

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE

**CONTAMINANTES EMERGENTES EM ÁGUAS NATURAIS: DETERMINAÇÃO DE  
FÁRMACOS E HORMÔNIOS EMPREGANDO VOLTAMETRIA**

Dissertação de Mestrado

Chalder Nogueira Nunes

GUARAPUAVA – PR

2014

CHALDER NOGUEIRA NUNES

CONTAMINANTES EMERGENTES EM ÁGUAS NATURAIS: DETERMINAÇÃO DE  
FÁRMACOS E HORMÔNIOS EMPREGANDO VOLTAMETRIA

Dissertação de mestrado  
apresentada à Universidade Estadual  
do Centro Oeste – UNICENTRO como  
parte de avaliação do programa de  
Pós Graduação em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Sueli Pércio Quináia

Co-orientadora: Profa. Dra. Vanessa Egéa dos Anjos

GUARAPUAVA – PR

2014

Nunes, Chalder Nogueira

N972c            Contaminantes emergentes em águas naturais: determinação de fármacos e hormônios empregando voltametria / Chalder Nogueira Nunes. – Guarapuava, 2014

xviii, 113 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de Pós-Graduação em Química, 2014

Orientadora: Sueli Pércio Quináia

Co-orientadora: Vanessa Egéa dos Anjos

Banca examinadora: Mauro Chierici Lopes, Elizabeth Weinhardt Scheffer

#### Bibliografia

1. Química. 2. Contaminantes emergentes. 3. Ambientes aquáticos. 4. Alprazolam. 5. 17a-etinilestradiol. 6. Voltametria. 7. Eletrodo de gota pendente de mercúrio. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Química.

CDD 660

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus;

Aos meus amigos e colegas que estiveram presentes durante estes dois anos, dando motivos e forças para continuar, e que tiveram, sobretudo, paciência e tolerância comigo, enfim, aos AMIGOS.

Ao aluno de iniciação científica e meu amigo Lucas, pelo auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

À minha família, meus pais Gilmar e Marisa e minha irmã Scheisi, os quais são o principal motivo da minha vida;

Às minhas orientadoras Profa. Dra. Sueli Pércio Quináia e Profa. Dra. Vanessa Egéa dos Anjos pela paciência, amizade, confiança e ensinamentos transmitidos;

Aos professores do Departamento de Química, sempre disponíveis para sanar dúvidas, dar ideias e tomar uma cervejinha;

Aos colegas e também amigos do LABGATI e CRONAT pelo auxílio e pelos momentos juntos;

À coordenação e secretaria do programa de Pós-Graduação em Química da UNICENTRO;

À Capes e Fundação Araucária pela bolsa concedida;

À UNICENTRO;

E a todos que colaboraram de alguma forma neste trabalho.

## RESUMO

Os contaminantes emergentes compreendem uma série de substâncias naturais e sintéticas, ainda pouco estudadas. Dentre estes contaminantes, destacam-se os produtos farmacêuticos e de higiene pessoal, defensivos agrícolas, produtos industriais, entre outros. Este trabalho teve por objetivo o desenvolvimento de métodos de análise empregando voltametria para determinação do psicofármaco alprazolam e do contraceptivo sintético, 17 $\alpha$ -etinilestradiol, em águas naturais. As condições experimentais para análise voltamétrica de cada fármaco foram otimizadas, tais como eletrólito de suporte, pH, diluição de amostras e parâmetros instrumentais. A voltametria cíclica foi empregada a fim de determinar a natureza do processo eletroquímico envolvido nas análises voltamétricas de ambos os analitos. As metodologias desenvolvidas foram validadas por meio de estudos de linearidade, sensibilidade, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), exatidão, precisão e seletividade. Para o alprazolam, os limites de detecção e quantificação foram 0,1  $\mu\text{g L}^{-1}$  e 0,4  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente. Para esse mesmo fármaco, nos testes de precisão foram obtidos valores inferiores a 10% para o desvio padrão relativo. Com relação aos testes de exatidão, as recuperações alcançadas variaram entre 96 e 116 %. Os LD e LQ para o 17 $\alpha$ -etinilestradiol foram 0,5  $\mu\text{g L}^{-1}$  e 1,6  $\mu\text{g L}^{-1}$  respectivamente. O desvio padrão relativo alcançado nos testes de precisão foi inferior a 15% e as recuperações variaram entre 90 e 106 %. Após a validação dos métodos desenvolvidos, os fármacos foram determinados em águas de rios e nascentes da região próxima ao município de Guarapuava-PR. As amostras coletadas da nascente, do riacho Carro Quebrado e da montante do rio Cascavel foram analisadas, porém as concentrações ficaram abaixo do limite de detecção para ambos os fármacos. Para uma amostra do Rio Cascavel, localizado na jusante da estação de tratamento de esgoto do município, a concentração média determinada de alprazolam foi  $5,9 \pm 0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ . A presença deste contaminante na jusante do rio evidencia a ineficácia dos processos de tratamento atualmente empregados. Sabe-se que espécies psicoativas causam mudanças comportamentais em alguns organismos aquáticos, porém os efeitos da exposição crônica às substâncias psicoativas ainda são pouco conhecidos.

**Palavras-Chave:** Contaminantes emergentes, ambientes aquáticos, alprazolam, 17 $\alpha$ -etinilestradiol, voltametria, eletrodo de gota pendente de mercúrio.

## ABSTRACT

Emerging contaminants comprise a series of natural and synthetic chemical substances including pharmaceutical, and personal care products, pesticides, industrial products, and other. These substances are poorly studied. The analytical methods employing voltammetry for determination of psychotropic drug, alprazolam, and synthetic contraceptive, 17 $\alpha$ -ethinylestradiol, in natural waters was developed. The experimental conditions of voltammetric analysis for each drug was optimized, such as supporting electrolyte, pH, dilution of the samples and voltammetric conditions. Cyclic voltammetry was used to determine the nature of the electrochemical process involved. The developed methods were validated through studies of linearity, sensitivity, limits of detection (LOD) and quantification (LOQ), accuracy, precision and selectivity. For alprazolam, limits of detection and quantification were 0.1  $\mu\text{g L}^{-1}$  and 0.4  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectively. The relative standard deviation was below 10 % in the precision tests for alprazolam. The recoveries ranged of 96 to 116% for accuracy tests. The LOD and LOQ to 17 $\alpha$ -ethinylestradiol were 0.5  $\mu\text{g L}^{-1}$  and 1.6  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectively. The relative standard deviation was less than 15% in the tests of precision and the recoveries ranged of 90 to 106% for contraceptive. The drugs were determined in samples of natural water from rivers, and springs next to Guarapuava region, Paraná, Brazil. The samples were collected from the spring, the Carro Quebrado stream and upstream of Cascavel River. The concentrations determined in the samples were below the limit of detection for both drugs. The concentration of alprazolam determined in Cascavel River located in the downstream of municipal sewage treatment plant was  $5.9 \pm 0.5 \mu\text{g L}^{-1}$ . The presence of alprazolam in the downstream of the Brazilian river showed that the sewage treatment processes was ineffective. It is known that psychoactive species cause behavioral changes in some aquatic organisms, but the effects of chronic exposure to psychoactive substances are poorly understood.

**Keywords:** Emerging contaminants, alprazolam, 17 $\alpha$ -ethinylestradiol, aquatic environments, voltammetry, hanging mercury drop electrode.

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	i
<b>RESUMO</b> .....	ii
<b>ABSTRACT</b> .....	iii
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	vii
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	xiv
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	xv
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	20
<b>3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	21
<b>3.1. Fármacos e hormônios</b> .....	24
3.1.1. O psicotrópico Alprazolam.....	27
3.1.2. O contraceptivo sintético 17 $\alpha$ -etinilestradiol.....	39
<b>3.2. Métodos analíticos empregados na determinação de fármacos em matrizes ambientais</b> .....	32
<b>3.3. As técnicas eletroanalíticas</b> .....	34
3.3.1. As técnicas pulsadas.....	37
3.3.2. Voltametria cíclica.....	39
3.3.3. Métodos de redissolução.....	40
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	42
<b>4.1. Técnicas limpas</b> .....	42
<b>4.2. Equipamentos</b> .....	42
<b>4.3. Reagentes e soluções</b> .....	42
<b>4.4. Desenvolvimento de metodologias analíticas para determinação de ALP e ETE por voltametria</b> .....	43
<b>4.5. Validação dos métodos analíticos desenvolvidos</b> .....	45
4.5.1. Avaliação da forma de calibração, linearidade e sensibilidade.....	45
4.5.2. Limites de detecção e quantificação.....	46
4.5.3. Estudo de interferentes.....	46
4.5.4. Precisão.....	47

4.5.5. Exatidão.....	48
4.6. Amostragem.....	48
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>52</b>
<b>5.1. OTIMIZAÇÃO DE PARÂMETROS ANALÍTICOS E DETERMINAÇÃO DO ALPRAZOLAM.....</b>	<b>52</b>
5.1.1. Avaliação do processo eletroquímico do ALP por voltametria cíclica.....	52
5.1.2. Otimização dos parâmetros voltamétricos para a determinação de ALP em matrizes ambientais.....	57
5.1.2.1. Velocidade de varredura.....	57
5.1.2.2. Potencial de acumulação.....	58
5.1.2.3. Tempo de acumulação.....	60
5.1.2.4. Tempo de equilíbrio.....	61
5.1.2.5. Amplitude de pulso.....	62
5.1.2.6. Tempo de pulso.....	63
5.1.2.7. Parâmetros otimizados no desenvolvimento do método para a determinação do ALP.....	64
5.1.3. Validação do método analítico desenvolvido para determinações de ALP em amostras ambientais de água.....	65
5.1.3.1. Avaliação da Linearidade.....	65
5.1.3.2. Limites de detecção e quantificação.....	68
5.1.3.3. Estudo de interferentes.....	69
5.1.3.4. Precisão.....	76
5.1.3.5. Exatidão.....	77
5.1.4. Aplicações para o método desenvolvido para o ALP.....	78
5.1.5. Conclusões.....	81
<b>5.2. OTIMIZAÇÃO DE PARÂMETROS ANALÍTICOS E DETERMINAÇÃO DO 17<math>\alpha</math>-ETINILESTRADIOL.....</b>	<b>82</b>
5.2.1. Avaliação do processo eletroquímico do ETE por voltametria cíclica.....	82
5.2.2. Escolha de eletrólito suporte e potencial hidrogeniônico para determinações de ETE.....	86

<b>5.2.3. Otimização dos parâmetros voltamétricos para a determinação de ETE em matrizes ambientais.....</b>	<b>89</b>
<b>5.2.3.1. Tempo de acumulação.....</b>	<b>89</b>
<b>5.2.3.2. Velocidade de varredura.....</b>	<b>90</b>
<b>5.2.3.3. Potencial de acumulação.....</b>	<b>91</b>
<b>5.2.3.4. Amplitude de pulso.....</b>	<b>92</b>
<b>5.2.3.5. Tempo de pulso.....</b>	<b>93</b>
<b>5.2.3.6. Tempo de equilíbrio.....</b>	<b>94</b>
<b>5.2.3.7. Parâmetros otimizados no desenvolvimento do método para a determinação do ETE.....</b>	<b>95</b>
<b>5.2.4. Validação do método analítico desenvolvido para determinações de ETE em amostras ambientais de água.....</b>	<b>96</b>
<b>5.2.4.1. Avaliação da Linearidade.....</b>	<b>96</b>
<b>5.2.4.2. Limites de detecção e quantificação.....</b>	<b>98</b>
<b>5.2.4.3. Estudo de interferentes.....</b>	<b>98</b>
<b>5.2.4.4. Precisão.....</b>	<b>99</b>
<b>5.2.4.5. Exatidão.....</b>	<b>100</b>
<b>5.2.5. Aplicações do método desenvolvido para o ETE.....</b>	<b>101</b>
<b>5.2.6. Conclusões.....</b>	<b>103</b>
<b>5.3. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>104</b>
<b>6. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>105</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Possíveis rotas de contaminação de corpos aquáticos. Adaptado de Santana, 2013.....	22
<b>Figura 2.</b> Estrutura básica das 1,4-benzodiazepinas. Adaptado de Westland e Dorman, 2013.....	28
<b>Figura 3.</b> Estrutura básica dos esteróides. Adaptado de Sodré et al., 2007.....	30
<b>Figura 4.</b> Sinais de excitação de tensão em função dos tempos empregados na voltametria. (a) Varredura Linear. (b) Onda quadrada. (c) Pulso diferencial para instrumentos analógicos. (c') Pulso diferencial para instrumentos digitais. (d) Triangular. Adaptada de Skoog et al., 2006.....	37
<b>Figura 5.</b> Representação formação do sinal de excitação em função do tempo para voltametria de onda quadrada. Adaptado de Aleixo, 2003.....	38
<b>Figura 6.</b> Resposta de corrente para uma reação reversível, obtida por voltametria de onda quadrada. Adaptado de Skoog et al., 2006.....	39
<b>Figura 7.</b> Sinal de excitação e voltamograma cíclico. (a) Sinal de excitação triangular para VC. (b) Voltamograma cíclico típico para uma espécie reversível. Adaptado de Skoog et al., 2006.....	40
<b>Figura 8.</b> Mapa do município de Guarapuava indicando os pontos de coleta das amostras de água (Google Maps).....	49
<b>Figura 9.</b> Fotografias referentes aos pontos de coleta de água no município de Guarapuava-PR. (a) Nascente de água (Bairro Batel). (b) Rio Carro Quebrado (Vila Carli). (c) Lago presente no campus CEDETEG – UNICETRO (Vila Carli). (d) Montante da ETE do Município de Guarapuava (Rio Cascavel). (e) Jusante da ETE do Município de Guarapuava (Rio Cascavel).....	50
<b>Figura 10.</b> Fórmula estrutural do ALP, adaptado de Habeeb et al., 1989b.....	52
<b>Figura 11.</b> Determinação de ALP ( $100,4 \mu\text{g L}^{-1}$ ) em meio de Tampão fosfato, pH 7,0 empregando voltametria cíclica e com variação da velocidade de varredura. (a) Voltamograma cíclico do tampão fosfato na ausência de ALP, pH 7,0, denominado de controle. Velocidade de varredura, $100 \text{ mV s}^{-1}$ . (b) Voltamogramas cíclicos completos obtidos na determinação ALP em tampão fosfato pH 7. (c) Seleção da melhor faixa de potencial para mostrar o pico do	

ALP. Parâmetros utilizados, $E_{ac}$ : -0,8 V; $t_{ac}$ : 120 s; $t_{eq}$ : 5 s, $\Delta E$ : -0,6 até -1,6 V...	54
<b>Figura 12.</b> Tratamento dos dados obtidos na determinação do ALP por voltametria cíclica com variação da velocidade de varredura a fim de compreender os processos eletroquímicos envolvidos no processo. Dependência da intensidade de corrente em função da velocidade de varredura da voltametria cíclica.....	55
<b>Figura 13.</b> Tratamento dos dados obtidos na determinação do ALP por voltametria cíclica com variação de velocidade de varredura a fim de compreender os processos eletroquímicos envolvidos no processo (a) Dependência da intensidade de corrente com a raiz quadrada da velocidade de varredura da voltametria cíclica. (b) Variação do logaritmo da corrente em função dos valores de logaritmo em base 10 da velocidade de varredura do potencial.....	55
<b>Figura 14.</b> Sinal voltamétrico do ALP. (a) Sinal analítico do ALP e eletrólito suporte tampão fosfato, pH 7. (b) Voltamogramas obtidos na determinação do antidepressivo ALP ( $19,5 \mu\text{g L}^{-1}$ ) em meio de tampão fosfato com diferentes valores de pH empregando $VA_{ds}RC-PD$ , eletrólito suporte pH 7. Velocidade de varredura, $25 \text{ mV s}^{-1}$ ; $t_{eq}$ , 5s; $E_{ac}$ , -0,8 V; $t_{ac}$ , 60 s; $\Delta E$ , -0,6 até -1,2 V; amplitude de pulso, 50 mV e tempo de pulso 40 ms.....	57
<b>Figura 15.</b> Variação da intensidade de corrente em função da velocidade de varredura (a) Voltamogramas obtidos para a determinação de ALP ( $56,3 \mu\text{g L}^{-1}$ ) em tampão fosfato, pH 7 utilizando a $VA_{ds}RC-PD$ com diferentes velocidades de varredura do potencial, (b) Relação entre a intensidade de corrente de pico do ALP em função da velocidade de varredura. Parâmetros utilizados, $t_{eq}$ , 5s; $E_{ac}$ , -0,8 V; $t_{ac}$ , 60 s; $\Delta E$ , -0,6 até -1,1 V; amplitude de pulso, 50 mV e tempo de pulso, 40 ms.....	58
<b>Figura 16.</b> Variação da intensidade de corrente em função do potencial de acumulação (a) Voltamogramas obtidos na determinação de $56,3 \mu\text{g L}^{-1}$ de ALP em meio de tampão fosfato pH 7 variando os potenciais de acumulação utilizando $VA_{ds}RC-PD$ . (b) Relação entre intensidade de corrente de pico em função do potencial de acumulação. Velocidade de varredura, $25 \text{ mV s}^{-1}$ ; $t_{eq}$ , 5s; $t_{ac}$ , 60 s; $\Delta E$ , -0,6 até -1,2 V; amplitude de pulso, 50 mV e tempo de pulso 40 ms.....	59

<b>Figura 17.</b> Variação da intensidade de corrente em função do tempo de acumulação empregado. (a) Voltamogramas obtidos para a determinação de 56,3 $\mu\text{g L}^{-1}$ de ALP em diferentes tempos de acumulação, utilizando a $\text{VA}_{\text{dsRC}}$ -PD em tampão fosfato, pH 7. (b) Variação da intensidade de corrente de pico em função do tempo de acumulação aplicado. Velocidade de varredura, 25 $\text{mV s}^{-1}$ ; $t_{\text{eq}}$ , 5s; $E_{\text{ac}}$ , -0,8 V; $\Delta E$ , -0,6 até -1,2 V; amplitude de pulso, 50 mV e tempo de pulso 40 ms.....	60
<b>Figura 18.</b> Variação da intensidade de corrente em função da variação da amplitude de pulso (a) Voltamogramas obtidos para a determinação de 56,33 $\mu\text{g L}^{-1}$ de ALP por $\text{VA}_{\text{dsRC}}$ em tampão fosfato pH 7 utilizando diferentes valores de amplitude de pulso. (b) Relação entre intensidade de corrente de pico em função da amplitude de pulso utilizado. Velocidade de varredura, 25 $\text{mV s}^{-1}$ ; $t_{\text{eq}}$ , 5s; $E_{\text{ac}}$ , -0,8 V; $t_{\text{ac}}$ , 60 s; $\Delta E$ , -0,6 até -1,2 V e tempo de pulso 40 ms.....	63
<b>Figura 19.</b> Variação da intensidade de corrente em função do tempo de pulso aplicado (a) Voltamogramas obtidos no estudo da influência do tempo de pulso na determinação de 56,33 $\mu\text{g L}^{-1}$ de ALP utilizando a $\text{VA}_{\text{dsRC}}$ -PD em meio de tampão fosfato, pH 7.(b) Curva da intensidade de corrente em função do tempo de pulso. Velocidade de varredura, 25 $\text{mV s}^{-1}$ ; $t_{\text{eq}}$ , 5s; $E_{\text{ac}}$ , -0,8 V; $t_{\text{ac}}$ , 60 s; $\Delta E$ , -0,6 até -1,2 V e amplitude de pulso 50 mV.....	64
<b>Figura 20.</b> Resultados obtidos no estudo da calibração e avaliação da linearidade. (a) Voltamogramas obtidos na determinação de ALP utilizando $\text{VA}_{\text{dsRC}}$ -PD em tampão fosfato pH 7 por meio de curva de adição padrão. (b) Curva de adição padrão para o ALP. Parâmetros voltamétricos conforme Tabela 4.....	66
<b>Figura 21.</b> Estudo da linearidade (a) Faixa linear dinâmica. (b) Curva de adição padrão para o ALP em sua faixa linear.....	67
<b>Figura 22.</b> Resultados obtidos nos testes de interferência com $\text{Zn}^{2+}$ . (a) Voltamogramas obtidos nos testes de interferência do zinco na determinação do ALP utilizando $\text{VA}_{\text{dsRC}}$ -PD em meio de tampão fosfato pH 7. (b) Gráfico da variação da intensidade de corrente de pico do ALP em função das adições de $\text{Zn}^{2+}$ . Condições de análise: Velocidade de varredura, 25 $\text{mV s}^{-1}$ ; $t_{\text{eq}}$ , 5s; $E_{\text{ac}}$ , -0,8V; $t_{\text{ac}}$ , 120 s; $\Delta E$ , -0,7 até -1,0 V; tempo de pulso 40 ms e amplitude de	

pulso 80 mV.....	70
<b>Figura 23.</b> Fórmula estrutural do lorazepam, adaptado de Sampaio, 2007.....	71
<b>Figura 24.</b> Resultados obtidos nos testes de interferência com o psicofármaco lorazepam. (a) Voltamogramas obtidos nos testes de interferência do psicofármaco lorazepam na determinação do ALP utilizando VA <sub>ds</sub> RC-PD em meio de tampão fosfato pH 7. (b) Gráfico da variação da intensidade de corrente de pico do ALP em função das adições de lorazepam. Condições de análise: Velocidade de varredura, 25 mV s <sup>-1</sup> ; t <sub>eq</sub> , 5 s; E <sub>ac</sub> , -0,8 V; t <sub>ac</sub> , 120 s; ΔE, -0,7 até -1,0 V; tempo de pulso 40 ms e amplitude de pulso 80 mV.....	72
<b>Figura 25.</b> Voltamogramas obtidos nos testes de interferência do contraceptivo ETE na determinação do ALP utilizando VA <sub>ds</sub> RC-PD em meio de tampão fosfato pH 7. Condições de análise: Velocidade de varredura, 25 mV s <sup>-1</sup> ; t <sub>eq</sub> , 5 s; E <sub>ac</sub> , -0,8 V; t <sub>ac</sub> , 120 s; ΔE, -0,7 até -1,0 V; tempo de pulso 40 ms e amplitude de pulso 80 mV.....	73
<b>Figura 26.</b> Resultados obtidos nos estudos de interferência com AH. (a) Voltamogramas do estudo sobre a influência do AH no sinal do ALP, utilizando VA <sub>ds</sub> RC-PD em tampão fosfato, pH 7. (b) Curva da intensidade de corrente em função da concentração de AH adicionada. Velocidade de varredura, 25 mV s <sup>-1</sup> ; t <sub>eq</sub> , 5 s; E <sub>ac</sub> , -0,8 V; t <sub>ac</sub> , 120 s; ΔE, -0,7 até -1,0 V; tempo de pulso 40 ms e amplitude de pulso 80 mV.....	74
<b>Figura 27.</b> Resultados obtidos para estudos filtrando e diluindo soluções contendo 7,51 μg L <sup>-1</sup> de ALP (a) Voltamogramas do sinal analítico do ALP com a amostra <i>in natura</i> (sem filtração) e sem diluição. (b) Voltamograma do sinal analítico de ALP com filtração, utilizando 5 mL de amostra, 4 mL de água e 1 mL de eletrólito, em tampão fosfato pH 7. Velocidade de varredura, 25 mV s <sup>-1</sup> ; t <sub>eq</sub> , 5 s; E <sub>ac</sub> , -0,8 V; t <sub>ac</sub> , 120 s; ΔE, -0,7 até -1,0 V; tempo de pulso 40 ms e amplitude de pulso 80 mV.....	75
<b>Figura 28.</b> Resultados obtidos na determinação de ALP em amostras de água de rios e águas subterrânea de Guarapuava, empregando VA <sub>ds</sub> RC-PD, diluídas para 5 mL de amostra, 4 mL de água ultrapura e 1 mL de eletrólito suporte. (a) Voltamogramas obtidos na determinação do ALP em amostra de	

<p>água subterrânea da nascente localizada no Bairro Batel. (b) Voltamogramas obtidos na determinação do ALP em amostra de água do riacho Carro Quebrado. (c) Voltamogramas obtidos na determinação do ALP em amostra de água a montante da estação de tratamento de esgoto Vassoural. Eletrólito suporte tampão fosfato pH7, velocidade de varredura, <math>25 \text{ mV s}^{-1}</math>; <math>t_{\text{eq}}</math>, 5 s; <math>E_{\text{ac}}</math>, -0,8 V; <math>t_{\text{ac}}</math>, 120 s; <math>\Delta E</math>, -0,7 até -1,0 V; tempo de pulso 40 ms e amplitude de pulso 80 mV.....</p>	78
<p><b>Figura 29.</b> Resultados obtidos na determinação de ALP em jusante da estação de tratamento de esgoto Vassoural (a) Voltamogramas obtidos na determinação do ALP em amostra de água real da jusante de ETE de Guarapuava. (b) Quantificação do ALP por método de adição de padrão. Eletrólito suporte tampão fosfato pH 7, velocidade de varredura, <math>25 \text{ mV s}^{-1}</math>; <math>t_{\text{eq}}</math>, 5 s; <math>E_{\text{ac}}</math>, -0,8 V; <math>t_{\text{ac}}</math>, 120 s; <math>\Delta E</math>, -0,7 até -1,0 V; tempo de pulso 40 ms e amplitude de pulso 80 mV.....</p>	80
<p><b>Figura 30.</b> Fórmula estrutural do ETE, adaptado de Ghoneim et al., 2005.....</p>	82
<p><b>Figura 31.</b> Resultados obtidos para o ETE utilizando VC (a) Voltamograma cíclico completo do eletrólito suporte tampão B-R na ausência de ETE. (b) Voltamogramas cíclicos completos para <math>119,5 \mu\text{g L}^{-1}</math> do contraceptivo sintético em meio de tampão B-R pH 6,3. (c) Ampliação do pico de redução do ETE. Parâmetros utilizados, <math>t_{\text{ac}}</math>, 150 s; <math>E_{\text{ac}}</math>, -0,7 V; <math>t_{\text{eq}}</math>, 5 s <math>\Delta E</math>, -0,8 até -1,6 V.....</p>	83
<p><b>Figura 32.</b> Tratamento dos dados obtidos na determinação do ETE por VC com variação da velocidade de varredura a fim de compreender os processos eletroquímicos envolvidos no processo. Dependência da intensidade de corrente em função da velocidade de varredura da voltametria cíclica.....</p>	85
<p><b>Figura 33.</b> Tratamento dos dados obtidos na determinação do ETE por VC com variação da velocidade de varredura (a) Dependência da intensidade de corrente com a raiz quadrada da velocidade de varredura. (b) Dependência do log da intensidade de corrente com o log da velocidade de varredura. Parâmetros utilizados, <math>E_{\text{ac}}</math>, -0,7; <math>t_{\text{ac}}</math>, 150s; <math>t_{\text{eq}}</math>, 5 s <math>\Delta E</math>, -0,8 até -1,6 V.....</p>	86
<p><b>Figura 34.</b> Estudos obtidos na determinação do ETE sob diferentes condições</p>	

de pH para o eletrólito suporte tampão B-R, empregando VRC-PD. (a) Voltamogramas obtidos na determinação de  $7,98 \mu\text{g L}^{-1}$  de ETE em meio de tampão B-R em diferentes valores de pH, utilizando VARC-PD. (b) Curva da intensidade de corrente de pico em função do pH. Velocidade de varredura,  $60 \text{ mV s}^{-1}$ ;  $t_{\text{eq}}$ , 5s;  $E_{\text{ac}}$ , -0,7 V;  $t_{\text{ac}}$ , 300 s;  $\Delta E$ , -0,95 até -1,4 V; amplitude de pulso, 50 mV e tempo de pulso 40 ms.....

87

**Figura 35.** Voltamogramas obtidos para avaliação do eletrólito suporte tampão B-R em diferentes valores de pH, sem ajuste de linha base. (a) Voltamogramas obtidos para o eletrólito suporte tampão B-R em diferentes valores de pH,. (b) Voltamogramas obtidos na determinação de  $7,98 \mu\text{g L}^{-1}$  de ETE em meio de tampão B-R pH 6,3, empregando VRC-PD. Velocidade de varredura,  $60 \text{ mV s}^{-1}$ ;  $t_{\text{eq}}$ , 5s;  $E_{\text{ac}}$ , -0,7 V;  $t_{\text{ac}}$ , 300 s;  $\Delta E$ , -0,95 até -1,4 V; amplitude de pulso, 50 mV e tempo de pulso 40 ms.....

88

**Figura 36.** Resultados obtidos na determinação de ETE para diferentes tempos de acumulação. (a) Voltamogramas obtidos para a determinação do ETE ( $5,98 \mu\text{g L}^{-1}$ ) sob diferentes tempos de acumulação, utilizando a VRC-PD em tampão B-R, pH 7. (b) Variação da intensidade de corrente de pico em função do tempo de acumulação utilizado.  $E_{\text{ac}}$ , -0,7 V; velocidade de varredura,  $6 \text{ mV s}^{-1}$ ;  $t_{\text{eq}}$ , 5s;  $\Delta E$ , -0,95 até -1,4 V; amplitude de pulso, 50 mV e tempo de pulso 40 ms.....

90

**Figura 37.** Resultados obtidos na determinação do ETE para diferentes velocidades de varredura, empregando VRC-PD. (a) Voltamogramas obtidos para a determinação de  $19,70 \mu\text{g L}^{-1}$  de ETE em diferentes velocidades de varredura, utilizando a VRC-PD em meio de tampão B-R pH 7,0. (b) Curva da intensidade de corrente de pico em função da velocidade de varredura.  $E_{\text{ac}}$ , -0,5 V;  $t_{\text{eq}}$ , 5s;  $t_{\text{ac}}$ , 60 s;  $\Delta E$ , -0,9 até -1,4 V; amplitude de pulso, 70 mV e tempo de pulso, 50 ms.....

91

**Figura 38.** Resultados obtidos para a determinação do ETE em empregando diferentes potenciais de acumulação. (a) Voltamogramas obtidos na determinação de  $19,7 \mu\text{g L}^{-1}$  de ETE em meio de tampão B-R pH 7 em diferentes potenciais de acumulação utilizando VRC-PD. (b) Relação entre intensidade de corrente de pico e o potencial de acumulação. Velocidade de varredura,  $90 \text{ mV s}^{-1}$ ;  $t_{\text{eq}}$ , 5s;  $t_{\text{ac}}$ , 150 s;  $\Delta E$ , -0,9 até -1,4 V; amplitude de pulso,

70 mV e tempo de pulso 50 ms.....	92
<b>Figura 39.</b> Resultados obtidos na determinação de ETE sob diferentes amplitudes de pulso(a) Voltamogramas obtidos para a determinação de 19,7 $\mu\text{g L}^{-1}$ de ETE por VRC-PD em tampão B-R pH 7 sob diferentes valores de amplitude de pulso. (b) Relação entre intensidade de corrente de pico em função da amplitude de pulso utilizado. Velocidade de varredura, 90 $\text{mV s}^{-1}$ ; $t_{\text{eq}}$ , 5s; $E_{\text{ac}}$ , -0,8 V; $t_{\text{ac}}$ , 150 s; $\Delta E$ , -0,9 até -1,4 V e tempo de pulso 50 ms.....	93
<b>Figura 40.</b> Resultados obtidos na determinação de ETE utilizando diferentes tempos de pulso (a) Voltamogramas obtidos no estudo de variação do tempo de pulso na determinação de 19,7 $\mu\text{g L}^{-1}$ de ETE utilizando a VRC-PD em meio de tampão B-R, pH 7.(b) Relação entre a intensidade de corrente em função do tempo de pulso aplicado. Velocidade de varredura, 90 $\text{mV s}^{-1}$ ; $t_{\text{eq}}$ , 5s; $E_{\text{ac}}$ , -0,8 V; $t_{\text{ac}}$ , 150 s; $\Delta E$ , -0,9 até -1,4 V e amplitude de pulso 70 mV.....	94
<b>Figura 41.</b> Voltamogramas obtidos para a determinação de 7,98 $\mu\text{g L}^{-1}$ de ETE para diferentes tempos de equilíbrio utilizando a $VA_{\text{dsRC}}$ -PD em tampão B-R, pH 7. Velocidade de varredura, 60 $\text{mV s}^{-1}$ ; $E_{\text{ac}}$ , -0,7 V; $t_{\text{ac}}$ , 150 s; $\Delta E$ , -0,95 até -1,4 V Amplitude de pulso 70 mV e tempo de pulso 40 ms.....	95
<b>Figura 42</b> Estudo da calibração e avaliação da linearidade. (a) Voltamogramas obtidos na determinação de ETE utilizando VRC-PD em meio de tampão B-R, pH 6,3. (b) Curva de calibração para o ETE. Parâmetros voltamétricos conforme Tabela 9.....	96
<b>Figura 43.</b> Curva para o estudo de calibração para o ETE em sua faixa linear.....	97
<b>Figura 44.</b> Estudo sobre a interferência do C no sinal voltamétrico do ETE utilizando VRC-PD em meio de tampão B-R, pH 6,3. Parâmetros voltamétricos conforme Tabela 9.....	99
<b>Figura 45.</b> Voltamogramas obtidos na determinação de ETE em amostra real de água da jusante da estação de tratamento de esgoto Vassoural, em meio de eletrólito suporte tampão B-R, pH 6,3, empregando VRC-PD. Parâmetros voltamétricos conforme Tabela 12.....	102
<b>Figura 46.</b> Quantificação do ETE por método de adição de padrão. Eletrólito suporte tampão B-R, pH 6,3.....	102

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Propriedades do psicofármaco, alprazolam (ALP).....	28
<b>Tabela 2.</b> Propriedades do hormônio sintético 17 $\alpha$ -etinilestradiol. (Ferreira, 2008).....	30
<b>Tabela 3.</b> Parâmetros avaliados para o desenvolvimento das metodologias analíticas para a determinação do alprazolam e do 17 $\alpha$ -etinilestradiol em amostras ambientais.....	45
<b>Tabela 4.</b> Localização geográfica dos locais de amostragem de água utilizada para estudos de validação e determinações do ALP e do ETE.....	49
<b>Tabela 5.</b> Resposta analítica do ALP em função do tempo de equilíbrio.....	61
<b>Tabela 6.</b> Parâmetros voltamétricos otimizados para o método analítico desenvolvido para o ALP em amostras ambientais.....	65
<b>Tabela 7.</b> Parâmetros da regressão linear do método analítico desenvolvido para o ALP, para duas faixas de concentração.....	68
<b>Tabela 8.</b> Interferência dos íons metálicos no sinal analítico do ALP.....	69
<b>Tabela 9.</b> Valores determinados experimentalmente para a repetibilidade e precisão intermediária para o método analítico desenvolvido para determinações de ALP.....	76
<b>Tabela 10.</b> Estudos de recuperação do ALP em soluções aquosas e amostras reais enriquecidas.....	77
<b>Tabela 11.</b> Concentração de ALP determinada na amostra de jusante da estação Vassoural de Guarapuava. Considerando o fator de diluição.....	80
<b>Tabela 12.</b> Parâmetros otimizados para o método analítico desenvolvido para o ETE em amostras ambientais.....	95
<b>Tabela 13.</b> Parâmetros da regressão linear do método analítico desenvolvido para o ETE na faixa de concentração estudada.....	97
<b>Tabela 14.</b> Valores determinados experimentalmente para a repetibilidade e precisão intermediária para o método analítico desenvolvido para determinações de ETE.....	100
<b>Tabela 15.</b> Estudos de recuperação do ETE em soluções aquosas e amostras reais enriquecidas.....	101

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AH	Ácido Húmico
ALP	Alprazolam
B-R	Britton – Robinson
BDZs	Benzodiazepínicos
COD	Carbono orgânico dissolvido
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DME	Dropping Mercury Electrode
$\Delta E$	Faixa de potencial
$E_{ac}$	Potencial de acumulação
ET	Eletrodo de trabalho
ETE	17 $\alpha$ - Etinilestradiol
Fr	F de regressão
Ffaj	F de falta de ajuste
HMDE	Hanging Mercury Drop Electrode
$I_p$	Corrente de pico
LC/MS	Liquid Chromatography Mass Spectrometry
LD	Limite(s) de detecção
LQ	Limite(s) de quantificação
PFHP	Produtos farmacêuticos e de higiene pessoal
PD	Pulso diferencial
RSD	Desvio padrão relativo
SD	Desvio padrão
$T_{ac}$	Tempo de acumulação
$T_{eq}$	Tempo de equilíbrio
USEPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da America
v	Velocidade de varredura
VC	Voltametria cíclica
VA <sub>ds</sub> RC-PD	Voltametria adsortiva de redissolução catódica por pulso diferencial
VRA	Voltametria de redissolução anódica

VRC	Voltametria de redissolução catódica
VRC – PD	Voltametria de redissolução catódica por pulso diferencial

## 1. INTRODUÇÃO

O avanço tecnológico alcançado nas últimas décadas tem proporcionado benefícios a uma parcela da população mundial. Entretanto, este estilo de vida moderno, exige uma produção em larga escala de novos materiais para as mais diversificadas aplicações, produtos de higiene pessoal, bens de consumo, medicamentos, alimentos, cosméticos, produtos de limpeza, defensivos agrícolas para controlar a propagação de pragas, entre outros, que acarretam na geração de toneladas de resíduos.

Dentre todos os poluentes e contaminantes gerados, os contaminantes emergentes ou também chamados de contaminantes de preocupação emergente têm se destacado. A sua presença foi confirmada em cursos aquáticos e efluentes de estações de tratamento de esgoto e os riscos que estas substâncias oferecem ao ambiente e aos seres humanos ainda não são totalmente conhecidos. Atualmente não existe uma única definição para contaminantes emergentes e o termo emergente não se deve necessariamente ao fato de serem novos compostos, muitas vezes trata-se de substâncias utilizadas a vários anos. A presença de muitos destes contaminantes em corpos aquáticos está diretamente relacionada ao aporte de esgoto tratado ou bruto nos rios. Isso porque, muitas destas substâncias são simplesmente descartadas ou são produtos da excreção intactos ou metabolizados (Santana, 2013). Aliados à ineficiência de remoção destes compostos pelas estações de tratamento de esgoto, estes contaminantes podem ser encontrados em diversos compartimentos ambientais.

A intensa utilização de medicamentos, as deficiências das estações de tratamento de esgoto e o pequeno número de trabalhos relacionados aos problemas que estas substâncias podem causar em organismos aquáticos e até mesmo aos seres humanos, vêm despertando o interesse dos cientistas (Lajeunesse et al., 2012; Ternes et al., 1999). No Brasil, são poucos os estudos existentes a respeito destes contaminantes em ambientes naturais (Montagner e Jardim, 2011; Miranda et al. 2013, Feitosa et al. 2013). Estes estudos são insuficientes para dimensionar o problema e os efeitos causados ao ambiente aquático e aos seres humanos.

Os estudos referentes aos contaminantes emergentes, em sua maioria, têm utilizado técnicas cromatográficas aliadas à espectrometria de massas. A cromatografia com detector de massa vem sendo utilizada devido às vantagens, tais

como, alta sensibilidade, seletividade, robustez, confiabilidade na identificação e quantificação do analito. Contudo, devido às baixas concentrações dos analitos em matrizes ambientais, torna-se necessário, processos de pré-concentração, extração e limpeza anteriores à etapa de detecção e quantificação do analito. Sendo assim, geralmente são necessárias grandes quantidades de solventes orgânicos tóxicos e processos de tratamento da amostra, que podem envolver etapas de extração e purificação dos analitos. Todos estes procedimentos para o preparo da amostra são complicados e podem tornar a análise trabalhosa, demorada e com elevados custos, inviabilizando análises sucessivas de várias amostras, além da possibilidade de contaminação da amostra e perdas do analito.

Para a determinação de fármacos e hormônios, as técnicas eletroanalíticas, em especial as voltamétricas, são uma opção interessante. A determinação de algumas destas moléculas orgânicas por voltametria, utilizando o eletrodo de gota pendente de mercúrio, é possível por elas apresentarem sítios ativos que sofrem processos de oxidação-redução, resultando em um sinal elétrico proporcional a concentração do analito na amostra. Caracterizam-se também como vantagens a ausência de tratamentos prévios da amostra, mesmo em matrizes mais complexas como amostras ambientais, além do baixo consumo de reagentes e elevada frequência analítica.

A alta sensibilidade da técnica deve-se à voltametria de redissolução (stripping method), onde o analito pode ser pré-concentrado no eletrodo de trabalho com a aplicação de um potencial fixo durante determinado tempo, após alguns segundos de equilíbrio, segue-se uma varredura no potencial desejado, causando a redissolução do analito.

Alguns pesquisadores vêm utilizando a voltametria para determinações de fármacos, em especial psicofármacos e hormônios, em formulações farmacêuticas e amostras biológicas (EL-Enany et al., 2002; Ghoneim et al., 2006). Porém ainda são poucos os estudos a respeito da presença, comportamento, persistência e efeitos ecotoxicológicos destes contaminantes no meio ambiente, especialmente em ambientes aquáticos. Desta forma, o desenvolvimento de métodos analíticos sensíveis, rápidos, e menos custosos mostra-se necessário para a determinação de fármacos e hormônios em águas naturais e de consumo humano. Da mesma maneira é necessária a aquisição de dados acerca da presença destes fármacos em

ambientes aquáticos, sendo que estes resultados poderão auxiliar outras pesquisas a respeito da interferência destas substâncias sobre organismos aquáticos e seres humanos.

## 2. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho consistiram no desenvolvimento de metodologias analíticas de baixo custo baseadas em voltametria para a determinação de contaminantes emergentes, especialmente fármacos, em amostras de interesse ambiental. Além disso, foi avaliada a presença de alguns compostos em águas naturais da região de Guarapuava, Paraná.

Objetivos específicos foram:

- Avaliar a eletroatividade dos fármacos alprazolam e 17 $\alpha$ -etinilestradiol empregando voltametria de redissolução catódica e voltametria cíclica com eletrodo de trabalho de gota pendente de mercúrio;
- Implantação de protocolos analíticos voltados à determinação destes fármacos em matrizes ambientais empregando voltametria;
- Validação dos métodos analíticos desenvolvidos;
- Aplicação dos métodos voltamétricos desenvolvidos e validados em amostras de interesse da região de Guarapuava, Paraná e aquisição de dados a respeito da presença do alprazolam e do 17 $\alpha$ -etinilestradiol em corpos aquáticos da região.

### 3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A água é um recurso indispensável para a vida no nosso planeta, sendo ele o único do nosso sistema solar a apresentar esta substância no estado sólido, líquido e gasoso (Grassi, 2001). A maior parte da superfície terrestre, cerca de 71%, está recoberta por água. Porém, deste montante aproximadamente 97,5% está presente nos oceanos e desta forma torna-se imprópria para o consumo. Dos 2,5% restantes 1,7% estão presas em geleiras restando apenas 0,77% de água doce acessível. Esta água doce encontra-se majoritariamente em rios, lagos, águas subterrâneas e água presente no solo (Grassi, 2001). Entretanto, o estilo de vida adotado atualmente por populações urbanas tem comprometido a qualidade destas águas, reduzindo ainda mais a porcentagem de água apropriada para o consumo humano. Isto ocorre porque, a sociedade atual exige toneladas de alimentos, produtos farmacêuticos e de higiene pessoal (PFHP), bens de consumo, produtos de limpeza, plastificantes, novos materiais e tecnologias, entre outros consumíveis. Toda esta produção acelerada ocasiona inevitavelmente na geração de imensas quantidades de resíduos orgânicos e inorgânicos, os quais nem sempre são tratados adequadamente ou até mesmo são simplesmente dispostos no ambiente. Estes descartes por sua vez acabam contaminando rios, lagos e águas subterrâneas que poderiam ser utilizadas para o consumo humano.

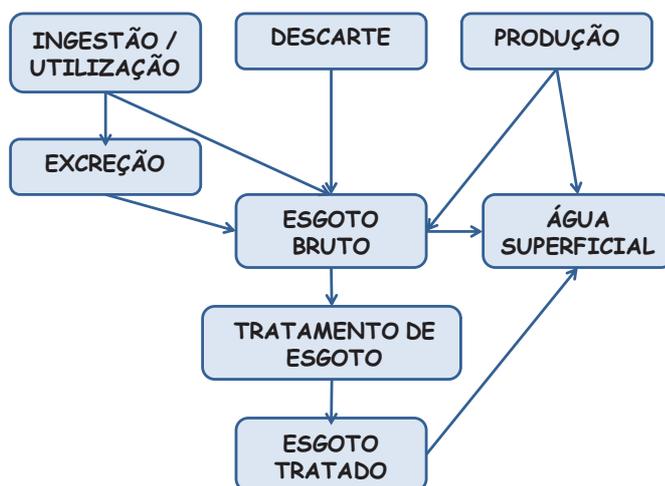
Recentemente, as atenções dos cientistas foram voltadas para os contaminantes emergentes, ou contaminantes de preocupação emergente, que englobam substâncias presentes em produtos e bens de consumo e que, vêm sendo detectados no ar, solo, sedimento, água superficial, água subterrânea, etc. Embora sejam produzidos novos compostos anualmente, o termo emergente não se deve exclusivamente a compostos recentes (Santana, 2013).

Sendo assim, um contaminante emergente pode ser definido como uma substância ou microrganismo que sua presença ou importância no ambiente foi recentemente constatada (Santana, 2013; Collins e Silva, 2011). Para alguns destes contaminantes, sua determinação só tornou-se possível devido a avanços instrumentais que possibilitaram alcançar limites de detecção e quantificação mais baixos (Collins e Silva, 2011).

Os contaminantes ditos emergentes, assim sendo, compreendem produtos farmacêuticos (humano ou veterinário) e de higiene pessoal (PFHP), hormônios

naturais e sintéticos, surfactantes, plastificantes, compostos químicos presentes em embalagens de alimentos, defensivos agrícolas, alguns subprodutos industriais, drogas ilícitas, retardantes de chama, nanomateriais, protetores solares, microrganismos, entre outros (Petrovic´et al.,2003; Sodré et al., 2010; Collins e Silva, 2011).

Estes contaminantes podem alcançar os corpos aquáticos através de diferentes maneiras. Entretanto o esgoto doméstico tratado e/ou bruto é uma das principais formas com que eles aportam em rios. Outras rotas de contaminação de corpos aquáticos por contaminantes emergentes também podem ser traçadas, tais como a pecuária, o descarte de resíduos domésticos, a lixiviação de solos utilizados para a agricultura, entre outros. Indústrias, por exemplo, muitas vezes realizam o tratamento de seus efluentes, através da neutralização do pH do resíduo, diminuição de teores de metais ou matéria orgânica, entre outras substâncias legisladas. Entretanto, alguns contaminantes emergentes, por não serem contemplados pela legislação brasileira e, assim não possuírem dados a respeito de teores máximos permitidos, podem ser descartados sem tratamento adequado (Sodré, 2010; Collins e Silva, 2011). Alguns dos mecanismos pelos quais contaminantes acabam chegando às águas naturais estão esquematizados na Figura 1.



**Figura 1.** Possíveis rotas de contaminação de corpos aquáticos. Adaptado de Santana (2013).

Uma vez presentes em sistemas aquáticos, estes contaminantes podem ser encontrados em concentrações traço, na ordem de  $\text{pg L}^{-1}$  a  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Entretanto, mesmos nestas baixas concentrações, tais contaminantes são capazes de afetar todo o ecossistema. O comportamento destes contaminantes no ambiente, e

principalmente, os efeitos ecotoxicológicos ainda não são completamente compreendidos (Feitosa, 2013, Petrovic', 2003). Os efeitos tóxicos podem ser percebidos em células, órgãos, organismos, população e no ecossistema. É conhecido que alguns desses contaminantes são considerados interferentes endócrinos, ou seja, substâncias exógenas que causam efeitos adversos na saúde de um organismo intacto, ou em seus descendentes, como consequência de alterações do sistema endócrino (Ghiselli e Jardim, 2007). Os organismos em contato direto ou indireto com estes contaminantes podem sofrer uma contaminação crônica, devido à baixa concentração do contaminante e ao longo período de exposição. Os efeitos desta contaminação ainda não são completamente conhecidos.

A maioria das evidências sobre os possíveis efeitos deletérios que os interferentes endócrinos (IE) podem causar nos seres humanos foi obtida através de experimentos *in vivo* com mulheres grávidas. Estas mulheres foram expostas a doses de um medicamento contendo o estrogênio sintético dietil-estibestrol, utilizado para promover o crescimento fetal e evitar o aborto espontâneo. As filhas destas mulheres, em grande parte, tornaram-se estéreis e algumas delas desenvolveram um tipo raro de câncer vaginal. Os homens apresentaram má formação do órgão sexual, diminuição da contagem média de espermatozoides e maior tendência de desenvolver câncer testicular (Birkett e Lester, 2003).

O comportamento e os efeitos dos contaminantes emergentes em matrizes ambientais e biológicas dependem das características físico-químicas da substância. Assim, determinado contaminante pode apresentar biodisponibilidade diferenciada conforme sua afinidade com a água ou com compostos mais apolares, influenciando seu comportamento e a forma como ele pode ser encontrado no ambiente (Ghiselli e Jardim, 2007). Por exemplo, os compostos farmacêuticos apresentam características diferentes, que podem variar de hidrofóbicos à hidrofílicos na seguinte sequência: estrógenos; tranquilizantes; analgésicos; antibióticos (Torres, 2009). Assim, as suas características de hidrofílicidade e hidrofobicidade podem controlar a quantidade em que estes fármacos são encontrados em águas naturais, solos, sedimentos, e também comandam os processos biológicos de absorção dos medicamentos. Os compostos farmacêuticos de características mais hidrofóbicas, presentes em um sistema aquático, apresentam a tendência de possuir maior afinidade com a matéria

orgânica dissolvida ou particulada. Assim, eles podem ser adsorvidos no material em suspensão, minimizando a sua mobilidade no ambiente (Bila e Dezotti, 2003).

As características físico-químicas dos contaminantes emergentes também podem determinar a porcentagem de remoção destas substâncias pelas estações de tratamento de esgoto. Os processos de tratamento de esgoto convencionais envolvem etapas de adsorção em sólidos suspensos, interação com óleos e ácidos graxos, biodegradação aeróbia e anaeróbia, degradação química e volatilização (Bila e Dezotti, 2003). Desta forma, contaminantes com características mais hidrofóbicas podem apresentar maiores taxas de remoção, pelas estações de tratamento de esgoto, que substâncias mais hidrofílicas (Bila e Dezotti, 2003). Além disso, os contaminantes emergentes apresentam estabilidade química distintas, sendo uns mais facilmente degradados que outros. Esta maior estabilidade química de algumas substâncias, permite que elas permaneçam mais tempo intactas no ambiente, mesmo em condições adversas. Alguns destes contaminantes são fotossensíveis, entretanto, quando eles encontram-se sorvidos na matéria orgânica, tornam-se mais protegidos da luz ultravioleta, diminuindo sua degradação no ambiente, por meio da fotólise direta (Bila e Dezotti, 2003). As propriedades físico-químicas destas substâncias, podem também afetar os processos de absorção e metabolização destes compostos pelos organismos vivos. Algumas substâncias não são facilmente metabolizadas e acabam se acumulando ao longo do tempo em órgãos e tecidos de seres vivos. A este processo dá-se o nome de bioacumulação. Quando estes organismos contaminados são consumidos por outros seres ao longo da cadeia alimentar, o processo de bioacumulação alcança proporções maiores, sendo chamado de biomagnificação. Onde os predadores que se alimentam dos seres contaminados, apresentarão concentrações maiores da substância no organismo (Bila e Dezotti, 2003).

### **3.1. Fármacos e hormônios**

Dentre estes contaminantes ditos emergentes, os fármacos e os hormônios, naturais e sintéticos, vêm sendo detectados há algum tempo em diversos compartimentos ambientais e em vários lugares do mundo, tais como Alemanha, Canadá e Brasil. Ternes et al. (1999) avaliaram o comportamento e a ocorrência de alguns estrogênios naturais e sintéticos em estações de tratamento de esgoto

alemãs, canadenses e brasileiras. Hormônios como o  $17\alpha$ -etinilestradiol,  $17\beta$ -estradiol, estrona e alguns metabólitos foram estudados. Sendo que estas espécies foram detectadas no efluente das estações de tratamento de esgoto analisadas. Hirsch et al. (1999) realizaram a determinação de 18 substâncias antibióticas em amostras de efluentes de estações de tratamento de esgoto e águas subterrâneas. A presença destas substâncias foi constatada em ambas as matrizes.

Fármacos são substâncias químicas de estrutura definida e possuem propriedades farmacológicas, ou seja, apresentam algum efeito terapêutico. Eles podem ser de origem vegetal, animal ou de síntese e vêm sendo utilizados há muitos anos (Júnior et al., 2006). Sendo assim, hormônios utilizados para fins terapêuticos são considerados fármacos. Hormônios naturais são substâncias que podem ser produzidas naturalmente por tecidos ou glândulas especializadas, também podem ser sintetizados. Possuem em geral elevado peso molecular e são considerados os mensageiros químicos do corpo. Os hormônios são responsáveis por regular o crescimento, o desenvolvimento, funções do sistema reprodutor, metabolismo, entre outros (Ghiselli e Jardim, 2007).

Os fármacos e hormônios apresentam uma ampla utilização tanto na medicina humana quanto veterinária e quando administrados, geralmente, uma pequena porcentagem do princípio ativo desempenha o seu papel no organismo e é metabolizado, mas outra parte é excretada intacta (Hirsch et al., 1999). Esses compostos apresentam uma elevada estabilidade química e física, mesmo em condições extremas como as que eles enfrentam dentro de um organismo (Pereira, 2007; Bila e Dezotti, 2003). Assim sendo, esses compostos e seus metabólitos quando são coletados e tratados em estações de tratamento de esgoto podem não ser degradados facilmente, por serem resistentes. Deste modo, quando os efluentes tratados atingem os sistemas aquáticos, os fármacos e seus metabólitos continuam ativos e possuem a capacidade de causar efeitos tóxicos em microrganismos presentes no ambiente (Hirsch et al., 1999).

Dentro desta classe de contaminantes emergentes, os fármacos tais como analgésicos, antibióticos, antidepressivos, ansiolíticos, sedativos, contraceptivos, e antiepiléticos vêm sendo encontrados em águas superficiais, solos, sedimento e em afluentes e efluentes de estações de tratamento de esgoto (Pailler et al., 2009; Lajeunesse et al., 2012). Estudos ambientais e toxicológicos com antibióticos e

hormônios têm sido bastante realizados (Ternes et al., 1999; Hirsch et al., 1999; Baquero et al., 2008), devido ao amplo uso e a capacidade elevada de causar problemas ambientais e efeitos tóxicos para organismos. O principal problema causado pelo uso indiscriminado de antibióticos é o surgimento de bactérias resistentes ao medicamento (Hirsch et al., 1999), sendo necessário assim, o desenvolvimento de novas drogas. Abreu et al. (2010), investigaram a presença de bactérias resistentes a diferentes antibióticos, no esgoto bruto do Hospital Universitário Regional de Maringá. Seus resultados indicaram uma utilização expressiva de antibióticos no local, onde tais medicamentos eram lançados direta ou indiretamente na rede de esgoto do município. Também foi confirmada a presença de bactérias multirresistentes a determinados antibióticos.

Li, et al. (2013) estudaram a presença de PFHP e hormônios em lagoas de tratamento de esgoto rurais, assim como avaliaram a eficiência de remoção destas substâncias pelo processo de tratamento empregado. Estudos também foram realizados a fim de verificar a influência das variações sazonais na ocorrência e remoção destes contaminantes emergentes. Li, et al. (2013) observaram que para a maioria das espécies estudadas, o processo de tratamento foi eficaz, reduzindo a concentração destes contaminantes no efluente. Foi verificado também que variações sazonais influenciaram nas taxas de remoção de algumas destas espécies estudadas.

Os hormônios, sejam eles naturais ou sintéticos, tem recebido atenção devido aos problemas que eles podem causar ao sistema endócrino de seres humanos e animais. Nas últimas décadas, estudos relatam a interferência destes contaminantes no sistema endócrino de organismos aquáticos, eles também indicam que os estrogênios podem estar associados ao aumento de casos de câncer testicular e infertilidade em seres humanos (Ternes et al., 1999; Ghiselli e Jardim, 2007). Andersen et al. (2006) realizaram estudos com peixes-zebra (*Danio rerio*), onde demonstraram que espécimes machos, expostos durante curtos espaços de tempo a baixas concentrações do hormônio sintético  $17\alpha$ -metiltestosterona, sofrem alterações no sistema endócrino reprodutivo. Estas alterações podem interferir na fisiologia e comportamento reprodutivo dos peixes. Entretanto, os efeitos da exposição crônica a este hormônio ainda não são totalmente conhecidos para esta espécie.

Outra classe de fármacos que tem começado a receber atenção são os psicofármacos. Isto se deve as ditas doenças do século, tais como a ansiedade, depressão e transtornos psiquiátricos, resultado em parte da vida moderna, corrida e estressante dos grandes centros urbanos (Margis et al., 2003). Estas novas doenças acometeram grande parte da população levando a necessidade de produzir medicamentos que atuem no sistema nervoso central auxiliando no tratamento de problemas psíquicos. Com aumento do consumo destas drogas, cresce também a preocupação com seus efeitos ecotoxicológicos.

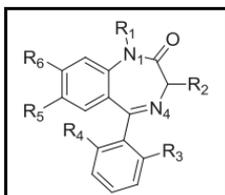
No que se refere ao cenário internacional alguns estudos vêm sendo realizados. Valcárcel et al. (2011) realizaram a determinação de 33 compostos farmacêuticos ativos, dentre eles alguns psicofármacos, em águas de rios e de torneira da rede de distribuição da região de Madri, na Espanha. Das dez substâncias antidepressivas, antiepiléticas e ansiolíticas analisadas, seis foram detectadas nestas matrizes e dos 33 compostos analisados, 25 foram encontrados. Sendo assim, Valcárcel et al. (2011) concluíram que mais estudos de monitoramento são necessário e que os processos de tratamento para águas residuais e águas destinadas ao consumo humano devem ser melhorados. Porém os estudos existentes são mínimos e incapazes de dar a dimensão dos problemas relacionados a estes contaminantes, principalmente no contexto brasileiro.

Com estes exemplos apresentados fica evidenciada a necessidade de mais trabalhos que, além de identificar fármacos no ambiente, avaliem seu comportamento, e efeitos ecotoxicológicos, em especial para psicofármacos e hormônios.

### **3.1.1. O psicotrópico Alprazolam**

O Alprazolam (ALP) é um fármaco psicoativo da classe dos benzodiazepínicos (BDZs). A classe dos benzodiazepínicos apresenta como estrutura básica inicial a 1,4-diazepina fundida a um anel aromático, denominada 1,4-benzodiazepina (Westland e Dorman, 2013). A Figura 2 mostra a estrutura base dos BDZs. Os BDZs estão entre as drogas mais prescritas no mundo (Auchewski et al., 2004). No que se refere ao Brasil, sua utilização é considerável (Baldissera et al., 2010). Estes fármacos apresentam propriedades, anestésicas, sedativas, tranquilizantes, anticonvulsionantes, relaxantes musculares e hipnóticas. Entretanto,

o ALP, é frequentemente utilizado para o tratamento transtornos de pânico e estados de ansiedade (Bugey e Staub, 2004; Poyares et al., 2005; Kassab e Paulo, 2013; Porto, 2000). Algumas de suas propriedades estão mostradas na Tabela 1.



**Figura 2.** Estrutura básica das 1,4-benzodiazepinas. Adaptado de Westland e Dorman, 2013.

**Tabela 1.** Propriedades do psicofármaco, alprazolam (ALP).

Propriedades	Especificações
Nome (IUPAC)	8-cloro-1-metil-6-fenil-4-H-s-triazolo-(4,3-( $\alpha$ )) (1,4) benzodiazepina
Descrição	Pó cristalino branco
Ponto de Fusão	Aproximadamente 225° C
Fórmula Molecular	C <sub>17</sub> H <sub>13</sub> ClN <sub>4</sub>
Massa Molecular	308,76 g mol <sup>-1</sup>
Densidade Aparente	0,67 g mL <sup>-1</sup>

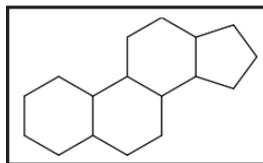
A utilização dos BDZs pelos seres humanos, incluindo o ALP, pode causar dependência em alguns dias ou em semanas. Os principais sintomas da descontinuação do seu uso crônico (a longo prazo) são contrários aos efeitos terapêuticos esperados ou a intensificação da recorrência dos sintomas originalmente apresentados. São alguns benzodiazepínicos: clonazepam; fluorazepam; diazepam; lorazepam; midazolam; alprazolam e medazepam. Estes fármacos diferenciam-se pelos grupos funcionais ligados à estrutura básica das benzodiazepinas.

Os possíveis problemas a saúde humana e os efeitos ecotoxicológicos relacionados à exposição crônica a esta classe de fármacos impulsionaram o surgimento de estudos voltados à determinação e quantificação de BDZs nas mais distintas matrizes (Westland e Dorman, 2013; Baldissera et al., 2010, Kosjek et al., 2012). Carvalho et al. (2010) realizaram a determinação simultânea de sete benzodiazepínicos, juntamente com o anoréxico anfepramona, como adulterantes em formulações fitoterápicas comercializadas no Brasil para fins de emagrecimento.

As determinações foram conduzidas utilizando voltametria de redissolução. Bugey e Staub (2004) realizaram estudos com oito benzodiazepínicos em amostras de sangue, por meio da cromatografia. Estes estudos encontram aplicabilidade para avaliação da presença e comportamento destas substâncias em organismos vivos, bem como na ciência forense. No que se refere à questão ambiental, são poucos os estudos relacionados a estes psicofármacos (Kosjek et al., 2012). Ternes et al. (2001) realizaram a determinação de fármacos em águas naturais e residuais da Alemanha, utilizando a cromatografia. Dentre os fármacos avaliados, estava o benzodiazepínico diazepam. Concentrações de até  $0,033 \mu\text{g L}^{-1}$  do fármaco foram encontradas em dois córregos avaliados. Ven et al. (2004) desenvolveram um método rápido e sensível por cromatografia líquida capilar para a determinação do benzodiazepínico diazepam em amostras de água de estações de tratamento de esgoto da Bélgica. A aplicabilidade do método desenvolvido foi comprovada por meio de determinações do fármaco em amostras reais dopadas com  $25 \mu\text{g L}^{-1}$  de diazepam.

### **3.1.2. O contraceptivo sintético $17\alpha$ - etinilestradiol**

O etinilestradiol (ETE) é um estrogênio sintético amplamente utilizado como agente contraceptivo. Apresenta ainda aplicações no tratamento de reposição hormonal e câncer de próstata em seres humanos (Fernandes et al., 2011). Ele, juntamente com mestranol, também sintético, e os hormônios naturais, estrona;  $17\beta$ -estradiol e estriol, são os causadores de atividades estrogênicas (que interferem no sistema endócrino) mais encontrados em esgoto bruto, tratado e em corpos aquáticos (Fernandes et al., 2011). O ETE é um hormônio esteroide sintético que apresenta em sua estrutura básica, assim como os outros esteroides, três anéis hexagonais e um pentagonal. A Figura 3 apresenta a estrutura básica dos esteroides. Insaturações, metilas, hidroxilas e carbonilas, presentes nesta estrutura, dão origem aos diversos hormônios esteroidais (Ferreira, 2008; Sodré et al., 2007). Algumas das propriedades do ETE estão mostradas na Tabela 2.



**Figura 3.** Estrutura básica dos esteróides. Adaptado de Sodré et al., 2007.

**Tabela 2.** Propriedades do hormônio sintético 17 -etinilestradiol. (Ferreira, 2008)

Propriedades	Especifica�es
Nome (IUPAC)	17�-etil-1,3,5(10)-estratriene-3,17�-diol
Descri�o	P� branco
Ponto de Fusão	Aproximadamente 182 �C
Fórmula Molecular	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>
Peso Molecular	296,4 g mol <sup>-1</sup>

\* (Bianchetti, 2008)

O ETE   um interferente do sistema endócrino (IE), ou seja,   um composto orgânico hormonalmente ativo capaz de causar distúrbios no sistema endócrino dos seres humanos e de animais mesmo em baixas concentra es. Peters et al. (2007) avaliaram a influência do ETE em peixes adultos da espécie *Fundulus heteroclitus*. Foi verificado que a exposi o durante 28 dias a concentra es de até 100 ng L<sup>-1</sup> do hormônio, pode ocasionar distúrbios no sistema endócrino desta espécie. Foi verificado mudanças em níveis de vitelogenina, proteína que desempenha papel no sistema reprodutivo de vertebrados ovíparos fêmeas e está presente em pequenas concentra es nos machos (Ghiselli e Jardim, 2007). Foi observado ainda, um aumento no  ndice gonadossomático, relacionado ao ciclo reprodutivo dos peixes, e diminui o dos níveis de testosterona. As fêmeas expostas ao ETE apresentaram ainda diminui o da produ o de ovos e também menor fertiliza o dos mesmos.

Muitos dos interferentes endócrinos possuem a capacidade de mimetizar alguns hormônios esteroidais ou da tireoide, de forma agonista ou antagonista. Um efeito agonista ocorre quando ao se ligar a um receptor hormonal, o IE provoca uma resposta que apresentar  um efeito biológico, já um efeito antagonista bloqueia o efeito agonista de outro hormônio, impedindo determinado efeito biológico (Sodré et al. 2007). Ambas interferências provocam distúrbios no funcionamento do sistema endócrino. O sistema endócrino humano   composto por uma série de glândulas

distribuídas pelo corpo, como a hipófise, a tireoide, ovários e testículos e pelos hormônios por elas produzidos (Ghiselli e Jardim, 2007).

Os IE apresentam potências de ação distintas, onde alguns interferem mais que outros no sistema endócrino. A estrogenicidade relativa, avalia esta capacidade de interferência causada por determinado IE em relação ao  $17\beta$ -estradiol, utilizado como padrão na medida da atividade estrogênica por apresentar o maior potencial estrogênico (Bila, 2005). Sabe-se que no geral, estrogênios sintéticos apresentam estrogenicidade superior aos estrogênios naturais, e assim, são também possivelmente mais tóxicos. O ETE é um dos desreguladores endócrinos mais importantes, apresentando elevado potencial estrógeno (Ferreira, 2008; Sodré et al. 2007).

Ambos os fármacos, ALP e ETE, assim como vários outros contaminantes emergentes, não possuem limites máximos estabelecidos pela legislação. A resolução 357 do CONAMA, de 17 de Março de 2005 dispõe sobre a classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento de águas superficiais e limites permitidos para algumas substâncias orgânicas e inorgânicas. Porém, não aborda tais contaminantes. Em Maio de 2011, a resolução 357 foi complementada e alterada pela resolução de nº 430, dispondo sobre condições e padrões de lançamento de efluentes. Entretanto contaminantes emergentes, em especial os fármacos ALP e ETE, não foram contemplados pelas modificações. Desta forma, a aquisição de dados a respeito da presença e concentração destas substâncias em corpos aquáticos, mostra-se necessária. Tais dados, juntamente com estudos toxicológicos, são o primeiro passo para estimar limites seguros destas substâncias em ambientes aquáticos.

A determinação destes contaminantes emergentes em matrizes ambientais requer a utilização de métodos analíticos sensíveis para a determinação em níveis traço.

### **3.2. Métodos analíticos empregados na determinação de fármacos em matrizes ambientais**

A maioria dos estudos envolvendo os contaminantes emergentes em ambientes naturais têm utilizado técnicas cromatográficas nas determinações, em especial a cromatografia líquida de alta eficiência. As técnicas cromatográficas baseiam-se em processos de separação do analito. Tal separação ocorre devido às diferenças de velocidades nas quais os componentes da mistura são transportados por uma fase móvel através de uma fase fixa estacionária (Skoog et al., 2006). Após a etapa de separação do analito, este chega a um detector podendo assim ser determinado. A cromatografia líquida aliada à espectrometria de massa, do inglês liquid chromatography mass spectrometry (LC/MS), tem sido utilizada devido a sua elevada seletividade, sensibilidade e confiabilidade na identificação e quantificação do analito (Allqvist et al., 2005; Rodil et al., 2009). Lajeunesse et al. (2012) desenvolveram um método analítico para a determinação de 14 antidepressivos, seus metabólitos e a droga anticonvulsivante carbamazepina em água residual e biosólido tratado em cinco diferentes estações de tratamento de esgoto do Canadá. A separação e determinação das substâncias estudadas foi conduzida utilizando cromatografia líquida com espectrômetro de massa. A LC/MS foi empregada devido à elevada sensibilidade da técnica, além da possibilidade de confirmação estrutural das drogas e seus metabólitos. O método foi validado e foram determinados limites de quantificação (LQ) de até 0,04 ng L<sup>-1</sup>. Por meio deste estudo, foi possível avaliar a eficiência de remoção dos processos de tratamento empregados nas cinco distintas estações de tratamento de esgoto. Lajeunesse et al. (2012) concluíram que os processos de tratamento empregados apresentam baixa eficiência de remoção de tais substâncias.

A possibilidade de confirmação estrutural do analito, alcançada pela cromatografia aliada ao detector massa, deve-se ao fato deste detector promover fragmentações da molécula, as quais são comparadas a uma base de dados, e juntamente com a informação da massa do íon molecular, apontam para uma estrutura mais provável. Desta forma, as técnicas cromatográficas são utilizadas na maioria dos métodos oficiais da Agência de Proteção Ambiental dos E.U.A.(USEPA) inclusive para a separação e determinação de alguns poluentes orgânicos emergentes que já apresentam métodos oficiais estabelecidos (Collins e Silva,

2011). Contudo, devido os teores dos analitos serem bastante reduzidos, é necessário utilizar técnicas de pré-concentração anterior à etapa de detecção e quantificação por LC/MS, e de várias etapas prévias de tratamento da amostra. Tais tratamentos podem envolver a extração do analito por cromatografia líquido-líquido, pré-concentração e limpeza (cleanup) por extração em fase sólida. Todos esses processos são bastante trabalhosos e morosos, podendo acarretar na contaminação da amostra e em perdas do analito, além de encarecer as análises (Ghoneim et al., 2004; Radi et al., 2003). Ainda nos dias atuais, a determinação desses contaminantes em matrizes ambientais, que são bastante complexas, é um desafio analítico. Portanto, é necessário o desenvolvimento de métodos analíticos mais simples, rápidos e de baixo custo, capazes de detectar de maneira seletiva, concentrações bastante baixas de fármacos em amostras de interesse ambiental.

Uma opção interessante para a análise de fármacos e hormônios em concentrações traço envolve a utilização de técnicas eletroquímicas, especialmente as voltamétricas. Isso porque muitos destes compostos são eletroativos, possuindo pelo menos um sítio ativo capaz de reduzir-se ou oxidar-se. Outro motivo também é devido à baixa necessidade de tratar e purificar a amostra (El-Desoky et al., 2005; EL-Enany et al., 2002; Ghoneim et al., 2006). Além disso, muitas moléculas orgânicas de interesse farmacêutico apresentam uma elevada tendência a serem adsorvidas em superfícies de mercúrio, largamente utilizadas em voltametria, a partir de soluções aquosas (Skoog et al., 2006).

Radi et al. (2003) realizaram a determinação de cefonocida, um antibiótico da classe das cefalosporinas, em urina humana por meio da voltametria adsortiva de redissolução por onda quadrada. Foram encontradas concentrações de até 0,03 mg L<sup>-1</sup> do fármaco e o método provou ser adequado para o monitoramento de cefonocida em urina. El-Enany et al. (2002) propuseram um método analítico baseado em voltametria de pulso diferencial e de corrente direta para a determinação do antidepressivo trazodona em comprimidos e fluidos biológicos tais como urina e plasma. O método desenvolvido mostrou-se adequado para determinações deste antibiótico em amostras biológicas como sangue e urina.

Habeeb et al. (1989b) estudaram o processo de redução psicotrópico alprazolam utilizando a voltametria adsortiva de redissolução catódica por pulso diferencial, para usar a técnica na determinação deste fármaco em fluidos

biológicos. Eletrólitos suporte, bem como seus pH e parâmetros voltamétricos como potencial de acumulação e tempo de acumulação foram avaliados. O método mostrou-se adequado para a determinação do alprazolam em amostras de soro humano. Os limites de detecção e quantificação obtidos foram 0,3 e 1,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

Os trabalhos encontrados na literatura que fazem uso da voltametria como ferramenta para determinações de fármacos realizam, em sua grande maioria, determinações em amostras biológicas ou composições farmacêuticas.

Sendo assim, mostra-se necessário o desenvolvimento de uma metodologia analítica simples, rápida, sensível e barata para determinações de contaminantes emergentes, em especial fármacos e hormônios em amostras complexas de interesse ambiental, como águas naturais de rios e lagos e jusantes de estações de tratamento de esgoto.

### **3.3. As técnicas eletroanalíticas**

A voltametria compreende uma variedade de métodos eletroanalíticos nos quais as informações sobre a espécie de interesse são obtidas pela medida da corrente em função de um potencial aplicado a um pequeno eletrodo (Skoog et al., 2006). A corrente gerada no eletrodo é monitorada em função da varredura de potencial gerando um voltamograma. A esta corrente formada durante o processo de redução do analito dá-se o nome de corrente de difusão ( $i_d$ ), pois ela é limitada apenas pelo processo de difusão das espécies à superfície do eletrodo de mercúrio. A difusão ocorre devido à presença de um gradiente de concentração que provoca o movimento das espécies de uma região mais concentrada da solução para outra mais diluída. das espécies (Skoog et al., 2006). A corrente de difusão é uma corrente faradaica resultante da reação da espécie eletroativa no eletrodo de trabalho (ET). Têm-se ainda dois outros processos de transferência de massa ao eletrodo de trabalho, o processo de migração e o de convecção. O primeiro ocorre devido a presença de espécies carregadas em solução, as quais são atraídas pelo campo elétrico gerado no eletrodo. Este processo de migração é indesejado e pode ser suprimido com a utilização de um eletrólito de suporte em concentração muito elevada frente ao analito. A presença deste eletrólito inerte inibe a migração do analito ao ET (Agostinho et al., 2004). Já a convecção é uma transferência de massa mecânica ocasionada pela agitação da solução. Sendo assim, este processo de

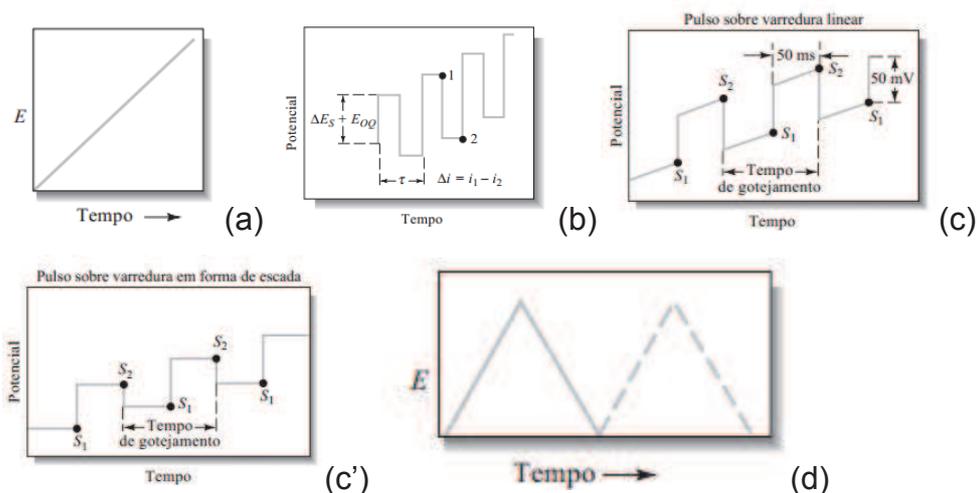
convecção é eliminado mantendo-se a solução sem agitação. Desta maneira, o processo de transferência de massa passa a ser controlado apenas pela difusão das espécies, resultando na corrente de difusão proporcional à concentração do analito (Skoog et al., 2006; Aleixo, 2003).

O sistema utilizado para medidas voltamétricas pode ser constituído por uma cela voltamétrica contendo três eletrodos imersos em solução com o analito e eletrólito de suporte. O eletrodo de trabalho, muitas vezes chamado de microeletrodo, apresenta área superficial reduzida para manter-se sempre polarizado. O eletrodo de referência tem a função de manter um potencial constante durante a varredura de potencial. O terceiro eletrodo, é um contra-eletrodo, no qual a corrente flui entre ele e o eletrodo de trabalho e onde ocorrem também reações secundárias de outras espécies (Skoog et al., 2006). A cela voltamétrica pode conter ainda uma haste agitadora e um tubo para o gás de purga. A purga é uma etapa crucial para análises utilizando o eletrodo de mercúrio. Por se trabalhar em potenciais catódicos a presença de oxigênio dissolvido provoca o surgimento de duas ondas voltamétricas, a primeira associada à redução do oxigênio a peróxido e a segunda do peróxido a água. Estas ondas voltamétricas acabam por aumentar a corrente de fundo, encobrindo o sinal voltamétrico do analito. Sendo assim, a solução geralmente é desaerada por alguns minutos através da passagem de um gás inerte. Este processo é denominado purga (Skoog et al., 2006).

Os eletrodos de mercúrio são amplamente utilizados na voltametria por diversas razões (Skoog et al., 2006). Uma delas é a ampla faixa de potencial negativo ao qual ele pode ser aplicado. Além disso, muitos íons metálicos podem ser reduzidos e formar amálgamas na superfície do eletrodo. Entretanto para os eletrodos de gota de mercúrio, a superfície renovada e reproduzível a cada formação de uma nova gota é a principal vantagem deste tipo de eletrodo (Skoog et al., 2006). Eletrodos sólidos, como o de ouro, carbono vítreo também são empregados em análises voltamétricas, porém com menor frequência que os eletrodos de mercúrio (Skoog et al., 2006). Os eletrodos sólidos apresentam como desvantagem a possibilidade de envenenamento da superfície, assim como a necessidade de limpeza da superfície eletrolítica, a qual pode comprometer a reprodutibilidade da superfície do eletrodo (Aleixo, 2003).

A voltametria surgiu da polarografia, a qual se utilizava de um eletrodo gotejante de mercúrio. Este tipo de eletrodo era composto por um reservatório de mercúrio a cima de um capilar e as gotas eram formadas pela ação da gravidade. Atualmente os eletrodos de mercúrio comercialmente disponíveis podem ser operados no modo gotejante (DME, do inglês, dropping mercury electrode) e como gota pendente (HMDE, do inglês, hanging mercury drop electrode), onde a formação da gota é controlada por uma válvula solenoide e seu tempo de vida é comandado por uma martelete mecânico. A principal vantagem deste controle eletrônico é rápida formação da gota, além da amostragem de corrente poder ser atrasada até que o crescimento da gota esteja praticamente cessado, eliminando as altas flutuações de corrente observadas no eletrodo gotejante clássico (Skoog et al., 2006). Outra vantagem, proporcionada pelo avanço tecnológico, é minimização do volume de mercúrio necessário nas determinações no modo HMDE. O mercúrio é um metal que apresenta elevada toxicidade, principalmente na forma organometálica como metilmercúrio, sendo um toxicante ambiental bioacumulativo (Skoog et al., 2006). Entretanto, com a otimização instrumental ocorrida, o volume de Hg utilizado durante as análises é ínfimo, sendo importante destacar ainda, que este metal pode ser posteriormente recuperado, não oferecendo riscos ao meio ambiente.

A aplicação do potencial ao eletrodo de trabalho (ET) pode ser realizada de várias maneiras. Estas funções voltagem-tempo são chamadas de sinais de excitação. A varredura linear é a mais simples delas, onde uma voltagem aplicada ao ET muda linearmente com o tempo. Podem ainda ser aplicadas ondas pulsadas e triangulares. As técnicas pulsadas permitiram alcançar baixos limites de detecção e quantificação, sendo utilizadas para determinações a nível traço. Já a onda triangular resulta em um voltamograma cíclico, que encontrou aplicação para estudos e diagnósticos de mecanismos de reação em reações redox (Skoog et al., 2006). Os principais sinais de excitação estão mostrados na Figura 4.



**Figura 4.** Sinais de excitação de tensão em função tempos empregados na voltametria. (a) Varredura Linear. (b) Onda quadrada. (c) Pulso diferencial para instrumentos analógicos. (c') Pulso diferencial para instrumentos digitais. (d) Triangular. Adaptada de Skoog et al., 2006.

### 3.3.1. As técnicas pulsadas

O advento das técnicas de pulso e o desenvolvimento dos eletrodos de mercúrio possibilitou a superação das limitações apresentadas pela polarografia, tais como, a demora das análise e limites de detecção pobres. Tais técnicas passaram a ser chamadas de voltametria de pulso diferencial e onda quadrada, devido a utilização de eletrodos alternativos ao DME (Skoog et al. 2006).

As técnicas de pulso diferencial encontraram aplicação em determinações de substâncias orgânicas e inorgânicas em nível traço (Wang, 2000). Na voltametria de pulso diferencial, pulsos são aplicados sobre uma varredura em forma de escada. Cada pulso geralmente apresenta amplitude de 50 mV. A amostragem de corrente é realizada em dois pontos, um imediatamente antes da aplicação do pulso ( $S_1$ ) e outro em ( $S_2$ ) no final da aplicação do pulso, como pode ser observado na Figura 4c'. A diferença entre a corrente amostrada em  $S_1$  e  $S_2$  é chamada de  $\Delta i$  e refere-se a corrente de difusão, proporcional a concentração do analito. A voltametria de pulso diferencial apresenta uma vantagem de possuir maior sensibilidade e melhores limites de detecção comparada à polarografia normal (Skoog et al., 2006).

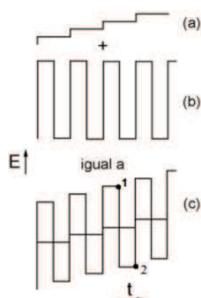
Esta maior sensibilidade deve-se à melhora da corrente faradaica e diminuição da corrente não-faradaica, resultante da expansão da gota de mercúrio. A primeira ocorre devido ao aumento repentino de potencial causado pelo pulso, que gera um pico de corrente resultante da reação das espécies presentes na camada

superficial próxima ao eletrodo. Após a aplicação deste incremento de pulso, as espécies presentes nesta camada são consumidas e a corrente resultante passa a ser controlada pela difusão das espécies. A corrente é então amostrada antes que decaia completamente e, desta forma, a corrente medida tem tanto uma componente referente à difusão das espécies quanto uma devido à redução desta camada de difusão que possibilita um maior fluxo de analito e conseqüente um aumento da corrente faradaica (Skoog et al., 2006; Wang et a., 2000).

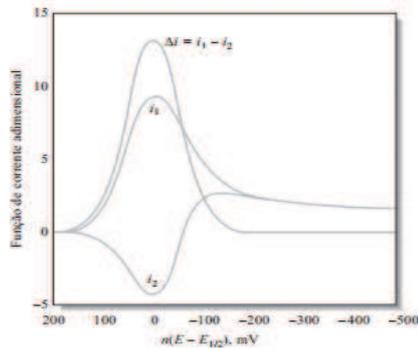
Com a aplicação do pulso pela primeira vez na gota, ocorre um aumento da corrente não faradaica, ou capacitiva, enquanto a carga na gota aumenta. Entretanto, esta corrente decai exponencialmente com o tempo, aproximando-se de zero no final da vida da gota, onde flutuações na sua área superficial são praticamente nulas. Medindo-se a corrente neste ponto, a corrente residual capacitiva é fortemente minimizada, aumentando assim a relação sinal ruído e melhorando a sensibilidade da técnica.

A voltametria de onda quadrada também é muito utilizada atualmente. Ela apresenta sensibilidade igual ou até maior, em alguns casos, comparada ao pulso diferencial. Além disso, é extremamente rápida, tornando possível a aquisição de um voltamograma em poucos segundos (Skoog et al., 2006).

O sinal de excitação para esta técnica (Figura 5c) é obtido através da superposição de uma seqüência de pulsos (Figura 5b) sobre um sinal na forma de escada como apresentado na Figura 5a. Assim, o pulso no sentido direto produz uma corrente catódica ( $i_1$ ) e o pulso inverso da origem a uma corrente anódica ( $i_2$ ). A resposta de corrente resultante do processo está apresentada na Figura 6.



**Figura 5.** Representação formação do sinal de excitação em função do tempo para voltametria de onda quadrada. Adaptado de Aleixo, 2003.

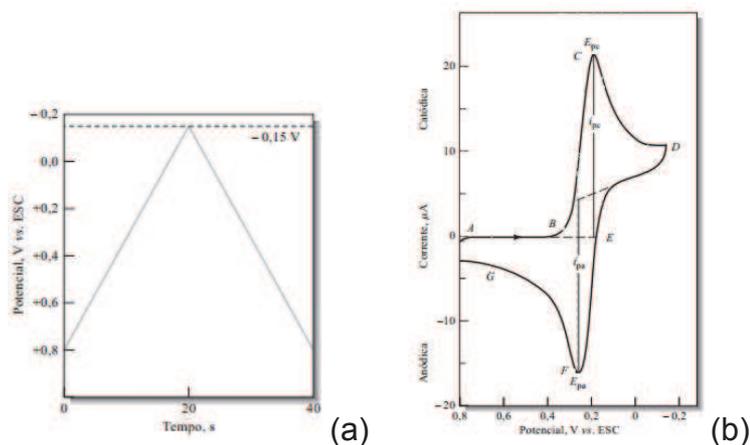


**Figura 6.** Resposta de corrente para uma reação reversível, obtida por voltametria de onda quadrada. Adaptado de Skoog et al., 2006.

A Corrente catódica ( $i_1$ ) é resultante da redução do analito, enquanto a corrente  $i_2$  deve-se a oxidação da espécie previamente reduzida no pulso anterior, antes que esta se afastasse da superfície do eletrodo. Desta forma, a corrente resultante ( $\Delta i$ ) é obtida fazendo a diferença entre a corrente catódica e a anódica. Para processos reversíveis, este procedimento provoca uma promoção do sinal voltamétrico, melhorando assim a sensibilidade da técnica (Figura 6). Além disso, a amostragem de corrente é realizada ao final de ambos os pulsos, catódico e anódico, diminuindo assim a contribuição da corrente não-faradaica e amostrando preferencialmente a corrente faradaica (Skoog et al., 2006; Wang, 2000; Aleixo, 2003).

### 3.3.2. Voltametria cíclica

A voltametria cíclica (VC) é uma técnica eletroanalítica amplamente utilizada. Embora não apresente aplicações para análises quantitativas devido à baixa sensibilidade, a VC é útil para a aquisição de dados qualitativos a respeito de mecanismos e intermediários de reação, assim como no acompanhamento de reações envolvendo produtos gerados no eletrodo. Em VC, ocorre a aplicação da voltagem em um sentido e em seguida no outro. Voltamogramas gerados por VC podem ser completos, parciais ou compostos por vários ciclos (Skoog et al., 2006). A representação do sinal de excitação juntamente com o seu voltamograma esta mostrada na Figura 7.



**Figura 7.** Sinal de excitação e voltamograma cíclico. (a) Sinal de excitação triangular para VC. (b) Voltamograma cíclico típico para uma espécie reversível. Adaptado de Skoog et al., 2006.

A Figura 7a mostra a forma de aplicação da voltagem para uma voltametria cíclica. Observa-se que o potencial segue linearmente no sentido catódico (varredura direta) em função do tempo até determinado ponto (potencial de inversão) e então segue para potenciais mais anódicos (varredura inversa). Esta forma de aplicação de voltagem resulta em um voltamograma como o apresentado na Figura 7b. Observa-se a ausência de pico voltamétrico do ponto A até B. Do ponto B até C (potencial de pico) tem-se o aumento da corrente de pico devido a processos de redução do analito. De C até D (potencial de inversão) observa-se uma diminuição da corrente de pico devido a redução da concentração do analito. Do ponto D até E a corrente ainda continua catódica e de E até F (potencial de pico) tem-se um aumento da corrente anódica proveniente da oxidação do analito. De F até G ocorre um decréscimo da corrente anódica, completando o ciclo (Skoog et al., 2006).

### 3.3.3. Métodos de redissolução

O desenvolvimento das técnicas de pulso e os avanços instrumentais compensaram as limitações apresentadas pela voltametria, possibilitando sobre tudo, melhorar os pobres limites de detecção alcançados pela polarografia clássica. Entretanto, para alcançar os cada vez mais baixos limites de detecção, estes avanços não foram suficientes. Para solucionar este problema, etapas de pré-concentração tornam-se necessárias. Em voltametria a pré-concentração pode ser realizada no momento da análise, sobre o eletrodo de trabalho. Esta possibilidade é alcançada utilizando os métodos de redissolução (do inglês, Stripping methods). A

redissolução pode ser catódica, anódica ou adsortiva, empregando eletrodo de gota pendente de mercúrio como eletrodo de trabalho devido a sua sensibilidade (Skoog et al., 2006).

Os métodos de redissolução incluem uma etapa de pré-concentração quantitativa seguida de uma etapa voltamétrica. Portanto, primeiramente o analito é depositado no eletrodo de trabalho a partir de uma amostra, durante um determinado período. Posteriormente, o analito depositado é determinado por um procedimento voltamétrico, ou seja, o analito é redissolvido ou retirado do eletrodo medindo-se o processo de oxidação ou redução. Na voltametria de redissolução anódica (VRA), aplica-se um potencial e o analito é depositado por redução no eletrodo (eletrodeposição) durante um período. Após um período de equilíbrio, inicia-se uma varredura de potencial no sentido anódico para que analito seja reoxidado e redissolvido. A corrente resultante pode ser medida e sua intensidade está diretamente relacionada com a concentração do analito presente na amostra. Na voltametria de redissolução catódica (VRC), o analito é depositado por um processo de oxidação no eletrodo de trabalho (pré-concentração). Posteriormente, o analito é redissolvido por redução. No que diz respeito aos métodos de redissolução adsortivos, o processo de pré-concentração do analito no eletrodo de trabalho ocorre por adsorção física e não eletrolítica. Após o processo de acumulação, o analito depositado é determinado por medida voltamétrica, ou seja, varredura de potencial no sentido anódico ou catódico.

Atualmente a sensibilidade alcançada pelas técnicas eletroanalíticas se compara as obtidas por técnicas cromatográficas, atingindo limites de detecção muito próximos aos conseguidos por cromatografia (Souza et al., 2004). Os métodos de redissolução possibilitaram obter, com razoável exatidão, limites de detecção na ordem de  $10^{-10}$  mol L<sup>-1</sup>, imprescindíveis para análises de traços (Ghoneim et al., 2006).

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. Técnicas limpas**

Todos os procedimentos foram baseados em protocolos de técnica limpa visando minimizar possíveis contaminações. Todo material utilizado foi deixado em banho de ácido nítrico (3%, v/v). Em seguida os materiais foram enxaguados cinco vezes com água deionizada e água ultra-pura (TKA Genpure UV, model n° 082205). Os materiais foram ainda enxaguados cinco vezes com álcool etílico e propanona com função de remover compostos orgânicos remanescentes (Campos et al., 2002; Montagner e Jardim, 2011).

### **4.2. Equipamentos**

Análises dos fármacos foram realizadas com o analisador voltamétrico 757 VA controlado pelo programa computacional 757 VA Computrace (Metrohm). O analisador contém célula eletroquímica com três eletrodos. Os eletrodos de referência, auxiliar e de trabalho são o Ag/AgCl, KCl (3,0 mol L<sup>-1</sup>), fio de platina e eletrodo de gota pendente de mercúrio (do inglês hanging mercury drop electrode - HMDE), respectivamente. O nitrogênio ultrapuro (99,999% de pureza) foi empregado como gás de purga para remoção de oxigênio da célula durante as medidas. Os métodos voltamétricos empregados foram a voltametria cíclica (VC) e a voltametria adsortiva de redissolução catódica por pulso diferencial (VRC-PD). Foi também utilizado para ajustes do pH das soluções tampão um pHmetro Hanna.

### **4.3. Reagentes e soluções**

Para a realização deste trabalho foram utilizados somente reagentes de grau analítico e água do tipo ultrapura (TKA Genpure UV, model n° 082205).

Soluções padrão estoque de ambos os fármacos (1,0 – 4,0 mg L<sup>-1</sup>) foram preparadas dissolvendo o padrão de ALP (Pharmanostra) e de ETE (Sigma, Aldrich) em metanol. As soluções foram mantidas sob refrigeração (4°C) e ao abrigo da luz. Soluções de trabalho de ambos os fármacos foram preparadas através de diluições das soluções padrão estoques com metanol. Todas as soluções de trabalho foram preparadas a cada dois meses. Soluções 1 mg L<sup>-1</sup> do psicoativo lorazepam foram preparadas para o estudo de interferência na determinação do ALP.

Soluções padrão estoque de ácido húmico comercial (AH)  $1,5 \text{ g L}^{-1}$  foram preparadas dissolvendo o reagente (Sigma, Aldrich) em água ultrapura e foram utilizadas nos ensaios de interferência na determinação de ALP e ETE. É importante destacar que foi considerado neste trabalho, que o ácido húmico comercial apresenta 35% de carbono orgânico dissolvido (COD) de acordo com dados da literatura (Sodré, 2005).

Soluções tampão também foram utilizadas nas determinações do ALP e do ETE e para tal foram escolhidos a solução fosfato e o Britton-Robinson (B-R) respectivamente. O tampão fosfato foi preparado com  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de ácido acético e  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de ácido fosfórico (Habeeb et al., 1989b). O tampão B-R foi preparado pela mistura de ácido fosfórico, acético e bórico e perclorato de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (Miranda, 2012). O pH das soluções tampão foram corrigidos até o valor desejado com  $2 \text{ mol L}^{-1}$  NaOH.

#### **4.4. Desenvolvimento de metodologias analíticas para determinação do ALP e do ETE por voltametria**

Inicialmente foi avaliada a eletroatividade e a natureza do processo eletroquímico envolvido através da voltametria cíclica (VC). Para tal, soluções individuais dos fármacos contendo  $100 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  de ALP e  $120 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  para o ETE foram adicionadas na cela eletroquímica contendo tampão fosfato como eletrólito de suporte em pH 7,0 e tampão B-R em pH 6,3 respectivamente. Os estudos foram conduzidos aumentando a velocidade de varredura e avaliando a resposta voltamétrica dos analitos sob um potencial de acumulação de  $-0,8 \text{ V}$  durante 120 s para o ALP e  $-0,7 \text{ V}$  durante 150 s para o ETE.

Para o desenvolvimento metodológico da determinação do ALP e do ETE em amostras ambientais de água, foi empregada a voltametria de redissolução catódica por pulso diferencial (VRC-PD) e para tal foi necessária a otimização das condições experimentais (eletrólito de suporte e pH) e dos parâmetros voltamétricos necessários na obtenção de um método seletivo, sensível, e rápido para cada fármaco. Parâmetros como velocidade de varredura, potencial de acumulação ( $E_{ac}$ ), tempo de acumulação ( $t_{ac}$ ), tempo e amplitude de pulso, tempo de equilíbrio ( $t_{eq}$ ), e faixa de potencial da varredura ( $\Delta E$ ), foram estudados.

A escolha dos eletrólitos de suporte e do pH iniciou-se pela avaliação do sinal analítico dos fármacos. Para a determinação do ALP por voltametria adsortiva de redissolução catódica ( $VA_{dsRC-PD}$ ), foi empregada solução aquosa contendo  $20 \mu\text{g L}^{-1}$  do fármaco em pH 7,0. O eletrólito de suporte estudado foi o tampão fosfato onde avaliou-se sua concentração na cela voltamétrica, cuja concentração variou de 10 a 100 % do volume da solução.

Para otimizar o pH das medidas, as soluções de ALP foram analisadas sob diferentes condições de pH. A faixa de pH estudada foi de 5,0 a 8,0, sendo que o ajuste foi realizado com NaOH  $2 \text{ mol L}^{-1}$ . Neste estudo utilizou-se velocidade de varredura de  $25 \text{ mV s}^{-1}$ ,  $E_{ac}$  de -0,8 V durante 60 s e amplitude de pulso de 50 mV durante 40 ms.

Para a determinação do ETE, foi utilizada uma solução aquosa contendo  $8 \mu\text{g L}^{-1}$  do fármaco em pH 7,0. O eletrólito de suporte estudado foi o tampão Britton-Robinson (B-R) e a concentração de eletrólito na cela voltamétrica foi variada de 10 a 100% do volume total da solução. Diferentes condições de pH foram avaliadas para a otimização deste parâmetro. A faixa de pH estudada foi de 6,3 a 9,0 e o ajuste de pH das soluções foi realizado com a adição de NaOH  $2 \text{ mol L}^{-1}$ . As condições voltamétricas empregadas neste estudo foram a velocidade de varredura de  $60 \text{ mV s}^{-1}$ ,  $E_{ac}$  de -0,7 V durante 300 s,  $\Delta E$ , -0,95 até -1,4 V e amplitude de pulso de 50 mV durante 40 ms.

Após, o estabelecimento do eletrólito de suporte e do pH mais adequado para determinação dos fármacos, realizou a otimização dos parâmetros voltamétricos através de ensaios univariados, que consistiram em variar um parâmetro voltamétrico enquanto os outros eram mantidos constantes.

Para o ALP foram usadas soluções aquosas contendo  $60 \mu\text{g L}^{-1}$  do fármaco em meio de tampão fosfato, pH 7,0. Para o ETE, os estudos foram conduzidos com soluções contendo  $20 \mu\text{g L}^{-1}$  do contraceptivo, em meio de tampão B-R, pH 6,3. A Tabela 3 apresenta as condições voltamétricas avaliadas para os dois fármacos.

**Tabela 3.** Parâmetros avaliados para o desenvolvimento das metodologias analíticas para a determinação do alprazolam e do 17 $\alpha$ -etinilestradiol em amostras ambientais.

Parâmetro	ALP	ETE
Potencial de acumulação (V)	-1,0 a 0	-0,5 a -0,9
Tempo de acumulação (s)	20 a 120	60 a 450
Velocidade de varredura (mV s <sup>-1</sup> )	25 a 50	45 a 105
Tempo de equilíbrio (s)	0 a 18	0 a 7
Amplitude de pulso (mV)	10 a 100	50 a 100
Tempo de pulso (ms)	20 a 180	30 a 70
Potencial de varredura (V)	0 a -1,4	-0,8 a -1,8

#### 4.5. Validação dos métodos analíticos desenvolvidos

Para avaliar o desempenho e a confiabilidade dos métodos analíticos desenvolvidos, foram realizadas medidas de alguns parâmetros de validação a fim de estipular a faixa linear de trabalho, limites de detecção e quantificação, precisão, exatidão e sensibilidade. Foram utilizadas nestes estudos as condições otimizadas para os métodos em soluções aquosas enriquecidas com o padrão do ALP (0,5 a 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) e do ETE (2 a 96  $\mu\text{g L}^{-1}$ ).

##### 4.5.1. Avaliação da forma de calibração, linearidade e sensibilidade

As quantificações do ALP e do ETE empregando os métodos desenvolvidos foram realizadas através do método de adição de padrão, devido à complexidade da matriz. Além da avaliação da forma calibração, estudou-se a linearidade dos métodos e suas respectivas sensibilidades através de curvas analíticas com padronização externa, utilizando um tempo de acumulação do analito no eletrodo de trabalho fixo. Para o ALP foi empregado 120 s de acumulação e para o ETE utilizou-se 150 s de acumulação.

Para o estudo da linearidade dos métodos, inicialmente realizou-se uma análise do controle analítico (eletrólitos de suporte em água ultrapura) por VRC-PD. Posteriormente, realizou-se dez medidas do analito em um intervalo de concentração de 0,5 a 100,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  para o ALP e treze medidas do analito em um intervalo de 2,0 a 96,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  para o ETE. Os dados obtidos foram utilizados na avaliação da linearidade através de gráficos que relacionam o sinal de corrente de pico do analito com a concentração do analito e por regressão pelo método dos

mínimos quadrados. Além disso, avaliou-se a regressão linear através do programa computacional MINITAB – versão 16.2.2. (*Minitab, Minitab Incorporation, USA, 2010*). Os dados gerados, tais como coeficiente de correlação ( $r$ ), variância explicada ( $R^2$ ), F de regressão ( $F_r$ ) e F de falta de ajuste ( $F_{faj}$ ) foram interpretados. A sensibilidade dos métodos foi avaliada através do coeficiente angular (slope) das curvas analíticas.

#### 4.5.2. Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram obtidos através da análise voltamétrica do controle analítico (1 mL do tampão fosfato ou B-R em 9 mL de água) realizada com vinte réplicas. Assim, obteve-se a média e desvio padrão das medidas de corrente no potencial de pico para o ALP e para o ETE. Os valores de LD e LQ foram calculados pelas Equações 1 e 2, respectivamente (Ribani et al., 2004).

$$LD = \frac{3 \times s}{S} \quad \text{Equação 1} \quad LQ = \frac{10 \times s}{S} \quad \text{Equação 2}$$

onde  $s$  refere-se ao desvio padrão das medidas do branco e  $S$  é o coeficiente angular da equação da reta obtida no estudo da linearidade de cada fármaco.

#### 4.5.3. Estudo de interferentes

A seletividade ou especificidade do método analítico desenvolvido para o ALP foi avaliada por meio de estudos de interferência com íons metálicos e outros compostos orgânicos tais como matéria orgânica dissolvida e outros fármacos. Para tais estudos foram preparadas soluções contendo  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $5 \mu\text{g L}^{-1}$  de ALP em cela.

No estudo com íons metálicos, realizou-se a medida do sinal voltamétrico de  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  de ALP em meio de eletrólito suporte fosfato, pH 7,0. Em seguida foram adicionadas concentrações crescentes dos íons metálicos,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$ , de forma individual ou em conjunto. As concentrações dos íons metálicos adicionados isoladamente foram 9,8; 19,4 e  $28,8 \mu\text{g L}^{-1}$ . Para o estudo de interferência com os três íons em conjunto em solução os teores das adições foram de 9,8 e  $19,4 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Estudos de interferência com AH contendo 35% de carbono orgânico (COD) foram realizados. Primeiramente, realizou-se a medida do sinal voltamétrico do ALP

em uma concentração de  $10,0 \mu\text{g L}^{-1}$ , após, foram feitas sucessivas adições de AH em que a concentração variou de  $2,0$  a  $47,0 \text{ mg L}^{-1}$  de COD.

Testes de interferência também foram realizados com a adição de concentrações crescentes do lorazepam, outro fármaco da classe dos benzodiazepínicos e do contraceptivo ETE. Utilizaram-se as mesmas condições aplicadas nas determinações do ALP com interferentes metálicos e com AH. Para os estudos de interferência com o psicofármaco lorazepam, foi feita a medida da intensidade de corrente referente a  $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$  de ALP em meio de tampão fosfato, seguido por adições da solução de lorazepam que variaram de  $5,0$  a  $50,0 \mu\text{g L}^{-1}$ . As intensidades de corrente do ALP foram então amostradas em cada adição do interferente. No estudo com ETE realizou-se a medida do sinal analítico de  $10,0 \mu\text{g L}^{-1}$  de ALP, em seguida foram feitas adições de concentrações crescentes do contraceptivo ( $10$  a  $80 \mu\text{g L}^{-1}$ ), e o sinal referente ao hormônio foi amostrado em cada adição de ETE.

Para o ETE foram realizados estudos de interferência com o ácido húmico comercial, a fim de verificar a influência da matéria orgânica sobre o sinal analítico do contraceptivo. Para tal, utilizaram-se soluções aquosas contendo  $10,0 \mu\text{g L}^{-1}$  de ETE em cela, em meio de tampão B-R, pH 6,3. A intensidade de corrente referente ao analito foi amostrada, e em seguida foram feitas sucessivas adições de AH contendo concentrações de carbono orgânico de  $2,1$  a  $48,8 \text{ mg L}^{-1}$ .

#### **4.5.4. Precisão**

A precisão dos métodos desenvolvidos foi avaliada por meio de estudos de repetibilidade e precisão intermediária.

A avaliação da repetibilidade do método, medida da concordância de resultados obtidos em um mesmo dia, foi realizada através das medidas da intensidade de corrente, em triplicata, de soluções aquosas de ALP ( $9,5 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e de ETE ( $9,1 \mu\text{g L}^{-1}$ ) preparadas em cinco balões volumétricos distintos. Para avaliar a precisão intermediária, medidas voltamétricas do ALP ( $9,5 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e do ETE ( $9,1 \mu\text{g L}^{-1}$ ) foram feitas em cinco dias consecutivos. Após a aquisição dos dados, realizou-se o cálculo do valor de desvio padrão (SD) e desvio padrão relativo (RSD) das intensidades de corrente de pico de cada analito.

#### 4.5.5. Exatidão

A exatidão dos métodos desenvolvidos foi avaliada através de estudos de recuperação realizados em soluções aquosas enriquecidas com os respectivos fármacos. Para o ALP utilizaram-se soluções aquosas contendo 2,5; 5,0 e 7,5  $\mu\text{g L}^{-1}$  do psicotrópico. Para o ETE soluções aquosas contendo 8,0 e 10,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  do hormônio foram preparadas. Alíquotas de 9 mL das soluções de ambos os fármacos foram transferidas para a cela voltamétrica, juntamente com 1 mL de eletrólito suporte tampão fosfato para as determinações de ALP e tampão B-R para determinações do ETE. As determinações foram conduzidas para os estudos de recuperação.

Além disso, realizou-se o teste de adição e recuperação com amostra de água superficial coletada no bairro Batel-Guarapuava. A amostra foi coletada com frasco âmbar descontaminado e transferida ao laboratório, então, acondicionada em geladeira. A amostra foi analisada através de VRC-PD. Para a determinação de ALP uma alíquota da amostra foi enriquecida com 2,5 e 5,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  de ALP e em seguida analisada. Para o ETE uma alíquota da amostra foi enriquecida com 16,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  do hormônio.

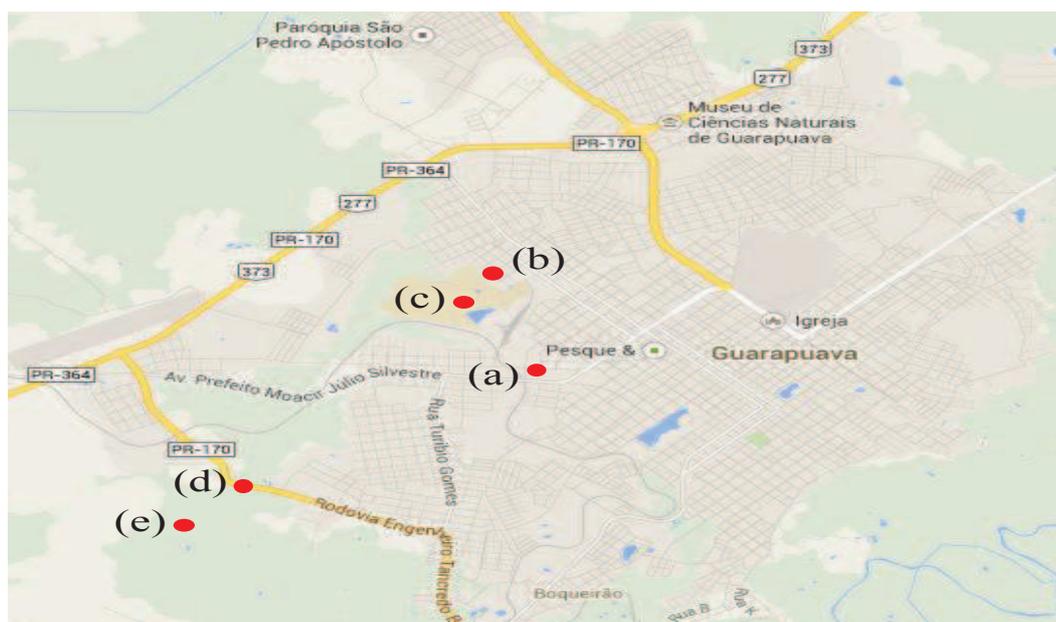
#### 4.6. Amostragem

A coleta de amostras de águas naturais foi realizada manualmente com frascos de vidro previamente descontaminados. Foram coletados volumes de 1,0 litro de amostras de água em nascentes, rios e lagos do município de Guarapuava, conforme Tabela 4. Cada amostra foi filtrada em cadinho de vidro sinterizado N° 3 para a remoção de materiais particulados em suspensão. As determinações dos fármacos foram realizadas em triplicata empregando as metodologias desenvolvidas. As determinações foram realizadas em até 24 h após a coleta.

**Tabela 4.** Localização geográfica dos locais de amostragem de água utilizada para estudos de validação e determinações do ALP e do ETE. \*Fonte: Google Earth.

Amostra / Bairro	Data da coleta	Temperatura da água (°C)	Localização*
Nascente / Batel	02/04/13	20	25°23'38.14"S - 51°29'8.10"O
Riacho Carro Quebrado / Vila Carli	17/04/13	15	25°22'56.59"S - 51°29'18.17"O
Lagoa / Campus CEDETEG	09/04/13	24	25°23'8.70"S - 51°29'26.64"O
Montante da ETE de Guarapuava – Rio Cascavel	28/10/13	21	25°24'31.64"S - 51°30'27.88"O
Jusante da ETE de Guarapuava – Rio Cascavel	28/10/13	21	25°24'50.26"S - 51°30'54.84"O

As Figuras 8 e 9 mostram os pontos onde foram realizadas as coletas de águas naturais para a validação e aplicação dos métodos desenvolvidos para a determinação do ALP e do ETE.



**Figura 8.** Mapa do município de Guarapuava indicando os pontos de coleta das amostras de água (Google Maps).

A Figura 8 mostra o mapa do município de Guarapuava - PR e indica os pontos onde foram coletadas as amostras para validação e aplicação dos métodos desenvolvidos para a determinação de ALP e ETE.



**Figura 9.** Fotografias referentes aos pontos de coleta de água no município de Guarapuava-PR. (a) Nascente de água (Bairro Batel). (b) Rio Carro Quebrado (Vila Carli). (c) Lago presente no campus CEDETEG – UNICETRO (Vila Carli). (d) Montante da ETE do Município de Guarapuava (Rio Cascavel). (e) Jusante da ETE do Município de Guarapuava (Rio Cascavel).

A Figura 9a mostra a nascente de água do Bairro Batel, dentro do perímetro urbano do município de Guarapuava. A água desta fonte não apresentava material particulado em suspensão. Esta água é frequentemente utilizada pelos moradores

do entorno para limpeza de veículos e para o consumo. Esta matriz foi utilizada para os estudos de validação dos métodos desenvolvidos.

A Figura 9b, refere-se a um arroio que percorre parte do município de Guarapuava e passa próximo ao campus CEDETEG – UNICENTRO. Este rio era utilizado para o descarte de efluente de uma estação de tratamento de esgoto. Esta estação de tratamento foi desativada por não comportar mais o volume de esgoto requisitado. A água deste arroio também foi analisada para determinar a presença do psicofármaco ALP.

A Figura 9c corresponde ao lago existente no campus CEDETEG-UNICENTRO. Amostras de água deste lago foram utilizadas para aperfeiçoar o processo de preparo de amostra, tais como a filtração e diluição da amostra real para a determinação dos fármacos.

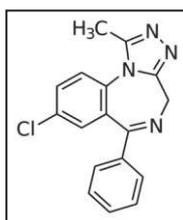
Na Figura 9d, a fotografia mostra o Rio Cascavel, localizado em Guarapuava, a montante da estação de tratamento de esgoto Vassoural. Este ponto de coleta localiza-se a cerca de 900 m antes do ponto de despejo do esgoto tratado. Esta estação de tratamento foi inaugurada a cerca de três anos e é uma das mais modernas do estado do Paraná. Totalmente informatizada, é possível o monitoramento de todos os processos em tempo real. Em média,  $200 \text{ L s}^{-1}$  de esgoto são tratados.

Já a Figura 9e refere-se a jusante da estação de tratamento de esgoto, este ponto de coleta, localiza-se aproximadamente a 450 m abaixo do ponto de descarte do efluente tratado. Comparando-se as Figuras 9d e 9e é possível observar a diferença na coloração da água nestes dois pontos. Além disso, a água da jusante apresentava um odor característico de esgoto assim como bastante matéria orgânica suspensa.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

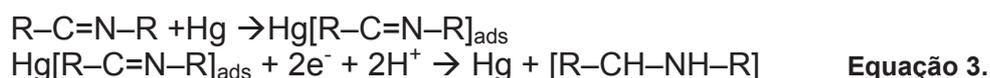
### 5.1. OTIMIZAÇÃO DE PARÂMETROS ANALÍTICOS E DETERMINAÇÃO DO ALPRAZOLAM

A determinação do ALP por voltametria foi possível empregando eletrodo de gota pendente de mercúrio como eletrodo de trabalho, devido à presença de sítios ativos passíveis de redução, cujo potencial de redução encontra-se no potencial -0,88 V que é compatível com a faixa de potencial relativa ao eletrodo de trabalho (Skoog et al., 2006). Em valores de pH inferiores a 10, o sinal voltamétrico pode ser atribuído a redução do grupo C=N ligado ao radical fenil (Habeeb et al., 1989b; Carvalho et al., 2010), dando origem ao CH–NH. A Figura 10 mostra a fórmula estrutural da molécula de ALP, que é um composto pertencente à família dos benzodiazepínicos, marcado pela presença de uma 1,4-benzodiazepina ligada a um anel benzênico.



**Figura 10.** Fórmula estrutural do ALP, adaptado de Habeeb et al., 1989b.

O processo de redução do grupo C=N envolve a transferência de dois elétrons e dois prótons na superfície do eletrodo como mostrado na Equação 3 (Carvalho et al., 2010). Primeiramente a molécula de ALP é adsorvida na superfície de mercúrio do eletrodo, após, ocorre a redução no sítio ativo da molécula seguido pela dessorção do analito.

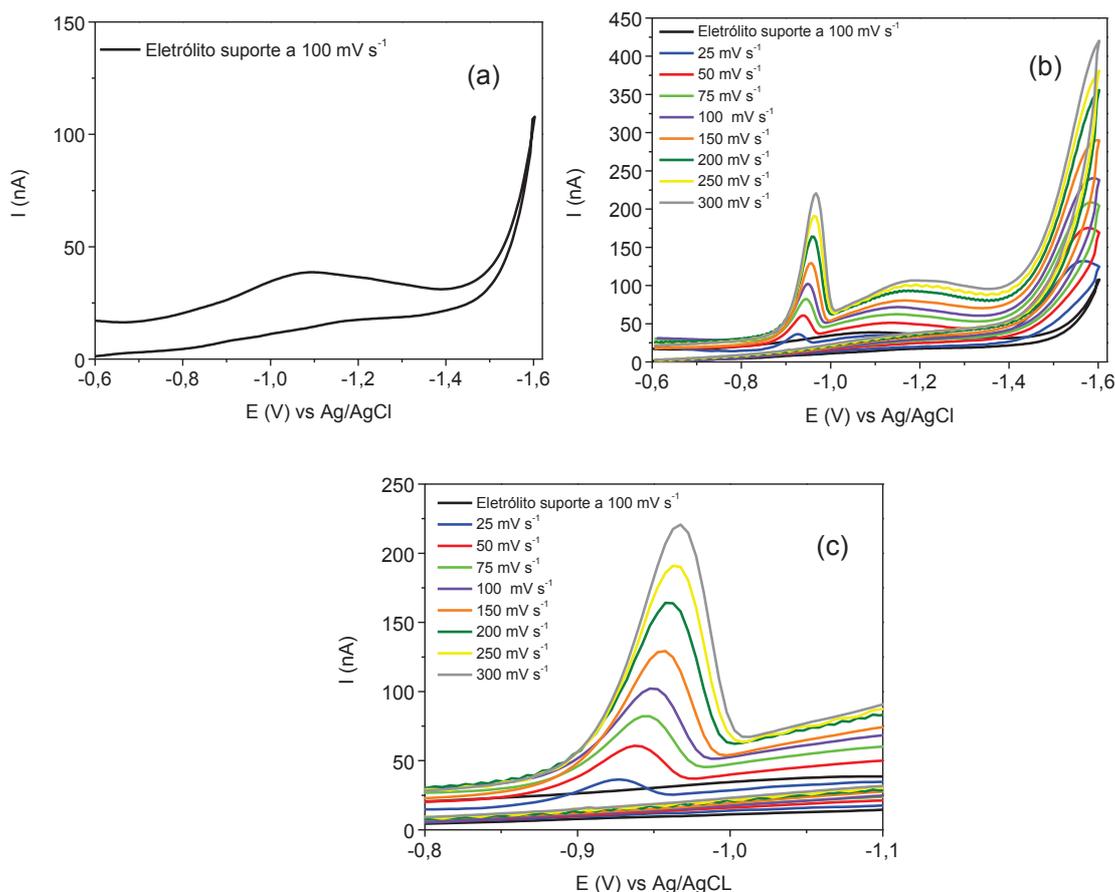


#### 5.1.1. Avaliação do processo eletroquímico do ALP por voltametria cíclica

A eletroatividade e a natureza do processo de transferência de massas ao eletrodo de trabalho do ALP foram avaliadas utilizando a voltametria cíclica (VC) com eletrodo de gota pendente de mercúrio (HMDE). Por meio desta técnica foi possível avaliar os processos eletroquímicos envolvidos na determinação do ALP.

Os voltamogramas cíclicos obtidos para o ALP em função da alteração da velocidade de varredura estão mostrados na Figura 11. A Figura 11a apresenta o voltamograma cíclico referente a solução contendo o tampão fosfato, que foi o eletrólito de suporte escolhido. Observa-se a presença de um pico voltamétrico no potencial de  $-1,1 \pm 0,01$  V, referente ao eletrólito suporte na varredura direta. Como o potencial de pico do ALP é em aproximadamente  $-0,95$  V este sinal voltamétrico não interfere na determinação do fármaco. A Figura 11b mostra o voltamograma cíclico para a faixa de potencial completa que variou de  $-0,6$  a  $-1,6$  V e retorno do  $-1,6$  a  $-0,6$ V, referente à determinação do ALP em tampão fosfato, pH 7,0. Observa-se a presença de dois picos voltamétricos, um em  $-0,95$  V e outro em  $-1,2$  V na varredura direta do potencial. O primeiro refere-se à redução do analito, já o segundo pico corresponde ao sinal do controle analítico. Embora ocorra um aumento do sinal do branco com o aumento da velocidade de varredura este não interfere na medida do sinal do analito, pois os dois picos apresentam potencias de pico distintos.

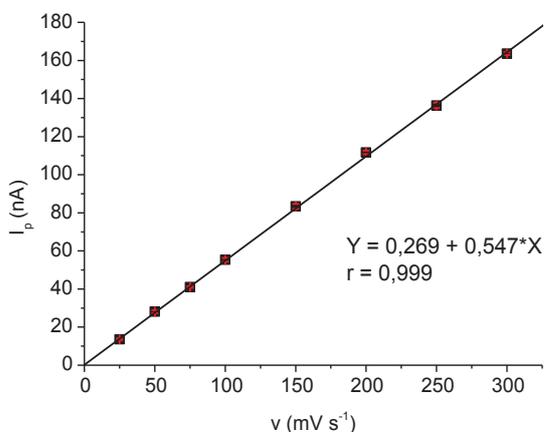
A Figura 11c mostra uma ampliação da área de interesse do voltamograma que foi a presença apenas do sinal analítico do ALP. Assim, é mostrada apenas a faixa de  $-0,8$  a  $-1,1$  V. Nessa figura, verifica-se a presença de um único pico voltamétrico,  $-0,95$  V no sentido direto referente à redução do analito na faixa de potencial de interesse, não apresentando pico reverso, indicativo de um processo irreversível. O potencial de pico observado para o ALP foi de  $-0,95 \pm 0,01$  V. Esse valor é concordante com o encontrado na literatura sob as mesmas condições de pH e eletrólito suporte que foi aproximadamente  $-0,95$  V (Habeeb et al., 1989b). Observa-se na mesma figura que o aumento da velocidade de varredura do potencial provocou um deslocamento do potencial de pico do ALP para regiões mais catódicas, característico de processos irreversíveis (Mazo et al., 2005). A reversibilidade de um processo eletroquímico está relacionada diretamente com as velocidades da reação direta e inversa. Sendo que para processos totalmente irreversíveis, a velocidade de reação em uma direção é muito mais lenta que na outra, podendo ser considerada desprezível. Processos voltamétricos de substâncias orgânicas são parcialmente ou totalmente irreversíveis (Skoog et al., 2006).



**Figura 11.** Determinação de ALP ( $100,4 \mu\text{g L}^{-1}$ ) em meio de Tampão fosfato, pH 7,0 empregando voltametria cíclica e com variação da velocidade de varredura. (a) Voltamograma cíclico do tampão fosfato na ausência de ALP, pH 7,0, denominado de controle. Velocidade de varredura,  $100 \text{ mV s}^{-1}$ . (b) Voltamogramas cíclicos completos obtidos na determinação ALP em tampão fosfato pH 7. (c) Seleção da melhor faixa de potencial para mostrar o pico do ALP. Parâmetros utilizados,  $E_{ac}$ :  $-0,8 \text{ V}$ ;  $t_{ac}$ :  $120 \text{ s}$ ;  $t_{eq}$ :  $5 \text{ s}$ ,  $\Delta E$ :  $-0,6$  até  $-1,6 \text{ V}$ .

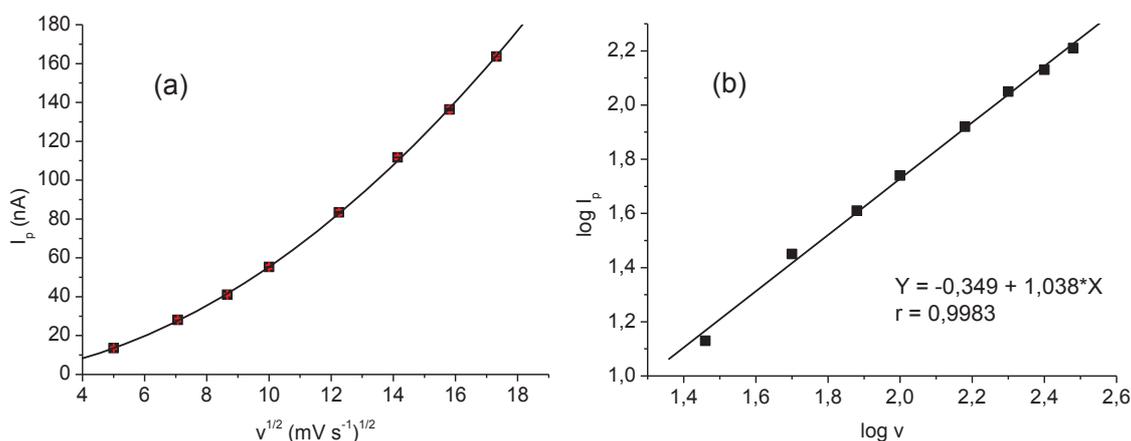
A partir dos dados obtidos nas análises voltamétricas com perturbação do sistema de modo cíclico, foi relacionado a intensidade de corrente de pico com a velocidade de varredura a fim de determinar a natureza do processo de transferência de massas ao eletrodo de trabalho. A Figura 12 mostra a influência da velocidade de varredura do potencial na intensidade de corrente para a determinação do ALP. De modo geral, nota-se que a intensidade de corrente de pico do analito aumentou com o aumento da velocidade de varredura de modo linear com coeficiente de correlação ser superior a 0,9. Esse comportamento parece indicar que o processo eletroquímico foi controlado pela adsorção e não pela difusão do analito na superfície do eletrodo (Mazo et al., 2005). Ou seja, ocorre uma acumulação por adsorção das espécies na superfície do eletrodo. Em um processo controlado pela difusão, o produto resultante da redução do analito se acumula próximo ao eletrodo

de trabalho e o gradiente de concentração formado promove uma difusão destas espécies ao seio da solução.



**Figura 12.** Tratamento dos dados obtidos na determinação do ALP por voltametria cíclica com variação da velocidade de varredura a fim de compreender os processos eletroquímicos envolvidos no processo. Dependência da intensidade de corrente em função da velocidade de varredura da voltametria cíclica.

Realizou-se também a avaliação da intensidade de corrente em função da raiz quadrada da velocidade de varredura e do logaritmo na base dez da corrente de pico em função do log da velocidade de varredura. Estes estudos servem para comprovar a natureza dos processos eletroativos do analito na superfície do eletrodo de trabalho. As Figuras 13a e 13b apresentam tais relações.



**Figura 13.** Tratamento dos dados obtidos na determinação do ALP por voltametria cíclica com variação de velocidade de varredura a fim de compreender os processos eletroquímicos envolvidos no processo (a) Dependência da intensidade de corrente com a raiz quadrada da velocidade de varredura da voltametria cíclica. (b) Variação do logaritmo da corrente em função dos valores de logaritmo em base 10 da velocidade de varredura do potencial.

Segundo a literatura, a relação da intensidade de corrente com a raiz quadrada da velocidade de varredura não deve ser linear para um processo

controlado pela adsorção das espécies (Pham et al., 1994). Como pode ser visto na Figura 13a, a relação de intensidade de pico e raiz quadrada da velocidade de varredura não foi linear, indicando um processo adsorptivo (Pham et al., 1994).

Outra forma de comprovar o processo de transporte de massa é relacionar o logaritmo na base dez da intensidade de pico com log da velocidade de varredura, um comportamento linear e um coeficiente angular (inclinação) próximo a 1,0 indica um fenômeno adsorptivo. Se a inclinação for próxima a 0,5, correspondem à sistemas controlados pela difusão (Amaral, 2012) . Desta forma, como pode ser observado na Figura 13b, a inclinação da reta foi de 1,04 aproximadamente 1,0, confirmando assim o caráter adsorptivo do sistema. Assim, pode-se concluir que o processo voltamétrico envolvido na determinação do ALP baseia-se provavelmente na adsorção do analito sobre a superfície do eletrodo de trabalho.

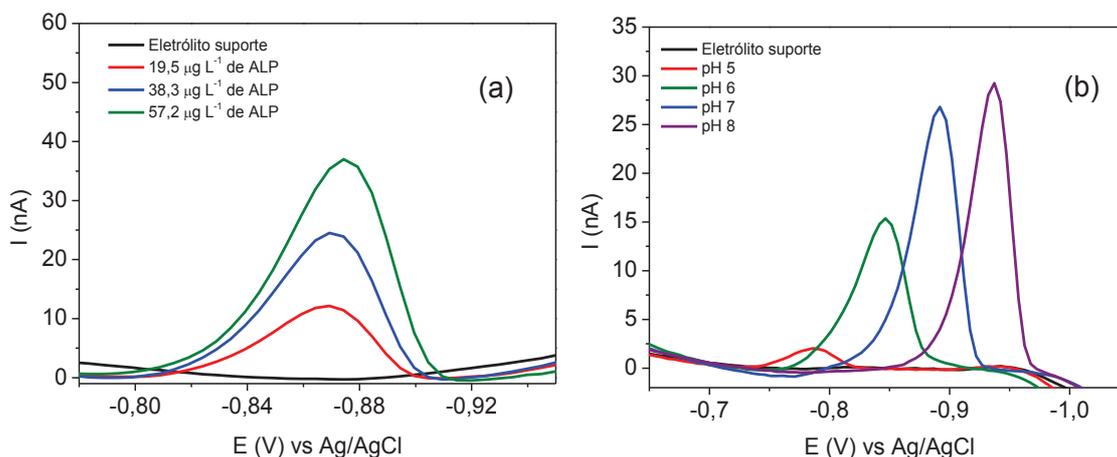
Avaliação do eletrólito suporte e potencial hidrogeniônico para determinações do ALP

Para os estudos com ALP, análises foram conduzidas com o eletrólito tampão fosfato. Este eletrólito vem sendo empregado em determinações voltamétricas do ALP em amostras biológicas (Habeeb et al., 1989b) e foi escolhido para os estudos com ALP em matrizes ambientais. Após a escolha do eletrólito de suporte, avaliou-se a influência do potencial hidrogeniônico (pH) nos sinais voltamétricos do ALP.

A Figura 14a mostra o sinal voltamétrico do eletrólito suporte tampão fosfato pH 7,0 na ausência do fármaco e o sinal voltamétrico do ALP em meio do eletrólito suporte, obtidos por  $VA_{ds}RC$ -PD. Observa-se a presença de um único pico referente ao ALP na região de interesse, indicando a ausência de outras espécies eletroativas, próximo ao potencial de meia onda do fármaco  $0,87 \pm 0,002$  V.

A Figura 14b mostra a influência do pH sobre o sinal voltamétrico do ALP e pode-se notar uma variação do potencial de pico do ALP com a mudança do pH. Observa-se um deslocamento para regiões mais anódicas quando o pH do meio torna-se mais ácido. A variação do potencial de pico deve-se a participação de íons hidrogênio no processo de redução do ALP (Habeeb et al., 1989b). Além disso, é possível notar a variação da intensidade de pico nas diferentes condições de pH do meio. Para pH 5,0, a intensidade foi 2,2 nA, enquanto que para pH 8,0, o valor aumentou cerca de 13,3 vezes. Sinais mais elevados do analito são desejados, pois

se diferenciam mais claramente dos ruídos, sendo possível obter baixos limites de detecção e quantificação. Devido a pequena diferença das intensidades de corrente entre o pH 7,0 e 8,0 e às facilidades de se trabalhar em condição de neutralidade, o pH 7,0 foi escolhido como o mais adequado.



**Figura 14.** Sinal voltamétrico do ALP. (a) Sinal analítico do ALP e eletrólito suporte tampão fosfato, pH 7. (b) Voltamogramas obtidos na determinação do antidepressivo ALP ( $19,5 \mu\text{g L}^{-1}$ ) em meio de tampão fosfato com diferentes valores de pH empregando VA<sub>ds</sub>RC-PD, eletrólito suporte pH 7. Velocidade de varredura,  $25 \text{ mV s}^{-1}$ ;  $t_{\text{eq}}$ , 5s;  $E_{\text{ac}}$ , -0,8 V;  $t_{\text{ac}}$ , 60 s;  $\Delta E$ , -0,6 até -1,2 V; amplitude de pulso, 50 mV e tempo de pulso 40 ms.

### 5.1.2. Otimização dos parâmetros voltamétricos para a determinação de ALP em matrizes ambientais

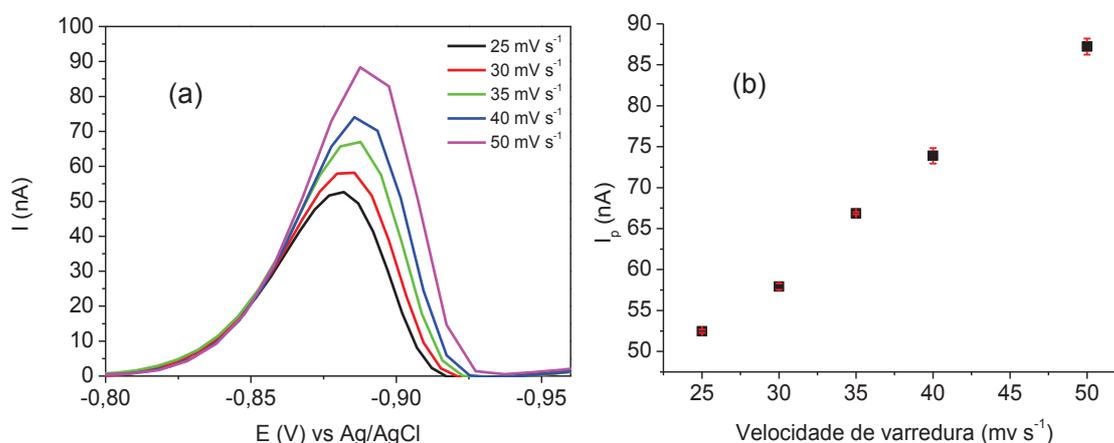
Parâmetros utilizados na literatura para análises voltamétricas do ALP em outras matrizes, serviram de ponto de partida para os estudos de otimização das variáveis voltamétricas (Habeeb et al., 1989a; Habeeb et al., 1989b). Desta forma, devido às diferenças nas características da amostra, buscou-se determinar as melhores condições de análise para ALP em matrizes ambientais.

#### 5.1.2.1. Velocidade de varredura

A velocidade de varredura de potencial pode ser definida como a variação do potencial aplicado durante determinado tempo. Este parâmetro pode ser variado para tornar as análises mais rápidas, porém o aumento da velocidade de varredura pode afetar a resolução e formato do pico (Aleixo, 2003). A influência da velocidade de varredura sobre a intensidade de corrente do ALP está mostrada na Figura 15. A Figura 15a apresenta os voltamogramas para a determinação de  $56,3 \mu\text{g L}^{-1}$  de ALP

sob diferentes velocidades de varredura. Nota-se que a intensidade de corrente do pico variou em função da velocidade de varredura aplicada, aumentando com os incrementos deste parâmetro. Com o aumento da velocidade de varredura, observa-se também uma menor resolução do voltamograma e pequenos deslocamentos do pico para potenciais mais catódicos.

Na Figura 15b é possível observar que a intensidade de corrente do pico referente ao analito aumentou de forma linear com o aumento da velocidade de varredura. Apesar do aumento de corrente do analito em velocidades maiores de varredura, nota-se uma diminuição da simetria e resolução do pico. Assim, o parâmetro escolhido foi  $25 \text{ mV s}^{-1}$ , por apresentar melhor resolução do pico voltamétrico. Trabalhos existentes na literatura utilizam velocidades de varredura de 5 a  $50 \text{ mV s}^{-1}$  para a determinação do ALP e outros BDZs por voltametria em amostras biológicas e composições farmacêuticas (Habeeb et al., 1989a ; Habeeb et al., 1989b; Carvalho et al., 2010).



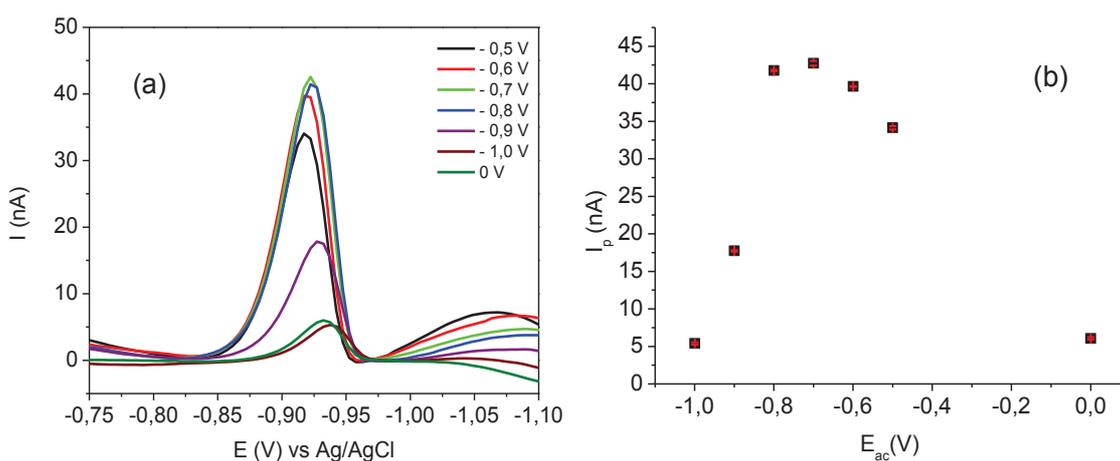
**Figura 15.** Variação da intensidade de corrente em função da velocidade de varredura (a) Voltamogramas obtidos para a determinação de ALP ( $56,3 \mu\text{g L}^{-1}$ ) em tampão fosfato, pH 7 utilizando a VA<sub>ds</sub>RC-PD com diferentes velocidades de varredura do potencial, (b) Relação entre a intensidade de corrente de pico do ALP em função da velocidade de varredura. Parâmetros utilizados,  $t_{\text{eq}}$ , 5s;  $E_{\text{ac}}$ , -0,8 V;  $t_{\text{ac}}$ , 60 s;  $\Delta E$ , -0,6 até -1,1 V; amplitude de pulso, 50 mV e tempo de pulso, 40 ms.

### 5.1.2.2. Potencial de acumulação

O potencial de acumulação do ALP também foi otimizado a fim de melhorar a acumulação do analito sobre a superfície do eletrodo de mercúrio. Esse parâmetro pode ser definido como um potencial aplicado previamente à varredura para pré-concentrar o analito, possibilitando análises em concentrações traço. A Figura 16a mostra os voltamogramas do analito obtidos para os diferentes potenciais de

acumulação utilizados para a determinação do ALP. Pode-se observar um pequeno deslocamento do potencial de pico do analito para potenciais mais catódicos para os potenciais 0,0 e de -0,8V até -1,0V. Nota-se ainda uma variação da intensidade de pico do ALP em função do potencial de acumulação aplicado. A intensidade de pico referente ao fármaco aumentou até o potencial de -0,7 V, após, ocorreu uma diminuição na magnitude do sinal.

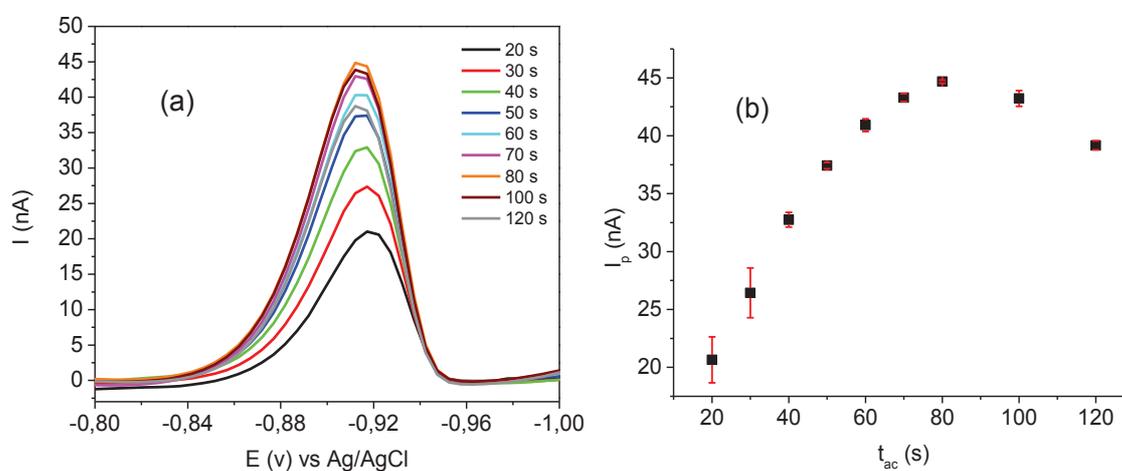
A Figura 16b apresenta a variação da intensidade de corrente de pico para os potenciais de acumulação avaliados. Nota-se que os menores valores de corrente foram obtidos para 0,0 V e para os potenciais mais negativos estudados. Por exemplo, em potenciais de acumulação mais negativos e próximos de zero, como -1,0 V, a intensidade de corrente foi aproximadamente 7,9 vezes inferior ao sinal mais elevado obtido, com potencial de -0,7 V. Percebe-se ainda, que as intensidades do sinal analítico foram similares e mais elevadas com os potenciais de acumulação -0,7 e -0,8 V. Assim, escolheu o potencial de -0,8 V como o mais adequado devido ao sinal elevado e a melhor resolução de pico. O potencial de acumulação otimizado está condizente com o encontrado na literatura para o ALP que é -0,8 V, onde utilizou-se a voltametria de pulso diferencial para determinações de alguns benzodiazepínicos a amfepramona em composições farmacêuticas (Carvalho et al., 2010).



**Figura 16.** Variação da intensidade de corrente em função do potencial de acumulação (a) Voltamogramas obtidos na determinação de  $56,3 \mu\text{g L}^{-1}$  de ALP em meio de tampão fosfato pH 7 variando os potenciais de acumulação utilizando  $VA_{ds}RC$ -PD. (b) Relação entre intensidade de corrente de pico em função do potencial de acumulação. Velocidade de varredura,  $25 \text{ mV s}^{-1}$ ;  $t_{eq}$ , 5s;  $t_{ac}$ , 60 s;  $\Delta E$ , -0,6 até -1,2 V; amplitude de pulso, 50 mV e tempo de pulso 40 ms.

### 5.1.2.3. Tempo de acumulação

O tempo em que ocorre a aplicação do potencial de acumulação, para a pré-concentração do analito também foi otimizado. Essa otimização foi importante realizar, pois devido às baixas concentrações do analito como contaminantes em matrizes ambientais, torna-se necessária a pré-concentração do mesmo, na superfície eletrolítica, pouco antes à realização da medida. Este parâmetro determina o tempo em que o analito é acumulado na superfície da gota de mercúrio imediatamente antes da varredura no potencial desejado, ocasionando a redissolução do analito e obtenção do sinal analítico. Sabe-se que concentrações mais baixas do analito demandam maiores períodos de acumulação para obter sinais mensuráveis. Pode-se notar na Figura 17a que o tempo de acumulação influencia no sinal voltamétrico do ALP. De modo geral, nota-se que o potencial de pico sofre um deslocamento desprezível com o aumento do tempo de acumulação, o valor para o potencial foi  $0,91 \pm 0,003$  V. Percebe-se ainda que o sinal do analito aumentou proporcionalmente com o aumento do tempo de pré concentração até 80 s. Após esse período, o sinal analítico diminuiu em relação ao tempo de 80 s.



**Figura 17.** Variação da intensidade de corrente em função do tempo de acumulação empregado. (a) Voltamogramas obtidos para a determinação de  $56,3 \mu\text{g L}^{-1}$  de ALP em diferentes tempos de acumulação, utilizando a VA<sub>ds</sub>RC-PD em tampão fosfato, pH 7. (b) Variação da intensidade de corrente de pico em função do tempo de acumulação aplicado. Velocidade de varredura,  $25 \text{ mV s}^{-1}$ ;  $t_{\text{eq}}$ , 5s;  $E_{\text{ac}}$ , -0,8 V;  $\Delta E$ , -0,6 até -1,2 V; amplitude de pulso, 50 mV e tempo de pulso 40 ms.

A variação do sinal voltamétrico em função do tempo de acumulação pode ser analisada na Figura 17b. Observa-se que a intensidade de corrente de pico variou linearmente em função ao aumento do tempo de acumulação de 20 a 60 s. Após 60 s, nota-se claramente um desvio na linearidade, mudando o comportamento da

curva, devido à diminuição do sinal voltamétrico. Pode-se sugerir que tal fenômeno ocorre devido à saturação da superfície do eletrodo de trabalho pela acumulação da substância orgânica (Santos, 2012).

Sendo assim, o tempo de acumulação necessário em cada análise depende diretamente da concentração do analito, tornando-se necessária a avaliação de cada caso em particular. Para evitar a saturação do fármaco na gota de mercúrio e obter maior sinal de corrente foi escolhido o tempo de 60 s para ser empregado nos outros estudos de otimização utilizando  $56,3 \mu\text{g L}^{-1}$  de ALP.

#### 5.1.2.4. Tempo de equilíbrio

O tempo de equilíbrio, ou tempo de repouso, é uma variável importante em análises voltamétricas. Imediatamente após a acumulação do analito no eletrodo, as espécies eletroativas não estão uniformemente distribuídas sobre a superfície do eletrodo, sendo necessário um curto período de tempo para que ocorra a homogeneização das mesmas por toda a superfície da gota de mercúrio (Cunha, 2010). Os sinais de corrente de pico obtidos estão mostrados na Tabela 5. Neste estudo foram utilizados velocidade de varredura,  $25 \text{ mV s}^{-1}$ ;  $E_{ac}$ ,  $-0,8 \text{ V}$ ;  $\Delta E$ ,  $-0,6$  até  $-1,2 \text{ V}$ ; amplitude de pulso,  $50 \text{ mV}$  e tempo de pulso  $40 \text{ ms}$ .

**Tabela 5.** Resposta analítica do ALP em função do tempo de equilíbrio.

Tempo de equilíbrio (s)	Intensidade de corrente média (na)	Desvio padrão
0	30	2
2	31	3
5	32,6	0,3
7	32,5	0,2
10	32,6	0,3
12	32,6	0,1
18	32,8	0,2

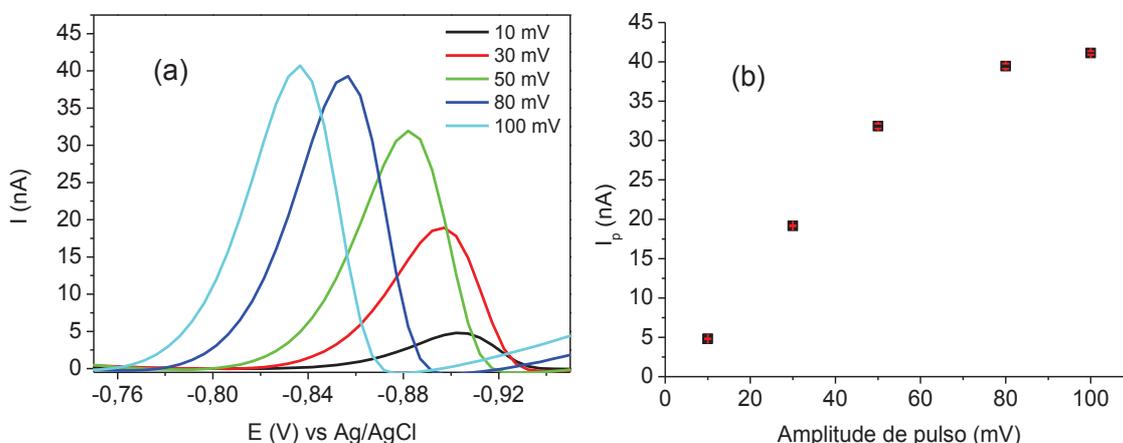
Através dos resultados mostrados na Tabela 5, nota-se que as intensidades de corrente obtidas, no geral, não apresentaram diferenças significativas para os tempos de equilíbrio avaliados. Entretanto, para o tempo de equilíbrio de 0 e 2

s, observa-se um desvio padrão mais elevado em relação aos outros tempos. Este comportamento pode estar relacionado à má homogeneização do analito na superfície da gota de mercúrio. O valor médio de corrente foi  $32 \pm 1,1$  nA. Pode-se relatar ainda que os voltamogramas apresentam perfis similares, sem deslocamento do potencial de pico. Desta forma, estipulou-se um tempo de 5 s para garantir a homogeneidade do sistema sem prolongar o tempo de análise. Este tempo foi escolhido devido ao menor desvio padrão das réplicas de corrente amostrada.

#### **5.1.2.5. Amplitude de pulso**

A forma de aplicação de potencial em função do tempo pode variar dependendo do método voltamétrico escolhido. Nesse trabalho escolheu-se trabalhar com a voltametria adsortiva com pulso diferencial. Esta técnica pulsada foi empregada por já ser utilizada em determinações do ALP em amostras biológicas e composições farmacêuticas (Habeb et al., 1989b; Carvalho et al., 2010). A amplitude de pulso pode ser definida como a intensidade do incremento de pulso aplicado sobre um potencial de varredura. A amplitude do pulso diferencial foi otimizada visando minimizar a contribuição da corrente não faradaica, uma das componentes da corrente de fundo. A amplitude de pulso geralmente é mantida em 50 mV e normalmente não se utilizam valores superiores a 100 mV, pois o aumento da altura do pulso pode provocar um aumento da largura do pico, causando a diminuição da resolução do voltamograma (Bard e Faulkner, 2001; Aleixo, 2003). Desta forma, este parâmetro foi variado de 10 a 100 mV na determinação do ALP por  $VA_{ds}RC-PD$  (Figura 18). Na Figura 18a pode-se notar que a amplitude de pulso durante aplicação de potencial influencia o voltamograma do ALP. A influência observada deve-se à alteração da intensidade de corrente e ao deslocamento do pico para potenciais mais catódicos. Na Figura 18b observa-se que a intensidade de corrente do pico aumentou com o aumento da intensidade da amplitude de pulso. O aumento da amplitude de pulso de 10 mV para 100 mV ocasionou um aumento de aproximadamente oito vezes o sinal analítico. Esse comportamento é esperado porque com a aplicação do pulso, ocorre uma maior diferenciação entre a corrente faradaica e não faradaica e, portanto, observa-se um maior sinal do analito. Além disso, nota-se que a partir de 80 mV, o sinal analítico torna-se praticamente constante. Devido à pequena diferença da intensidade de corrente para as

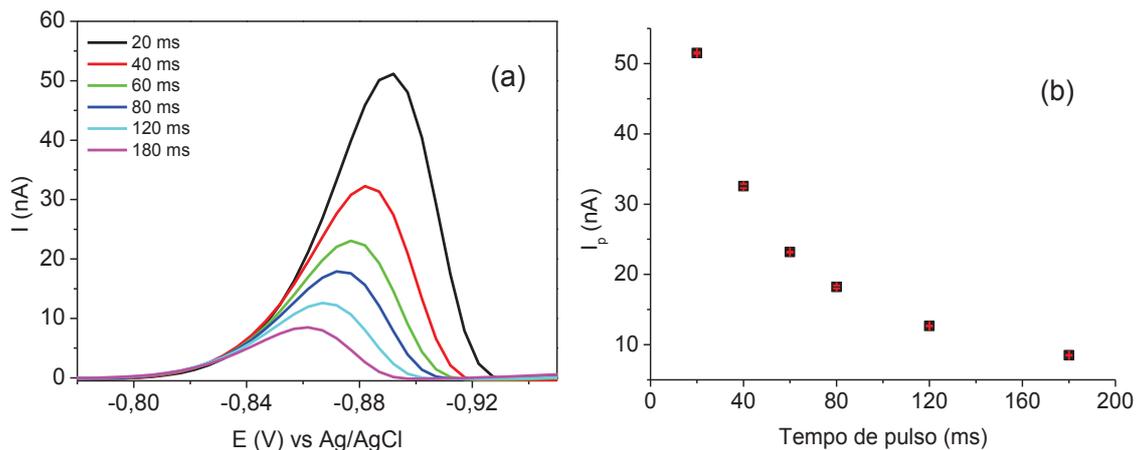
amplitudes de 80 e 100 mV e para evitar possível diminuição da resolução em amplitudes superiores a 100 mV, decidiu-se utilizar 80 mV de amplitude de pulso.



**Figura 18.** Variação da intensidade de corrente em função da variação da amplitude de pulso (a) Voltamogramas obtidos para a determinação de  $56,33 \mu\text{g L}^{-1}$  de ALP por  $\text{VA}_{\text{ds}}\text{RC}$  em tampão fosfato pH 7 utilizando diferentes valores de amplitude de pulso. (b) Relação entre intensidade de corrente de pico em função da amplitude de pulso utilizado. Velocidade de varredura,  $25 \text{ mV s}^{-1}$ ;  $t_{\text{eq}}$ , 5s;  $E_{\text{ac}}$ , -0,8 V;  $t_{\text{ac}}$ , 60 s;  $\Delta E$ , -0,6 até -1,2 V e tempo de pulso 40 ms.

#### 5.1.2.6. Tempo de pulso

O tempo de pulso pode ser definido como o tempo em que ocorre a aplicação do pulso sobre o potencial de varredura. Este parâmetro pode influenciar diretamente na capacidade de detecção do método analítico. Isto porque, como as intensidades de corrente decaem com o tempo, tanto a faradaica (referente ao analito) quanto a capacitiva (devido aos processos de carga e descarga da dupla camada elétrica), um tempo de pulso relativamente alto pode ocasionar a diminuição do sinal analítico (Skoog et al., 2006). Na otimização desse parâmetro, escolheu-se variar de 20 a 180 ms o tempo de pulso empregado na varredura de potencial. A Figura 19a mostra a influência do tempo de pulso no sinal analítico do ALP em meio de tampão fosfato pH 7,0, utilizando  $\text{VA}_{\text{ds}}\text{RC-PD}$ . É possível observar um deslocamento do pico para potenciais mais anódicos com o aumento do tempo de pulso. Além disso, nota-se que o tempo de pulso influencia a intensidade de corrente, o aumento do tempo de pulso ocasiona a diminuição da magnitude de pico do ALP.



**Figura 19.** Variação da intensidade de corrente em função do tempo de pulso aplicado (a) Voltamogramas obtidos no estudo da influência do tempo de pulso na determinação de  $56,33 \mu\text{g L}^{-1}$  de ALP utilizando a  $\text{VA}_{\text{dsRC-PD}}$  em meio de tampão fosfato, pH 7. (b) Curva da intensidade de corrente em função do tempo de pulso. Velocidade de varredura,  $25 \text{ mV s}^{-1}$ ;  $t_{\text{eq}}$ , 5s;  $E_{\text{ac}}$ , -0,8 V;  $t_{\text{ac}}$ , 60 s;  $\Delta E$ , -0,6 até -1,2 V e amplitude de pulso 50 mV.

Nota-se na Figura 19b, um decaimento da corrente de pico com o aumento do tempo de pulso. Provavelmente isso ocorra devido ao fato da corrente gerada pelo incremento no potencial decair com o tempo. Desta forma, quanto maior o tempo de pulso, menor será a intensidade do pico (Skoog, et al., 2006). Embora, tenha uma diferença significativa na intensidade de corrente de pico entre 20 e 40 ms de tempo de pulso, escolheu-se trabalhar com 40 ms devido à melhor resolução do pico voltamétrico nesta condição. Este tempo condiz com o utilizado por Carvalho et al. (2010), 40 ms.

#### 5.1.2.7. Parâmetros otimizados no desenvolvimento do método para a determinação do ALP

Após a otimização dos parâmetros voltamétricos para o método analítico, as condições mais adequadas dos parâmetros voltamétricos foram utilizadas para estudos de validação do método desenvolvido e determinações de ALP em amostras aquosas reais de rios e lagos. Os parâmetros otimizados estão mostrados na Tabela 6.

**Tabela 6.** Parâmetros voltamétricos otimizados para o método analítico desenvolvido para o ALP em amostras ambientais.

Parâmetro	Valores
Potencial de acumulação	- 0,8 V
Tempo de acumulação	60 s
Velocidade de varredura	25 mV s <sup>-1</sup>
Tempo de equilíbrio	5 s
Amplitude de pulso	80 mV
Tempo de pulso	40 ms
Área da gota	0,32 mm <sup>2</sup>
Tempo de purga	300 s
Potencial de varredura	-0,75 a -0,95

Os parâmetros otimizados para o método analítico desenvolvido, são consideravelmente diferentes que os utilizados em outros estudos com o ALP. Habeeb et al. (1989a) e Habeeb et al. (1989b) realizaram determinação em amostras biológicas. Enquanto, Carvalho et al., (2010), realizaram estudos com o ALP, entre outros BDZs, em composições farmacêuticas. Carvalho et al. (2010), por exemplo, utilizaram -0,8 V de potencial de acumulação e 40 ms de tempo de pulso, entretanto, suas determinações foram realizadas em pH 10,0.

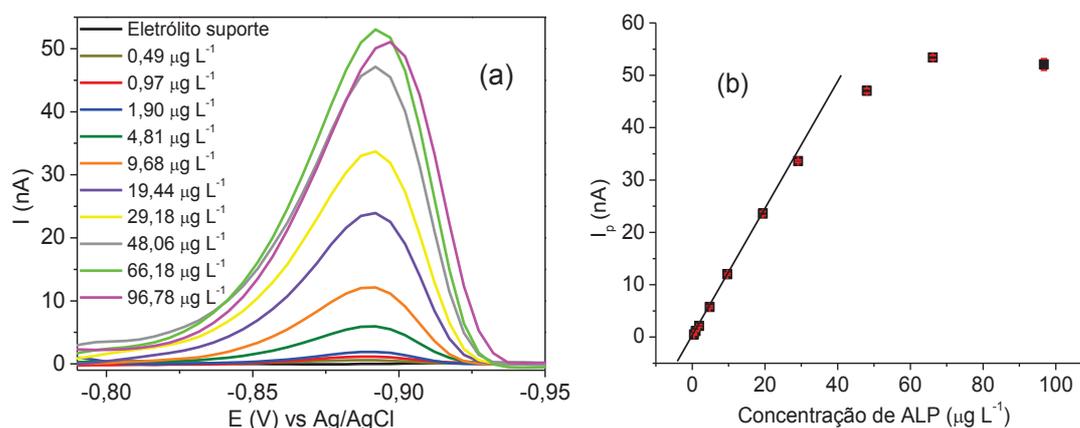
### 5.1.3. Validação do método analítico desenvolvido para determinações de ALP em amostras ambientais de água

Estudos de validação são necessários para avaliar o desempenho e a confiabilidade do método analítico desenvolvido. Para tal, parâmetros de validação como Linearidade, exatidão, precisão, limites de detecção e quantificação são avaliados.

#### 5.1.3.1. Avaliação da Linearidade

Utilizando as condições otimizadas, previamente estabelecidas, foi realizada uma curva com dez níveis de concentração do ALP em meio de eletrólito suporte a fim de verificar a faixa linear de trabalho do método desenvolvido. A linearidade é um

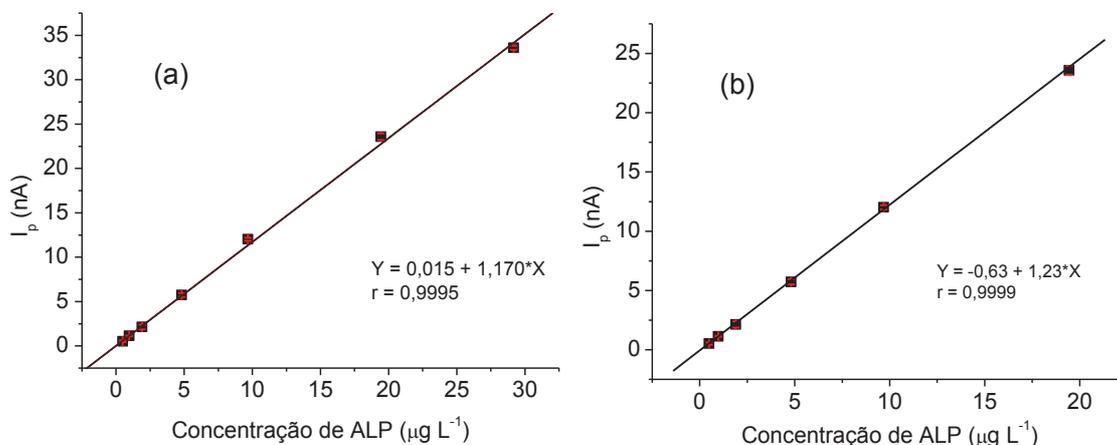
parâmetro de validação importante para análises quantitativas. Em um modelo linear, como sugere o nome, a resposta do sinal aumenta linearmente com a concentração do analito, permitindo assim a construção de uma curva de calibração (ANVISA, 2003). A Figura 20 apresenta os dados obtidos nesse estudo de adição padrão e avaliação da faixa linear de trabalho. Para tal, utilizou-se uma calibração por curva de adição padrão, que consiste em obter o sinal de resposta em função da concentração do analito. O sinal de resposta refere-se à intensidade de corrente de pico ( $I_p$ ) que é obtida através da altura do pico referente ao analito em função de uma linha base. A Figura 20a mostra a presença do pico do ALP localizado no potencial  $-0,89$  V. De modo geral, nota-se que a adição consecutiva do analito promoveu um aumento da intensidade de corrente de pico para uma faixa de concentração que variou de  $0,5$  a  $66,2 \mu\text{g L}^{-1}$  de ALP.



**Figura 20.** Resultados obtidos no estudo da calibração e avaliação da linearidade. (a) Voltamogramas obtidos na determinação de ALP utilizando  $VA_{ds}RC$ -PD em tampão fosfato pH 7 por meio de curva de adição padrão. (b) Curva de adição padrão para o ALP. Parâmetros voltamétricos conforme Tabela 4.

A Figura 20b mostra a relação entre as intensidades de corrente de pico em função da concentração de ALP em toda a faixa de trabalho estudada, compreendida entre  $0,5$  a  $96,8 \mu\text{g L}^{-1}$ . Nota-se que o aumento da  $I_p$  do ALP foi diretamente proporcional à concentração do analito até cerca de  $30 \mu\text{g L}^{-1}$ . Acima desta concentração, nota-se que a resposta não aumenta proporcionalmente com a concentração, apresentando um desvio na linearidade, indicativo de que o modelo linear não se ajusta para concentrações mais elevadas. Assim, é importante realizar um estudo mais aprofundado da faixa linear de trabalho para a determinação voltamétrica do ALP através da avaliação do método de regressão linear. As Figuras

21a e 21b mostram as curva de adição padrão para o ALP, onde foi obtida uma correlação linear entre a concentração do analito e o sinal instrumental.



**Figura 21.** Estudo da linearidade (a) Faixa linear dinâmica. (b) Curva de adição padrão para o ALP em sua faixa linear.

Observa-se na Figura 21a um ótimo coeficiente de correlação ( $r = 0,9995$ ) indicando uma resposta linear do método. A Figura 21b mostra a curva de adição padrão do ALP onde é possível realizar uma determinação com precisão e exatidão e linearidade exigidas. Observa-se na Figura 21b um excelente coeficiente de correlação ( $r = 0,9999$ ). Comparando a Figura 21a com a 19b, observa-se ainda, que além da melhora no coeficiente de correlação, ocorre um aumento da sensibilidade do método com a retirada do ponto correspondente a  $29,18 \mu\text{g L}^{-1}$ . A sensibilidade do método é indicada pela inclinação da reta (*slope*), que passou de 1,17 para 1,23. A confirmação da linearidade do método foi obtida por meio de uma regressão linear (ANOVA) utilizando o software MINITAB 16.2.2.

Com o auxílio deste software estatístico, foi possível determinar o valor da variância explicada ( $R^2$ ), do F de regressão ( $F_r$ ) e do F de falta de ajuste ( $F_{faj}$ ) que servem para confirmar a linearidade. As grandezas determinadas e os valores de F crítico tabelado, no nível de confiança de 95% para uma distribuição bicaudal, estão mostrados na Tabela 7.

**Tabela 7.** Parâmetros da regressão linear do método analítico desenvolvido para o ALP, para duas faixas de concentração.

	0,5 a 29,2 $\mu\text{g L}^{-1}$	Valor tabelado (95%)	0,5 a 19,4 $\mu\text{g L}^{-1}$	Valor tabelado (95%)
$R^2$	99,8%		99,9%	
$F_r$	11692,52	4,381	21850,13	4,494
$F_{faj}$	16,47	2,958	1,49	3,259

A Tabela 7 apresenta os valores de  $R^2$ ,  $F_r$  e  $F_{faj}$  determinados e tabelados para a regressão linear em cada faixa de concentração de ALP. É possível afirmar que o modelo proposto não apresenta linearidade na faixa de concentração estudada, do limite de quantificação até 29,18  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Para tal, devem-se analisar os valores de variância explicada, F de regressão e F de falta de ajuste, onde  $R^2$  deve ser próximo a 1,  $F_r$  deve ser maior que o valor tabelado e  $F_{faj}$  menor que o F crítico tabelado. Como o  $F_{faj}$  apresentou valor maior que o F tabelado, pode-se afirmar que existe uma falta de ajuste do modelo linear para esta faixa de concentração.

Analisando a regressão para a faixa de concentração do LQ a 19,44  $\mu\text{g L}^{-1}$ , nota-se que o  $R^2$  é aproximadamente 1 e o  $F_r$  é maior que F crítico tabelado, indicando que o modelo é linear. A análise do  $F_{faj}$  nos diz se o modelo proposto se ajusta aos dados obtidos. Como 1,49 é menor que o F crítico tabelado, o modelo linear ajusta-se perfeitamente à faixa de concentração estudada. Desta forma, as determinações do ALP podem ser realizadas por método de adição padrão dentro da faixa linear de trabalho. A faixa linear de trabalho pode ser definida como a faixa de concentração onde é possível realizar uma determinação com precisão, exatidão e linearidade exigidas.

### 5.1.3.2. Limites de detecção e quantificação

Segundo a resolução da ANVISA nº 899 de 29 de maio de 2003, limite de detecção pode ser definido como a menor quantidade do analito que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado em uma amostra. Da mesma forma, o limite de quantificação pode ser entendido como a menor quantidade de analito que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis em uma amostra (ANVISA, 2003).

Os valores determinados para LD e LQ do método foram  $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $0,4 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente. Estes valores foram similares ou melhores que os descritos na literatura para o ALP, utilizando voltametria por pulso diferencial (Habeeb et al., 1989a; Habeeb et al., 1989b).

### 5.1.3.3. Estudo de interferentes

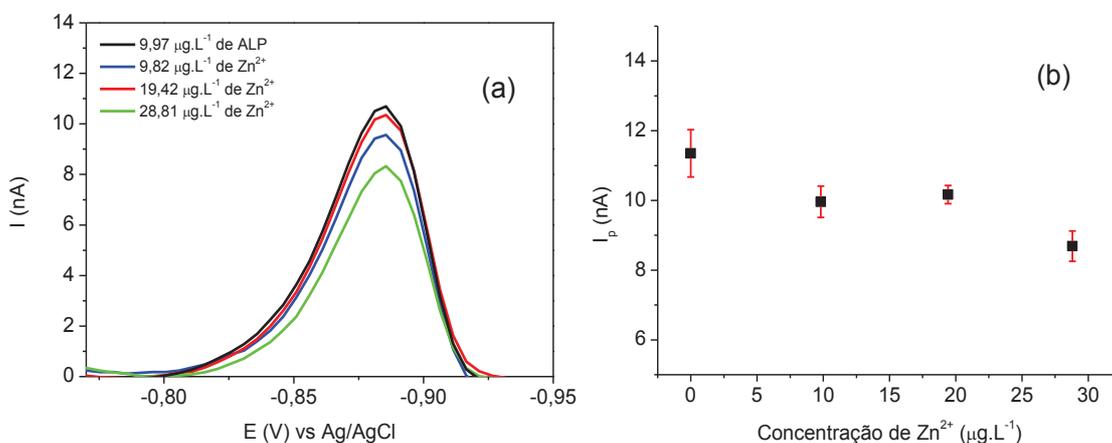
“A seletividade pode ser entendida como a capacidade que o método tem de medir exatamente um composto em presença de outros componentes, tais como impurezas, produtos de degradação, etc.” (ANVISA, 2003). A avaliação da seletividade do método deu-se por meio de estudos de interferência com íons metálicos e substâncias orgânicas. Alguns metais, como  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$ , estão presentes em grandes concentrações no ambiente. Estes metais apresentam como característica a possibilidade de se complexarem à substâncias orgânicas. Para os estudos de interferência com íons metálicos, foram realizadas adições de  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$ , em concentrações próximas à do analito,  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ , e até três vezes superiores à concentração inicial. Os estudos foram realizados com os íons metálicos separadamente e com os três íons juntos em solução. Os resultados desses ensaios estão mostrados na Tabela 8.

**Tabela 8.** Interferência dos íons metálicos no sinal analítico do ALP.

Concentrações. Adicionadas ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Intensidades de corrente médias (nA) para o ALP			
	$\text{Cu}^{2+}$	$\text{Fe}^{3+}$	$\text{Zn}^{2+}$	$\text{Cu}^{2+}+\text{Fe}^{3+}+\text{Zn}^{2+}$
0	$11,4 \pm 0,7$	$11,3 \pm 0,7$	$11,4 \pm 0,7$	$11,4 \pm 0,7$
9,8	$11,4 \pm 0,4$	$10,3 \pm 0,8$	$10,0 \pm 0,5$	$10 \pm 1$
19,4	$10,7 \pm 0,4$	$10,7 \pm 0,5$	$10,2 \pm 0,3$	$9,3 \pm 0,5$
28,8	$10,4 \pm 0,5$	$10,7 \pm 0,1$	$8,7 \pm 0,4$	

Observa-se de modo geral uma baixa interferência destes íons metálicos no sinal analítico do ALP. Pode-se observar que o íon que provocou maior variabilidade na intensidade de corrente foi o  $\text{Zn}^{2+}$ . A adição de  $28,8 \mu\text{g L}^{-1}$  do íon provocou uma diminuição de 24% na intensidade de corrente do ALP. Nota-se ainda que as adições dos outros metais não provocaram interferência significativa no sinal analítico do ALP. A Figura 22 mostra a variação da intensidade de pico do ALP com

a adição de  $Zn^{2+}$ . Observando as Figuras 22a e 22b, nota-se uma influência do íon metálico sobre a intensidade de pico. É possível verificar que a adição deste metal de transição provoca uma leve diminuição da intensidade de corrente do analito, de  $11,4 \pm 0,7$  nA para  $8,7 \pm 0,4$  nA quando adicionado  $28,8 \mu\text{g L}^{-1}$  de zinco em solução contendo  $9,97 \mu\text{g L}^{-1}$  do analito. Porém a interferência é mínima mesmo em concentrações mais elevadas de zinco e não atrapalha significativamente a determinação do ALP. O teste realizado com os três íons concomitantemente em solução apresentou resposta semelhante a este, como os outros metais não interferiram na intensidade de pico do analito, pode-se atribuir a diminuição da corrente à presença de  $Zn^{2+}$  em solução.

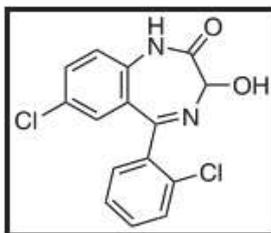


**Figura 22.** Resultados obtidos nos testes de interferência com  $Zn^{2+}$ . (a) Voltamogramas obtidos nos testes de interferência do zinco na determinação do ALP utilizando  $VA_{ds}RC$ -PD em meio de tampão fosfato pH 7. (b) Gráfico da variação da intensidade de corrente de pico do ALP em função das adições de  $Zn^{2+}$ . Condições de análise: Velocidade de varredura,  $25 \text{ mV s}^{-1}$ ;  $t_{eq}$ , 5s;  $E_{ac}$ , -0,8V;  $t_{ac}$ , 120 s;  $\Delta E$ , -0,7 até -1,0 V; tempo de pulso 40 ms e amplitude de pulso 80 mV.

Análises de interferência com compostos orgânicos mostraram-se necessárias, pois algumas moléculas podem adsorver na gota de mercúrio e atrapalhar a adsorção do analito de interesse. Pode ocorrer também a interação destas moléculas com o analito, mudando suas características e interferindo no potencial de pico. Para este estudo, realizaram-se testes com dois fármacos. Lorazepam e ETE, e com ácido húmico comercial, mimetizando a matéria orgânica dissolvida presente em ambientes aquáticos.

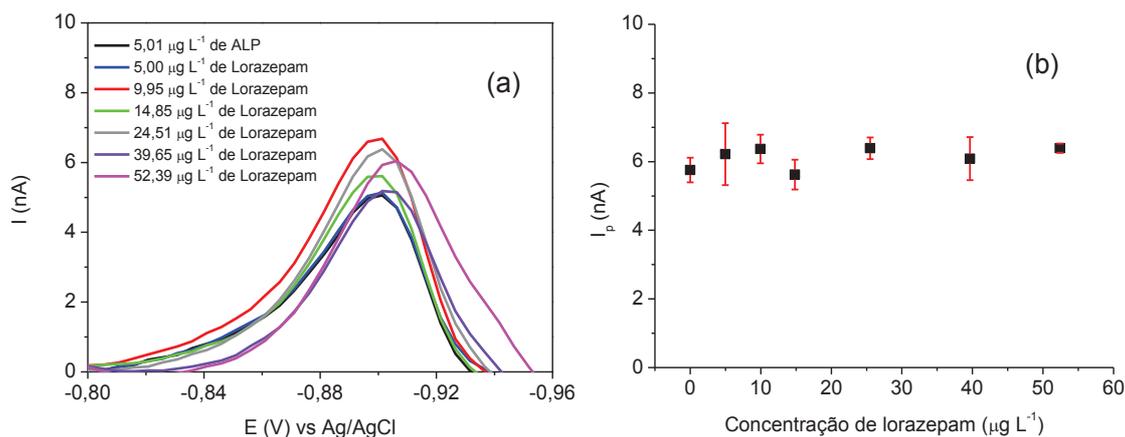
A influência do psicofármaco lorazepam no sinal analítico do ALP foi avaliada. O psicofármaco lorazepam, pertence à mesma classe do ALP, os benzodiazepínicos, apresenta em sua fórmula estrutural anéis aromáticos e uma ligação  $C=N$ , assim como o ALP e, portanto, devido às características semelhantes, é um possível

interferente na determinação do ALP em amostras reais. A Figura 23 mostra a fórmula estrutural do lorazepam.



**Figura 23.** Fórmula estrutural do lorazepam, adaptado de Sampaio, 2007.

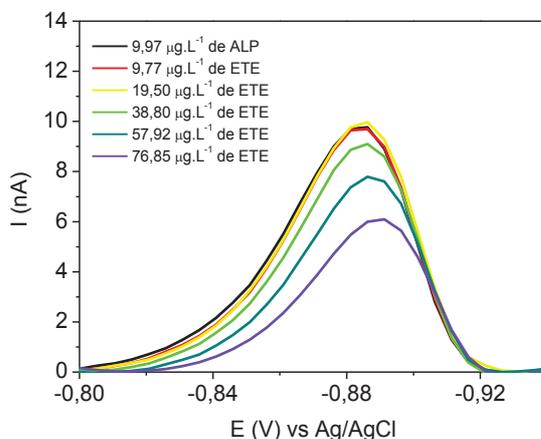
Para o estudo com o lorazepam, uma solução contendo  $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$  de ALP foi preparada e analisada por  $\text{VA}_{\text{ds}}\text{RC-PD}$ , em seguida foram realizadas adições do lorazepam e determinações voltamétricas. A Figura 24a mostra o pico do sinal analítico do ALP em tampão fosfato, seguido por adições do lorazepam. Nota-se a ausência de interferências significativas do lorazepam sobre o analito para as adições de 5,0 a 39,6 de lorazepam, pois as variações das intensidades de pico do ALP encontram-se dentro do desvio padrão. Também a simetria e resolução do pico voltamétrico não foram afetados. Observa-se ainda, nos voltamogramas, um leve deslocamento do potencial de pico do ALP para regiões mais catódicas em concentrações de lorazepam superiores a  $39,7 \mu\text{g L}^{-1}$ , ou seja, oito vezes maior em relação à concentração do ALP. Este comportamento pode ser explicado devido ao potencial de pico para a redução do lorazepam, determinado experimentalmente, ser próximo ao do ALP, ligeiramente mais catódico sob as mesmas condições. É possível observar que a intensidade de corrente do ALP permanece praticamente inalterada, como mostrado na Figura 24b. Assim, concluiu-se que este fármaco psicoativo não interfere nas determinações quantitativas do ALP.



**Figura 24.** Resultados obtidos nos testes de interferência com o psicofármaco lorazepam. (a) Voltamogramas obtidos nos testes de interferência do psicofármaco lorazepam na determinação do ALP utilizando  $\text{VA}_{\text{dsRC-PD}}$  em meio de tampão fosfato pH 7. (b) Gráfico da variação da intensidade de corrente de pico do ALP em função das adições de lorazepam. Condições de análise: Velocidade de varredura,  $25 \text{ mV s}^{-1}$ ;  $t_{\text{eq}}$ , 5 s;  $E_{\text{ac}}$ , -0,8 V;  $t_{\text{ac}}$ , 120 s;  $\Delta E$ , -0,7 até -1,0 V; tempo de pulso 40 ms e amplitude de pulso 80 mV.

Análises de interferência foram também conduzidas com o contraceptivo ETE. Este fármaco também apresenta eletroatividade e pode estar presente em ambientes aquáticos, desta forma, sendo um possível interferente para as determinações do ALP. Para este estudo, utilizou-se uma solução de  $9,97 \mu\text{g L}^{-1}$  de ALP e a concentração de do ETE foi variada de  $9,77$  a  $76,85 \mu\text{g L}^{-1}$ . A Figura 25 mostra o sinal voltamétrico referente ao ALP nos testes de interferência realizados com o hormônio sintético mimetizando a presença de compostos orgânicos com capacidade de adsorção no eletrodo de trabalho. De um modo em geral, nota-se que utilizando as condições voltamétricas para a determinação do ALP, o hormônio não apresentou eletroatividade na faixa de potencial estudada, devido a ausência de um segundo pico nos voltamogramas. Além disso, é possível notar que adições de baixas concentrações do hormônio não interferiram na análise, pois não se observa uma diminuição significativa da intensidade de corrente de pico do ALP. A partir da adição do ETE em concentrações superiores a  $38 \mu\text{g L}^{-1}$ , ocorre uma diminuição no pico voltamétrico. Assim, pode-se afirmar que dependendo da concentração do hormônio no meio pode existir uma interferência na determinação do ALP por voltametria. Contudo, é importante destacar que essa interferência pode ser considerada mínima, pois os hormônios são encontrados em concentrações traço em águas naturais na ordem de  $\text{ng L}^{-1}$  (Andersen et al., 2006). Uma diminuição na intensidade de corrente do pico do ALP foi observada a partir de concentrações quatro vezes maior que a do analito de interesse. A intensidade de corrente do ALP

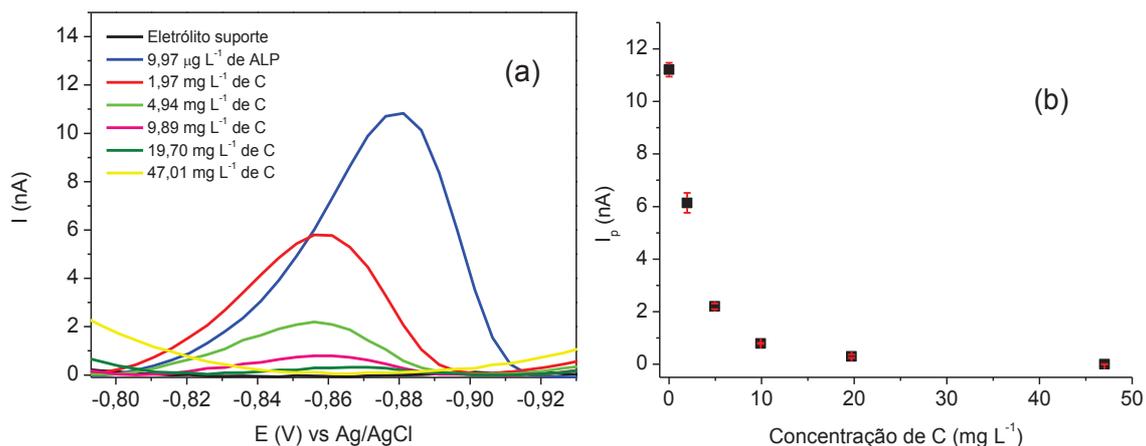
foi de  $9,68 \pm 0,09$  nA para  $5,9 \pm 0,2$  nA com a adição de  $76,9 \mu\text{g L}^{-1}$  de ETE. Desta forma, é possível afirmar que o contraceptivo ETE pode interferir na determinação do ALP em condições de elevadas concentrações do hormônio.



**Figura 25.** Voltamogramas obtidos nos testes de interferência do contraceptivo ETE na determinação do ALP utilizando  $\text{VA}_{\text{ds}}\text{RC-PD}$  em meio de tampão fosfato pH 7. Condições de análise: Velocidade de varredura,  $25 \text{ mV s}^{-1}$ ;  $t_{\text{eq}}$ , 5 s;  $E_{\text{ac}}$ ,  $-0,8 \text{ V}$ ;  $t_{\text{ac}}$ , 120 s;  $\Delta E$ ,  $-0,7$  até  $-1,0 \text{ V}$ ; tempo de pulso 40 ms e amplitude de pulso 80 mV.

A utilização de AH comercial em estudos de interferência teve o objetivo de avaliar a influência de matéria orgânica dissolvida presente em ambientes aquáticos na determinação do ALP. Os ácidos húmicos são os principais componentes das substâncias húmicas presentes no solo e em águas (Haddou, et al., 2012). Estas substâncias são uma mistura de macromoléculas de elevadas massas moleculares que realizam funções importantes em sistemas aquáticos. São elas quem conferem coloração à água, além de poderem se complexar com metais e poluentes orgânicos como pesticidas (Haddou, et al., 2012). A matéria orgânica presente em águas naturais pode adsorver na superfície do eletrodo e saturá-la, interferindo nas determinações voltamétricas. Também pode se ligar aos fármacos e outros contaminantes emergentes, modificando assim a eletroatividade destas substâncias.

Na Figura 26, pode-se observar a relação entre a concentração de AH e o sinal analítico do ALP na determinação de ALP na presença de ácido húmico em concentrações que variaram de  $5,6$  a  $134,4 \text{ mg L}^{-1}$ , o que representa teores de  $2,0$  a  $47,0 \text{ mg L}^{-1}$  de carbono orgânico dissolvido. Os teores de AH foram escolhidos para abranger condições naturalmente encontradas em ambientes aquáticos, bem como condições extremas.



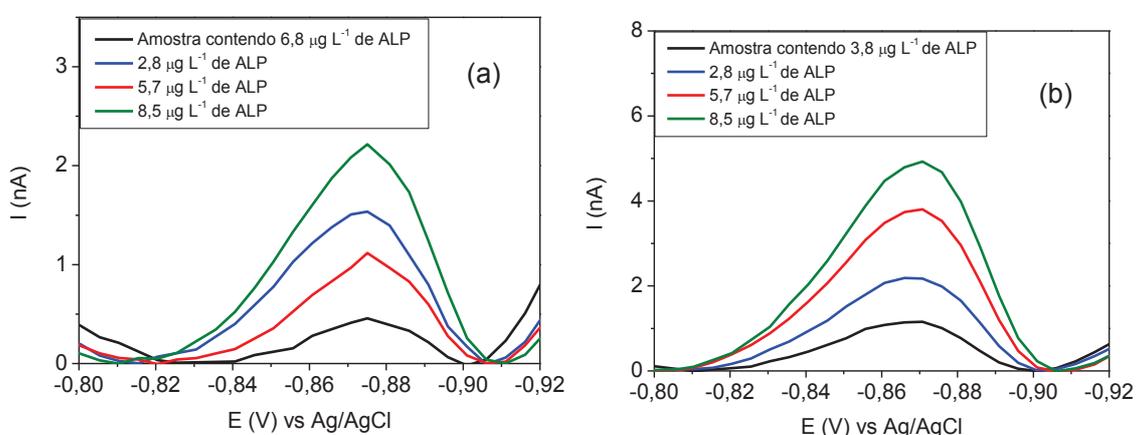
**Figura 26.** Resultados obtidos nos estudos de interferência com AH. (a) Voltamogramas do estudo sobre a influência do AH no sinal do ALP, utilizando VA<sub>ds</sub>RC-PD em tampão fosfato, pH 7. (b) Curva da intensidade de corrente em função da concentração de AH adicionada. Velocidade de varredura, 25 mV s<sup>-1</sup>; t<sub>eq</sub>, 5 s; E<sub>ac</sub>, -0,8 V; t<sub>ac</sub>, 120 s; ΔE, -0,7 até -1,0 V; tempo de pulso 40 ms e amplitude de pulso 80 mV.

A Figura 26a mostra voltamogramas obtidos na determinação de 9,97 μg L<sup>-1</sup> de ALP seguido por adições de AH. Foi possível observar que o AH interfere na determinação do ALP, pois ocorreu um deslocamento do pico do analito para potenciais mais anódicos e uma evidente minimização da intensidade de corrente de pico do ALP. Tal comportamento pode ser devido à adsorção do C na superfície do eletrodo de trabalho e minimização da superfície disponível do eletrodo para adsorção do ALP. Ou ainda, pode ser que o analito interage com esta substância orgânica e esse complexo adsorve no eletrodo de mercúrio, porém o potencial de pico não é o mesmo que o ALP. Na Figura 26b nota-se que com a adição de AH, a intensidade de corrente de pico do ALP variou entre 11,2 ± 0,3 nA a próximo de zero. Para uma concentração de 1,97 mg L<sup>-1</sup> de C, concentração que pode ser mais comumente encontrada em sistemas aquáticos, o sinal de ALP diminui cerca de 55%. É importante destacar que a partir da adição de 9,89 mg L<sup>-1</sup> de C, a solução analisada adquiriu uma coloração escura e observou-se a presença de material em suspensão. Essas condições não são normalmente encontradas nos ambientes aquáticos. Desta forma, pode-se afirmar que a concentração de AH utilizada neste experimento foi superior à encontrada naturalmente em águas superficiais, até 30 mg L<sup>-1</sup> (Liao et al.,2012).

Verificada a interferência que o AH provocou na determinação do ALP em água ultrapura, é esperado que a presença de matéria orgânica dissolvida e particulada em águas naturais também interfira na determinação de ALP por

voltametria. Assim, estudos foram conduzidos a fim de minimizar as interferências da análise, através da filtração das amostras reais para remover o material particulado e a diluição das mesmas antes das determinações do ALP.

Para a realização dos experimentos, amostras de água foram coletadas em lagoa e enriquecidas com  $7,51 \mu\text{g L}^{-1}$  de ALP, a fim de simular uma amostra real contaminada por ALP. Ensaios foram realizados com a amostra filtrada em cadinho de vidro sinterizado N° 3 e sem filtrar e também com a amostra diluída (50 % do volume da cela) em água ultrapura. A Figura 27 mostra os resultados obtidos nos estudos de preparo da amostra (filtração e diluição).



**Figura 27.** Resultados obtidos para estudos filtrando e diluindo soluções contendo  $7,51 \mu\text{g L}^{-1}$  de ALP (a) Voltamogramas do sinal analítico do ALP com a amostra *in natura* (sem filtração) e sem diluição. (b) Voltamograma do sinal analítico de ALP com filtração, utilizando 5 mL de amostra, 4 mL de água e 1 mL de eletrólito, em tampão fosfato pH 7. Velocidade de varredura,  $25 \text{ mV s}^{-1}$ ;  $t_{\text{eq}}$ , 5 s;  $E_{\text{ac}}$ , -0,8 V;  $t_{\text{ac}}$ , 120 s;  $\Delta E$ , -0,7 até -1,0 V; tempo de pulso 40 ms e amplitude de pulso 80 mV.

A Figura 27a mostra o sinal voltamétrico do ALP presente na amostra de água natural sem filtração em meio de eletrólito de suporte, pH 7. É possível observar que a presença de partículas suspensas e matéria orgânica dissolvida em solução afeta a resolução do pico voltamétrico do ALP e a intensidade de corrente diminui. Entretanto, a matéria orgânica presente naturalmente na amostra de água não influenciou no potencial de pico do ALP, sendo -0,87 V, semelhante ao potencial de pico do fármaco em água ultrapura, como pode ser visto na Figura 26a. A Figura 27b apresenta o pico voltamétrico do ALP após a filtração da amostra e com a sua diluição. Observa-se na Figura 27b uma melhora considerável na resolução do pico. Além disso, nota-se um aumento na intensidade de pico em relação à Figura 27a. Mesmo a concentração do ALP sendo diminuída cerca de 1,8 vezes, com a diluição, a intensidade de pico aumentou de  $2,18 \pm 0,06$  para  $4,95 \pm 0,07$  nA.

Desta forma, devido a melhora no sinal voltamétrico do ALP e a melhor resolução de pico, escolheu-se trabalhar com a amostra real diluída (5 mL de amostra filtrada, 4 mL de água milli-Q e 1 mL de eletrólito de suporte) para minimizar efeitos de interferências por material orgânico presente nos ambientes aquáticos.

#### 5.1.3.4. Precisão

A precisão pode ser entendida como “a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra” (ANVISA, 2003), ou seja, a proximidade dos valores experimentais obtidos entre si. A avaliação da precisão de um método pode ser feita por meio do desvio padrão relativo (RSD) dos resultados obtidos. Para a análise de traços ou impurezas são admitidos RSD de até 20%, dependendo da amostra (Ribani et al., 2004) . Para avaliar a precisão do método, soluções contendo cerca de  $8,6 \mu\text{g L}^{-1}$  de ALP foram preparadas e analisadas por  $\text{VA}_{\text{dsRC-PD}}$  em tampão fosfato pH 7. Dois níveis de precisão foram analisados, a repetibilidade e a precisão intermediária.

##### Repetibilidade

A repetibilidade (precisão intra-corrída) avalia a concordância dos valores experimentais obtidos no mesmo dia. As soluções preparadas em cinco balões distintos foram analisadas e sua intensidade corrente no potencial de pico foi determinada. Após a aquisição dos dados, realizou-se o cálculo da média, do desvio padrão (SD) e do desvio padrão relativo referente à corrente obtida.

##### Precisão intermediária

A análise das soluções preparadas diariamente em cinco dias consecutivos, por analistas diferentes ou em equipamentos diferentes, caracteriza o nível de precisão intermediária.

Os valores determinados para a repetibilidade e para a precisão intermediária estão mostrados na Tabela 9.

**Tabela 9.** Valores determinados experimentalmente para a repetibilidade e precisão intermediária para o método analítico desenvolvido para determinações de ALP.

	$I_p$ Média (nA)	SD (nA)	RSD (%)
<b>Repetibilidade</b>	9,89	0,66	6,7
<b>Precisão Intermediária</b>	9,18	0,56	6,1

Na Tabela 9, estão mostrados os valores de corrente de pico média, SD e RSD obtidos para a precisão, em estudos de repetibilidade e precisão intermediária, do método analítico desenvolvido para a determinação do ALP em amostras de águas naturais. Observa-se que os valores de desvio padrão relativo para a repetibilidade e precisão intermediária, ficaram abaixo de 20 %, considerado nível máximo para esta faixa de concentração e por se tratar de análises de amostras ambientais. Desta forma, pode-se dizer que a precisão do método foi aceitável (Ribani et al., 2004).

#### 5.1.3.5. Exatidão

A exatidão avalia a proximidade dos valores experimentais obtidos com o valor verdadeiro (ANVISA, 2003). Este parâmetro de validação foi avaliado por meio de testes de recuperação em soluções aquosas e amostras reais coletadas na nascente localizada no bairro Batel, enriquecidas com o padrão de ALP. A concentração de cada solução foi determinada utilizando VA<sub>ds</sub>RC-PD com as condições otimizadas, pelo método de adição de padrão. Devido à complexidade de matrizes ambientais, o método de adição de padrão mostra-se mais adequado para o estudo. As amostras reais enriquecidas foram filtradas e diluídas e os resultados de recuperação encontram-se na Tabela 10.

**Tabela 10.** Estudos de recuperação do ALP em soluções aquosas e amostras reais enriquecidas.

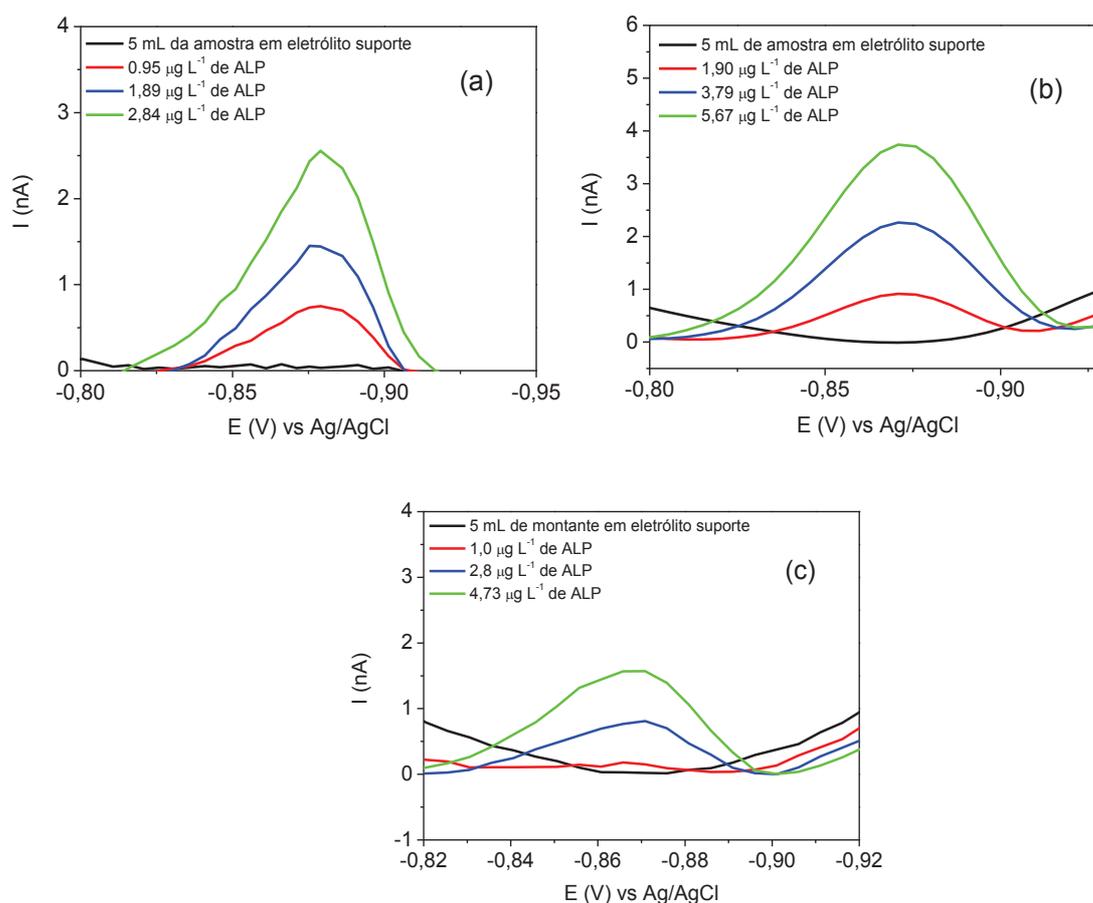
Amostra	Concentração real ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Concentração média determinada ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Recuperação (%)
	2,5	2,5 $\pm$ 0,3	100
Água ultrapura	5,0	5,6 $\pm$ 1,8	112
	7,5	7,2 $\pm$ 1,0	96
Amostra de água superficial	2,5	2,7 $\pm$ 0,6	108
	5,0	5,8 $\pm$ 0,7	116

Observa-se que a faixa de recuperação foi de 96 a 116%, para as diferentes matrizes e concentrações adicionadas de ALP. A partir dos dados da Tabela 10 pode-se afirmar que os valores de recuperação foram adequados para

concentrações em níveis traço do ALP, independente do meio estudado. Para análises de traços, admitem-se intervalos de  $\pm 20\%$  ou até maiores dependendo da concentração e natureza do analito e da complexidade da matriz (ANVISA, 2003; Ribani et al., 2004). Além disso, as recuperações obtidas com o método analítico desenvolvido mostraram-se condizentes com as obtidas em outros trabalhos com o ALP em amostras biológicas e composições farmacêuticas (Carvalho et al., 2010; Habeeb, et al., 1989b).

#### 5.1.4. Aplicações do método desenvolvido para o ALP

A Figura 28 mostra determinações de ALP em amostras de água de rios e nascentes localizadas em Guarapuava, empregando  $VA_{ds}RC-PD$ ,  $t_{ac}$  de 120 s e método de adição padrão.

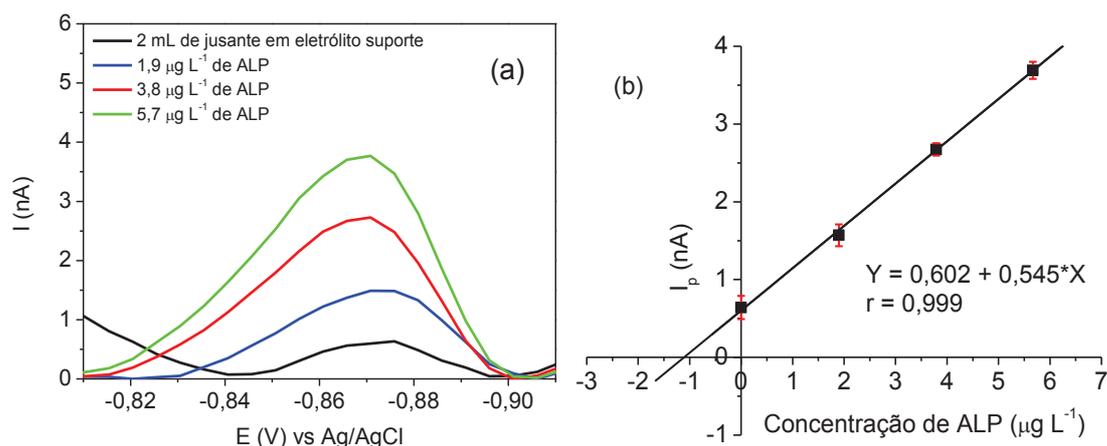


**Figura 28** Resultados obtidos na determinação de ALP em amostras de água de rios e águas subterrânea de Guarapuava, empregando  $VA_{ds}RC-PD$ , diluídas para 5 mL de amostra, 4 mL de água ultrapura e 1 mL de eletrólito suporte. (a) Voltamogramas obtidos na determinação do ALP em amostra de água subterrânea da nascente localizada no Bairro Batel. (b) Voltamogramas obtidos na determinação do ALP em amostra de água do riacho Carro Quebrado. (c) Voltamogramas obtidos na determinação do ALP em amostra de água a montante da estação de tratamento de esgoto

Vassoural. Eletrólito suporte tampão fosfato pH7, velocidade de varredura,  $25 \text{ mV s}^{-1}$ ;  $t_{eq}$ , 5 s;  $E_{ac}$ , -0,8 V;  $t_{ac}$ , 120 s;  $\Delta E$ , -0,7 até -1,0 V; tempo de pulso 40 ms e amplitude de pulso 80 mV.

Na Figura 28a, água da nascente localizada no bairro Batel, é possível notar ruídos nos voltamogramas, os quais comprometeram a resolução do pico voltamétrico. Tal interferência pode estar relacionada à presença de materiais suspensos em solução, pois esta amostra não foi filtrada. Observa-se ainda a ausência de um pico voltamétrico relacionado à presença do ALP no voltamograma referente à amostra. A Figura 28b corresponde à amostra de água coletada no Riacho Caro Quebrado, perto do campus CEDETEG – UNICENTRO. Esta amostra foi filtrada em cadinho de vidro. Tal amostra também não apresentou sinais do ALP. Para esta amostra, em outro estudo, o tempo de acumulação também foi aumentado para 600 s objetivando alcançar LD e LQ mais baixos. Entretanto mesmo nestas condições o ALP não foi determinado. Na Figura 28c estão mostrados os voltamogramas para a determinação do ALP em água coletada a montante da estação de tratamento de esgoto Vassoural, a qual foi filtrada em cadinho de vidro sinterizado. É possível notar que a concentração do analito ficou abaixo do LD do método. Mesmo aumentando o tempo de acumulação para 240 s, o fármaco não foi determinado.

A Figura 29a apresenta os voltamogramas referentes à determinação do ALP determinado em amostra de água superficial coletada a jusante da estação de tratamento de esgoto Vassoural, filtrada em cadinho de vidro sinterizado e diluída a um fator de cinco vezes. Nota-se que os picos voltamétricos da amostra e das adições localizam-se no mesmo potencial de meia onda,  $0,87 \pm 0,003 \text{ V}$ , indicando que o sinal voltamétrico apresentado pela amostra refere-se ao analito, ALP. Observa-se ainda que o aumento da concentração de ALP ocasionou um acréscimo proporcional da magnitude de corrente do pico voltamétrico, como pode ser notado na Figura 29b. Observa-se nesta figura, um ótimo coeficiente de correlação entre os pontos ( $r = 0,999$ ), sendo que a faixa de concentração utilizada neste estudo está dentro da faixa linear, onde é possível realizar uma determinação com nível de exatidão, precisão e linearidade exigidas. Os valores de ALP determinados nesta amostra estão mostrados na Tabela 11.



**Figura 29.** Resultados obtidos na determinação de ALP em jusante da estação de tratamento de esgoto Vassoural (a) Voltamogramas obtidos na determinação do ALP em amostra de água real a jusante de ETE de Guarapuava. (b) Quantificação do ALP por método de adição de padrão. Eletrólito suporte tampão fosfato pH 7, velocidade de varredura,  $25 \text{ mV s}^{-1}$ ;  $t_{\text{eq}}$ , 5 s;  $E_{\text{ac}}$ , -0,8 V;  $t_{\text{ac}}$ , 120 s;  $\Delta E$ , -0,7 até -1,0 V; tempo de pulso 40 ms e amplitude de pulso 80 mV.

**Tabela 11.** Concentração de ALP determinada na amostra a jusante da estação Vassoural de Guarapuava. Considerando o fator de diluição.

Ensaio	Coefficiente de correlação (r)	Concentração determinada de ALP ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Concentração média de ALP ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	SD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
1	0,999	5,52		
2	0,996	6,50	5,89	0,53
3	0,997	5,66		

A concentração determinada de ALP a jusante da estação de tratamento de esgoto foi  $5,89 \pm 0,53 \mu\text{g L}^{-1}$ . Alguns fármacos, inclusive antidepressivos, e interferentes endócrinos, têm sido detectados em efluentes de estações de tratamento de esgoto. Ghiselli (2006) determinou interferentes endócrinos e PFHP em águas superficiais, na sub-bacia do Atibaia, em afluentes e efluentes de estações de tratamento de esgoto e em água potável da região de Campinas. As concentrações para algumas destas substâncias (cafeína, diclofenaco, dipirona, estrona, etinilestradiol, progesterona, estigmasterol, entre outros) variaram de  $1,32$  a  $1958 \mu\text{g L}^{-1}$  no esgoto tratado. Lajeunesse et al. (2012) realizaram determinações de antidepressivos, tais como, a fluxitina, sertralina, sirtalopram, mirtazapina, entre outros, na água residual e no biossólido tratado de estações de tratamento de esgoto do Canadá. As concentrações determinadas para o efluente tratado variaram de  $3,4 \text{ ng L}^{-1}$  a  $2,49 \mu\text{g L}^{-1}$ .

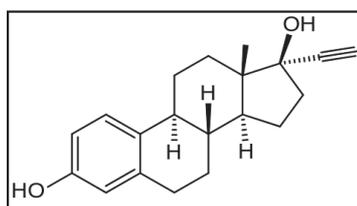
O psicofármaco ALP foi determinado apenas em uma das amostras analisadas, sendo que a concentração do fármaco nas outras amostras ficou abaixo do LD. A presença desta substância em tal matriz está diretamente relacionada ao aporte de efluente tratado no rio Cascavel. Embora o afluente seja tratado, por meio de processos de degradação biológica, decantação e filtração, este tipo de tratamento é ineficaz para a completa remoção de grande parte dos contaminantes emergentes, em especial IE e PFHP (Lajeunesse et al., 2012; Ghiselli, 2006). Estudos indicam que mesmo concentrações baixas de benzodiazepínicos podem provocar alterações comportamentais em organismos vivos, como peixes (Brodin et al., 2013). Entretanto, os possíveis efeitos deletérios que esta substância pode causar em organismos aquáticos ainda não são completamente conhecidos.

#### **5.1.5. Conclusões**

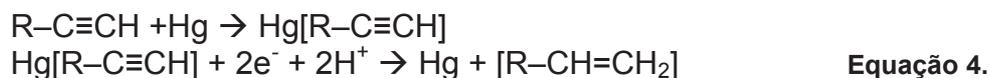
O método analítico desenvolvido para o ALP pode ser utilizado na determinação do psicofármaco em amostras aquosas de interesse ambiental. Ele foi devidamente validado através da determinação da faixa linear, sensibilidade, limites de quantificação e detecção, exatidão e precisão. Sendo assim, dentro da faixa linear de trabalho determinada, o ALP pode ser detectado mesmo em matrizes complexas como amostras ambientais. A concentração determinada deste fármaco aponta para uma extensa utilização destes medicamentos no município de Guarapuava. Evidencia ainda que tal substância não foi completamente removida pela estação de tratamento de esgoto.

## 5.2. OTIMIZAÇÃO DE PARÂMETROS ANALÍTICOS E DETERMINAÇÃO DO 17 $\alpha$ -ETINILESTRADIOL

O ETE assim como o ALP possui um centro eletroativo passível de redução, possibilitando assim sua determinação através de técnicas eletroanalíticas. O sinal voltamétrico gerado deve-se ao grupo  $-C\equiv CH$ , onde a redução, envolve a transferência de dois elétrons dando origem provavelmente ao 17 $\alpha$ -vinil-estradiol ( $-CH=CH_2$ ) (Ghoneim et al., 2005), após ser reduzido como mostrado pela equação 4. A Figura 30 mostra a fórmula estrutural da molécula de ETE.



**Figura 30.** Fórmula estrutural do ETE, adaptado de Ghoneim et al., 2005.



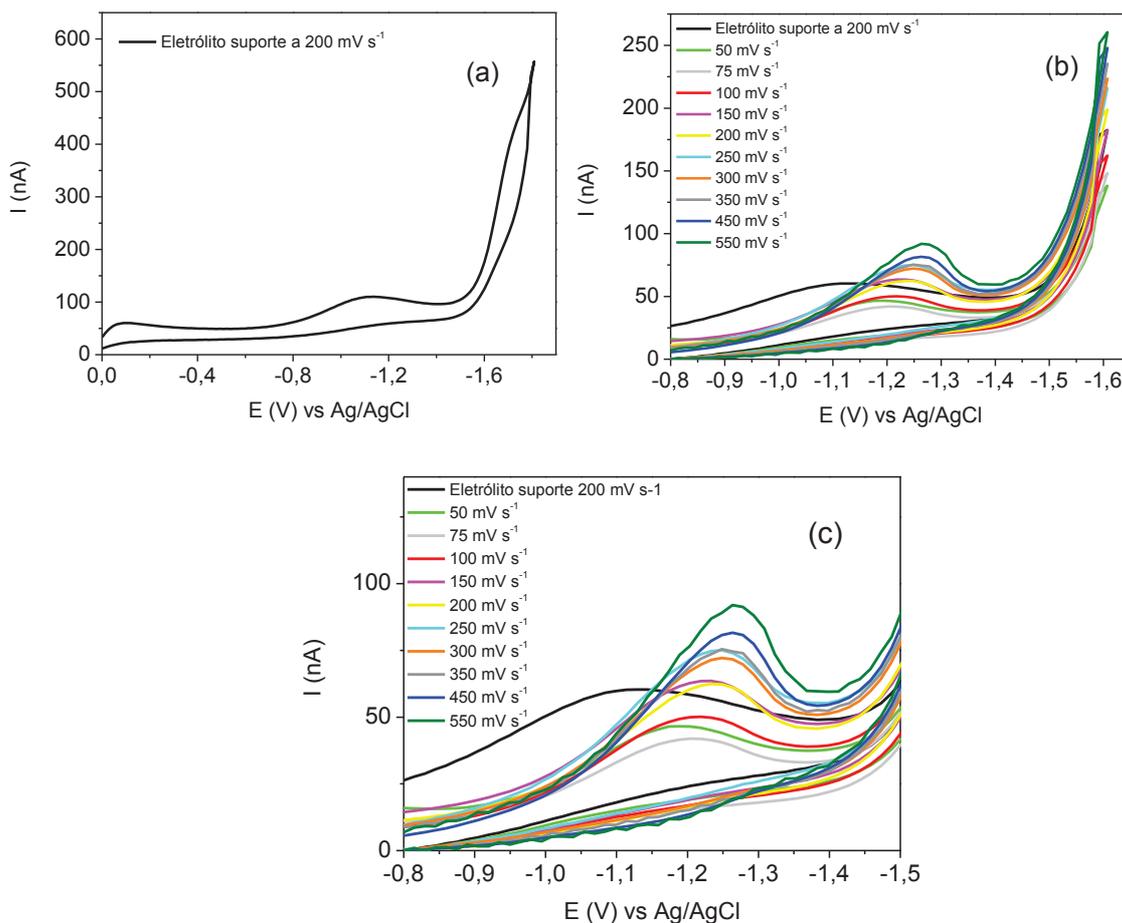
A Equação 4 mostra a possível reação que ocorre na superfície do eletrodo. Primeiramente o analito aproxima-se da superfície de mercúrio do eletrodo, onde em seguida, ocorre a transferência de dois elétrons e dois prótons para o sítio ativo da molécula do ETE, dando origem provavelmente a um radical vinil. Após reduzida, a molécula afasta-se da superfície do eletrodo (Ghoneim et al., 2005).

### 5.2.1. Avaliação do processo eletroquímico do ETE por voltametria cíclica

Por meio da voltametria cíclica com eletrodo de gota pendente de mercúrio (HMDE) foi possível avaliar a eletroatividade do contraceptivo e determinar a natureza do transporte de massa do analito à superfície do eletrodo. Sendo assim, os estudos serviram para avaliar os processos eletroquímicos envolvidos na determinação voltamétrica do ETE.

A Figura 31a apresenta o sinal voltamétrico do eletrólito de suporte, tampão B-R, pH 6,3, obtido com VC com uma velocidade de varredura de  $200 \text{ mV s}^{-1}$ . Observa-se neste voltamograma um pico voltamétrico em  $-1,14 \pm 0,001 \text{ V}$  da voltametria direta, referente ao eletrólito suporte. Entretanto este sinal voltamétrico

possui potencial de meia onda distinto ao do ETE,  $-1,24 \pm 0,03$  V, não interferindo assim na determinação do hormônio. Ainda pode-se observar a ausência de um pico voltamétrico na varredura inversa do potencial na faixa de potencial de interesse, compreendida entre  $-0,8$  e  $-1,4$  V.



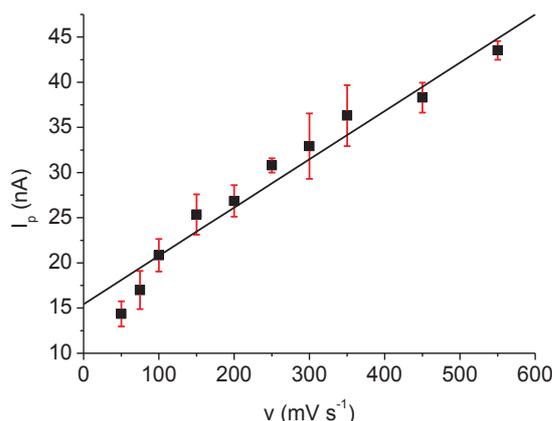
**Figura 31.** Resultados obtidos para o ETE utilizando VC (a) Voltamograma cíclico completo do eletrólito suporte tampão B-R na ausência de ETE. (b) Voltamogramas cíclicos completos para  $119,5 \mu\text{g L}^{-1}$  do contraceptivo sintético em meio de tampão B-R pH 6,3. (c) Ampliação do pico de redução do ETE. Parâmetros utilizados,  $t_{ac}$ , 150 s;  $E_{ac}$ ,  $-0,7$  V;  $t_{eq}$ , 5 s  $\Delta E$ ,  $-0,8$  até  $-1,6$  V.

A Figura 31b mostra o voltamograma cíclico para a faixa de potencial completa, compreendida entre  $-0,8$  e  $-1,6$  V referente à determinação do contraceptivo em meio de tampão B-R, pH 6,3. É possível notar a presença de somente um pico voltamétrico no potencial de  $-1,24 \pm 0,03$  V devido à redução do analito. Observa-se ainda um leve aumento do sinal do branco com o aumento da velocidade de varredura, entretanto este não interfere significativamente no pico

voltamétrico do analito. O ajuste da linha base é possível devido à diferença dos potenciais de pico do eletrólito e do analito.

A Figura 31c, mostra a ampliação da área de interesse do voltamograma contendo o sinal analítico do ETE. Nota-se a presença de um único pico voltamétrico no sentido direto, em aproximadamente  $-1,24$  V, referente à redução do analito. No sentido inverso, ocorre o surgimento de um pequeno pico no potencial de  $-1,2$  V em velocidades de varredura mais elevadas. Este sinal analítico corresponde possivelmente à oxidação do fármaco anteriormente reduzido. No entanto, o baixo valor de corrente e a diferença dos potenciais de meia onda entre o pico de redução e o de oxidação, evidenciam que o processo é praticamente irreversível. Sendo que neste caso a velocidade de reação de oxidação é mais lenta que a de redução (Skoog et al., 2006). Nota-se ainda que com o aumento da velocidade de varredura, o pico do sentido direto sofre um leve deslocamento para potenciais mais catódicos, comportamento característico de processos irreversíveis (Mazo et al., 2005).

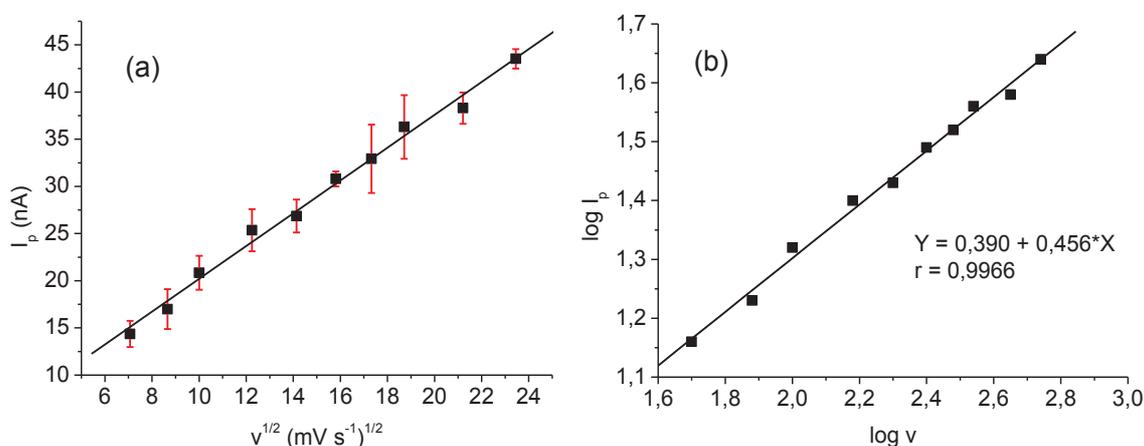
Utilizando os dados adquiridos nas análises variando a velocidade de varredura da VC, relacionou-se a intensidade de corrente de pico com a velocidade de varredura, objetivando determinar a natureza do processo de transferência de massas ao eletrodo de trabalho. A Figura 32 mostra tal relação. Nota-se, de modo geral, um aumento da magnitude de corrente de pico ocasionado pelo aumento da velocidade de varredura. Entretanto, este acréscimo não segue um comportamento linear entre o sinal e a concentração do analito, conferindo à curva, uma certa concavidade. Esse comportamento pode indicar que o processo eletroquímico foi controlado pela difusão e não pela adsorção do analito na superfície do eletrodo (Mazo et al., 2005). Ou seja, o produto resultante da redução do analito se acumula próximo ao eletrodo de trabalho e o gradiente de concentração formado promove uma difusão destas espécies para a solução.



**Figura 32.** Tratamento dos dados obtidos na determinação do ETE por VC com variação da velocidade de varredura a fim de compreender os processos eletroquímicos envolvidos no processo. Dependência da intensidade de corrente em função da velocidade de varredura da voltametria cíclica.

As relações entre a intensidade de corrente em função da raiz quadrada da velocidade de varredura e do logaritmo na base dez da corrente de pico em função do log da velocidade de varredura também foram avaliadas. Tais estudos servem para confirmar a natureza dos processos eletroativos do analito na superfície do eletrodo de trabalho. A Figura 33 apresenta tais relações. Segundo a literatura, uma relação linear entre estes dois parâmetros, é um indicativo de que a natureza do processo de transporte de massa ao ET é difusional (Pham et al., 1994). Comportamento este observado na Figura 33a. A Figura 33b relaciona o log da corrente em função do log da velocidade de varredura. Segundo Amaral, (2012) esta relação apresenta valores de inclinação (coeficiente angular de uma equação de reta linear) próximos de 1,0 para processos adsorptivos, enquanto inclinações próximas a 0,5 correspondem a sistemas controlados pela difusão. Sendo assim, observa-se na Figura 33b que a inclinação da reta foi de 0,456, confirmando assim o caráter difusional do sistema. Entretanto, tal conclusão diverge à encontrada por outros pesquisadores. Ghoneim et al. (2006) concluíram através de estudos com a VC que o ETE apresenta um caráter interfacial adsorptivo com o HMDE. Primeiramente, foi realizada uma VC de potencial, onde a varredura direta foi de -0,8 a -1,4 V e a varredura inversa retornou a -0,8V sem realizar acumulação do analito, empregando  $200 \text{ mV s}^{-1}$  de velocidade de varredura. Em seguida, utilizou-se um tempo de acumulação de 60s com um potencial de -0,8 V para a concentração de  $1,48 \text{ mg L}^{-1}$  de ETE. O terceiro voltamograma cíclico foi realizado na mesma gota de mercúrio da VC anterior, sem nova acumulação do analito. Com base neste estudo, Ghoneim et

al. (2006) observaram uma rápida dessorção do analito da superfície do eletrodo. Ghoneim et al. (2006) também variaram a velocidade de varredura de 25 até 500  $\text{mV s}^{-1}$ , tal estudo mostrou um aumento da intensidade de corrente de pico com o aumento da velocidade de varredura. A relação entre o logaritmo na base dez da corrente de pico em função do logaritmo na base dez da velocidade de varredura mostrou ser linear, apresentando um valor slope 0,853, muito próximo de 1,0, característico de processos adsorptivos. Foi também realizada a relação entre o potencial de pico e o logaritmo na base dez da velocidade de varredura. A partir destes estudos, Ghoneim et al. (2006) confirmaram o caráter adsorptivo do ETE no eletrodo de trabalho.



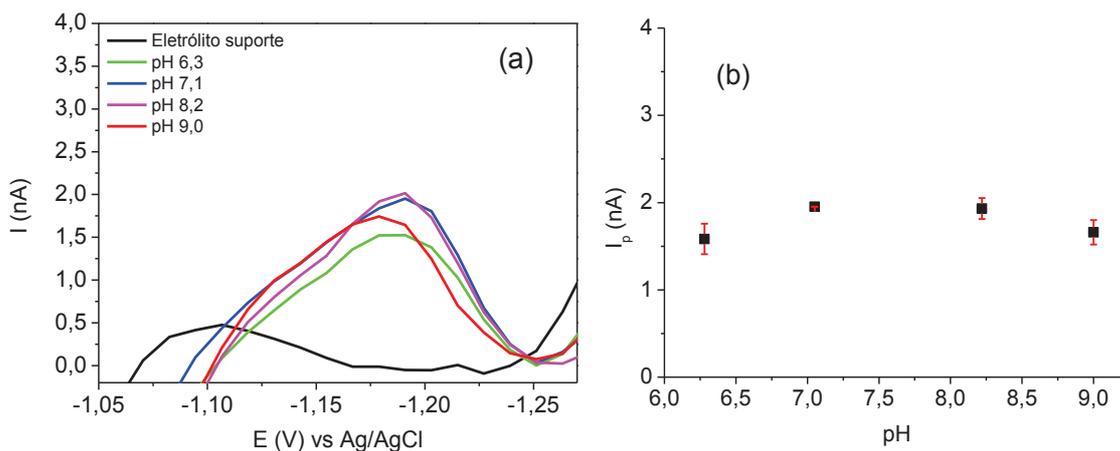
**Figura 33.** Tratamento dos dados obtidos na determinação do ETE por VC com variação da velocidade de varredura (a) Dependência da intensidade de corrente com a raiz quadrada da velocidade de varredura. (b) Dependência do log da intensidade de corrente com o log da velocidade de varredura. Parâmetros utilizados,  $E_{ac}$ , -0,7;  $t_{ac}$ , 150s;  $t_{eq}$ , 5 s  $\Delta E$ , -0,8 até -1,6 V.

### 5.2.2. Escolha de eletrólito de suporte e potencial hidrogeniônico para determinações de ETE

O sinal voltamétrico do ETE foi avaliado em três eletrólitos de suporte distintos, tampão B-R, fosfato e fosfato monobásico de sódio com hidróxido de sódio. Sendo que apenas o tampão B-R possibilitou a diferenciação do sinal voltamétrico entre o branco e o analito, que pode ser visto na Figura 34 em diferentes condições de pH, devido ao elevado sinal de fundo dos outros eletrólitos.

Após a escolha do eletrólito de suporte, foi avaliada a melhor condição de pH para a determinação voltamétrica do ETE empregando VRC-PD. A Figura 34a apresenta voltamogramas da determinação do ETE obtidos em diferentes valores de

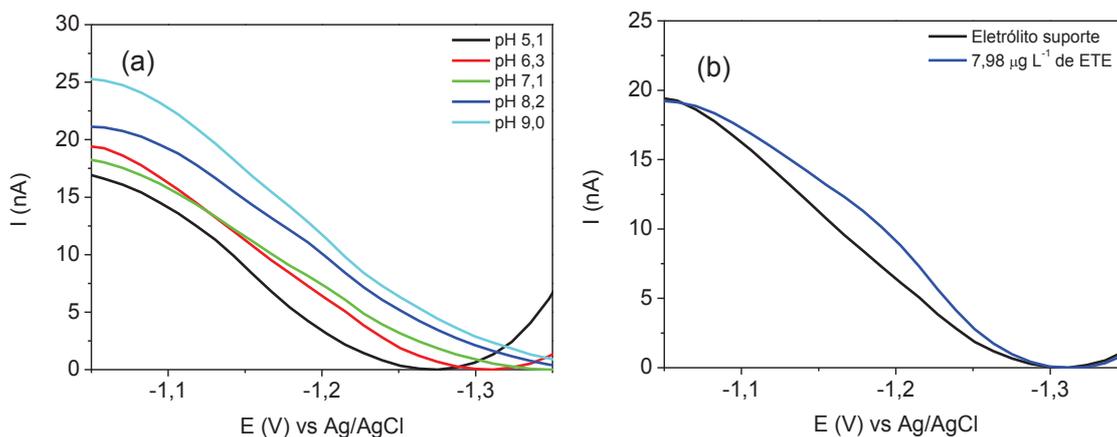
pH empregando VRC-PD. Observa-se nesta Figura a ausência de picos voltamétricos na região de interesse do analito, em aproximadamente  $-1,18$  V para o sinal do eletrólito suporte. Para a determinação de  $7,98 \mu\text{g L}^{-1}$  do ETE, observa-se um pico voltamétrico em  $-1,18 \pm 0,005$  V. As intensidades de corrente do pico referente ao ETE para o pH de 7,1 e 8,2 foram levemente superiores aos demais, cujos valores foram próximos a  $1,9$  nA e os demais ficaram em torno de  $1,6$  nA, entretanto essas diferenças da intensidade de pico foram baixas e a corrente média foi  $1,78 \pm 0,19$  nA. Esse fato pode ser observado na Figura 34b que mostra a curva da intensidade de corrente em função do pH utilizado na determinação do ETE, em meio de eletrólito suporte tampão B-R. Nota-se ainda na Figura 34a que a mudança do pH não altera o potencial de pico do analito ( $1,18 \pm 0,005$  V). Desta forma, é possível afirmar que o pH não exerce influência significativa na intensidade de corrente do ETE.



**Figura 34.** Estudos obtidos na determinação do ETE sob diferentes condições de pH para o eletrólito suporte tampão B-R, empregando VRC-PD. (a) Voltamogramas obtidos na determinação de  $7,98 \mu\text{g L}^{-1}$  de ETE em meio de tampão B-R em diferentes valores de pH, utilizando VRC-PD. (b) Curva da intensidade de corrente de pico em função do pH. Velocidade de varredura,  $60 \text{ mV s}^{-1}$ ;  $t_{\text{eq}}$ , 5s;  $E_{\text{ac}}$ ,  $-0,7$  V;  $t_{\text{ac}}$ , 300 s;  $\Delta E$ ,  $-0,95$  até  $-1,4$  V; amplitude de pulso, 50 mV e tempo de pulso 40 ms.

Embora a intensidade de corrente do ETE não tenha variado com a alteração do pH no meio, novas medidas alterando o pH do eletrólito suporte foram realizadas visando diminuir o sinal de corrente do branco (tampão B-R). A mudança do pH pode modificar o sinal voltamétrico do eletrólito suporte, facilitando a distinção entre o sinal do analito e do branco que são muito próximas. A Figura 35a mostra os voltamogramas, sem ajuste de linha base, obtidos para o eletrólito suporte tampão B-R em diferentes condições de pH. Observa-se que para o pH 5,1, o sinal voltamétrico do eletrólito não apresenta uma superfície plana na faixa de potencial

compreendida entre -1,05 e -1,25. Este comportamento dificulta a medida do sinal eletroquímico do analito que apresenta potencial de pico em aproximadamente -1,18 V, como pode ser observado na Figura 35b. Analisando ainda os voltamogramas apresentado na Figura 35a, fica evidente que o sinal voltamétrico do eletrólito de suporte em pH 6,3 foi mais adequado. Nestas condições, o sinal do branco torna-se visualmente mais constante na faixa de potencial compreendida entre -1,1 e -1,25 V. Na Figura 35b, estão mostrados dois voltamogramas, um referente ao eletrólito de suporte na ausência do ETE e outro na presença de  $7,98 \mu\text{g L}^{-1}$  do fármaco, ambos em pH 6,3. Nesta Figura fica evidenciada a importância do sinal voltamétrico do branco, pois como pode ser observado, se este não apresentar comportamento constante na faixa de potencial próxima ao potencial de meia onda do analito, torna-se difícil a distinção entre o sinal do eletrólito e do fármaco.



**Figura 35.** Voltamogramas obtidos para avaliação do eletrólito suporte tampão B-R em diferentes valores de pH, sem ajuste de linha base. (a) Voltamogramas obtidos para o eletrólito suporte tampão B-R em diferentes valores de pH,. (b) Voltamogramas obtidos na determinação de  $7,98 \mu\text{g L}^{-1}$  de ETE em meio de tampão B-R pH 6,3, empregando VRC-PD. Velocidade de varredura,  $60 \text{ mV s}^{-1}$ ;  $t_{\text{eq}}$ , 5s;  $E_{\text{ac}}$ , -0,7 V;  $t_{\text{ac}}$ , 300 s;  $\Delta E$ , -0,95 até -1,4 V; amplitude de pulso, 50 mV e tempo de pulso 40 ms.

Embora o sinal analítico do ETE, tenha sido maior em pH 7,1 e 8,2, a validação do método foi realizada em pH 6,3, devido a melhor condição de sinal do branco, que possibilitou estudos em concentrações mais baixas.

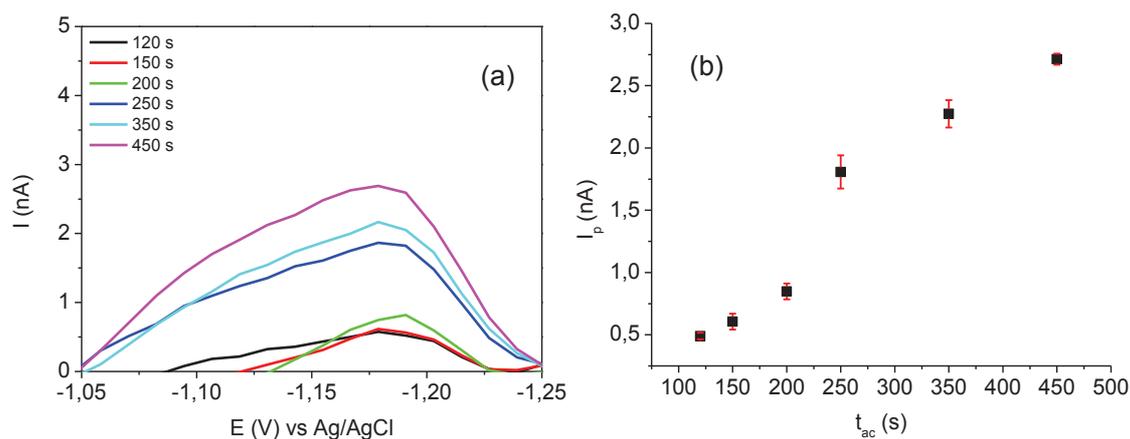
Desta forma, a otimização dos parâmetros voltamétricos foi conduzida em pH 7,0, enquanto a validação do método desenvolvido, deu-se, e pH 6,3. Ghoneim et al. (2006) realizaram a determinação de ETE em composições farmacêuticas e soro humano, utilizando o tampão B-R, pH 7,0.

### 5.2.3. Otimização dos parâmetros voltamétricos para a determinação de ETE em matrizes ambientais

A otimização dos parâmetros voltamétricos para a determinação de ETE em amostras de águas naturais utilizando VRC-PD, foi conduzida em meio de eletrólito suporte tampão B-R, pH 7. O pH 7 foi utilizado nestes estudos pois a otimização do eletrólito de suporte entre o pH 7,0 e 6,3, ocorreu posteriormente, durante a etapa de validação do método, visando melhorar o sinal do eletrólito suporte e assim baixar os limites de detecção e quantificação. Definido o eletrólito suporte e seu pH, foi realizada a otimização de parâmetros voltamétricos como  $E_{ac}$ ,  $t_{ac}$ ,  $t_{eq}$ , AE, velocidade de varredura amplitude e tempo de pulso, objetivando encontrar as melhores condições para a determinação do ETE em soluções aquosas.

#### 5.2.3.1. Tempo de acumulação

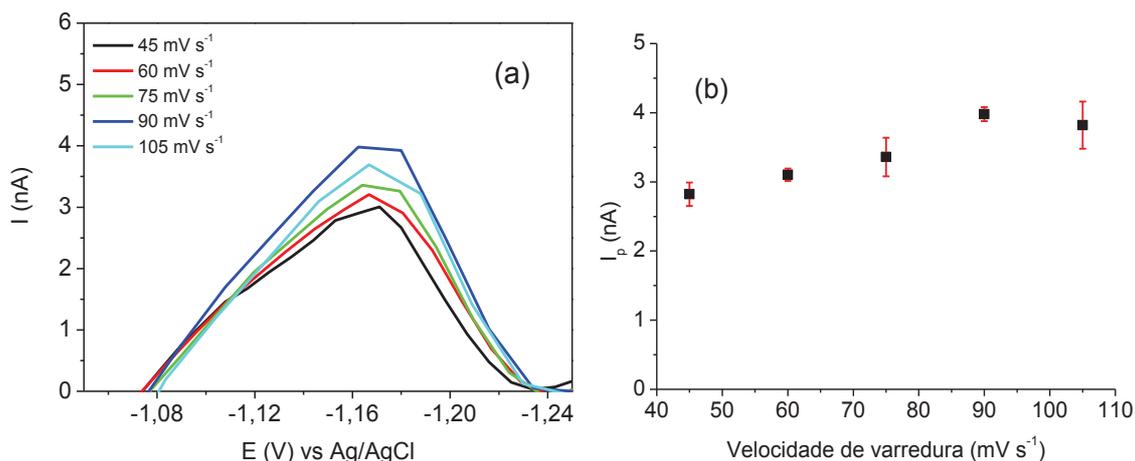
A Figura 36a mostra os resultados obtidos no estudo de tempo de acumulação para a determinação de  $5,98 \mu\text{g L}^{-1}$  de ETE em meio de eletrólito suporte tampão B-R. Pode-se notar na Figura 36a que o tempo de acumulação apresenta grande influência no sinal voltamétrico do fármaco. O aumento do tempo de acumulação ocasionou um acréscimo proporcional da intensidade de pico do ETE, conforme apresentado na Figura 36b. Ainda pode ser notado na Figura 36a que tempos de acumulação mais longos provocam assimetria e perda da resolução do pico voltamétrico do analito. Mesmo utilizando-se tempos de acumulação relativamente altos, nota-se que a intensidade de corrente não atinge um patamar, ou seja, não alcança um equilíbrio, como pode ser visto na Figura 36b. Este comportamento é um indicativo que a acumulação do analito no ET ainda não cessou e a superfície do ET ainda apresenta área superficial disponível para o analito. Tempos de acumulação muito longos não são desejáveis, pois prolongam o tempo de análise e comprometem a frequência analítica e, além disso, comprometem a resolução do sinal analítico do fármaco. Desta forma, decidiu-se utilizar o tempo de 150 s nestas condições de concentração. Tempos de acumulação ficam geralmente entre 30 e 180 s, dependendo do analito e sua concentração (Aleixo, 2003).



**Figura 36.** Resultados obtidos na determinação de ETE para diferentes tempos de acumulação. (a) Voltamogramas obtidos para a determinação do ETE ( $5,98 \mu\text{g L}^{-1}$ ) sob diferentes tempos de acumulação, utilizando a VRC-PD em tampão B-R, pH 7. (b) Variação da intensidade de corrente de pico em função do tempo de acumulação utilizado.  $E_{ac}$ ,  $-0,7 \text{ V}$ ; velocidade de varredura,  $6 \text{ mV s}^{-1}$ ;  $t_{eq}$ ,  $5 \text{ s}$ ;  $\Delta E$ ,  $-0,95$  até  $-1,4 \text{ V}$ ; amplitude de pulso,  $50 \text{ mV}$  e tempo de pulso  $40 \text{ ms}$ .

### 5.2.3.2. Velocidade de varredura

Os estudos da variação da velocidade de varredura para a determinação de  $19,7 \mu\text{g L}^{-1}$  de ETE, em meio de tampão B-R, empregando VRC-PD estão apresentados na Figura 37. Nota-se que o aumento da velocidade de varredura ocasionou um aumento na intensidade da corrente de pico até a velocidade de  $90 \text{ mV s}^{-1}$ , sendo que a velocidade de varredura de  $105 \text{ mV s}^{-1}$  ocasionou o decréscimo da corrente de pico. É possível ainda observar que a resolução do pico voltamétrico foi afetada pela variação deste parâmetro, onde as velocidades mais altas alteram significativamente a resolução do pico voltamétrico, em especial para  $105 \text{ mV s}^{-1}$ . Na Figura 37b, nota-se um aumento da intensidade de corrente de pico, embora pequeno, em função do aumento da velocidade de varredura para  $90 \text{ mV s}^{-1}$ . A partir desta velocidade de varredura nota-se uma diminuição da intensidade de corrente, sendo que o sinal diminui cerca de 1 vez quando a velocidade foi de  $90$  a  $105 \text{ mV s}^{-1}$ . Embora, velocidades de varredura mais elevadas tenham proporcionado maiores intensidade de corrente de pico, a escolha deste parâmetro levou em consideração também a resolução do sinal analítico. Assim, o parâmetro escolhido foi de  $60 \text{ mV s}^{-1}$ , privilegiando velocidades de varredura que não afetam muito a resolução do pico voltamétrico.

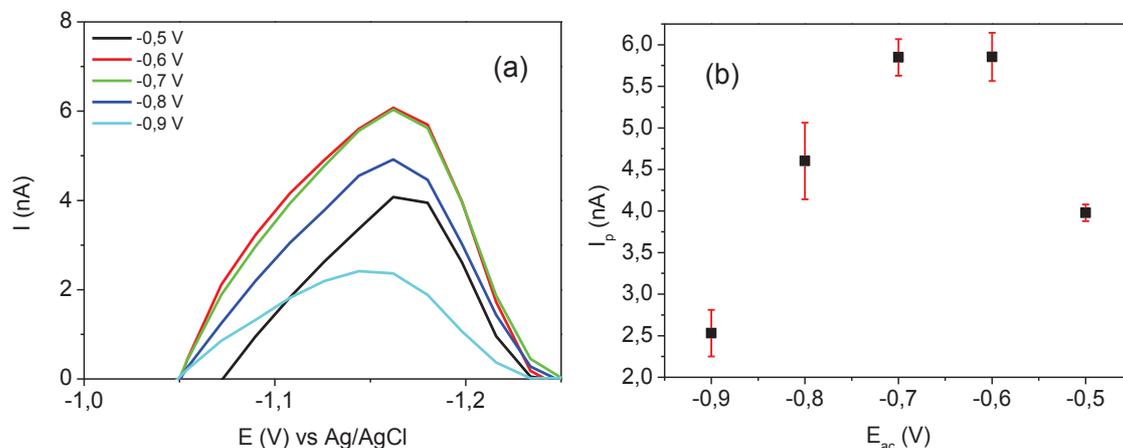


**Figura 37.** Resultados obtidos na determinação do ETE para diferentes velocidades de varredura, empregando VRC-PD. (a) Voltamogramas obtidos para a determinação de  $19,70 \mu\text{g L}^{-1}$  de ETE em diferentes velocidades de varredura, utilizando a VRC-PD em meio de tampão B-R pH 7,0. (b) Curva da intensidade de corrente de pico em função da velocidade de varredura.  $E_{ac}$ ,  $-0,5 \text{ V}$ ;  $t_{eq}$ ,  $5 \text{ s}$ ;  $t_{ac}$ ,  $60 \text{ s}$ ;  $\Delta E$ ,  $-0,9$  até  $-1,4 \text{ V}$ ; amplitude de pulso,  $70 \text{ mV}$  e tempo de pulso,  $50 \text{ ms}$ .

### 5.2.3.3. Potencial de acumulação

Para melhorar a acumulação do ETE sobre a superfície do eletrodo de trabalho, e aumentar a seletividade do método, o potencial de acumulação também foi otimizado. A Figura 38a mostra os voltamogramas obtidos na determinação do ETE para diferentes potenciais de acumulação. Observa-se que houve alteração na intensidade de pico, bem como na sua resolução. Assim, pode-se afirmar que existiu uma influência do potencial de acumulação na intensidade de corrente do pico do ETE. Nota-se que para os potenciais de acumulação de  $-0,7$  e  $-0,6 \text{ V}$  o sinal analítico do hormônio foi mais pronunciado. Observa-se ainda que o formato do pico voltamétrico foi afetado com os diferentes potenciais de acumulação empregados, em especial o potencial de  $-0,9 \text{ V}$  proporcionou um pico voltamétrico de boa resolução, entretanto, sua intensidade de corrente foi baixa em relação aos outros potenciais. Ainda nesta Figura pode-se observar a ausência de um deslocamento do pico voltamétrico proporcionado pela alteração do potencial de acumulação. A variação da intensidade de pico em função do potencial de acumulação pode ser observada na Figura 38b. Nota-se que os maiores valores de intensidade de corrente foram para os potenciais de acumulação de  $-0,7$  e  $-0,6 \text{ V}$ , sendo 2 vezes maior que o sinal obtido utilizando  $-0,9 \text{ V}$  de  $E_{ac}$ . Entre os potenciais de  $-0,7$  e  $-0,6 \text{ V}$  não foram observadas diferenças significativas na resolução dos picos voltamétricos e, sobretudo, na intensidade de corrente de pico do ETE. Sendo assim escolheu-se trabalhar com o potencial de acumulação de  $-0,7 \text{ V}$ , visando um maior sinal analítico

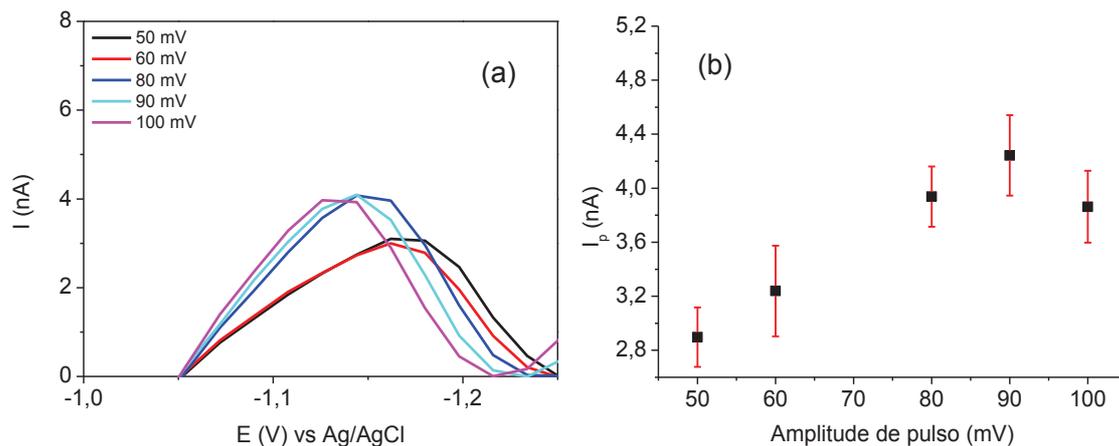
para o ETE. Ghoneim et al. (2006) utilizaram o potencial de acumulação de -0,8 V durante 60 s para determinações de ETE em formulações farmacêuticas e em amostras de plasma humano empregando a técnica de onda quadrada.



**Figura 38.** Resultados obtidos para a determinação do ETE em empregando diferentes potenciais de acumulação. (a) Voltamogramas obtidos na determinação de 19,7 µg L<sup>-1</sup> de ETE em meio de tampão B-R pH 7 em diferentes potenciais de acumulação utilizando VRC-PD. (b) Relação entre intensidade de corrente de pico e o potencial de acumulação. Velocidade de varredura, 90 mV s<sup>-1</sup>; t<sub>eq</sub>, 5s; t<sub>ac</sub>, 150 s; ΔE, -0,9 até -1,4 V; amplitude de pulso, 70 mV e tempo de pulso 50 ms.

#### 5.2.3.4. Amplitude de pulso

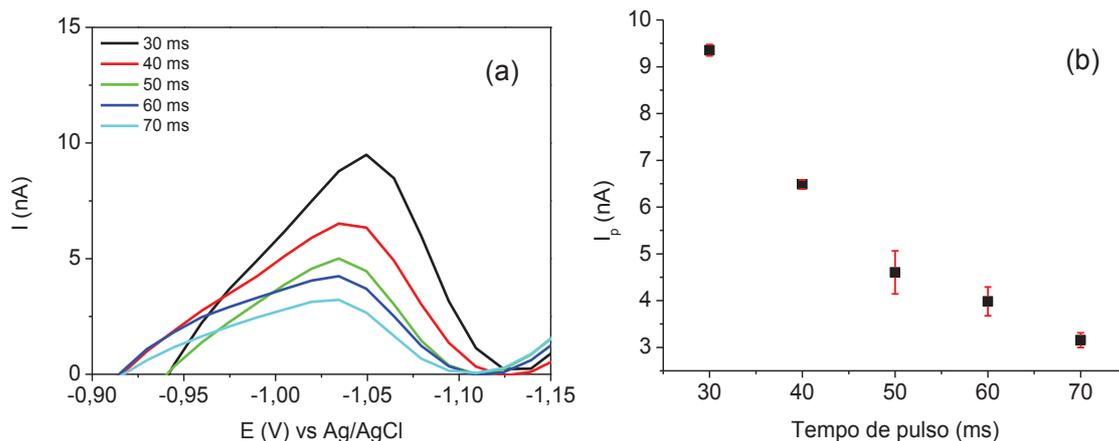
Para o ETE foram avaliadas amplitudes de pulso na faixa compreendida entre 50 a 100 mV na sua determinação. A Figura 39a apresenta os voltamogramas obtidos na determinação de 19,7 µg L<sup>-1</sup> de ETE variando a amplitude de pulso. Observa-se que a corrente de pico variou em função da amplitude de pulso empregada exercendo influência sobre o sinal voltamétrico do ETE. Tal influência é observada no deslocamento do potencial de pico para regiões mais anódicas, em maiores amplitudes de pulso, bem como no aumento da intensidade de pico com o aumento do valor do incremento. Este aumento pode ser observado até 90 mV, sendo que para 100 mV ocorreu um decréscimo da magnitude do sinal. A Figura 39b mostra a relação entre a intensidade de corrente de pico e a amplitude de pulso utilizada no estudo. Embora a intensidade de corrente seja proporcional a amplitude de pulso aplicada e, as maiores intensidades de corrente tenham sido para 80, 90 e 100 mV, escolheu-se trabalhar com 50 mV, devido à melhor resolução do pico voltamétrico.



**Figura 39.** Resultados obtidos na determinação de ETE sob diferentes amplitudes de pulso (a) Voltamogramas obtidos para a determinação de  $19,7 \mu\text{g L}^{-1}$  de ETE por VRC-PD em tampão B-R pH 7 sob diferentes valores de amplitude de pulso. (b) Relação entre intensidade de corrente de pico em função da amplitude de pulso utilizado. Velocidade de varredura,  $90 \text{ mV s}^{-1}$ ;  $t_{\text{eq}}$ , 5s;  $E_{\text{ac}}$ ,  $-0,8 \text{ V}$ ;  $t_{\text{ac}}$ , 150 s;  $\Delta E$ ,  $-0,9$  até  $-1,4 \text{ V}$  e tempo de pulso 50 ms.

### 5.2.3.5. Tempo de pulso

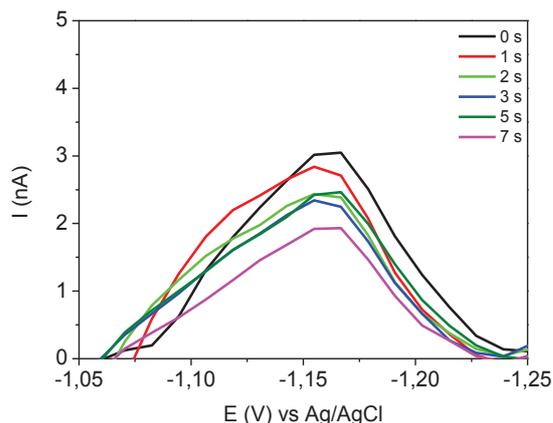
A otimização deste parâmetro foi feita visando determinar a condição que apresente maior intensidade de corrente de pico, aliada a melhor resolução do sinal analítico do ETE. A influência do tempo de pulso sobre o sinal voltamétrico do ETE foi avaliada em uma faixa entre 30 e 70 ms (Fig. 38). A Figura 40a mostra os voltamogramas obtidos na determinação de  $19,7 \mu\text{g L}^{-1}$  de ETE em eletrólito suporte tampão B-R utilizando diferentes tempos de pulso. É possível notar que este parâmetro voltamétrico interfere no sinal analítico do ETE. Esta influência se dá pela diminuição da intensidade de corrente do sinal voltamétrico do analito conforme se aumenta o tempo de aplicação do incremento. Nota-se ainda um leve deslocamento do pico do ETE para potenciais mais anódicos,  $1,04 \pm 0,008 \text{ V}$ . A Figura 40b, mostra a relação entre a intensidade de pico do ETE em função do tempo de pulso empregado. A diminuição da intensidade do sinal do analito com o aumento do tempo de pulso fica evidenciada. Por exemplo, para o tempo de 30 ms, a intensidade de corrente de pico foi de  $9,35 \pm 0,12 \text{ nA}$  e para 60 ms, a intensidade de corrente do pico diminuiu para  $3,98 \pm 0,31 \text{ nA}$ . Isto ocorre porque o pulso de corrente gerada devido à aplicação do incremento decai com o tempo e, desta forma, quanto maior o tempo de pulso, menor será a intensidade do pico (Skoog, et al., 2006). Desta forma, escolheu-se trabalhar com 40 ms de tempo de pulso.



**Figura 40.** Resultados obtidos na determinação de ETE utilizando diferentes tempos de pulso (a) Voltamogramas obtidos no estudo de variação do tempo de pulso na determinação de  $19,7 \mu\text{g L}^{-1}$  de ETE utilizando a VRC-PD em meio de tampão B-R, pH 7.(b) Relação entre a intensidade de corrente em função do tempo de pulso aplicado. Velocidade de varredura,  $90 \text{ mV s}^{-1}$ ;  $t_{\text{eq}}$ , 5s;  $E_{\text{ac}}$ , -0,8 V;  $t_{\text{ac}}$ , 150 s;  $\Delta E$ , -0,9 até -1,4 V e amplitude de pulso 70 mV.

#### 5.2.3.6. Tempo de equilíbrio

O estudo do tempo de equilíbrio para o ETE foi realizado a fim de determinar a melhor condição deste parâmetro para o sinal analítico do fármaco. A Figura 41 mostra os voltamogramas obtidos na determinação de  $7,98 \mu\text{g L}^{-1}$  de ETE em meio de tampão B-R, pH 7,0, sob diferentes tempos de equilíbrio. É possível notar nesta Figura, que os voltamogramas referentes aos tempos de 0, 1 e 2 s apresentam perturbações no sinal voltamétrico, as quais afetam a resolução do pico voltamétrico. Este fato deve-se ao baixo tempo de equilíbrio fornecido às espécies eletroativas, não permitindo às mesmas, a formação de uma camada homogênea na superfície da gota de mercúrio. Este comportamento não é observado para tempos de 3, 5 e 7 s. Sendo assim, para garantir a homogeneidade do sistema sem comprometer o tempo de análise, decidiu-se utilizar 5 s de equilíbrio.



**Figura 41.** Voltamogramas obtidos para a determinação de  $7,98 \mu\text{g L}^{-1}$  de ETE para diferentes tempos de equilíbrio utilizando a  $\text{VA}_{\text{ds}}\text{RC-PD}$  em tampão B-R, pH 7. Velocidade de varredura,  $60 \text{ mV s}^{-1}$ ;  $E_{\text{ac}}$ ,  $-0,7 \text{ V}$ ;  $t_{\text{ac}}$ ,  $150 \text{ s}$ ;  $\Delta E$ ,  $-0,95$  até  $-1,4 \text{ V}$  Amplitude de pulso  $70 \text{ mV}$  e tempo de pulso  $40 \text{ ms}$ .

### 5.2.3.7. Parâmetros otimizados no desenvolvimento do método para a determinação do ETE

A Tabela 12 apresenta os parâmetro otimizados para a determinação do ETE por voltametria.

**Tabela 12.** Parâmetros otimizados para o método analítico desenvolvido para o ETE em amostras ambientais.

Parâmetro	Valores
Potencial de acumulação	$-0,7 \text{ V}$
Tempo de acumulação	$150 \text{ s}$
Velocidade de varredura	$60 \text{ mV s}^{-1}$
Tempo de equilíbrio	$5 \text{ s}$
Amplitude de pulso	$50 \text{ mV}$
Tempo de pulso	$40 \text{ ms}$
Área da gota	$0,32 \text{ mm}^2$
Tempo de purga	$500 \text{ s}$
Potencial de varredura	$-0,95 \text{ a } -1,4$

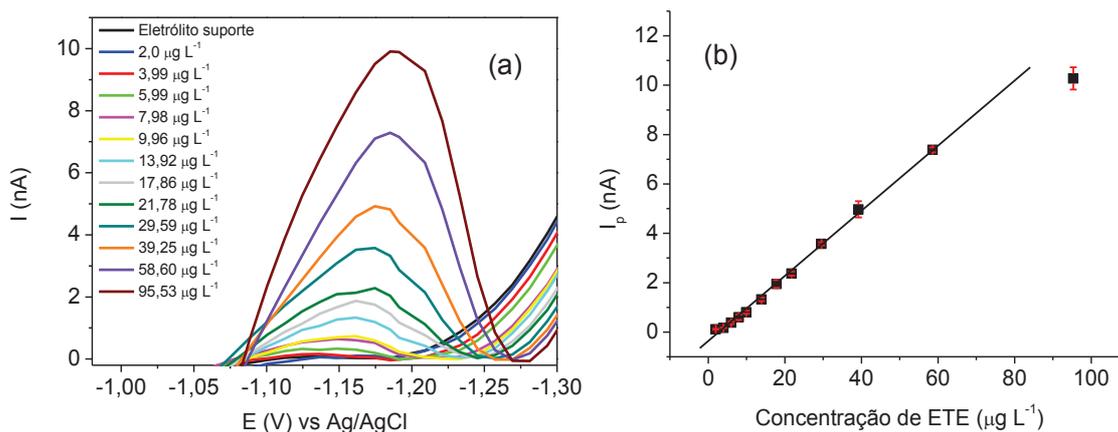
Os parâmetros otimizados para o método analítico desenvolvido, são diferentes que os utilizados em outros estudos com o fármaco. Por exemplo, Ghoneim et al. (2006) realizaram determinações do etinilestradiol em amostras biológicas e composições farmacêuticas, utilizando voltametria de onda quadrada

em tampão B-R, pH 7. Os parâmetros empregados foram  $E_{ac}$ , -0,8 V durante 60 s; velocidade de varredura de  $200 \text{ mV s}^{-1}$ ; amplitude de pulso, 70 mV e frequência de 120 Hz.

#### 5.2.4. Validação do método analítico desenvolvido para determinações de ETE

##### 5.2.4.1. Avaliação da Linearidade

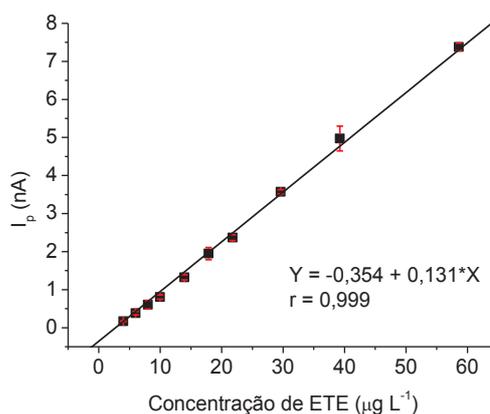
Utilizando os parâmetros otimizados para o método desenvolvido, foi construída uma curva analítica com doze níveis de concentração do ETE em meio de eletrólito suporte tampão B-R, a fim de verificar a faixa linear de trabalho do método desenvolvido. A Figura 42 mostra os resultados obtidos nesse estudo de calibração e avaliação da faixa linear de trabalho. Neste estudo, utilizou-se a calibração por método de adição de padrão.



**Figura 42.** Estudo da calibração e avaliação da linearidade. (a) Voltamogramas obtidos na determinação de ETE utilizando VRC-PD em meio de tampão B-R, pH 6,3. (b) Curva de calibração para o ETE. Parâmetros voltamétricos conforme Tabela 12.

A Figura 42a apresenta os voltamogramas, com correção da linha base, do estudo de calibração e avaliação da linearidade do método para a determinação de ETE. No potencial de aproximadamente -1,17 V observa-se a presença de um pico voltamétrico referente à redução do analito. Nota-se que o aumento da concentração do analito em cela, por meio de adições consecutivas do padrão, ocasionou um leve deslocamento do pico voltamétrico para potenciais mais catódicos, bem como promoveu um aumento da intensidade de corrente de pico. A Figura 42b mostra intensidades de corrente de pico em função da concentração de ETE em toda a faixa de trabalho estudada. Observa-se que o aumento da concentração do

contraceptivo propiciou um aumento proporcional da intensidade de pico seguindo um comportamento linear até  $59 \mu\text{g L}^{-1}$ . Acima desta concentração, nota-se que a resposta não aumenta proporcionalmente com a concentração, indicando um desvio na linearidade. Ou seja, para concentrações elevadas o modelo linear não é mais adequado. Sendo assim, estudos mais aprofundados da faixa linear do método desenvolvido foram conduzidos. A Figura 43 apresenta a curva de adição padrão obtida para o ETE, em sua faixa linear de trabalho. Nesta faixa de concentração é possível realizar uma determinação com precisão e exatidão e linearidade exigidas. A sensibilidade do método é indicada pelo coeficiente angular da reta (*slope*), apresentado na Figura 43, sendo este de 0,131, para um tempo de acumulação de 150 s. A confirmação da linearidade do método foi obtida por meio de uma regressão linear (ANOVA) utilizando o software MINITAB 16.2.2.



**Figura 43.** Curva para o estudo de calibração para o ETE em sua faixa linear.

Os valores da variância explicada, do F de regressão e do F de falta de ajuste que servem para confirmar a linearidade foram determinados para o método. As grandezas determinadas e os valores de F crítico tabelado, no nível de confiança de 95% para uma distribuição bicaudal, estão mostrados na Tabela 13.

**Tabela 13.** Parâmetros da regressão linear do método analítico desenvolvido para o ETE na faixa de concentração estudada.

	3,99 a 58,60 $\mu\text{g L}^{-1}$	Valor tabelado (95%)
$R^2$	99,6%	--
$F_r$	7702,26	4,196
$F_{faj}$	1,31	2,447

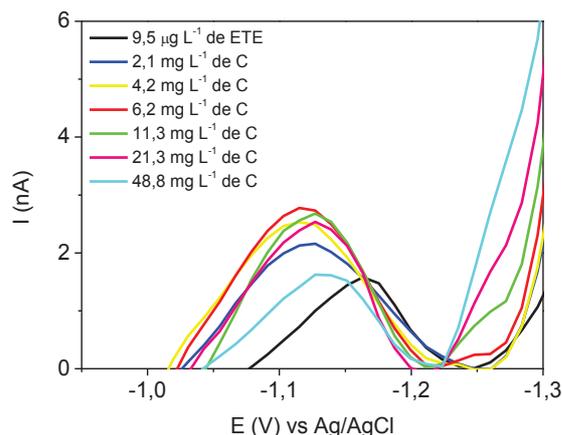
A Tabela 13 mostra os valores de  $R^2$ ,  $F_r$  e  $F_{faj}$  determinados através da regressão linear dentro da faixa de concentração avaliada. Sendo que o  $R^2$  deve ser muito próximo de 1, o  $F_r$  deve ser maior que o F crítico tabelado e o  $F_{faj}$  necessita ser menor que o F crítico tabelado para que o modelo não apresente falta de ajuste. Analisando a regressão para a faixa de concentração de 4,0 a 58,6  $\mu\text{g L}^{-1}$ , nota-se que o  $R^2$  é aproximadamente 1 e o  $F_r$  é maior que F crítico tabelado, indicando que o modelo é linear. A análise do  $F_{faj}$  indica que o modelo linear proposto se ajusta perfeitamente aos dados obtidos, pois 1,31 é menor que o F crítico tabelado. Sendo assim, o método desenvolvido apresenta linearidade dentro da faixa de concentração avaliada, compreendida entre 3,99 e 59,60  $\mu\text{g L}^{-1}$ , e pode ser utilizado para determinação do ETE por método de adição padrão.

#### **5.2.4.2. Limites de detecção e quantificação**

Foram realizadas medidas das vinte réplicas do eletrólito suporte tampão B-R, no potencial de pico do ETE. Após a determinação do desvio padrão das réplicas do branco, os limites de detecção e quantificação alcançados pelo método foram calculados utilizando as Equações 1 e 2. Os valores determinados para LD e LQ foram 0,49  $\mu\text{g L}^{-1}$  e 1,63  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente. Estes valores são próximos dos encontrados por Ghoneim et al. (2006) que foram de 0,26  $\mu\text{g L}^{-1}$  e 0,86  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente, em soro de sangue humano.

#### **5.2.4.3. Estudo de Interferentes**

Estudos de interferência foram realizados com ácido húmico, a fim de avaliar a influência da matéria orgânica na determinação do contraceptivo sintético em amostras de água natural. A matéria orgânica presente em águas naturais pode adsorver na superfície do eletrodo e saturá-la, interferindo nas determinações voltamétricas. Também pode se ligar aos fármacos e outros contaminantes emergentes, modificando assim a eletroatividade destas substâncias. A Figura 44 mostra a relação entre a concentração de AH e o sinal analítico do ETE na determinação de 9,5  $\mu\text{g L}^{-1}$  do hormônio na presença de ácido húmico em concentrações que variaram de 5,9 a 139,4  $\text{mg L}^{-1}$ , o que representa teores de 2,1 a 48,8  $\text{mg L}^{-1}$  de carbono orgânico dissolvido (C).



**Figura 44.** Estudo sobre a interferência do C no sinal voltamétrico do ETE utilizando VRC-PD em meio de tampão B-R, pH 6,3. Parâmetros voltamétricos conforme Tabela 12.

Na Figura 44, observa-se a interferência do carbono orgânico dissolvido sobre o sinal analítico do contraceptivo. Tal interferência dá-se pela valorização da intensidade de corrente com a adição de AH, bem como, pelo deslocamento do mesmo para potenciais mais anódicos. O deslocamento do potencial de pico pode indicar uma interação do analito com a matéria orgânica dissolvida. Mesmo em concentrações relativamente baixas, a matéria orgânica pode interferir na determinação do ETE em amostras de água naturais. Sendo assim torna-se necessária a diluição da amostra na cela voltamétrica para minimizar estes efeitos e possibilitar as determinações do fármaco. Dependendo da amostra, o fator de diluição pode ser de até 5 vezes.

#### 5.2.4.4. Precisão

Para avaliar a precisão do método desenvolvido para o ETE, soluções contendo  $10,1 \mu\text{g L}^{-1}$  do hormônio foram preparadas e analisadas por VRC-PD em tampão B-R, pH 6,3. Foram analisados dois níveis de precisão para o método, a repetibilidade e a precisão intermediária.

##### Repetibilidade

As soluções preparadas em cinco balões distintos foram analisadas e sua intensidade corrente no potencial de pico foi determinada. Após a determinação da intensidade de corrente, realizou-se o cálculo da média, do desvio padrão e do desvio padrão relativo referente à corrente obtida.

## Precisão intermediária

As soluções preparadas diariamente em cinco dias consecutivos ou por analistas diferentes foram também analisadas. Os valores determinados para a repetibilidade e para a precisão intermediária estão mostrados na Tabela 14 por meio dos valores de corrente de pico média, SD e RSD obtidos para a precisão, em estudos de repetibilidade e precisão intermediária. Observa-se que os valores de desvio padrão relativo para a repetibilidade e precisão intermediária, ficaram abaixo de 20 %, considerado nível máximo para esta faixa de concentração e por se tratar de análises de amostras ambientais (Ribani et al., 2004). Desta forma, pode-se dizer que a precisão do método foi adequada.

**Tabela 14.** Valores determinados experimentalmente para a repetibilidade e precisão intermediária para o método analítico desenvolvido para determinações de ETE.

	<b>I<sub>p</sub> Média (nA)</b>	<b>SD (nA)</b>	<b>RSD (%)</b>
<b>Repetibilidade</b>	4,16	0,38	9,2
<b>Precisão Intermediária</b>	2,16	0,28	13,0

### 5.2.4.5. Exatidão

Este parâmetro de validação foi avaliado por meio de testes de recuperação em soluções aquosas e amostras reais coletadas na nascente localizada no bairro Batel, enriquecidas com o padrão de ETE. A concentração de cada solução foi determinada utilizando VRC-PD com as condições otimizadas, pelo método de adição de padrão. Devido à complexidade de matrizes ambientais, o método de adição de padrão mostra-se mais adequado para o estudo. As amostras reais enriquecidas foram filtradas e diluídas. Na Tabela 15 estão apresentadas as recuperações em cada matriz e concentração de ETE.

**Tabela 15.** Estudos de recuperação do ETE em soluções aquosas e amostras reais enriquecidas.

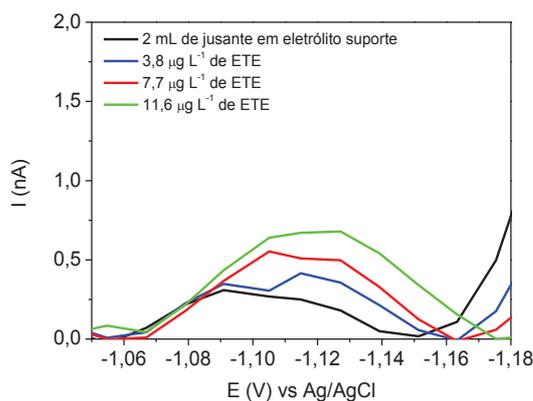
Amostra	Concentração real ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Concentração média determinada ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Recuperação (%)
Água ultrapura	7,8	$8,3 \pm 1,0$	106
	10,0	$10,3 \pm 1,3$	103
Amostra real de água de nascente	16,0	$14,4 \pm 1,2$	90

A partir dos resultados apresentados na Tabela 15, pode-se afirmar que as recuperações obtidas para o ETE, independentemente da matriz, foram boas. As recuperações variaram de 90 a 106%, consideradas adequadas para a faixa de concentração avaliada e devido à complexidade da matriz, no caso da amostra real. Para análises de traços, admitem-se intervalos de  $\pm 20\%$  ou até maiores dependendo da concentração e natureza do analito e da complexidade da matriz (ANVISA, 2003; Ribani et al., 2004).

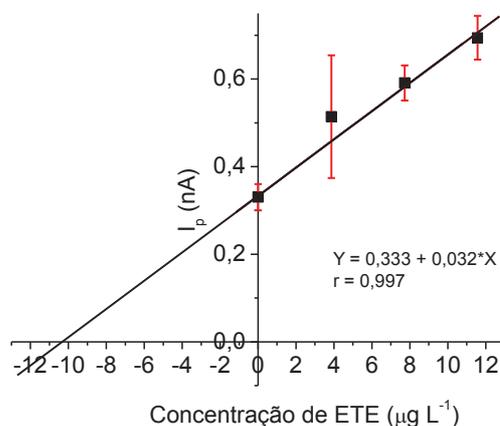
#### 5.2.5. Aplicações do método desenvolvido para o ETE

Determinações quantitativas do contraceptivo ETE foram conduzidas em amostras reais de água coletadas em rios do município de Guarapuava. Entretanto as concentrações do fármaco ficaram abaixo do LD do método. A Figura 45 mostra voltamogramas obtidos na determinação do ETE em amostra de água coletada a jusante da estação de tratamento de esgoto Vassoural. A amostra (2 mL) foi filtrada em cadinho de vidro sinterizado e diluída em 7 mL de água e 1 mL de eletrólito suporte tampão B-R, pH 6,3. É possível observar a presença de um pico voltamétrico (Fig. 43) no potencial de redução do analito. Ainda é possível notar que adições crescentes do padrão do hormônio, proporcionaram um aumento da intensidade de pico. No entanto, a resolução do pico voltamétrico foi severamente afetada devido a possíveis interferentes da matriz. A Figura 46 apresenta a curva de quantificação do ETE pelo método de adição padrão. Observa-se desvios grandes entre as triplicatas para cada ponto da curva de calibração. Levando em consideração os cálculos de diluição, a concentração de ETE estimada foi de  $51,8 \mu\text{g L}^{-1}$ , valor este que pode ser considerado superestimado em função das

interferências da matriz, indicando a possível presença de espécies eletroativas na mesma faixa de potencial do ETE. Tais espécies elevam a corrente de fundo, dificultando a determinação correta do analito. Entretanto, o pico voltamétrico no mesmo potencial de meia onda do padrão e o aumento da intensidade de corrente de pico apontam para a presença deste hormônio nesta matriz. Por ser um interferente endócrino, mesmo baixas concentrações desta espécie em ambientes aquáticos, podem provocar efeitos deletérios em organismos vivos.



**Figura 45.** Voltamogramas obtidos na determinação de ETE em amostra real de água da jusante da estação de tratamento de esgoto Vassoural, em meio de eletrólito suporte tampão B-R, pH 6,3, empregando VRC-PD. Parâmetros voltamétricos conforme Tabela 12.



**Figura 46.** Quantificação do ETE por método de adição de padrão. Eletrólito suporte tampão B-R, pH 6,3.

Ghiselli (2006) determinou, dentre outras substâncias, o ETE em águas superficiais e em afluentes e efluentes de estações de tratamento de esgoto da região de Campinas – SP, empregando cromatografia gasosa com detector massa. As concentrações determinadas do hormônio nas águas superficiais variaram de  $1,2 \pm 0,1 \mu\text{g L}^{-1}$  a  $3,5 \pm 0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ . As concentrações determinadas de ETE no esgoto

bruto e no esgoto tratado foram  $5,81 \pm 0,02 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $5,04 \pm 0,05 \mu\text{g L}^{-1}$  respectivamente.

#### **5.2.6. Conclusões**

O método analítico desenvolvido para a determinação do contraceptivo  $17\alpha$ -etinilestradiol foi otimizado e devidamente validado. O método pode ser facilmente empregado no controle de qualidade de fármacos contendo o ETE. Entretanto, as determinações em amostras de água reais não foram possíveis devido às interferências da matriz. Algumas condições de análise ainda podem ser reavaliadas visando aprimorar os parâmetros utilizados para a determinação do fármaco em matrizes mais complexas, tais como a utilização de outro eletrólito suporte para minimizar a corrente de fundo bem como a diluição da amostra para volumes inferiores a 1 mL quando elevados teores de matéria orgânica estiverem presentes nas amostras.

### 5.3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os métodos analíticos propostos para ambos os fármacos foram otimizados e devidamente validados. Para o ALP, o método foi aplicado em amostras reais de águas de rios e nascentes. Entretanto, as concentrações de do fármaco ficaram abaixo do LD para a maioria das amostras, exceto para uma amostra coletada a jusante da estação de tratamento de esgoto Vassoural em Guarapuava-PR. Para esta amostra, foi determinado  $5,89 \pm 0,53 \mu\text{g L}^{-1}$  de ALP. Estudos referentes à presença e possíveis efeitos deletérios que este fármaco pode causar em organismos aquáticos não foram encontrados na literatura. Porém, mesmo em baixas concentrações, contaminantes emergentes podem causar efeitos ecotoxicológicos.

Para o método desenvolvido para o ETE, divergências foram encontradas no que se refere à natureza do processo de transferência de massas ao eletrodo de trabalho. Ghoneim et al. (2006) determinaram, por meio de voltametria cíclica, que o ETE apresenta um caráter interfacial adsorptivo com o HMDE. Conclusão esta, diferente a determinada por meio dos estudos com VC realizados neste trabalho. Relações foram estabelecidas entre a Intensidade da corrente de pico em função da velocidade de varredura e também da raiz quadrada da velocidade de varredura e entre o logaritmo na base dez da intensidade de corrente de pico em função do logaritmo da velocidade de varredura. Tais relações convergiram para um caráter interfacial difusional do ETE com o HMDE.

Em relação às determinações de ETE em amostras reais, tornou-se evidente a interferência da matriz sobre o sinal analítico do hormônio. Sendo necessários assim, mais estudos para estabelecer melhores condições de análise em matrizes complexas, como amostras coletadas em jusantes de estações de tratamento de esgoto. Tais testes podem envolver maior diluição da amostra e modificação do potencial de acumulação visando aumentar a seletividade do método, bem como utilizar tempos de acumulação mais longos. Embora as determinações de ETE neste tipo de amostra não tenha sido possível, a aplicabilidade do método foi comprovada nos estudos de adição e recuperação em amostras reais, onde recuperações de 90 % foram alcançadas. Para futuros trabalhos, novas amostras podem ser avaliadas para obter uma amostragem mais significativa da presença deste IE em ambientes aquáticos.

## 6. REFERÊNCIAS

- Abreu, E. T.; Pretto, J A; Caleare, Â. de O.; Tavares, C. R. G.; Nakamura, C. V. Avaliação da resistência a antibióticos de bactérias isoladas de efluente hospitalar. *Acta Scientiarum. Technology*, 32: 1-5, 2010.
- Aleixo, M. L. Voltametria: Conceitos e Técnicas. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química, Campinas – SP, 2003. Disponível em: <<http://chemkeys.com/br/2003/03/25/voltametria-conceitos-e-tecnicas/>>. Acesso em: 8 nov. 2013.
- Allqvist, A.; Wennerholm, A.; Svensson, Jan-Olof; Mirghani, R. A. Simultaneous quantification of alprazolam, 4- and  $\alpha$ -hydroxyalprazolam in plasma samples using liquid chromatography mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 814: 127-131, 2005.
- Amaral, R. B. do. Investigação do comportamento eletroquímico do inseticida fipronil e desenvolvimento de metodologia eletroanalítica. 2012. 124 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, São Carlos – SP.
- 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*, 76: 343-352, 2006.
- ANVISA. Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003.
- Auchewski, L.; Andreatini, R.; Galduróz, J. C. F.; de Lacerda, R. B. Avaliação da orientação médica sobre os efeitos colaterais de benzodiazepínicos. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 26: 24-31, 2004.
- Baldissera, F. G.; Colet, C. De F.; Moreira, A. C. Uso Irracional de Benzodiazepínicos: Uma Revisão. *Revista Contexto & Saúde*, 10: 112-116, 2010.
- Baquero F., Martínez J.Luis, Cantón R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current Opinion in Biotechnology* 19: 260-265, 2008.

- Bard, A. J. e Faulkner, L. R. *Electrochemical methods : fundamentals and applications*. 2ª edição, editora John Wiley & Sons, Inc, 2001.
- Bianchetti, F. J. Remoção do agente hormonalmente ativo etinilestradiol por pré-oxidação e coagulação: Estudo em escala de bancada. 2008. 89 p. Dissertação (Mestrado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- Bila, D. M. Degradação e remoção da atividade estrogênica do desregulador endócrino 17 $\beta$ -estradiol pelo processo de ozonização. 2005. 281 p. Tese (Doutorado em Ciências em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ.
- Bila, D. M.; Dezotti, M. Fármacos no meio ambiente. *Química Nova*, 26: 523-530, 2003.
- Birkett, J. W.; Lester, J. N. *Endocrine Disrupters in Wastewater and Sludge Treatment Processes*. 1ª edição, IWA Publishing, Lewis Publishers, 2003. Disponível em: <<http://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=ZJDS0UqAFfYC&oi=fnd&pg=PA1&dq=+Endocrine+Disrupters+in+Wastewater+and+Sludge+Treatment+Processes&ots=yjzBdXice3&sig=aCZKBTqyFS8kNOrSgy6CCxatEpY#v=onepage&q=Endocrine%20Disrupters%20in%20Wastewater%20and%20Sludge%20Treatment%20Processes&f=false>>. Acesso em: 14 fev. 2014.
- Brodin, T.; Fick, J.; Jonsson, M.; Klaminder, J. Dilute Concentrations of a Psychiatric Drug Alter Behavior of Fish from Natural Populations. *Science*, 339: 814-815, 2013.
- Bugey, A.; Staub, C. Rapid analysis of benzodiazepines in whole blood by high-performance liquid chromatography: use of a monolithic column. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 35: 555-562, 2004.
- Campos, M. L. A. M.; Bendo, A.; Viel, F. C. Métodos de baixo custo para purificação de reagentes e controle da contaminação para a determinação de metais traços em águas naturais. *Química Nova*, 25: 808-813, 2002.

- Carvalho, L. M.; Correia, D.; Garcia, S. C.; Bairros, André V. P.; Nascimento, C.; Bohrer, D. A new method for the simultaneous determination of 1,4-benzodiazepines and amfepramone as adulterants in phytotherapeutic formulations by voltammetry. *Forensic Science International* 202: 75-81, 2010.
- Collins, C. H; da Silva, C. G. A. Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes *Quimica Nova*, 34: 665-676, 2011.
- Cunha, R. C. da. Otimização da metodologia de determinação de boro empregando voltametria de pulso diferencial. 2010. 63 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica - Magister Scientiae) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG.
- 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://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>> Acesso em: 21 nov. 2013.
- Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011 – Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA. Brasília Disponível em: < <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646> > Acesso em: 17 dez. 2013.
- EL-Enany; Belal, N.F.; Rizk, M.S. Voltammetric analysis of trazodone HCl in pharmaceuticals and biological fluids. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 30: 219-226, 2002.
- Favretto, D.; Vogliardi, S.; Stocchero, G.; Nalessoa, A.; Tucci, M.; Ferrara, S. D. High performance liquid chromatography–high resolution mass spectrometry and micropulverized extraction for the quantification of amphetamines, cocaine, opioids, benzodiazepines, antidepressants and hallucinogens in 2.5 mg hair samples. *Journal of Chromatography A*, 1218: 6583-6595, 2011.

- Feitosa, R. S.; Sodré, F. F.; Maldaner, A. O. Drogas de abuso em águas naturais e residuárias urbanas: Ocorrência, determinação e aplicações forenses. *Química Nova*, 36: 291-305, 2013.
- Fernandes, A. N.; Almeida, C. A. P.; Esteves, V. I.; Sierra, M. M. D.; Grassi, M. T. Remoção dos hormônios 17 $\beta$ -estradiol e 17 $\alpha$ -etinilestradiol de soluções aquosas empregando turfa decomposta como material adsorvente. *Química Nova*, 34: 1526-1533, 2011.
- Ferreira, M. G. M. Remoção da atividade estrogênica de 17 $\beta$ -estradiol e de 17 $\alpha$ -etinilestradiol pelos processos de ozonização e O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. 2008. 173 p. Tese (Doutorado em Ciências em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ.
- Ghiselli, G. Avaliação da Qualidade das Águas Destinadas ao Abastecimento Público na Região de Campinas: Ocorrência e determinação de Interferentes Endócrinos (IE) e Produtos Farmacêuticos e de Higiene Pessoal (PFHP). 2006. 181 p. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Instituto de Química - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.
- Ghiselli, G. e Jardim, W. F. Interferentes endócrinos no ambiente. *Química Nova*, 30: 695-706, 2007.
- Ghoneim, M.M.; Baumann, W.; Hammam, E.; Tawfik, A. Voltammetric behavior and assay of the contraceptive drug levonorgestrel in bulk, tablets, and human serum at a mercury electrode. *Talanta* 64: 857-864, 2004.
- 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*, 40: 255-261, 2006.
- Google Maps. Disponível em: <<https://maps.google.com.br/>>. Acesso em: 7 jan. 2014.

Grassi, M. T. As águas do planeta Terra. Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola. 2001. Disponível em: < <http://qnesc.sbq.org.br/online/cadernos/01/aguas.pdf>> Acesso em: 21 nov. 2013.

<sup>a</sup>Habeeb, A.R.; Procopio, J. R.; Hernandez L. Determination of Alprazolam in Serum by Adsorptive Stripping Voltammetry. *Microchemical Journal*, 39: 247-252, 1989.

<sup>b</sup>Habeeb, A.R.; Procopio, J. R.; Hernandez L. Some observations on the polarographic behavior of a triazolobenzodiazepine (Alprazolam) and its use for the determination of alprazolam in serum. *Microchemical Journal*, 4: 341-351, 1989.

Haddou, B.; Ghouas, H.; Kameche, M.; Derriche, Z.; Gourdon, C. Extraction of humic acid by coacervat: Investigation of direct and back processes. *Journal of Hazardous Materials.*, 205-206: 171-178, 2012.

Hirsch R.; Ternes T.; Haberer K.; Kratz K. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *The Science of the Total Environment*, 225: 109-118, 1999.

Kassab, N. M.; de Paulo, G. N. C. Desenvolvimento e validação de métodos analíticos por clae para determinação de alprazolam e diazepam em formulações farmacêuticas de uso humano e veterinário. Disponível em: <<http://www.propp.ufms.br/gestor/titan.php?target=openFile&fileId=479>> Acesso em: 2013.

Kosjek, T.; Perko, S.; Zupanc, M.; Hren, M. Z.; Dragicevic', T. L.; Zigon, D.; Kompare, B.; Heath, E. Environmental occurrence, fate and transformation of benzodiazepines in water treatment. *Water Research*, 46: 355-368, 2012.

Lajeunesse, A.; Smyth, S.A.; Barclay, K.; Sauvé, S.; Gagnon, C. Distribution of antidepressant residues in wastewater and biosolids following different treatment processes by municipal wastewater treatment plants in Canada. *Water Research*, 46: 5600-5612, 2012.

Li, X.; Zheng, W.; Kelly, W. R. Occurrence and removal of pharmaceutical and hormone contaminants in rural wastewater treatment lagoons. *Science of the Total Environment*, 445-446: 22-28, 2013.

- Liao, L.; Wang, M.; Zhang, X.; Li, Z. Adsorption of low concentration humic acid from water by palygorskite. *Applied Clay Science*, 67-68: 164-168, 2012.
- Margis, R.; Picon, P.; Cosner, A. F.; Silveira, R. de O. Relação entre estressores, estresse e ansiedade. *Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul*, 25: 65-74, 2003.
- Miranda, L.; Galli, A.; Quinária, S. P. Endocrine Interfering in Natural Waters: Voltammetric Determination of 17 $\alpha$ -methyltestosterone. *Revista Virtual Química*, 2013.
- Miranda, L. Otimização de uma metodologia eletroanalítica para determinar metiltestosterona em amostras ambientais. 2012. 73 p. Dissertação (Mestrado em Química Aplicada – Metodologias Analíticas e Aplicações) – Universidade Estadual do Centro Oeste, Guarapuava, PR.
- Montagner, C. C.; Jardim, W F. Spatial and seasonal variations of pharmaceuticals and endocrine disruptors in the Atibaia River, São Paulo State (Brazil). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 22: 1452-1462, 2011.
- Orsi, C. Água de 20 capitais tem ‘contaminantes emergentes’. *Jornal da UNICAMP Campinas*, 23 setembro 2013 a 29 setembro 2013 – Nº 576. Disponível em: <<http://www.unicamp.br/unicamp/ju/576/agua-de-20-capitais-tem-contaminantes-emergentes>>. Acesso em: 21 nov. 2013.
- Pailler, J.-Y.; Krein, A.; Pfister, L.; Hoffmann, L.; Guignard, C. Solid phase extraction coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of sulfonamides, tetracyclines, analgesics and hormones in surface water and wastewater in Luxembourg. *Science of the Total Environment*, 407: 4736-4743, 2009.
- Pereira, D. G. Importância do metabolismo no planejamento de fármacos. *Química Nova*, 30: 171-177, 2007.
- Peters, R. E.M.; Courtenay, S. C.; Cagampan, S.; Hewittd, M. L.; MacLatchy, D. L. Effects on reproductive potential and endocrine status in the mummichog

- (*Fundulus heteroclitus*) after exposure to 17 $\alpha$ -ethynylestradiol in a short-term reproductive bioassay. *Aquatic Toxicology*, 85: 154-166, 2007.
- Petrovic', M.; Gonzalez, S.; Barceló. D.; Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. *Trends in Analytical Chemistry*, 22: 685-696, 2003.
- Pham, M.; Mostefai, M.; Simon, M.; Lacaze, P. Electrochemical synthesis and study of poly(5-amino 1-naphthol) film in aqueous and organic media. *Synthetic Metals*. 63: 7-15, 1994.
- Porto, J. A. D. Crises de pânico na prática médica. Órgão Oficial do centro de Estudos – Departamento de psiquiatria – UNIFESP/EPM São Paulo, out. a dez. 2000 – N° 4. Disponível em <<http://www.unifesp.br/dpsiq/polbr/ppm/especial04a.htm>>. Acesso em: 04 nov. 2013.
- Poyares, D.; Pinto, L. R.; Tavares, S.; Vieira, S. B. Hipnoindutores e insônia. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 27: 2-7, 2005.
- Radi, A.; Wahdan, T.; El-Ghany, N. A. Determination of cefonicid in human urine by adsorptive square-wave stripping voltammetry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 31: 1041-1046, 2003.
- Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F. Melo, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, 27: 771-780, 2004.
- Rodil, R.; Quintana, J. B.; López-Mahía, P.; Muniategui-Lorenzo, S.; Prada-Rodríguez, D. Multi-residue analytical method for the determination of emerging pollutants in water by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216: 2958-2969, 2009.
- Sampaio, M. R. M. Avaliação da bioequivalência de formulações contendo lorazepam através de método bioanalítico utilizando a cromatografia líquida acoplada ao sistema de detecção por espectrometria de massa. 2007. 182p. Dissertação (Mestrado – Fármacos e Medicamentos) Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

- Santana, J. S. Determinação de contaminantes emergentes em mananciais de água bruta e na água para consumo humano do Distrito Federal. 2013. 101 p. Dissertação (Mestrado em química) – Universidade de Brasília, Brasília, DF.
- Santos, S. C. dos. Desenvolvimento de uma metodologia eletroanalítica para a determinação de pesticida glifosato em amostras ambientais. 2012. 90 p. Dissertação (Mestrado em Química Aplicada – Metodologias Analíticas e Aplicações) – Universidade Estadual do Centro Oeste, Guarapuava, PR.
- Sodré, F. F. Especiação do cobre em águas naturais: Influência de fatores associados à urbanização. 2005. 165 p. Tese (Doutorado em ciências) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.
- Sodré, F. F.; Locatelli Marco Antonio F.; Jardim. W. F. Sistema limpo em linha para extração em fase sólida de contaminantes emergentes em águas naturais. *Química Nova*, 33: 216-219, 2010.
- Sodré, F. F.; Locatelli, M. A. F.; Montagner C. C.; Jardim, W. F.; Origem e destino de interferentes em águas naturais. Campinas, Abril de 2007. Disponível em: < <http://lqa.iqm.unicamp.br/cadernos/caderno6.pdf> >. Acesso em: 21 nov. 2013.
- Souza, D. de; Codognoto, L.; Malagutti, A. R.; Toledo, R. A.; Pedrosa, V. A.; Oliveira, R. T. S.; Mazo, L. H.; Avaca, L. A.; Machado, S. A. S. Voltametria de Onda Quadrada. Segunda Parte: Aplicações. *Química Nova*, 27: 790-797, 2004.
- SKOOG; WEST; HOLLER; CROUCH. Fundamentos de Química Analítica. 8ª edição, editora Thomson, 2006.
- Ternes, T.; Bonerz, M.; Schmidt, T. Determination of neutral pharmaceuticals in wastewater and rivers by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 938: 175-185, 2001.
- Ternes, T. A.; Stumpf, M.; Mueller, J.; K. Haberer, Wilken, M. R.-D. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *The Science of the Total Environment*, 225: 81-90, 1999.

- Valcárcel, Y.; Alonso, S. G.; Rodríguez-Gil, J. L.; Gil, A.; Catalá, M. Detection of pharmaceutically active compounds in the rivers and tap water of the Madrid Region (Spain) and potential ecotoxicological risk. *Chemosphere*, 84: 1336-1348, 2011.
- Vem, K. van der; Dongen, W. V.; Maes, B. U. W.; Esmans, E. L.; Blust, R.; Coen, W. M. D. Determination of diazepam in aquatic samples by capillary liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Chemosphere*, 57: 967-973, 2004.
- Westland, J. L.; Dorman, F. L. QuEChERS extraction of benzodiazepines in biological matrices. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 509-517, 2013.