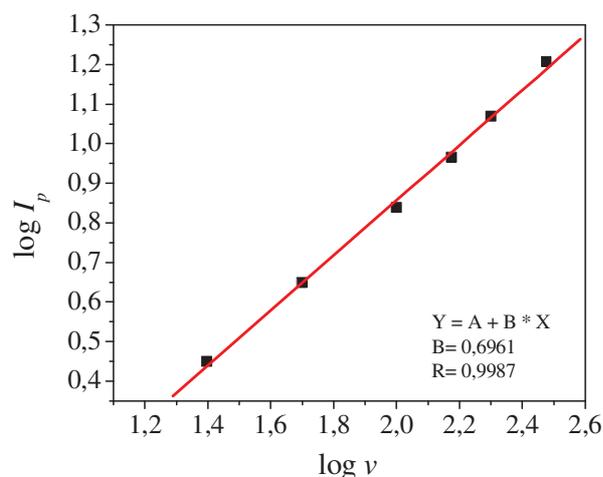


Figura 19. Relação entre o logaritmo da intensidade de corrente de pico e o logaritmo da velocidade de varredura para medidas do 17 α -metiltestosterona por VC e HMDE e T_{dep} = 120 s.

5.2. Avaliação dos fatores que influenciam na determinação do hormônio 17 α -metiltestosterona empregando Voltametria de Onda Quadrada (SWV)

A técnica de voltametria de onda quadrada foi utilizada para os estudos de redução eletroquímica do hormônio 17 α -metiltestosterona e aplicada no desenvolvimento de uma metodologia para quantificação deste composto em amostras de águas naturais e na análise de interferentes.

As medidas caracterizaram-se pelo estudo da variação da frequência de aplicação dos pulsos de potencial, do incremento de varredura, da amplitude e do pH. Para a determinação analítica do analito de interesse, curvas de adição de padrão foram construídas, o limite de detecção do hormônio foi calculado e experimentos de recuperação foram realizados.

O voltamograma de onda quadrada (Figura 20) mostra o pico de redução característico do hormônio 17 α -metiltestosterona em meio de NaOH em pH 9,0.

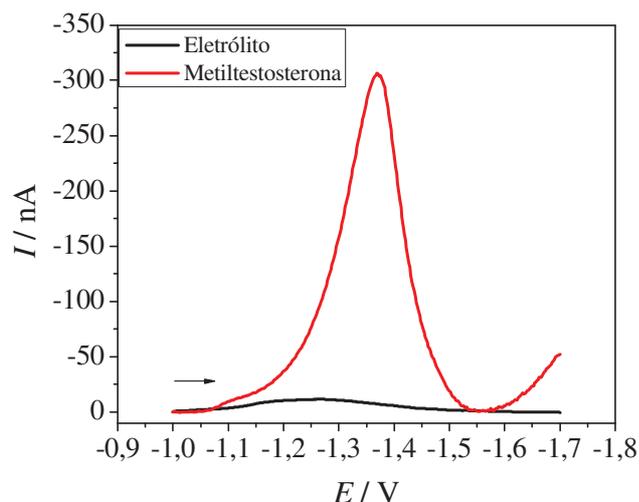


Figura 20. Voltamograma de onda quadrada obtido para o hormônio 17α -metiltestosterona com uso de HMDE. Condições: $C_{MT} = 1,96 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, em solução de NaOH em pH 9,0, potencial de varredura de (- 1,0 a -1,7 V) E_{dep} (-0,8), a (50 mV), ΔE_s (2 mV), T_{dep} (120 s). Com ajuste de linha base.

5.2.1 Estudo do tempo de deposição (T_{dep})

Em procedimentos eletroquímicos que envolvem a redissolução, o analito é depositado sobre um volume pequeno de mercúrio, que é a superfície de uma gota, por exemplo, enquanto a solução é agitada. Após um tempo pré-definido a agitação é interrompida e o analito depositado é quantificado empregando métodos voltamétricos (SKOOG et al., 2006).

O tempo de deposição do hormônio 17α -metiltestosterona na superfície da gota de mercúrio foi estudado adicionando-se $4,65 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ de hormônio na cela eletroquímica contendo 15 mL de solução de NaOH $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ pH 9,0. Os parâmetros voltamétricos empregados foram a frequência (140 Hz), incremento de varredura de potencial (2 mV), amplitude de potencial (50 mV). O tempo de pré-concentração do analito foi variado de 30 a 230 segundos. A Figura 21 mostra a variação da intensidade de corrente em função da variação do tempo de pré-concentração.

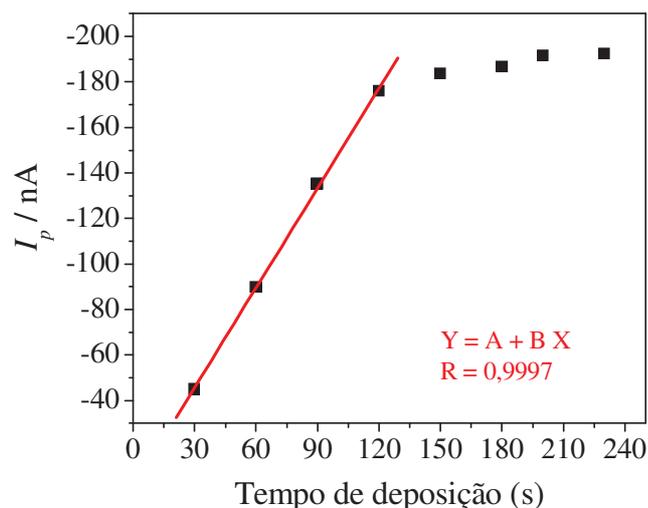


Figura 21. Variação da intensidade de corrente de pico em função do tempo pré-concentração do hormônio 17 α -metiltestosterona empregando SWV com uso de HMDE. Condições: $C_{MT} = 4,65 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$, em solução de NaOH, pH = 9,0, tempo de pré-concentração (30, 60, 90, 120, 150, 180, 200 e 230 s).

A intensidade da corrente de pico para o hormônio 17 α -metiltestosterona (Figura 10) mostrou um aumento linear com o tempo de pré-concentração até 120 segundos, ficando constante em para tempos maiores, o que indica a saturação da gota de mercúrio. Nesse estudo, observou-se no intervalo estudado não ocorreu o desprendimento e queda da gota de mercúrio com o aumento do tempo de deposição. Com base nesse resultado, o tempo escolhido para a pré-concentração do hormônio 17 α -metiltestosterona sobre o HMDE foi de 120 segundos.

5.2.2. Estudo do eletrólito suporte e variação da concentração hidrogeniônica do meio

O comportamento eletroquímico do hormônio 17 α -metiltestosterona empregando a voltametria de onda quadrada foi analisado em diferentes eletrólitos suporte (fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, sulfato de sódio (Na_2SO_4) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, hidróxido de sódio (NaOH) $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e solução tampão Britton-Robinson (BR) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$). Nesse estudo também foi avaliado a variação da concentração hidrogeniônica do meio.

A Figura 22 mostra os voltamogramas obtidos para a análise de 17 α -metiltestosterona em solução Na_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, em pH 5 e 9, respectivamente. O potencial de pico para o

17 α -metiltestosterona em solução pH 5,0 foi -1,36 V e para a solução ajustada em pH 9,0 foi -1,34 V.

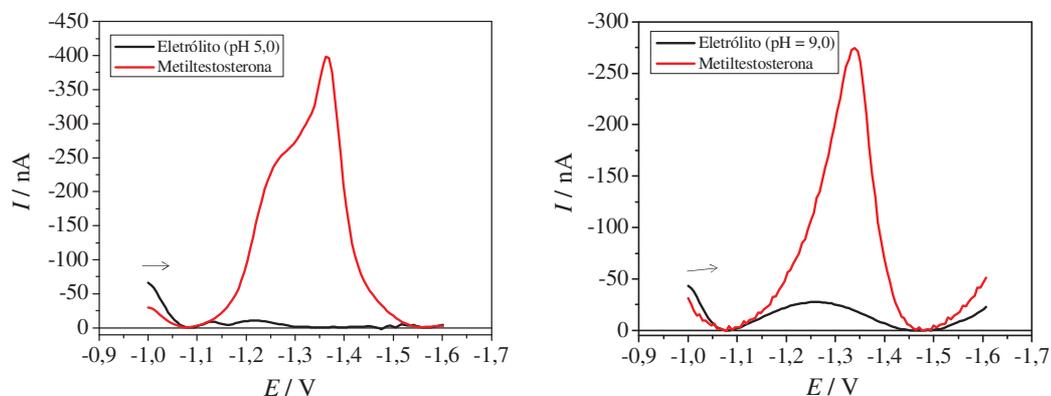


Figura 22. Voltamogramas de onda quadrada para a 17 α -metiltestosterona ($1,0 \times 10^{-7}$ mol L $^{-1}$) obtidos com voltametria de onda quadrada em solução de Na $_2$ SO $_4$ (0,1 mol L $^{-1}$), em pH 5 e 9. Parâmetros Voltamétricos utilizados: $E_{\text{dep}} = -0,8$ V; $E_{\text{inicial}} = -1,0$; $E_{\text{final}} = -1,6$ V; $a = 50$ mV; $f = 100$ Hz; $\Delta E_s = 2$ mV; $T_{\text{dep}} = 120$ s. Com ajuste de linha base.

Para a solução de Na $_2$ SO $_4$ 0,1 mol L $^{-1}$ em pH 5,0 (Figura 22), a intensidade decorrente de pico obtida foi de -397,30 nA, sendo superior a apresentada em pH 9,0. No entanto, observou-se uma sobreposição de dois picos no pH 5,0 mostrando que provavelmente ocorreu mais de um processo de oxidação na molécula de 17 α -metiltestosterona.

A Figura 23 apresenta os voltamogramas obtidos para a análise de 17 α -metiltestosterona em solução de NaH $_2$ PO $_4$ 0,1 mol L $^{-1}$, em pH 5 e 9, respectivamente.

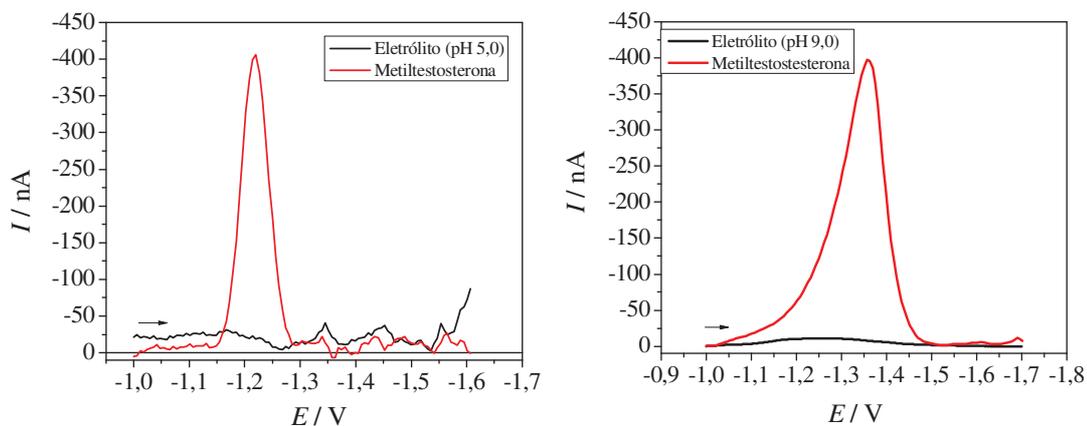


Figura 23. Voltamogramas de onda quadrada para a 17α -metiltestosterona ($1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) em diferentes condições experimentais. Solução de NaH_2PO_4 ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), pH 5 e 9,0. Parâmetros Voltamétricos utilizados: $E_{\text{dep}} = -0,8 \text{ V}$; $E_{\text{inicial}} = -1,0$; $E_{\text{final}} = -1,6 \text{ V}$; $a = 50 \text{ mV}$; $f = 100 \text{ Hz}$; $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$; $T_{\text{dep}} = 120 \text{ s}$. Com ajuste de linha base.

O potencial de pico para o 17α -metiltestosterona em solução NaH_2PO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,0 foi $-1,22 \text{ V}$ e, em solução em pH 9,0 $-1,36 \text{ V}$ (Figura 12). Verificou-se que ao aumentar o valor de pH, o potencial de pico para o 17α -metiltestosterona deslocou-se para valores mais negativos, revelando que a transferência eletrônica é dependente do pH do meio.

A Figura 24 mostra o voltamograma para 17α -metiltestosterona em solução de NaOH $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, como eletrólito em pH ajustado em 9,0.

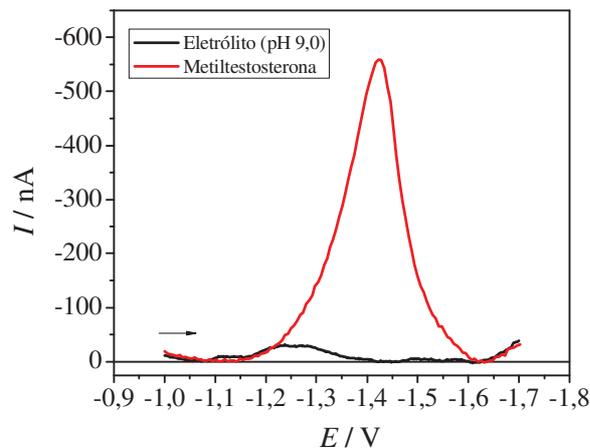


Figura 24. Voltamograma de onda quadrada para a 17α -metiltestosterona ($1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) obtidos com voltametria de onda quadrada, em solução de NaOH $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, em pH 9. Parâmetros Voltamétricos utilizados: $E_{\text{dep}} = -0,8 \text{ V}$; $E_{\text{inicial}} = -1,0$; $E_{\text{final}} = -1,7 \text{ V}$ $a = 50 \text{ mV}$; $f = 100 \text{ Hz}$; $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$; $T_{\text{dep}} = 120 \text{ s}$. Com ajuste de linha base.

A reação de redução do hormônio 17α -metiltestosterona também foi avaliada em solução tampão Britton-Robinson (BR), $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 9,0, como mostra a Figura 25.

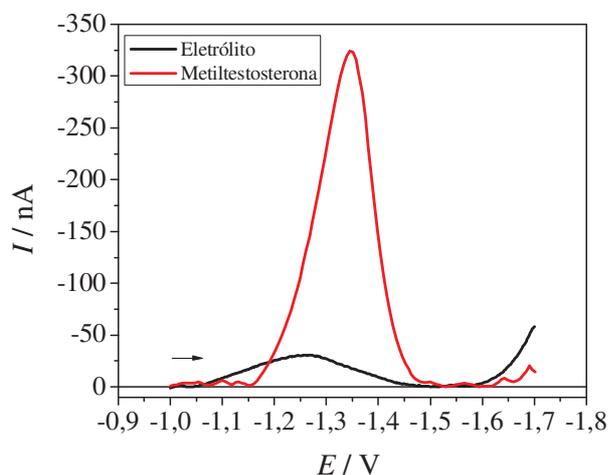


Figura 25. Voltamograma de onda quadrada para a 17α -metiltestosterona ($1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) obtidos com voltametria de onda quadrada, em solução tampão BR, em pH 9. Parâmetros utilizados: $E_{\text{dep}} = -0,8 \text{ V}$; $E_{\text{inicial}} = -1,0$; $E_{\text{final}} = -1,7 \text{ V}$ $a = 50 \text{ mV}$; $f = 100 \text{ Hz}$; $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$; $T_{\text{dep}} = 120 \text{ s}$. Com ajuste de linha base.

A Figura 26 mostra os voltamogramas para a análise de 17α -metiltestosterona nos eletrólitos estudados em pH ajustado em 9,0, em solução de Na_2SO_4 ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), NaH_2PO_4 ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), NaOH ($5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) e solução Tampão-BR ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$).

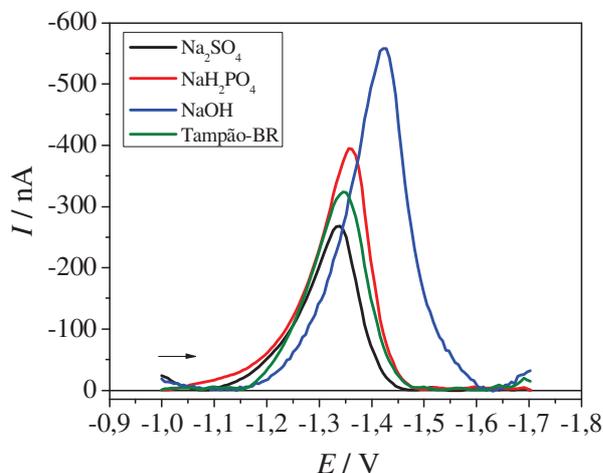


Figura 26. Voltamograma de onda quadrada para a 17α -metiltestosterona ($1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) obtidos com voltametria de onda quadrada em soluções em pH ajustado 9,0: solução de Na_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (—); NaH_2PO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (—); NaOH $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (—); Solução Tampão BR (—). Parâmetros utilizados: $E_{\text{dep}} = -0,8 \text{ V}$; $E_{\text{inicial}} = -1,0$; $E_{\text{final}} = -1,7 \text{ V}$ $a = 50 \text{ mV}$; $f = 100 \text{ Hz}$; $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$; $T_{\text{dep}} = 120 \text{ s}$. Com ajuste de linha base.

A avaliação dos voltamogramas do hormônio 17α -metiltestosterona obtidos com a voltametria de onda quadrada utilizando diferentes eletrólitos e valores de pH, indica que a melhor resposta, em termos de intensidade de corrente de pico, foi observada com o uso da solução de NaOH ($5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), em pH 9,0.

Para os demais eletrólitos estudados, o pico de redução do hormônio apresentou resposta bem definida, contudo, os valores de intensidade de corrente de pico foram inferiores. Assim optou-se por utilizar como eletrólito a solução NaOH ($5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em pH 9,0, pois apresentou maior sensibilidade analítica. Com base nestes resultados, também avaliou-se o melhor pH para a redução do hormônio 17α -metiltestosterona em solução de NaOH ($5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$). Os valores de pH avaliados foram ajustados para 7,5 8,0, 8,5, 9,0, 10,0 e 11,0 utilizando-se solução de NaH_2PO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. As Figuras 27 e 28 apresentam os voltamogramas e intensidades de corrente de pico resultantes desta análise. Pode ser verificado que o pH 9 oferece maior sensibilidade analítica em relação aos demais pHs estudados.

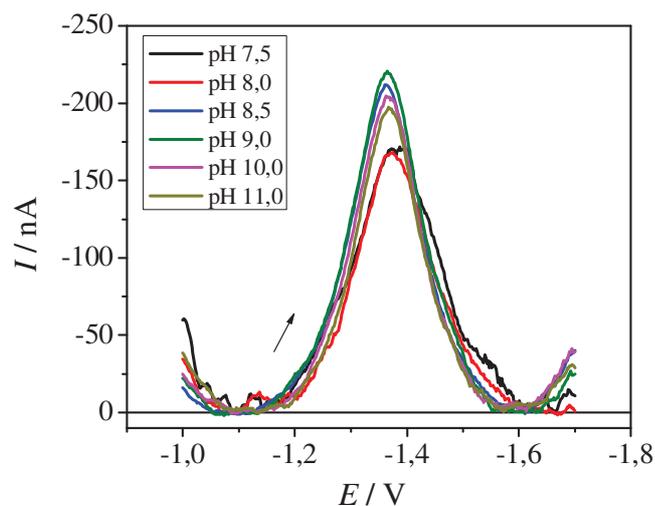


Figura 27. Voltamograma de onda quadrada para a 17α -metiltestosterona ($1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) obtidos com voltametria de onda quadrada em soluções de NaOH $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7,5, 8, 8,5, 9, 10 e 11. Parâmetros utilizados: $E_{\text{dep}} = -0,8 \text{ V}$; $E_{\text{inicial}} = -1,0$; $E_{\text{final}} = -1,7 \text{ V}$ $a = 50 \text{ mV}$; $f = 100 \text{ Hz}$; $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$; $T_{\text{dep}} = 120 \text{ s}$. Com ajuste de linha base.

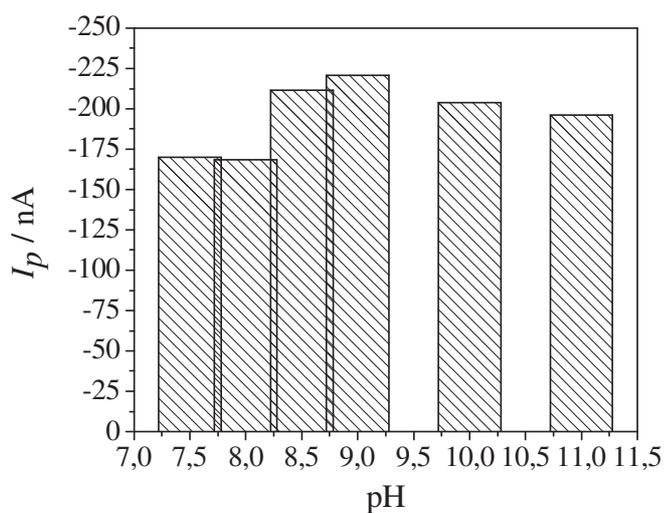


Figura 28. Relação entre os valores de pH e a intensidade de corrente de pico para as soluções de NaOH $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, nos diferentes valores de 7,5 até 11.

Um dos primeiros passos no desenvolvimento de uma metodologia é a otimização dos parâmetros envolvidos. Para a voltametria de onda quadrada, a avaliação de parâmetros como a frequência da onda quadrada, amplitude da onda quadrada e incremento de varredura podem melhorar a resposta eletroanalítica. Desta forma, estes parâmetros foram avaliados.

t

5.2.3 Efeito da frequência (f) nos voltamogramas do hormônio 17 α -metiltestosterona obtidos com SWV

A frequência de onda quadrada é um dos importantes parâmetros avaliados na voltametria de onda quadrada, pois influencia a intensidade dos sinais e conseqüentemente a sensibilidade do método. Adicionalmente, a variação da frequência de aplicação de potencial fornece informações importantes a respeito do grau de reversibilidade, do número de elétrons envolvidos (no caso de sistemas reversíveis) e do valor de an (número de elétrons envolvidos) para sistemas irreversíveis. A análise dessas informações fornece dados importantes para a elucidação do mecanismo da reação em estudo (SOUZA et al., 2003).

A Figura 29 mostra os voltamogramas obtidos com voltametria de onda quadrada obtidos para o hormônio 17 α -metiltestosterona em função da variação da frequência. Observou-se que com o aumento no valor da frequência ocorreu um aumento proporcional na intensidade de corrente de pico e também houve deslocamento do potencial de pico para regiões mais negativas. No entanto, devido a limitações no equipamento, não foi possível promover um maior aumento dos valores da frequência. Assim a frequência escolhida foi 140 Hz, onde se obtém um voltamograma bem definido e com maior intensidade de corrente de pico.

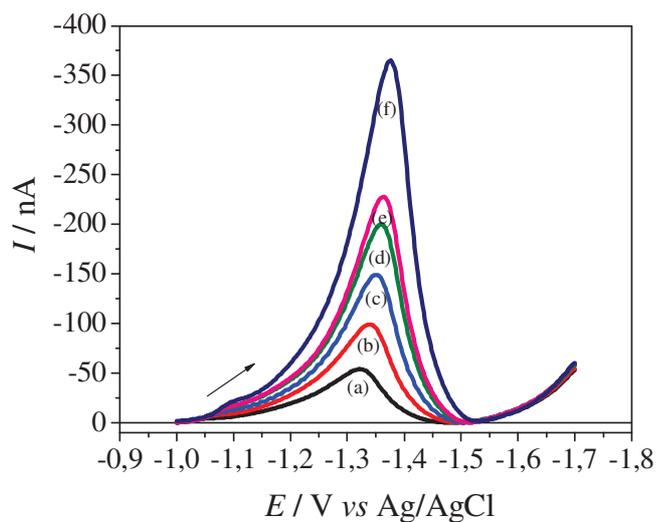


Figura 29. Influência da variação da frequência da onda quadrada nos voltamogramas do hormônio 17α -metiltestosterona obtidos com voltametria de onda quadrada HMDE ($1,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹, NaOH $5,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ pH = 9,0, $a = 50$ mV $\Delta E_s = 2$ mV. Frequências: (a) 30, (b) 50, (c) 70, (d) 90, (e) 100 e (f) 140 Hz. Com ajuste de linha base.

Analisando-se a relação da corrente de pico com a frequência (Figura 30), observou-se uma relação linear desses parâmetros (com coeficiente de correlação de 0,9952), obedecendo à relação $y = a + bx$; onde “b” é o coeficiente angular da reta. Esta característica está relacionada à processos irreversíveis controlados pela adsorção da espécie sobre a superfície do eletrodo, confirmando o que foi observado no estudo do processo redox para o 17α -metiltestosterona utilizando a voltametria cíclica.

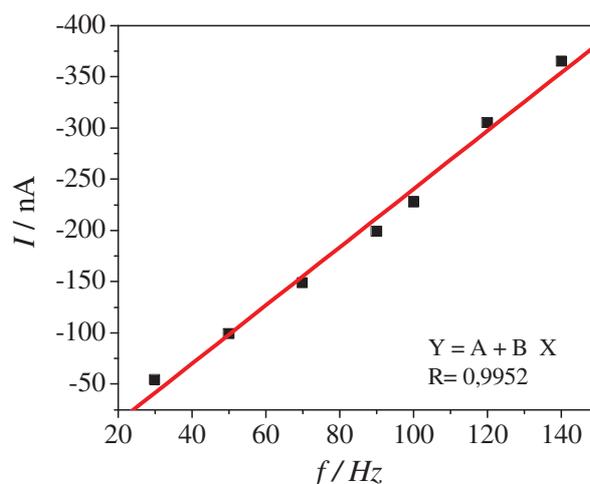


Figura 30. Dependência da corrente de pico para o 17 α -metiltestosterona, em função da frequência.

Também os valores da intensidade da corrente de pico em função da raiz quadrada da frequência (Figura 31), observou-se que a relação não é linear.

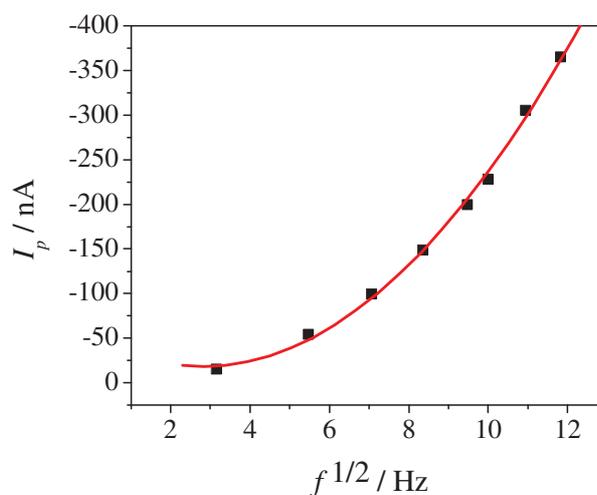


Figura 31. Dependência da corrente de pico para o 17 α -metiltestosterona, em função da raiz quadrada da frequência.

Com base no observado e segundo a teoria proposta por Osteryoung e O'dea (OSTERYOUNG & O'DEA, 1982) para sistemas totalmente irreversíveis com processo controlado pela adsorção das espécies, a intensidade de corrente varia linearmente com a frequência de aplicação dos pulsos. Se a variação da corrente de pico é linear em relação à

raiz quadrada da frequência, é característico de um processo controlado pela difusão das espécies, e no caso em que nenhuma das relações é linear, o processo é considerado como quase-reversível (SOUZA et al., 2003).

5.2.4. Efeito da amplitude de onda quadrada (*a*)

Nos sistemas redox totalmente irreversíveis, a sensibilidade analítica na voltametria de onda quadrada sofre grande influência com a variação da amplitude da onda, isto porque a largura de meia onda se mantêm constante para amplitudes maiores que 20 mV (SOUZA, 2003). Por isso a amplitude do pulso é um dos parâmetros avaliados em métodos que utilizam a voltametria de onda quadrada.

Na Figura 32 são apresentados os voltamogramas obtidos para o 17 α -metiltestosterona em função da variação da amplitude de pulso de potencial na voltametria de onda quadrada. Observou-se que para valores de amplitudes acima de 50 mV ocorreu deslocamento do potencial de pico para valores menos negativos.

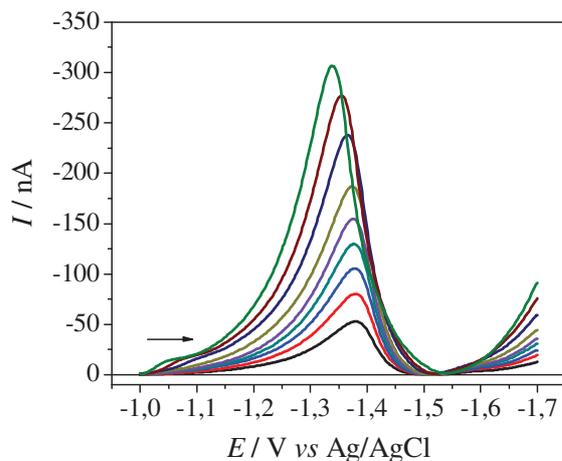


Figura 32. Influência da variação da amplitude de pulso de potencial com voltametria de onda quadrada nos voltamogramas do hormônio 17 α -metiltestosterona ($1,0 \times 10^{-7}$ mol L $^{-1}$, NaOH $5,0 \times 10^{-3}$ mol L $^{-1}$ pH = 9,0, $f = 100$ Hz, $\Delta E_s = 2$ mV). Amplitudes: 10 (—), 15 (—), 20 (—), 25 (—), 30 (—), 35 (—), 50 (—), 65 (—), 85 (—), mV. Com linha de base ajustada.

Para valores de amplitudes menores que 50 mV, o aumento da intensidade de corrente foi linear (Figura 33). Adicionalmente, amplitudes maiores parecem não atuar de modo significativo na sensibilidade para propósitos analíticos nos voltamogramas na figura 32

também se observa um deslocamento do potencial em frequências maiores. Este comportamento está de acordo com teoria de voltametria de onda quadrada, aplicada a sistemas totalmente irreversíveis, porque a largura de meia-onda se mantém constante para amplitudes superiores a 20 mV (SOUZA, 2003). Em função disto optou-se em trabalhar com amplitude da onda quadrada de 50 mV.

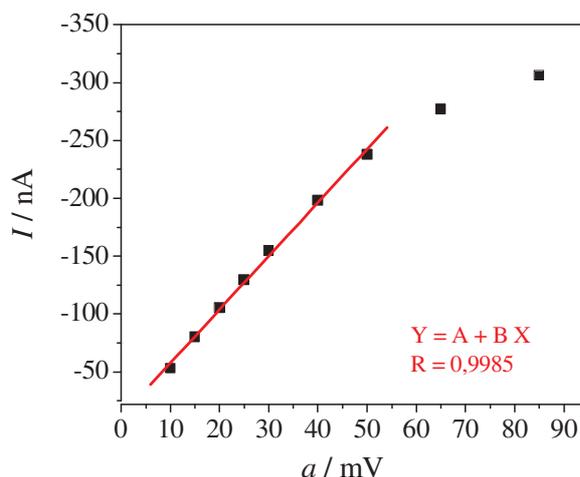


Figura 33. Dependência da corrente de pico para o 17 α -metiltestosterona em função da variação de amplitude de pulso de potencial, nas medidas por SWV.

5.2.5. Efeito do incremento de varredura de potencial (ΔE_s)

A velocidade efetiva na voltametria de onda quadrada é o resultado do produto da frequência pelo incremento de varredura. Deste modo, um incremento de varredura maior pode aumentar o sinal obtido e assim melhorar a sensibilidade do método (SOUZA et al., 2004).

Os voltamogramas de onda quadrada obtidos em função da variação do incremento de varredura estão apresentados na Figura 34.

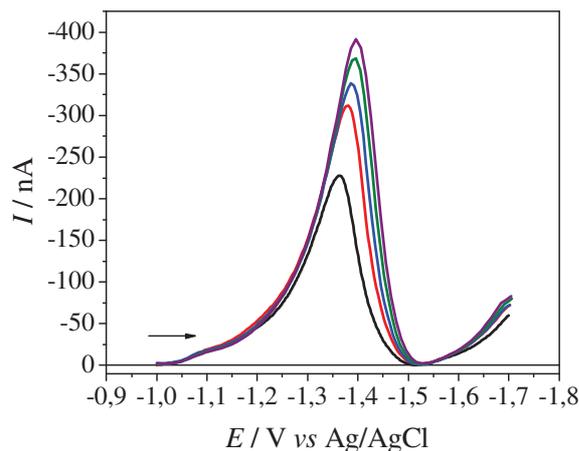


Figura 34. Influência da variação do incremento de varredura de potencial da onda quadrada nos voltamogramas do hormônio 17α -metiltestosterona obtido com SWV e HMDE ($1,0 \times 10^{-7}$ mol L $^{-1}$), NaOH $5,0 \times 10^{-3}$ mol L $^{-1}$ pH = 9,0, $f = 100$ Hz). Incremento: 2 (—), 4 (—), 6 (—), 8 (—), 10 (—), mV. Com ajuste de linha de base.

Observou-se que com o aumento do incremento de varredura ocorreu um aumento na intensidade de corrente de pico (Figura 35). No entanto, com incrementos maiores podem ocorrer alargamentos nos picos obtidos e assim, a resolução do voltamograma pode ser comprometida. Adicionalmente, o *software* do equipamento 757 VA Computrace não aceita incrementos acima de 2 mV para frequência igual ou superior a 140 Hz, e de acordo com o estudo do planejamento fatorial (item 5.2.6), verificou-se que a frequência e a amplitude são os fatores que mais influenciam a resposta do 17α -metiltestosterona. Desta forma, optou-se por trabalhar em frequência maior e incremento de 2mV.

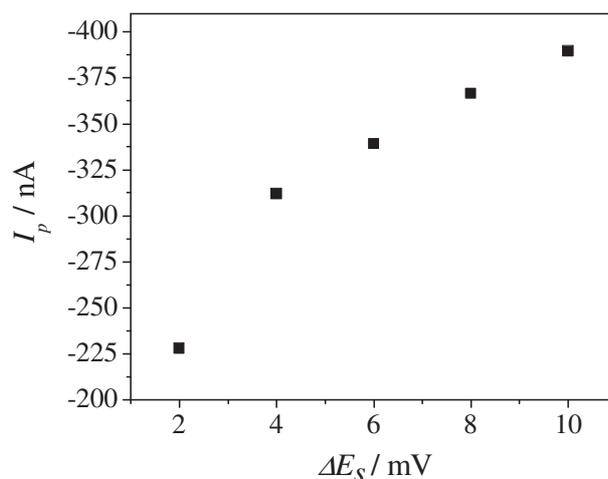


Figura 35. Dependência da intensidade de corrente de pico para o 17 α -metiltestosterona em função da variação de incremento de varredura.

5.2.6. Planejamento fatorial

Para complementar o estudo univariado e comprovar quais parâmetros da SWV mais influenciam simultaneamente no processo de redução do hormônio 17 α -metiltestosterona e determinação voltamétrica, foi realizado um experimento seguindo um planejamento fatorial 2⁴. No planejamento foram realizados dezoito ensaios, com dois pontos centrais, de acordo com os parâmetros propostos na Tabela 5. Na cela eletrolítica contendo 15 mL do eletrólito NaOH 5,0 $\times 10^{-3}$ mol L⁻¹ (pH 9), adicionou-se uma concentração de 1,0 $\times 10^{-7}$ mol L⁻¹ de 17 α -metiltestosterona.

Tabela 5. Fatores, níveis e coeficientes de contraste para o planejamento fatorial 2⁴.

Fatores	(+) Superior	(0) Central	(-) Inferior
1. $t_{\text{deposição}}$ (s)	120	90	60
2. Frequência (Hz)	100	75	50
3. Incremento de varredura de potencial (mV)	6	4	2
4. Amplitude (mV)	50	32,5	15

A Tabela 6 apresenta as respostas do planejamento em termos de intensidade de corrente de pico (nA) para os 18 ensaios de acordo com os parâmetros avaliados.

Tabela 6. Resultado do planejamento fatorial 2^4 contendo os fatores, coeficientes de contraste e resposta (intensidade de corrente de pico, medida em nA).

Ensaio	Fator 1	Fator 2	Fator 3	Fator 4	Resposta I_p (nA)
1	+ (120)	+ (100)	+ (6)	+ (50)	- 442,89
2	- (60)	+ (100)	+ (6)	+ (50)	- 259,78
3	+ (120)	- (50)	+ (6)	+ (50)	- 173,41
4	- (60)	- (50)	+ (6)	+ (50)	- 103,62
5	+ (120)	+ (100)	- (2)	+ (50)	- 274,20
6	- (60)	+ (100)	- (2)	+ (50)	- 163,25
7	+ (120)	- (50)	- (2)	+ (50)	- 106,09
8	- (60)	- (50)	- (2)	+ (50)	- 106,28
9	+ (120)	+ (100)	+ (6)	- (15)	- 132,32
10	- (60)	+ (100)	+ (6)	- (15)	- 82,46
11	+ (120)	- (50)	+ (6)	- (15)	- 56,24
12	- (60)	- (50)	+ (6)	- (15)	- 35,80
13	+ (120)	+ (100)	- (2)	- (15)	- 88,48
14	- (60)	+ (100)	- (2)	- (15)	- 54,61
15	+ (120)	- (75)	- (2)	- (15)	- 37,94
16	- (60)	- (75)	- (2)	- (15)	-18,64
17	0 (90)	0 (75)	0 (4)	0 (32,5)	- 115,41
18	0 (90)	0 (75)	0 (4)	0 (32,5)	- 116,62

A melhor resposta foi observada para o ensaio 1 (-442,89 nA), empregando os quatro fatores no nível superior. A menor corrente de pico foi para o ensaio 16 (-18,64 nA), com os parâmetros no nível inferior, conforme mostram os voltamogramas da Figura 36.

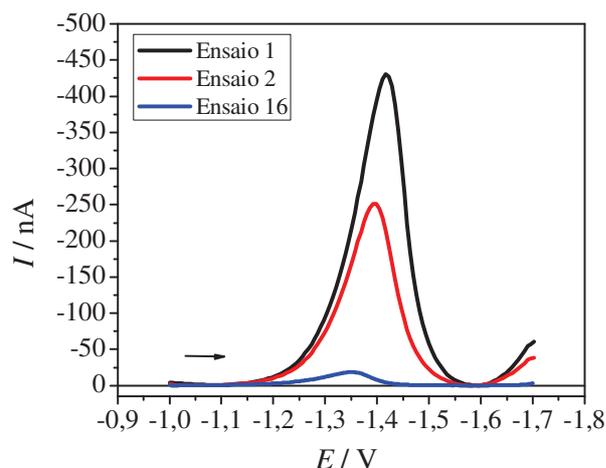


Figura 36. Voltamogramas de onda quadrada para o 17 α -metiltestosterona ($1,0 \times 10^{-7}$ mol L $^{-1}$) empregando HMDE, NaOH $5,0 \times 10^{-3}$ mol L $^{-1}$ pH = 9,0. Ensaio 1 ($I_p = -442,89$ nA), Ensaio 2 (-259,78 nA) e ensaio 16 ($I_p = -18,64$ nA).

O diagrama de Pareto obtido com base nos resultados dos ensaios permitiu verificar quais fatores foram mais significativos no processo de redução do hormônio 17 α -metiltestosterona, e também as interações entre os fatores (Figura 37).

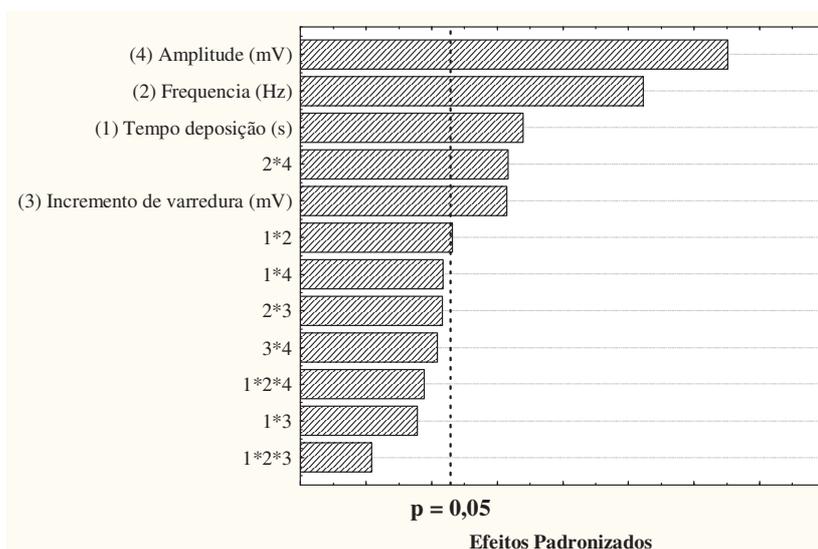


Figura 37. Distribuição de Pareto para os 18 ensaios com o hormônio 17 α -metiltestosterona, $1,0 \times 10^{-7}$ mol L $^{-1}$ empregando SWV e HMDE, em NaOH $5,0 \times 10^{-3}$ mol L $^{-1}$ pH= 9. Fator 1 representa o tempo de deposição; 2: a Frequência; 3 o Incremento de varredura e 4 a Amplitude. Valor de $p = 0,05$.

O diagrama de Pareto para os efeitos padronizados (Figura 37), considerando-se a probabilidade de 95% ($p < 0,05$), indicou que os termos de 1ª ordem do modelo são significativos. A amplitude de pico (4) e a frequência (2) são fatores altamente significativos. A interação (2 e 4) também é significativa, enquanto as demais interações não são significativas para aumentar o sinal analítico.

Por meio desse planejamento foi possível verificar que os quatro fatores considerados para o processo contribuem no resultado, sendo amplitude de pulso e frequência os fatores que mais influenciam no aumento da intensidade de corrente.

5.3. Curva de adição de padrão para a determinação de hormônio 17 α -metiltestosterona

Após a otimização dos parâmetros para a determinação do hormônio masculino 17 α -metiltestosterona por SWV (eletrólito de NaOH $5,0 \times 10^{-3} \text{ L}^{-1}$ em pH 9, frequência de aplicação dos pulsos (140 Hz), incremento de varredura (2 mV), amplitude da onda quadrada (50 mV) e tempo de deposição (120s)), construiu-se uma curva de adição de padrão do hormônio em eletrólito puro para avaliar a linearidade do sistema.

Para a construção da curva de adição de padrão (Figuras 38 e 39) utilizou-se concentrações de 17 α -metiltestosterona na faixa entre $9,99 \times 10^{-9}$ a $1,87 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

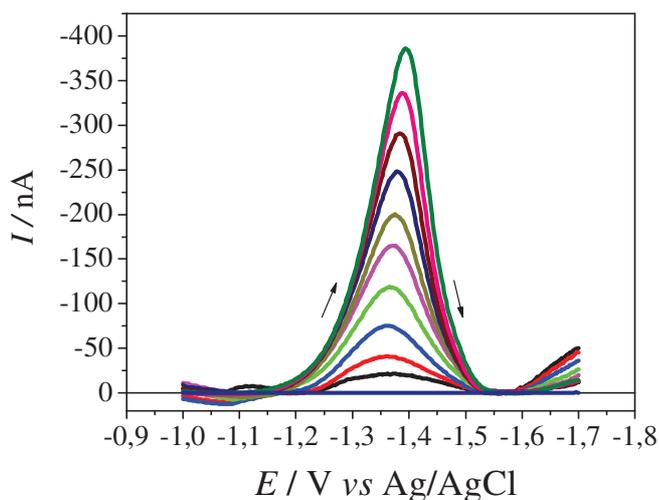


Figura 38. Voltamogramas de onda quadrada e obtidos com SWV e HMDE com adição de padrão do com $f = 140$ Hz, $a = 50$ mV, $\Delta E_s = 2$ mV, NaOH $5,0 \times 10^{-3}$ mol L $^{-1}$ pH = 9,0. Concentração: () 0, () $9,99 \times 10^{-9}$, () $2,99 \times 10^{-8}$, () $6,29 \times 10^{-8}$, () $1,09 \times 10^{-7}$, () $1,67 \times 10^{-7}$, () $2,31 \times 10^{-7}$, () $4,18 \times 10^{-7}$, () $5,98 \times 10^{-7}$, () $1,10 \times 10^{-6}$, () $1,87 \times 10^{-6}$ mol L $^{-1}$. Com ajuste de linha base.

A curva de adição de padrão da Figura 39 apresenta a variação da intensidade de corrente de pico em relação ao aumento da concentração do 17 α -metiltestosterona em solução.

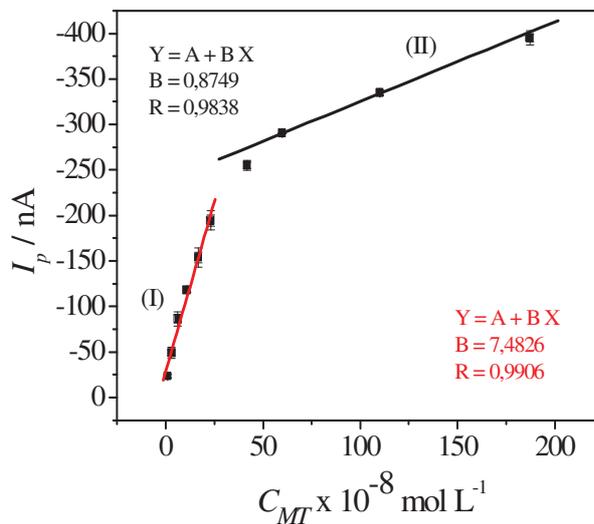


Figura 39. Curva de adição de padrão do hormônio 17 α -metiltestosterona sobre HMDE em diferentes concentrações.

Observou-se por meio da inclinação da reta que o aumento na corrente de pico foi linear até a concentração de $2,31 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ diminuindo nas adições seguintes. Este fato sugere que há o envolvimento de etapas de adsorção onde, para baixos valores de concentração, esse efeito não alterou a cinética do processo na superfície do eletrodo e, para valores elevados de concentração houve o decaimento nos valores de intensidade de corrente de pico devido ao bloqueio da superfície do eletrodo pela espécie eletroativa.

As adições de padrão foram feitas em triplicata e a curva analítica foi construída por meio da média das correntes de pico *vs* a concentração de 17α -metiltestosterona. Para a determinação do limite de detecção (LD), que é a menor concentração de um analito detectada, mas não quantificada, utilizou-se o desvio padrão da média aritmética de dez voltamogramas do branco respectivo a cada amostra (equação 1) (BRITO, 2003).

$$LD = \frac{3S_B}{b} \quad (\text{equação 1})$$

Onde, S_B é o desvio padrão da média aritmética das correntes dos voltamogramas do branco, no potencial equivalente aos dos picos de 17α -metiltestosterona e b o valor do coeficiente angular da curva analítica.

Além do limite de detecção (LD), o limite de quantificação (LQ) foi também avaliado. O LQ mostra o desempenho ou a sensibilidade do instrumento utilizado para análise, sendo definido como a menor concentração de um analito numa amostra que pode ser determinada (quantificada) com precisão e exatidão. Assim, o valor de LQ é definido como sendo o menor valor determinado para a metodologia proposta onde se considera que o limite do equipamento ainda não foi atingido, mas a confiabilidade atingida é de 99%. Considerando-se a metodologia proposta o valor de LQ é dado pela equação 2 (BRITO, 2003)

$$LQ = \frac{10S_B}{b} \quad (\text{equação 2})$$

Os limites de detecção e quantificação obtidos neste trabalho para o hormônio 17α -metiltestosterona foram respectivamente, $3,07 \mu\text{g L}^{-1}$ ($1,02 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$) e $10,78 \mu\text{g L}^{-1}$ ($3,6 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$).

Wang et al. (1985) desenvolveram um trabalho utilizando voltametria adsortiva para quantificar 17α -metiltestosterona em formulações farmacêuticas, obtendo LD de $3,3 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$, por meio da aplicação de um tempo de pré-concentração de 15 minutos. Portanto, comparando este valor com o obtido por meio da metodologia desenvolvida para o composto

17 α -metiltestosterona, em que utilizou-se um tempo de pré-concentração de 2 minutos, pode-se observar que houve boa sensibilidade na determinação analítica deste composto. Dessa forma, os valores de LD e LQ encontrados, se mostraram adequados para a análise de 17 α -metiltestosterona em amostras ambientais.

5.4. Estudo de recuperação do 17 α -metiltestosterona em águas ultrapura e naturais

Com base nas condições experimentais otimizadas a metodologia foi aplicada na recuperação do hormônio 17 α -metiltestosterona em águas ultrapura e naturais pelo método de adição de padrão. Inicialmente, em um balão volumétrico de 100 mL preparou-se nas amostras o eletrólito suporte NaOH $5,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ e o pH foi ajustado para 9. Em seguida as amostras preparadas como descrito foram fortificadas com hormônio adicionando-se alíquotas de solução padrão.

Para as medidas foram adicionados na cela voltamétrica 15 mL de soluções previamente preparadas conforme descrito, no caso das medidas de recuperação em amostras reais, devido ao efeito de interferência foram adicionados 10 mL de eletrólito puro e 5 ml da amostra. Em seguida as soluções foram purgadas por 4 minutos para eliminar o oxigênio e as medidas foram realizadas adições de padrão para a construção de curvas de recuperação.

A recuperação de 17 α -metiltestosterona nas amostras foi realizada por meio de curvas de adição de padrão como exemplificado na Figura 40, mostra os voltamogramas obtidos para a recuperação em água ultrapura. Com as adições de padrão de 17 α -metiltestosterona ($7,94 \times 10^{-8}$ a $2,02 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹) sobre a amostra foi possível encontrar o teor de hormônio adicionado na amostra e calcular a recuperação pela extrapolação da curva (Figura 41). Na tabela 8 encontram-se os valores de concentração adicionado e recuperado para a água ultrapura.

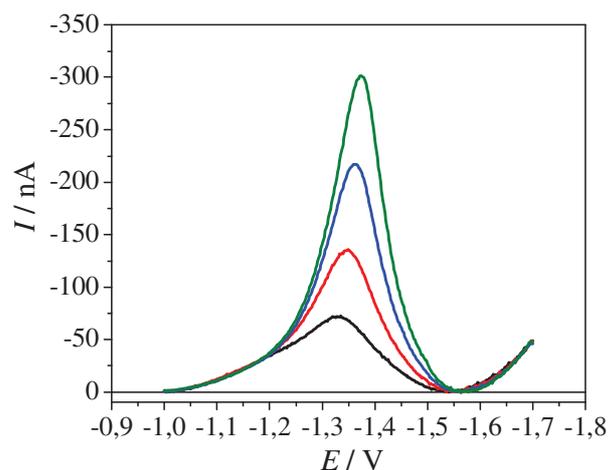


Figura 40. Voltamogramas do hormônio 17 α -metiltestosterona obtido com voltametria de onda quadrada e HMDE, com $f = 140$ Hz, $a = 50$ mV, $\Delta E_s = 2$ mV, NaOH $5,0 \times 10^{-3}$ mol L $^{-1}$ em pH 9,0. (—) Amostra, (—) Adição de $7,94 \times 10^{-8}$ mol L $^{-1}$, (—) Adição de $1,38 \times 10^{-7}$ mol L $^{-1}$, (—) Adição de $2,02 \times 10^{-7}$ mol L $^{-1}$. Com ajuste da linha base.

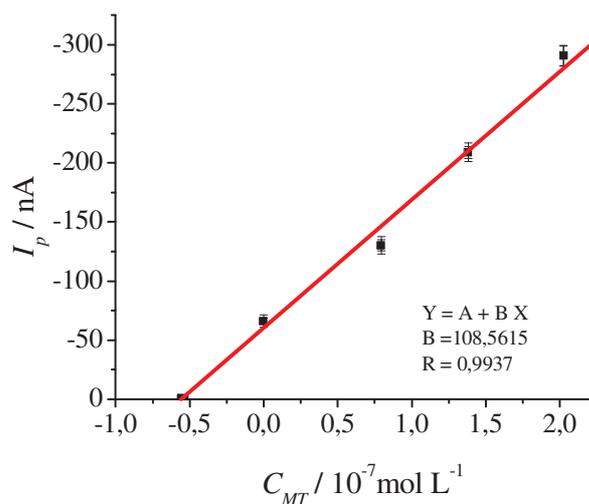


Figura 41. Curva de adição de padrão utilizada na recuperação do hormônio 17 α -metiltestosterona em água ultrapura.

Na Tabela 7 encontra-se a média das recuperações obtidas para as medidas de 17 α -metiltestosterona em água ultrapura e amostras de coletadas em tanque de peixes e de rio, todas as medidas foram realizadas em triplicata.

Tabela 7. Adição e recuperação de 17 α -metiltestosterona em amostras reais.

Amostra	17 α -metiltestosterona	*Concentração	
		mol L ⁻¹	μ g L ⁻¹
Água ultrapura	Adicionado	5,31 \times 10 ⁻⁸	16,06
	Determinado	5,33 \times 10 ⁻⁸ \pm 1,15 \times 10 ⁻⁹	16,12 \pm 0,35
	Recuperação	100,38%	-
Água de tanque de peixes	Adicionado	4,65 \times 10 ⁻⁸	14,06
	Determinado	5,07 \times 10 ⁻⁸ \pm 4,98 \times 10 ⁻⁹	15,34 \pm 1,51
	Recuperação	108,79 %	-
Água do Arroio Carro Quebrado (Vila Carli)	Adicionado	1,0 \times 10 ⁻⁷	30,25
	Determinado	1,15 \times 10 ⁻⁷ \pm 1,77 \times 10 ⁻⁹	34,78 \pm 0,54
	Recuperação	115,0%	-

* Concentração de 17 α -metiltestosterona \pm Desvio Padrão da média entra as medidas.

Os resultados obtidos para a recuperação do hormônio 17 α -metiltestosterona em água, padrão aquoso e amostras reais variou de 100,38 % a 115,0 %. Estes resultados mostraram-se adequados porque apresentaram coeficiente de variação (CV) de 2,16 %, 9,82 % e 1,54 %, respectivamente. Ribani et al (2004) descrevem que para compostos em níveis de traços são aceitos CV de até 20 % considerando-se o grau de complexidade da amostra.

5.5. Estudo de interferentes

Após a obtenção do limite de detecção e de quantificação, bem como o estudo de recuperação, foram realizados estudos de possíveis interferentes nas amostras de águas. Levou-se em consideração moléculas orgânicas, como o ácido húmico, presentes em demasia nestas amostras.

Assim o estudo de interferentes foi realizado com a adição de alíquotas de ácido húmico (AH) a partir de uma solução estoque de 0,15 % m/V (Sigma Aldrich, grau técnico). Estudos com diferentes teores de AH foram avaliados, com adições sucessivas de AH de 4,9 \times 10⁻⁷ a 3,8 \times 10⁻⁶ % m/V (Figuras 42, 43 e 44). Verificou-se que para baixas concentrações de AH não ocorreu interferência (Figura 30). No entanto, com a adição de soluções mais concentradas de AH, a corrente de pico diminui em até 63,97 %, em relação à corrente de pico inicial para a concentração de 1,96 \times 10⁻⁷ mol L⁻¹ de 17 α -metiltestosterona.

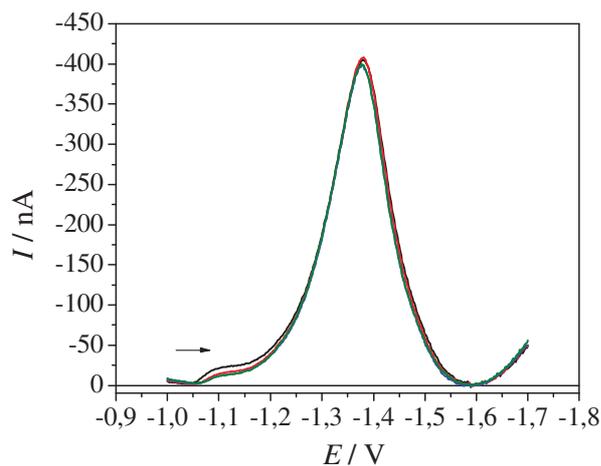


Figura 42. voltamogramas do estudo de interferência do ácido húmico (AH) sobre 17 α -metiltestosterona ($1,96 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$). Adições sucessivas de AH ($4,9 \times 10^{-7}$ a $2,3 \times 10^{-5} \%$ m/V). Em meio de NaOH $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ pH 9, com $a = 50 \text{ mV}$, $f = 140 \text{ s}^{-1}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$. Com ajuste de linha base.

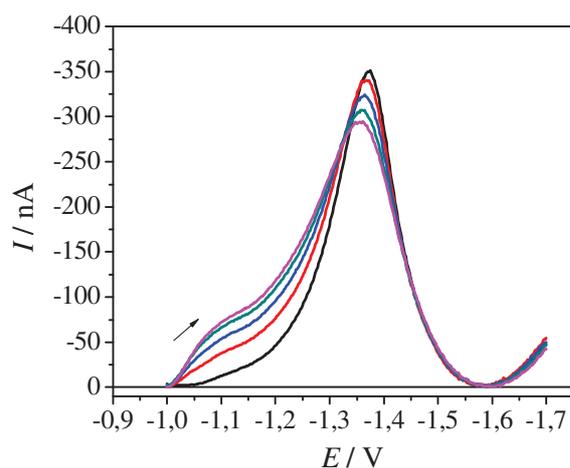


Figura 43. Voltamogramas do estudo de interferência do ácido húmico (AH) sobre 17 α -metiltestosterona ($1,96 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$). Adições sucessivas de AH ($4,9 \times 10^{-4}$ a $1,94 \times 10^{-3} \%$ m/V). Em meio de NaOH $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ pH 9, com $a = 50 \text{ mV}$, $f = 140 \text{ s}^{-1}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$. Com ajuste de linha base.

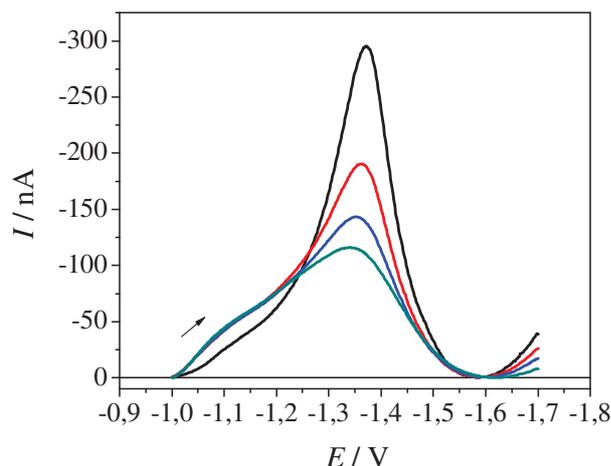


Figura 44. Voltamogramas do estudo de interferência do ácido húmico (AH) sobre 17α -metiltestosterona ($1,96 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$), voltamogramas mostrando as adições sucessivas de AH $9,74 \times 10^{-4}$ a $3,82 \times 10^{-3} \text{ \% m/V}$. Em meio de NaOH $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ pH 9, com $a = 50 \text{ mV}$, $f = 140 \text{ s}^{-1}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$. Com ajuste de linha de base.

A interferência causada por AH na quantificação de 17α -metiltestosterona foi mais significativa quando em teores elevados de AH, o qual conferiu uma coloração marrom à solução no interior da cela (eletrólito e hormônio), o que não foi observado nas amostras dos ambientes estudados, apresentavam ausência de cor e apenas algumas partículas em suspensão, que foram retiradas com a filtragem. No entanto, ao proceder as determinações do hormônio nestas amostras observou-se interferências significativas. A Figura 45 apresenta a variação da intensidade da corrente de pico em função da concentração de hormônio 17α -metiltestosterona em água ultrapura e de tanque de piscicultura. Pode-se observar que a inclinações das retas obtidas para os dois meios apresentaram uma diferença de aproximadamente 50 %, indicando a interferência negativa no sistema de medida ao se trabalhar com amostras reais, uma vez que há a diminuição da sensibilidade da técnica devido ao efeito de matriz.

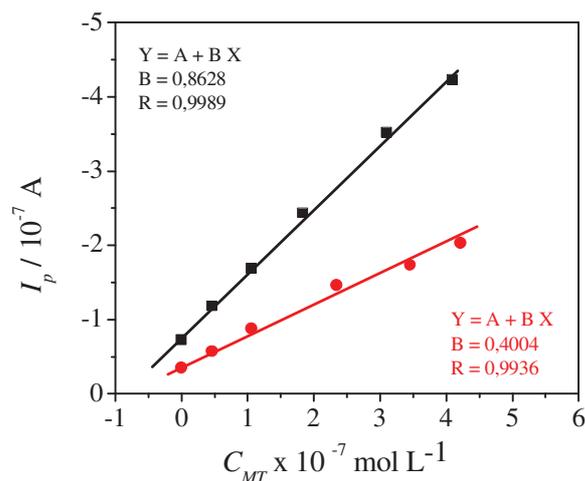


Figura 45. Relação entre a intensidade de corrente de pico e a concentração de 17 α -metiltestosterona em relação à matriz, em água ultrapura (—) e água de tanque de piscicultura (—). Nas concentrações ($4,6 \times 10^{-8}$ a $4,2 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$).

Os coeficientes angulares foram de 0,8628 para a água ultrapura e, 0,4004 para água de tanque. Isto sugere que outras substâncias, além de AH, podem estar causando a diminuição no sinal analítico de 17 α -metiltestosterona nas amostras.

Assim para suprimir as interferências na quantificação de 17 α -metiltestosterona as amostras foram diluídas antes das determinações. Alíquotas de 5mL de amostra foram diluídas para 15 mL com solução de eletrólito suporte, desta forma, os interferentes também foram diluídos, minimizando as interferências.

Outro estudo de interferentes foi realizado com a progesterona (PG), outro hormônio esteróide que também é eletroativo em medidas voltamétricas, e pode estar presente em águas naturais.

Os voltamogramas na Figura 46 mostram o comportamento da progesterona empregando a voltametria de onda quadrada e HMDE, onde foram adicionados $3,32 \times 10^{-8}$ e $6,62 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente.

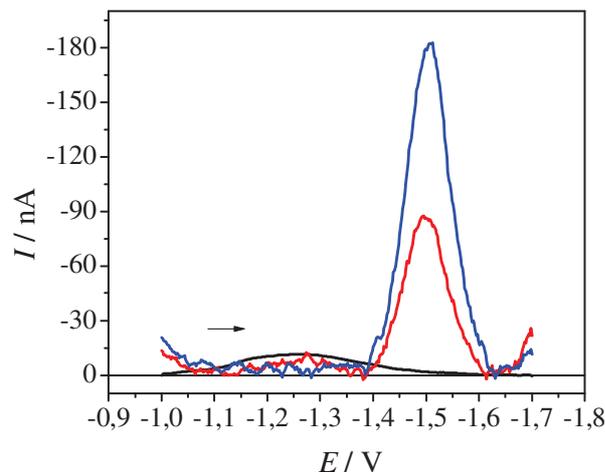


Figura 46. Voltamogramas do hormônio progesterona obtidos com SWV e HMDE. Concentração: 0 (—), adição de PG $3,32 \times 10^{-8}$ (—) adição de PG $6,62 \times 10^{-8}$ (—). Em meio de NaOH $5,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ em pH 9, com $a = 50$ mV, $f = 140$ s⁻¹ e $\Delta E_s = 2$ mV, $E_{\text{dep}} = -0,8$ V; $E_{\text{inicial}} = -1,0$; $E_{\text{final}} = -1,6$ V; $T_{\text{dep}} = 120$ s. Com ajuste de linha de base.

A tabela 8 apresenta os potenciais de pico para os compostos 17 α -metiltestosterona e progesterona sob as mesmas condições experimentais.

Tabela 8. Potencial de pico de redução dos hormônios 17 α -metiltestosterona e progesterona.

Composto	Potencial de pico (Volts)
17 α -metiltestosterona	-1,35
Progesterona	-1,5

Os voltamogramas apresentados na Figura 47 mostram o comportamento dos hormônios 17 α -metiltestosterona e progesterona. Observou-se uma queda na intensidade de corrente de pico para o hormônio 17 α -metiltestosterona, após sucessivas adições de progesterona. Além disso, os processos eletroquímicos de redução dos dois compostos se unem, prejudicando a resolução do sinal analítico.

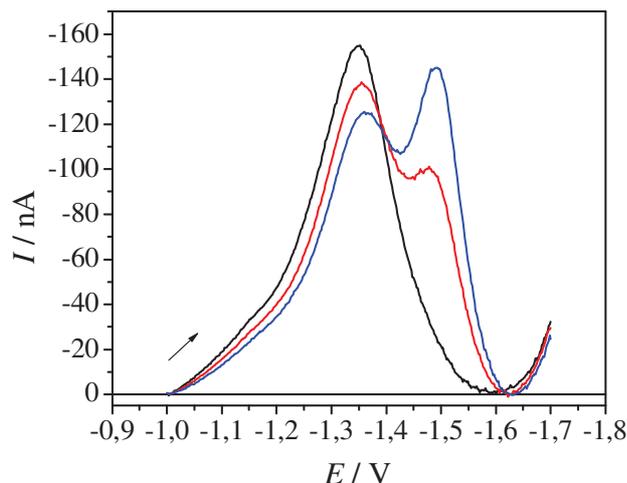


Figura 47. Voltamogramas do hormônio 17α -metiltestosterona e progesterona, obtidos com SWV e HMDE. 17α -metiltestosterona $9,9 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ (—), adições de progesterona $3,3 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ (—) e $5,3 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ (—). Em meio de NaOH $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em pH 9, com $a = 50 \text{ mV}$, $f = 140 \text{ s}^{-1}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $E_{\text{dep}} = -0,8 \text{ V}$; $E_{\text{inicial}} = -1,0$; $E_{\text{final}} = -1,6 \text{ V}$; $T_{\text{dep}} = 120 \text{ s}$. Com ajuste de linha base.

Os resultados do estudo com o hormônio progesterona indicam que caso os dois compostos estejam presentes na mesma matriz, haverá interferência na resposta eletroquímica do composto 17α -metiltestosterona. Portanto, para determinar 17α -metiltestosterona na presença de progesterona seria necessário aplicar à metodologia etapas prévias de tratamento da amostra e de separação, ou promover a detecção do sinal analítico de cada composto por meio da deconvolução dos sinais eletroquímicos (GARBELLINI et al., 2007). Entretanto, nas amostras em que a 17α -metiltestosterona foi quantificada não se observou a presença de picos no potencial $-1,5 \text{ V}$ da progesterona.

5.6. Quantificação do hormônio 17α -metiltestosterona em águas naturais

A metodologia desenvolvida foi aplicada para quantificar o hormônio 17α -metiltestosterona em amostras de águas coletadas em tanque de peixes e de rio. Nestas matrizes preparou-se o eletrólito suporte NaOH $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ajustando o pH em 9,0 com solução de NaH_2PO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Em seguida foram adicionados 10 mL de eletrólito puro e 5 mL de amostra na cela eletroquímica, a solução foi desaerada por 4 minutos com o objetivo de eliminar o oxigênio presente. Em seguida a quantificação foi realizada com adições de padrão. A intensidade da corrente de pico do 17α -metiltestosterona nas amostras foi medida

no potencial -1,35 V. Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

Na Tabela 9 são apresentados os valores de temperatura (medidos in loco) e o pH das amostras analisadas.

Tabela 9. Temperatura e pH das amostras de águas naturais avaliadas.

Amostra	Temperatura (° C)	pH
Tanque 01 - Jordão	14	6,9
Tanque 02 - Jordão	15	6,91
Tanque 04 - Jordão	15	7,15
Tanque 06 - Jordão	15	7,23
Tanque Palmeirinha	-	6,76
Arroio Carro Quebrado (Vila Carli)	20	7,0
Tanque (Alto da XV) - 01	18	6,47
Tanque (Alto da XV) -02	18	6,7

Os valores de pH das amostras de águas dos ambientes avaliados se encontravam neutros, ou próximos à neutralidade

A quantificação de 17α -metiltestosterona nas amostras foi realizada por meio de curvas de adição de padrão como exemplificado nas Figuras 48 e 49. A Figura 48 mostra o voltamograma obtido na determinação da 17α -metiltestosterona para a amostra coletada no tanque 2 (de criação de peixes, Vale do Jordão). Pode-se observar na curva (a) do voltamograma, que a amostra apresentou uma corrente de pico de -200 nA no potencial -1,37 V, característico do hormônio 17α -metiltestosterona. Com as adições de padrão de 17α -metiltestosterona ($4,65 \times 10^{-8}$ a $4,09 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹) foi possível encontrar o teor de hormônio presente na amostra (Figura 48).

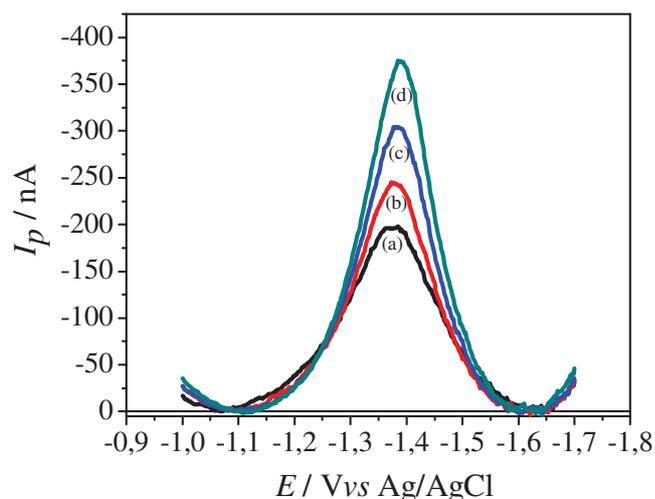


Figura 48. Voltamogramas do hormônio 17 α -metiltestosterona obtido com voltametria de onda quadrada e HMDE, amostra do tanque 02, com $f = 140$ Hz, $a = 50$ mV, $\Delta E_s = 2$ mV, NaOH $5,0 \times 10^{-3}$ mol L $^{-1}$ em pH 9,0. (a) Amostra, (b) Adição de $4,65 \times 10^{-8}$ mol L $^{-1}$, (c) Adição de $1,06 \times 10^{-7}$ mol L $^{-1}$ e (d) Adição de $1,83 \times 10^{-7}$ mol L $^{-1}$.

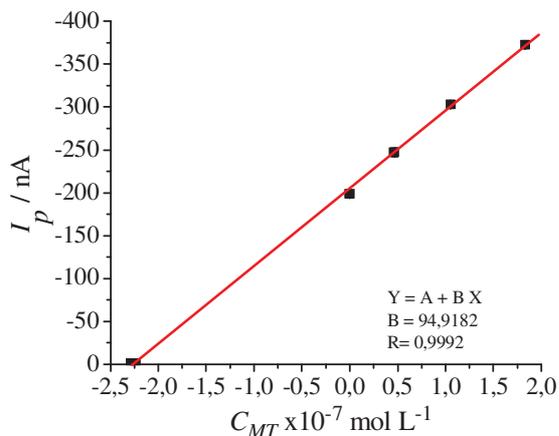


Figura 49. Curva de adição de padrão utilizada na quantificação do hormônio 17 α -metiltestosterona em amostra real (tanque 02).

O valor médio determinado para a amostra do tanque 02, considerando o fator de diluição (3x) foi de $6,84 \times 10^{-7}$ mol L $^{-1}$ ($206,9 \mu\text{g L}^{-1}$), com desvio padrão de $2,5 \times 10^{-8}$ ($7,6 \mu\text{g L}^{-1}$).

A Figura 50 mostra uma curva de regressão linear entre as medidas de 17 α -metiltestosterona para a amostra do tanque 02. Na faixa de concentração adicionada a

intensidade de corrente aumentou linearmente, mostrando o coeficiente de correlação linear ajustado de 98,9 %.

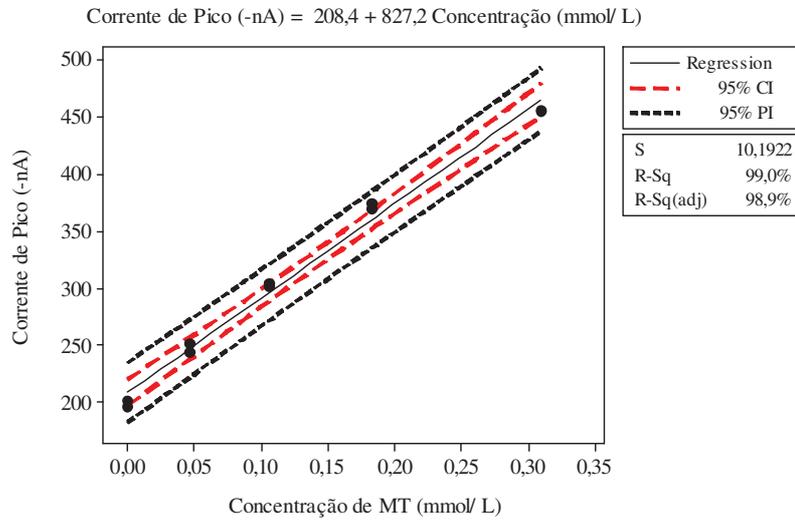


Figura 50. Regressão linear entre as replicatas para a quantificação de 17 α -metiltestosterona na amostra do Tanque 02. (—) Regressão, (- - -) Intervalo de confiança (95%), R-Sq (coeficiente de correlação linear) e R-Sq (adj.) (coeficiente de correlação linear ajustado).

A Tabela 10 apresenta os teores de 17 α -metiltestosterona para os demais pontos de coleta.

Tabela 10. Determinação do hormônio 17α -metiltestosterona em amostras de águas naturais.

Amostra	*Concentração de 17α -metiltestosterona	
	mol L ⁻¹	µg L ⁻¹
Tanque 01 (Vale Jordão)	$1,8 \times 10^{-7} \pm 9,2 \times 10^{-9}$	$54,4 \pm 2,8$
Tanque 04 (Vale Jordão)	$4,7 \times 10^{-7} \pm 5,13 \times 10^{-8}$	$142,2 \pm 15,5$
Tanque 06 (Vale Jordão)	$2,5 \times 10^{-7} \pm 2,4 \times 10^{-9}$	$75,6 \pm 0,7$
Tanque (Palmeirinha)	$2,2 \times 10^{-7} \pm 1,0 \times 10^{-8}$	$66,5 \pm 3,0$
Tanque 01 (Alto da XV)	$1,6 \times 10^{-7} \pm 1,8 \times 10^{-8}$	$48,4 \pm 5,4$
Tanque 02 (Alto da XV)	$1,7 \times 10^{-7} \pm 2,4 \times 10^{-8}$	$51,4 \pm 7,3$
Arroio Carro Quebrado (Vila Carli)	< LQ	-

* Concentração de 17α -metiltestosterona \pm Desvio Padrão da média entra as medidas.

Por meio da metodologia desenvolvida foi possível verificar a presença do hormônio 17α -metiltestosterona em amostras naturais provenientes de tanques de piscicultura. Nos locais estudados não é empregado o hormônio 17α -metiltestosterona em processos de reversão sexual. No entanto, os maiores teores do hormônio 17α -metiltestosterona foram encontrados nas amostras dos tanques de piscicultura do Vale do Jordão. Pode-se sugerir que a fonte de entrada de 17α -metiltestosterona para os tanques esteja relacionada com a ração empregada na alimentação dos peixes, pois os fabricantes produzem tanto a ração sem adição de 17α -metiltestosterona, quanto ração destinada à alimentação de tilápias, a qual pode conter em sua composição esse hormônio. Ou ainda, por meio das matérias-primas empregadas na fabricação da ração para peixes que apresenta em sua composição, como uma das fontes de proteínas, a farinha de peixes. Como insumos na fabricação de alimentos e rações, até mesmo as carcaças, vísceras podem ser re-utilizadas (OLIVEIRA, 2009).

5.7. Estudo de repetibilidade e reprodutibilidade

A repetibilidade foi calculada a partir de 5 medidas consecutivas de 17α -metiltestosterona apresentando um coeficiente de variação (CV) de 2,85 %. A reprodutibilidade foi obtida a partir de análises realizadas em 5 dias consecutivos, o CV calculado para a reprodutibilidade foi 14,91 %. Os Cvs foram satisfatórios, tanto para as medidas de repe quanto de repro, visto que o método trata-se de medidas de análise de traços.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A importância da determinação de metiltestosterona em águas naturais justifica-se na ação interferente desta substância nos organismos, sendo considerados possíveis causadores de desequilíbrio e mutações.

O estudo dos parâmetros na voltametria de onda quadrada foi importante para o entendimento desta técnica e suas vantagens, em relação às altas velocidades de varreduras e rapidez da resposta analítica.

Com o a metodologia eletroanalítica otimizada foi possível analisar o hormônio 17α -metiltestosterona em amostras de interesse de forma rápida e de menor custo, em relação às técnicas cromatográficas em geral empregadas nas análises de hormônios andrógenos.

Diante dos resultados apresentados e discutidos o método mostrou-se eficiente na determinação de 17α -metiltestosterona por meio da adição de padrão sobre amostras reais. Com isso foi possível quantificar o hormônio 17α -metiltestosterona e avaliar os ambientes aquáticos para detecção de fontes de poluição antrópicas. Em relação aos limites de detecção e quantificação o método mostrou-se sensível, considerando o tempo de pré-concentração relativamente baixo comparado com outros métodos reportados na literatura. para a SWV, mostrando a viabilidade do emprego desta técnica e do eletrodo de mercúrio.

Os efeitos de matriz nas amostras de água foram contornados com a diluição da amostra sem a necessidade de tratamentos prévios das mesmas. Foi determinado teores de 17α -metiltestosterona nas amostras reais. A possível fonte de entrada desse composto nos ambientes aquáticos estudados pode ser a ração empregada na alimentação dos peixes, esse fato pode ser avaliado em trabalhos futuros. Também surge a necessidade de uma avaliação mais em relação aos corpos hídricos que recebem efluentes destes reservatórios de criação de peixes para verificar se está ocorrendo alguma contaminação com o hormônio 17α -metiltestosterona.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINHO, S. M. L.; VILLAMIL, R. F. V.; NETO, A. A.; ARANHA, H. O. Eletrólito Suporte e suas Múltiplas Funções em Processos de Eletrodo. **Química Nova**, v. 27, No. 5, p. 813-817, 2004.

ALEIXO, M. L. **Voltametria: Conceitos e Técnicas**. Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química São Paulo-SP, 2003. Disponível em: <<http://www.chemkeys.com>>. Acesso em 24 Mar. 2010.

ALGHAMDI, A. H.; BELAL, F. F.; AL-OMARC, M, A. Square-wave adsorptive stripping voltammetric determination of danazol in capsules. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, p. 989–993, 2006.

ANDERSEN, L., HOLBECH, H., GESSBO, A., NORRGREN, L. PETERSEN, G. I. (2003) Effects of exposure to 17 α -ethinylestradiol during early development on sexual differentiation and induction of vitellogenin in zebrafish (*Danio rerio*). **Comparative Biochemistry and Physiology**. v 134, Part C, p. 365- 374, 2003.

ANDERSEN, L.; GOTO-KAZETO, R.; TRANT, J. M.; NASH, J. P.; KORSGAARD B.; BJERREGAARD, P. Short-term exposure to low concentrations of the synthetic androgen methyltestosterone affects vitellogenin and steroid levels in adult male zebrafish (*Danio rerio*). **Aquatic Toxicology**, v. 76, p. 343–352, 2006.

BAGHEL, D. S.; LAKRA, W. S.; RAO, G. P. S. Altered sex ratio in giant fresh water prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) using hormone bioencapsulated live Artemia feed. **Aquaculture Research**. v. 35, p.943 - 947, 2004.

BARRY, T. P.; MARWAH, A.; MARWAH, P. Stability of 17 α -methyltestosterone in fish feed. **Aquaculture**, v. 271, p. 523–529, 2007.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e conseqüências. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 651-666, 2007.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 523-530, 2003.

BOMBARDELLI, R. A. HAYASHI, C. Masculinização de larvas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) a partir de banhos de imersão com 17α -metiltestosterona. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.2, p.365-372, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde (2004). Portaria n. 518, de 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para o consumo humano e seu padrão de potabilidade e dá outras providências. Disponível em: Brasília: SVS, 2004. <<http://www.uniagua.org.br/images/destaque/portaria518.pdf>> Acesso em: 10 Fev. 2012.

BRITO, N. M.; AMARANTE-Jr, O. P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de Métodos Analíticos: Estratégias e Discussão. **Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129-146, 2003.

BRITTON, H. T. S.; ROBINSON, R. A. Universal buffer solutions and the dissociation constant of veronal. **Journal of the Chemical Society**, v. 2, p. 1456-1462, 1931.

CHRISTIE, J. H.; TURNER, J. A.; OSTERYOUNG, R. A. Square wave voltammetry at the dropping mercury electrode: experimental. **Analytical Chemistry**, v. 49, n. 13, p. 1904-1908, 1977.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005 – dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Brasília. Disponível em: <<http://mma.gov.br/conama/res05/res//res05/res35705.pdf>> Acesso em: 10 Fev. 2012.

DE-ROSE, E. H.; NETO, F. R. A; MOREAU, R. L. M.; CASTRO, R. R. T. Controle antidoping no Brasil: resultados do ano de 2003 e atividades de prevenção. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**. v. 10, n. 4, p. 289-293, 2004.

DEVLIN, R. H.; NAGAHAMA Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. **Aquaculture**, v. 208, p.191–364, 2002.

DIAS-KOBERSTEIN, T. C. R.; NETO, A. G.; DE STÉFANI, M. V.; MALHEIROS, E. B.; ZANARDI, M. F.; DOS SANTOS, M. A. Reversão sexual de larvas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) Por Meio de Banhos de Imersão em L Dosagens Hormonais. **Revista Acadêmica**, Curitiba, v. 5, n. 4, p. 391-395, 2007.

FALONE, S. Z. **Desenvolvimento de métodos para determinação do hormônio 17 α -Metiltestosterona em amostras de água e de sedimentos de piscicultura: ensaios ecotoxicológicos com cladóceros**. 2007. 155 p. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental) - Escola de Engenharia de São Carlos. São Carlos, SP.

GALLI, A.; DE SOUZA D.; GARBELLINI G.S.; COUTINHO C.F.B.; MAZO L.H.; AVACA L.A.;MACHADO S.A.S. Utilização de técnicas eletroanalíticas na determinação de pesticidas em alimentos. **Química Nova**, v. 29, n.1, p.105-112, 2006.

GALLI, A.; DE SOUZA, D.; MACHADO Pendimethalin determination in natural water, baby food and river sediment samples using electroanalytical methods. **Microchemical Journal**. v. 98, p.135–143, 2011.

GARBELLINI, G. S. PEDROSA, V. A., SALAZAR-BANDA, G. R. AVACA, L. A. Metodologias eletroanalíticas para a determinação de herbicidas triazínicos por voltametria de onda quadrada e técnicas de deconvolução. **Química Nova**, Vol. 30, No. 8, 2025-2034, 2007.

GHONEIM, E.M.; EL-DESOKY, H.S.; GHONEIM, M.M. Adsorptive cathodic stripping voltammetric assay of the estrogen drug ethinylestradiol in pharmaceutical formulation and human plasma at a mercury electrode. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 40, p. 255–261, 2006.

GONZALO-LUMBRELAS, R.; IZQUIERDO-HORNILLOS, R. Optimization and validation of convencional and micelar LC methods for the analysis of methyltestosterone in sugar-coated pills. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.31, n.1, p. 201-208,

2003.

GOOGLE EARTH. Disponível em: <<http://earthgoogle.com/intl/pt/>> Acesso em: 18 set. 2011.

GOSSER-Jr, K. D. Cyclic Voltammetry: simulation and analysis of reaction mechanisms. *New York: VCH*, p. 97-103, 1993.

GOYAL, R. N.; BISHNOI, S. Simultaneous voltammetric determination of prednisone and prednisolone in human body fluids. **Talanta**, v. 79, p. 768–774, 2009.

GOYAL, R. N.; BISHNOI, S.; RANA, A. R. S. A sensitive voltammetric sensor for detecting betamethasone in biological fluids. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 13, p., 610-618, 2010 a.

GOYAL, R. N.; CHATTERJEE, S.; RANA, A. R. S. A comparison of edge and basal-plane pyrolytic graphite electrodes towards the sensitive determination of hydrocortisone. **Talanta**, v. 83, p. 149–155, 2010 b.

GOYAL, R. N.; GUPTA, V. K.; CHATTERJEE, S. Electrochemical investigations of corticosteroid isomers - testosterone and epitestosterone and their simultaneous determination in human urine. **Analytica Chimica Acta** . p. v., 657, p.147–153, 2010 c.

GRASSI, M. T. As águas do Planeta Terra. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**. Edição especial, p. 31-46, 2001.

HERNÁNDEZ, P.; DABRIO-RAMOS, M.; PATÓN, F.; BALLESTEROS, Y.;
HERNÁNDEZ, L. Determination of abscisic acid by cathodic stripping square wave voltammetry. **Talanta**, v. 44, p.1783–1792, 1997.

HERNÁNDEZ-OLMOS, M. A.; AGUI, L.; YANÉZ-SEDENO, P.; PINGARRÓN, J. M. Analytical Voltammetry in low-permittivity organic solvents using disk and cylindrical microelectrodes. Determination of thiram in ethyl acetate. **Electrochimica Acta**, v. 46, p.289-294, 2000.

HOMKLIN, S.; KEE ONG, S.; LIMPIYAKORN, T. Biotransformation of 17 α -methyltestosterone in sediment under different electron acceptor conditions. **Chemosphere**, v. 82, p. 1401–1407, 2011.

JOHNSON, M. D. Anabolic steroid use in adolescent athletes. **Sport Medicine**. v.37, n. 5, p.1111–23. 1990.

KIM, F. J. P. **Efeitos do hormônio 17 α -metilttestosterona na masculinização do Peixe *Betta splendens* REGAN, 1909**. 2007. 48 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiros e Aquicultura) – Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, PE.

BOYD, C. E.; QUEIROZ, J. Aquaculture pond effluent management. **Aquaculture Asia**, **Bangkok**, v.2, p.43-46, 1997.

LE BIZEC, B. PINEL, G. ANTIGNAC, J.P. Options for veterinary drug analysis using mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 8016–8034, 2009.

LIBÂNIO, M. **Fundamentos de Qualidade e Tratamento de Água**. 1ª Edição. Campinas: Editora Átomo, 2005. 444 p.

LOPES, L.G.; MARCHI, M. R.R.; SOUZA, J. B.G.; MOURA, J. A.; LORENZON, C. S.; CRUZ, C.; AMARAL, L. A. Estrogênios em Águas Naturais e Tratadas da Região de Jaboticabal – São Paulo. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 639-643, 2010.

MARWAH, A.; MARWAH, P.; LARDY, H. Development and validation of a high performance liquid chromatography assay for 17 α -methyltestosterone in fish feed. **Journal of Chromatography B**, v. 824, p. 107-115, 2005.

McFARLAND, V.A.; CLARKE, J.L. Environmental occurrence abundance and potential toxicity of polychlorinated biphenyl congeners: considerations for a congener specific analysis. **Environmental Health Perspectives, Research Triangle Park**, v. 81 p. 225-239, 1989.

MIRCESKI, V.; KOMORSKY-LOVRIC, S.; LOVRIC, M. **Square Wave Voltametry**.

Theory and application. New York: Springer, 2007. 201p.

NELSON, D. L.; COX, M. **Lehninger – Princípios de Bioquímica.** 3 ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 1009p.

OLIVEIRA, R. C. O panorama da aquicultura no Brasil: a prática com foco na sustentabilidade. **Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v.2, n.1, 2009.

OLIVEIRA, R. T. S.; MACHADO, S.A.S. Quantificação do pesticida diclorvos por voltametria de onda quadrada em águas puras e naturais. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 911-915, 2004

OSTERYOUNG, J.; O'DEA, J.J. Square-wave voltametry. In: BARD, A. J. **Electroanalytical Chemistry.** New York: Marcel Dekker. v. 14, p. 209-308. 1982

PANDIAN, T. J., SHEELA, S. G. & KAVUMPURATH, S. Endocrine sex reversal in fishes: masculinization evokes greater stress and mortality. Research Communications. **Current Science.** v. 66, n. 3, p. 240-243. 1994.

PETROVIC, M.; ELJARRAT, E.; LOPEZ DE ALDA, M.J.; BARCELÓ, D. Endocrine Disrupting Compounds and other emerging contaminants in the environment: A survey on new monitoring strategies and occurrence data. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 378, p. 549-562, 2003.

PIWOWARSKA, I., RADOWICK, S., PACHECK, I. Simultaneous determination of eight estrogens and their metabolites in serum using liquid chromatography with electrochemical detection. **Talanta**, v. 81, p. L-280, 2010.

RAMALEY, L.; KRAUSE Jr., M. S. Analytical Application of Square Wave Voltammetry. **Analytical Chemistry**, v. 41, n. 11, p. 1365-1369, 1969 b.

RAMALEY, L.; KRAUSE Jr., M. S. Theory of square wave voltammetry. **Analytical Chemistry**, v. 41, n. 11, p. 1362-1365, 1969 a.

REIS FILHO, R. W. F.; ARAÚJO, J. C.; VIEIRA, E. M. Hormônios sexuais estrógenos: contaminantes bioativos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 817-822, 2006.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIVERA-ARCE, J. C.; MORALES-CRESPO, L.; VARGAS-PINTO, N.; VELÁZQUEZ, K. T.; JORGE, J. C. Central effects of the anabolic steroid 17 α -methyltestosterone in female anxiety. **Pharmacology, Biochemistry e Behavior**, v. 84, n.2, p.275-281, 2006.

RUPP, E. B.; ZUMAN, P. Polarographic determination of some pesticides. Application to a study of their adsorption on lignin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, n 10, p. 2016-2021, 1992.

SANTOS, K.; BRAGA, O.; VIEIRA C.; SPINELLI A. Electroanalytical determination of estriol hormone using a boron-doped diamond electrode. **Talanta**, v. 80, p. 1999–2006, 2010.

SCHELLENBEG, K.; LEUENBERGER, C.; SCHWARZENBACH, R. P. Sorption of Chlorinated Phenols by Natural Sediments and Aquifer Materials. **Environmental Science Technology**, v. 18, n. 9, p. 625-657, 1984.

SCHMELZING, Th. O.; GALL, G.A.E. Use of 17 α -methyltestosterone to sex inverse gynogenic female rainbow trout. **Journal of Applicative Ichthyology**. v. 7, p.120–128. 1991.

SILVA, P. R. P.; DANIELSKI, R.; CZEPIELEWSKI, M A. Esteróides anabolizantes no esporte. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**. v. 8, n. 6, 2002.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Principles of Instrumental Analysis**. Philadelphia: Saunders College, 1998. 917p.

SKOOG, D.A.; WEST, D.M.; HOLLER F.J.; CROUCH, S.R., **Fundamentos de Química Analítica**, Tradução da 8a Edição Norte-Americana, Thomson Learning, São Paulo, 2006,

999 p.

SOUZA D.; CODOGNOTO, L.; MALAGUTTI, A. R.; TOLEDO, R. A. PEDROSA, R. T. S.; OLIVEIRA, R. T. S.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. S. Voltametria de Onda Quadrada. Segunda Parte: Aplicações. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 790-797, 2004.

SOUZA D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Voltametria de Onda Quadrada. Primeira Parte: Aspectos Teóricos. **Química Nova**, v. 26, n. 1, 81-89, 2003.

SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S. Estudo Eletroanalítico do herbicida paraquat em soluções aquosas por voltametria de onda quadrada utilizando ultramicroeletrodos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 644-647, 2003.

SZCZEPANIAK, W.; CZYZOWICZ, B.; REN, M. Voltammetric determination of prometryne in soil and water. **Analytica Chimica Acta**, v. 305, p. 207-211, 1995.

TERNES, T. A.; STUMPF, M.; MUELLER, J.; HABERES, K.; WILKEN, R. D.; SERVO, M.; Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants – I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 225, p. 81-90, 1999.

TÖLGYESI, A.; VEREBEY, Z.; SHARMA, V. K.; KOVACSICS, L.; FEKETE, J. Simultaneous determination of corticosteroids, androgens, and progesterone in river water by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Chemosphere**, v. 78, p. 972–979, 2010.

URBATZKA, R.; CAUWENBERGE, A. V.; MAGGIONI, S.; VIGANO, L.; MANDICH, A.; BENFENATI, E.; LUTZ, I.; KLOAS, W. Androgenic and antiandrogenic activities in water and sediment samples from the river Lambro, Italy, detected by yeast androgen screen and chemical analyses. **Chemosphere**, v. 67, p. 1080–1087, 2007.

VAZ, C. M. P.; CRESTANA, S.; MACHADO, S. A. S.; MAZO, L. H.; MASSAROPI, M. R.C.; AVACA, L. A. Determinação de pesticidas por técnicas eletroanalíticas. **Pesticidas, Revista Técnico-Científica**, v. 6, p. 55-74, 1996.

VON SPERLING, M. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgoto**. 2. Ed. Ampliada. Belo Horizonte: UFMG. 1996, 196 p.

WANG, J. **Analytical Electrochemistry**. New York. John Wiley. Second Edition, 2000. 209 p.

WANG, J.; PERCIO, A. M. F.; MAHAMOUD, J. S. Adsorptive Stripping Voltametry of sex hormones at the static mercury drop electrode. **Analytica Chimica Acta**, v.171, p. 195-204, 1985.

ZANARDI, M. F.; KOBERSTEIN, T. C. R. D.; URBINATI, E. C.; FAGUNDES M.; SANTOS, M. A.; MATAQUEIRO, M. I. Concentrações de hormônio na carcaça de tilápias do Nilo e maturação precoce após reversão sexual. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n.1, p.7-11, 2011.

ZANINI, O. **Farmacologia Aplicada**. 5 ed. São Paulo: Atheneu, 1994, 739 p