

## VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL DA DETERMINAÇÃO DE METILTESTOSTERONA EM ÁGUAS NATURAIS POR VOLTAMETRIA USANDO ELETRODO DE GOTA PENDENTE DE MERCÚRIO

Luciane Miranda\*, Maria L. Felsner, Yohandra R. Torres, Ivonete Hoss, Andressa Galli e Sueli P. Quináia

Departamento de Química, Universidade Estadual do Centro-Oeste, 85040-080 Gurapuava – PR, Brasil

Recebido em 06/06/2014; aceito em 03/11/2014; publicado na web em 11/02/2015

IN-HOUSE VALIDATION OF METHYLTESTOSTERONE DETERMINATION IN NATURAL WATERS BY VOLTAMMETRY USING HANGING MERCURY DROP ELECTRODE.  $17\alpha$ -methyltestosterone ( $17\alpha$ -MT) is a hormone used in medicine and aquaculture which can be found in natural waters. It is considered an emerging organic pollutant and its accurate and precise analysis is required. Therefore, this study presents the in-house validation of a new voltammetric methodology for  $17\alpha$ -MT analysis in natural waters. A hanging mercury drop electrode and  $\text{NaOH } 5.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  solution as the electrolyte were employed in the voltammetric determinations. To confirm the presence of  $17\alpha$ -MT in water samples quantitative analysis was performed by *ESI-MS/MS*. The methodology exhibited good selectivity, linearity, accuracy (recovery of between 100.4 and 108.8%) and precision (RSDs for repeatability of 2.85% and for intermediate precision of 14.10%, with  $n = 5$ , respectively). LOD and LOQ were  $3.07 \mu\text{g L}^{-1}$  and  $10.78 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectively. The methodology was suitable for determination of  $17\alpha$ -MT in natural waters due to low-cost, good performance and no sample pre-treatment required.

Keywords:  $17\alpha$ -methyltestosterone; natural waters; voltammetry; method validation.

## INTRODUÇÃO

Anualmente, inúmeros compostos são produzidos. Contudo, das milhões de substâncias orgânicas e inorgânicas, poucas são monitoradas ou regulamentadas em relação ao tempo de vida e efeitos quando lançadas no ambiente. Assim, surge a necessidade do monitoramento da sua presença em diferentes matrizes e ecossistemas.<sup>1,2,3</sup>

Os produtos farmacêuticos, como os hormônios ou substâncias hormonalmente ativas, tem capacidade de interferir no sistema endócrino de humanos e outros animais, mesmo quando encontram-se em baixas concentrações. Por isso são chamados de interferentes endócrinos e considerados poluentes orgânicos emergentes.<sup>4,6</sup>

O hormônio  $17\alpha$ -metiltestosterona ( $17\alpha$ -MT) (Figura 1) é um composto sintético derivado da testosterona e pertencente aos hormônios considerados esteróides anabolizantes. Na medicina, é usado para suprir deficiências de testosterona e no tratamento de sintomas de andropausa em homens.<sup>7,8</sup> O  $17\alpha$ -MT possui massa molar de  $302,45 \text{ g mol}^{-1}$ , apresenta-se na forma de pó cristalino de coloração branca, sendo praticamente insolúvel em água, e dissolve-se facilmente em álcool etílico.<sup>9</sup>

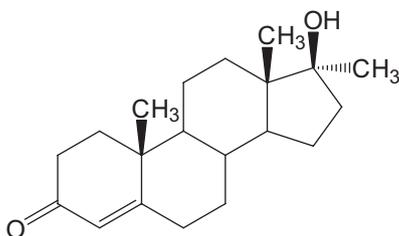


Figura 1. Estrutura química do hormônio  $17\alpha$ -MT

Na aquicultura o  $17\alpha$ -MT é amplamente utilizado na reversão sexual em camarões, como o gigante da Malásia (*Macrobrachium rosenbergii*),<sup>10</sup> a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*),<sup>11,12</sup> entre outras espécies de peixes. Essa atividade resulta em lançamento de

efluentes contendo o  $17\alpha$ -MT,<sup>13</sup> justificando a necessidade de monitoramento dos corpos d'água em relação à presença de substâncias hormonalmente ativas.

Os métodos analíticos tradicionalmente usados para quantificar o  $17\alpha$ -MT se baseiam em técnicas cromatográficas (cromatografia gasosa, líquida, e líquida de alta eficiência) com detecção com Arranjo de Diodos (*DAD*) e Ultravioleta,<sup>14</sup> e espectrometria de massas acoplado (*MS/MS*).<sup>1,15,16</sup> Apesar da versatilidade, sensibilidade e eficiência destas metodologias, elas tem como desvantagem a necessidade do uso de solventes tóxicos e de instrumentação de custo elevado, além de longos tempos de análise e de que normalmente não são aplicadas diretamente à análise de amostras concentradas.<sup>17</sup> Os métodos eletroquímicos, por sua vez, têm sido empregados para a determinação de compostos ativos farmacêuticos em níveis traço em estudos de monitoramento de produtos industriais, biológicos e ambientais com sensibilidade, precisão e exatidão adequadas.<sup>17</sup> As modernas técnicas eletroanalíticas são aplicáveis na quantificação de hormônios e outros agroquímicos, com algumas vantagens em relação a outras metodologias, pois produzem medidas rápidas e confiáveis do analito, consumindo pequenas quantidades de reagentes e eliminando ou minimizando etapas de pré-tratamento.<sup>17-19</sup> No entanto, podem ser adotadas somente quando os sinais de outros compostos presentes na amostra não apresentam uma resposta no mesmo potencial em relação a espécie de interesse, uma vez que não são técnicas de separação.<sup>20</sup>

Entre as técnicas voltamétricas empregadas na quantificação de compostos orgânicos destaca-se a voltametria de onda quadrada, que permite a realização de varreduras rápidas de potencial e obtenção de metodologias sensíveis.<sup>21</sup> Além disso, esta técnica eletroanalítica pode produzir resposta de corrente mais alta, quando comparada a outras técnicas de pulso, sobretudo quando se trata de um sistema quase ou totalmente reversível. No caso de processos cuja reversibilidade é total, a corrente de pico é até cinco vezes menor que para sistemas irreversíveis.<sup>21</sup>

A voltametria de onda quadrada é utilizada para determinar fármacos, tais como os hormônios, em diversas matrizes. Ghoneim *et al.* (2004)<sup>22</sup> propõe um método para quantificar o contraceptivo levonorgestrel em formulações farmacêuticas e soro humano, utilizando

\*e-mail: luciane\_miranda@yahoo.com.br

o eletrodo de mercúrio. Santos *et al.* (2010),<sup>23</sup> utilizando o eletrodo de diamante dopado com boro, determinaram o hormônio estriol em urina de mulheres grávidas empregando voltametria de onda quadrada. Todavia, pesquisas dedicadas à determinação eletroanalítica do hormônio 17 $\alpha$ -MT em diferentes matrizes são escassas na literatura. Wang *et al.* (1985)<sup>24</sup> descreve uma metodologia para determinar este hormônio em formulações farmacêuticas por técnicas voltamétricas. Outra metodologia para quantificar o 17 $\alpha$ -MT em matrizes aquosas é a apresentada no trabalho de Miranda *et al.* (2014)<sup>19</sup> empregando a voltametria de onda quadrada e o eletrodo de gota pendente de mercúrio (HDME). Entre as vantagens do uso do eletrodo de mercúrio está a renovação da superfície metálica a cada medida, eliminando a passivação da superfície eletródica. Uma nova gota é formada automaticamente por pressão de nitrogênio no sistema após a retirada da gota antiga. Além disso, o uso de equipamentos eletroanalíticos modernos permite uma diminuição considerável de resíduos de mercúrio. Uma vantagem adicional do emprego deste eletrodo na metodologia desenvolvida por Miranda *et al.* (2014)<sup>19</sup> é o fato de que a utilização de eletrodos sólidos para detecção de 17 $\alpha$ -MT é dificultada devido a adsorção dos produtos da reação redox na superfície do eletrodo, comprometendo a reprodutibilidade da resposta voltamétrica. Entretanto, uma das suas limitações é a facilidade de oxidação da superfície, restringindo a faixa de potencial anódico que pode ser utilizada.<sup>25</sup>

Conforme já abordado, são encontrados poucos trabalhos na literatura referentes à utilização de métodos voltamétricos para a determinação de 17 $\alpha$ -MT, principalmente em amostras de água. Desta forma, torna-se interessante o desenvolvimento e validação de um método voltamétrico para este hormônio.

Atualmente, é reconhecido que um método analítico antes de ser utilizado no controle de qualidade ou por órgãos reguladores deve ser validado, especialmente para fármacos. Para tanto, deve apresentar comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade nas medições químicas, comprovando sua adequação à finalidade pretendida.<sup>26-29</sup>

A validação de um método pode ser realizada de duas formas, a primeira delas somente no laboratório (validação intralaboratorial) abrangendo parâmetros como seletividade, linearidade, precisão (repetitividade e precisão intermediária) e exatidão, ou a segunda forma, incluindo estudos interlaboratoriais, que avaliam além dos parâmetros já descritos também a reprodutibilidade e a incerteza de medição da metodologia estudada. No último caso, o estudo recebe o nome de validação completa e é exigido por órgãos reguladores para adotar um método como oficial ou padrão.<sup>26</sup>

Com o desenvolvimento de novos fármacos em âmbito mundial, tornou-se imprescindível a harmonização de critérios para o registro desses produtos pelos órgãos reguladores. Com isso, cresceu a necessidade de se realizar estudos de validação das metodologias adotadas para a identificação e quantificação desses compostos. Um exemplo é a resolução 899 de 2003 da Anvisa,<sup>28</sup> que apresenta um guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos aplicados a formulações farmacêuticas, devendo ser adotado por indústrias e laboratórios de controle de qualidade e de fiscalização. Todavia, a validação de metodologias analíticas destinadas à análise de poluentes emergentes, como os fármacos em amostras ambientais, tem feito uso de estratégias diferenciadas de validação, descritas em guias da EPA, ISO e artigos da literatura.<sup>30</sup>

No Brasil, ainda são recentes os estudos voltados para a validação de metodologias eletroanalíticas destinadas à determinação de fármacos em diferentes matrizes, embora eles sejam realizados em outras partes do mundo.<sup>31</sup>

Por outro lado, os trabalhos de validação relatados na literatura utilizam-se de técnicas estatísticas menos sofisticadas do que as empregadas por métodos tais como os cromatográficos.<sup>30,31</sup> Em alguns casos, os resultados são validados somente por comparação com uma

metodologia de referência, por exemplo, a cromatografia líquida, como verificado no trabalho de Cámara *et al.*<sup>32</sup> que aborda a determinação quantitativa do alcalóide boldina em extratos de folha de boldo por voltametria cíclica e CLAE. Assim, verifica-se a importância da aplicação de estratégias de validação para a determinação de fármacos como o 17 $\alpha$ -MT em amostras ambientais por técnicas eletroanalíticas, fazendo uso de ferramentas quimiométricas mais sofisticadas. No presente trabalho foi desenvolvido um estudo de validação intralaboratorial para a quantificação rápida, simples e de baixo custo do hormônio 17 $\alpha$ -MT em águas naturais por voltametria de onda quadrada.<sup>28-30,33,34</sup>

## METODOLOGIA

### Materiais, reagentes e amostras

Na validação da metodologia foram utilizados reagentes de grau analítico. A solução padrão estoque de 9,98 $\times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> de hormônio 17 $\alpha$ -MT (DEG Reagents Corporation, 99,0%) foi preparada diariamente em etanol 99,3% (v/v). Soluções de trabalho foram preparadas a partir de diluições da solução estoque em água ultrapura. As vidrarias, béqueres e balões volumétricos foram previamente lavados e descontaminados em solução HNO<sub>3</sub> 10% (v/v) e, em seguida, foram enxaguadas com água destilada e com água ultrapura obtida por sistema de purificação *Mili-Q* (Human UP-90).

No estudo de seletividade utilizou-se o ácido húmico (AH) com grau técnico da *Sigma Aldrich*. Uma solução estoque de AH de 1,5 g L<sup>-1</sup> foi preparada e alíquotas dessa solução foram adicionadas à cela eletroquímica contendo o analito 17 $\alpha$ -MT.

O 17 $\alpha$ -MT foi determinado em amostras de águas naturais coletadas em dois ambientes devidamente identificados pelas coordenadas geográficas,<sup>35</sup> um riacho urbano (-25.382533,-51.487856) e em tanques de criação de peixes (-25.468616,-51.41151) no município de Guarapuava-PR.

### Voltametria de onda quadrada

As medidas voltamétricas para o analito 17 $\alpha$ -MT foram realizadas com um polarógrafo *Methrom 757 VA Computrace*, acoplado por uma interface a um micromputador, operando com o *software VA Computrace* para obtenção, armazenamento e tratamento dos dados obtidos. Como eletrodo de trabalho utilizou-se o eletrodo de gota pendente de mercúrio (*HMDE*), como eletrodo de referência o de Ag/AgCl em KCl 3,0 mol L<sup>-1</sup>, e como eletrodo auxiliar usou-se um fio de platina.

O potencial de deposição aplicado foi de -0,8 V, e a varredura de potencial de -1,0 a -1,7 V, ambos baseados na literatura.<sup>19,24</sup> A remoção do oxigênio atmosférico dissolvido nas soluções foi realizada pela passagem de gás N<sub>2</sub> (99,999%).

### Análises qualitativas por ESI-MS e ESI-MS/MS e extração do hormônio 17 $\alpha$ -MT de amostras de água

As análises por espectrometria de massas com ionização por *electrospray* (ESI) foram desenvolvidas no laboratório do Centro de Estudos Biofarmacêuticos – Biocinese, usando um espectrômetro de massas em tandem (ESI(-)-MS/MS) da *Waters - Quattro Premier XE* (*Waters*, Milford, MA, USA), equipado com fonte de ionização ESI, analisador de massas triplo quadrupolo, *software* MassLynx 4.1. Primeiramente, o padrão analítico de 17 $\alpha$ -MT foi submetido a ionização por *electrospray* no modo negativo ESI(-)-MS, seguido de fragmentação induzida por colisão com argônio para obter os espectros ESI(-)-MS/MS. Para a otimização da análise de 17 $\alpha$ -MT foi preparada uma solução de 100 ng mL<sup>-1</sup> de 17 $\alpha$ -MT em metanol 50%

(v/v) e alíquotas foram introduzidas no Espectrômetro de Massas por infusão direta com auxílio de seringa de volume de 250  $\mu\text{L}$  (*Harvard Apparatus, Natick, MA*) em fluxo de 20  $\mu\text{L min}^{-1}$ . Desta forma, a condição analítica do espectrômetro de massas foi otimizada para detecção de 17 $\alpha$ -MT com os seguintes parâmetros: gás do cone 100 L h<sup>-1</sup>, gás de dessolvatação (nitrogênio) 750 L h<sup>-1</sup>, voltagem do capilar (- 5,00 kV), voltagem do extrator (5 V), temperatura da Fonte (110 °C), temperatura de dessolvatação (500 °C), variação da voltagem do cone (-  $\Delta$  40) e a energia do gás de colisão (argônio) foi de 40 V. A detecção foi realizada no modo varredura na faixa de 60 a 400 m/z.

Para a extração e concentração do 17 $\alpha$ -MT a partir da água de rio utilizou-se a extração em fase sólida (*SPE*) em cartuchos *Strata-X* (500 mg/3 mL) *Phenomenex*. Os cartuchos foram acondicionados por lavagem com 6,0 mL de metanol grau *HPLC*, seguido de 6,0 mL de água ultrapura. O processo de eluição foi auxiliado por centrifugação a 1000 rpm durante 1 min (Eppendorf 5810 R). Após condicionamento dos cartuchos, foi aplicada uma alíquota da amostra de no cartucho *Strata-X*, que em seguida foi lavada com 6,0 mL de água ultrapura para retirar possíveis interferentes. A eluição do composto de interesse foi realizada com 6,0 mL metanol grau *HPLC*. A solução resultante foi concentrada em concentrador líquido-líquido sob fluxo de nitrogênio com aquecimento em banho-maria à temperatura de 45 °C (Tecnal TE-0195). O extrato final foi reconstituído em uma solução de metanol 50% e injetado no espectrômetro de massa para obtenção de *fingerprints* por *ESI/MS* e espectros de *ESI/MS/MS* na faixa de 60 a 400 m/z. O procedimento de extração e quantificação do analito foi realizado em triplicata.

### Validação da metodologia voltamétrica

Os parâmetros voltamétricos utilizados no presente estudo baseiam-se na metodologia voltamétrica desenvolvida e otimizada por Miranda *et al.* (2014).<sup>19</sup> Portanto, os parâmetros utilizados foram: eletrólito suporte (NaOH 5,0  $\times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>); pH<sub>aparente</sub> (9,0); *f* (frequência: 140 Hz); *a* (amplitude: 50 mV);  $\Delta E_s$  (incremento de varredura: 2 mV). Para verificar o desempenho da metodologia eletroanalítica foram analisados os parâmetros de seletividade, linearidade, limites de detecção (LD) e de quantificação, exatidão e precisão de acordo com recomendações de guias, resoluções e artigos da literatura.<sup>28-30,33,34</sup>

#### Seletividade

A seletividade do método foi avaliada qualitativamente a partir de análises empregando-se o ácido húmico (AH), por ser uma substância considerada abundante em águas naturais.<sup>36</sup> Este estudo foi realizado com sucessivas adições de AH em concentrações que variaram de 4,9  $\times 10^{-3}$  a 38,2 mg L<sup>-1</sup> a partir de uma solução estoque de 1,5 g L<sup>-1</sup>. A concentração de 17 $\alpha$ -MT adicionada inicialmente na cela voltamétrica foi de 1,96  $\times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>. A seletividade foi avaliada pela variação da intensidade da corrente de pico nos voltamogramas.

O efeito de interferência de matriz foi avaliado comparando-se a inclinação das curvas de padrão externo em eletrólito puro e de adição de padrão em amostras de água coletadas em tanque de criação de peixes em função da concentração do hormônio 17 $\alpha$ -MT (4,6  $\times 10^{-8}$  a 4,2  $\times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>).

A presença do analito 17 $\alpha$ -MT em amostras de água naturais foi confirmada pela técnica de espectrometria de massas com ionização por *electrospray* e fragmentação por colisão induzida como descrito no item: Análises qualitativas por *ESI-MS* e *ESI-MS/MS* e extração do hormônio 17 $\alpha$ -MT de amostras de água.

#### Linearidade

A linearidade foi avaliada através de curvas de padrão externo do hormônio 17 $\alpha$ -MT em eletrólito puro em duas faixas de concentração

(1,0  $\times 10^{-8}$  a 2,31  $\times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> e 4,18  $\times 10^{-7}$  a 1,87  $\times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>). Para cada ponto nas curvas analíticas foram realizadas três medidas voltamétricas. Uma análise de regressão linear e um teste de falta de ajuste no nível de 95% de confiança foram aplicados aos dados de calibração, para verificar se o modelo linear era o modelo mais adequado.<sup>33</sup> Para testar a significância dos coeficientes de cada uma das curvas analíticas (intercepto e inclinação) foi aplicado um teste-*t* no nível de 95% de confiança e foram construídos intervalos de confiança e de predição no mesmo nível de confiança.

#### Limites de Detecção (LD) e de Quantificação (LQ)

Para a determinação dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram utilizados os dados da equação da curva analítica de maior sensibilidade. Os valores de LD e de LQ foram obtidos pelo desvio padrão da média aritmética de dez voltamogramas do branco respectivo a cada amostra e pela inclinação da curva de calibração de acordo com as recomendações da Anvisa,<sup>28</sup> conforme mostram as equações 1 e 2:

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

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

onde,  $S_B$  é o desvio padrão da média aritmética das correntes dos voltamogramas do branco, no potencial equivalente aos dos picos de 17 $\alpha$ -MT e *b* o valor do coeficiente angular da curva analítica.

#### Precisão

A precisão do método foi avaliada pelas estimativas de repetitividade e de precisão intermediária, de acordo com as recomendações da Anvisa<sup>28</sup> e da AOAC.<sup>34</sup> A estimativa de repetitividade foi obtida pela realização de cinco medidas voltamétricas independentes em um único dia aplicando-se os parâmetros descritos na Tabela 1. A concentração do hormônio 17 $\alpha$ -MT adicionada foi de 1,96  $\times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>. A estimativa de precisão intermediária foi determinada da mesma maneira, durante cinco dias consecutivos. Os resultados do estudo de precisão foram avaliados a partir do cálculo do coeficiente de variação (CV) dado pela equação 3.<sup>28</sup>

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (3)$$

Na equação 3, o termo  $\bar{x}$  corresponde à média e o termo *s* ao desvio padrão entre as replicatas das medidas de corrente de pico.

#### Exatidão

A exatidão foi avaliada por estudos de recuperação de padrão adicionado em eletrólito puro e em amostras de água de acordo com as recomendações da Anvisa<sup>28</sup> e do Inmetro.<sup>29</sup> Curvas de adição de padrão em cinco níveis de concentração foram construídas a partir de adições sucessivas do analito, em triplicata. A concentração de hormônio foi determinada pela extrapolação do eixo nas abscissas e a taxa de recuperação do analito foi calculada pela equação 4:

$$\frac{\text{Valor observado}}{\text{Valor esperado}} \times 100 \quad (4)$$

#### Análise estatística

Toda a análise estatística dos dados foi realizada utilizando-se o software *Minitab for Windows* versão 16.2.2.<sup>37</sup>

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo de validação intralaboratorial do método voltamétrico proposto neste estudo para a determinação do hormônio  $17\alpha$ -MT em água foi realizado avaliando-se os parâmetros de seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão por diferentes técnicas estatísticas seguindo as recomendações de guias, resoluções e artigos da literatura.<sup>28-30,33,34</sup>

### Seletividade

Para confirmar se o sinal analítico observado nas medidas voltamétricas em amostras de águas naturais está relacionado à presença do hormônio  $17\alpha$ -MT foram realizadas análises por *ESI-MS* e *ESI-MS/MS*, tanto do padrão analítico, quanto das amostras de água em investigação (Figura 2).

O espectro do padrão analítico do hormônio  $17\alpha$ -MT apresentou íon molecular desprotonado  $[M-H]^-$  de  $m/z$  301 e pouca fragmentação por *ESI-MS/MS*, sendo o íon molecular o pico base do espectro. Os fragmentos resultantes foram todos de baixa intensidade, ou seja, mesmo utilizando uma energia do gás de colisão alta, o íon de  $m/z$  301 não sofreu fragmentação significativa, mantendo-se intenso. Este fato sugere que a molécula de  $17\alpha$ -MT apresenta estabilidade química. Os íons fragmentos observados podem ser originados por perdas de pequenos fragmentos de massa: íon  $m/z$  285 é a perda de 17 unidades, provavelmente correspondente a  $[M-OH]^-$ ; o íon  $m/z$  271 se deve à perda de 31 unidades de massa  $[M-CH_3O]^-$ . Por último, o íon de  $m/z$  229 origina-se pela perda de 73 unidades de massa, e pode ser explicado pela perda consecutiva de molécula neutra de CO e as 3 metilas presentes na molécula do hormônio  $17\alpha$ -MT  $[M-CO-CH_3-CH_3-CH_3]^-$ .

A presença do hormônio  $17\alpha$ -MT nas amostras de água de rio

e do lago foi comprovada pela observação de um íon  $[M-H]^-$  de  $m/z$  301 no *fingerprint ESI(-)/MS* (Figura 2-B). Adicionalmente, o íon de  $m/z$  301 presente nas amostras ambientais foi fragmentado por colisão induzida e observou-se o mesmo padrão de fragmentação obtido para o padrão analítico (dados não mostrados).

Uma etapa de pré-tratamento foi aplicada às amostras de água de rio e do lago, com extração em fase sólida. Contudo, os *fingerprints ESI(-)/MS* (Figura 2-B) mostraram a presença de outros componentes, não identificados. Estes resultados indicam que no estudo de seletividade é preciso avaliar a influência de possíveis interferentes. Por isso, ao avaliar este parâmetro de validação levou-se em consideração a presença de moléculas orgânicas como o ácido húmico (AH), presente em águas superficiais com teores de até 30 mg L<sup>-1</sup>.<sup>38</sup> Os voltamogramas nas Figuras 3-A e 3-B mostram o efeito da adição de diferentes concentrações de AH na corrente de pico do  $17\alpha$ -MT. Em baixas concentrações de AH ( $4,9 \times 10^{-3}$  a 0,015 mg L<sup>-1</sup>), a sobreposição dos voltamogramas na Figura 3-A indica que não há um efeito significativo de interferência na resposta analítica do hormônio. No entanto, para concentrações maiores (9,97 a 38,2 mg L<sup>-1</sup>) o efeito de interferência foi importante, devido à diminuição na corrente de pico observada nos voltamogramas mostrados na Figura 3-B. Vale ressaltar, que este intervalo de concentração de AH conferiu uma coloração marrom à solução contida na cela voltamétrica, e esta coloração não foi observada em amostras dos ambientes aquáticos estudados. Esta observação física sugere que um excesso de AH foi usado neste estudo.

A seletividade também foi verificada pela construção de curvas analíticas de padrão externo, em eletrólito puro (água ultrapura) e adição de padrão, no caso das amostras de água de tanque de piscicultura (Figura 4). A análise das inclinações (coeficiente angular) obtidas para as curvas analíticas em eletrólito puro (0,86) e em amostras de água de tanque (0,40), sem diluir, indicam uma interferência negativa no sistema ao se trabalhar com amostras reais, uma vez que há

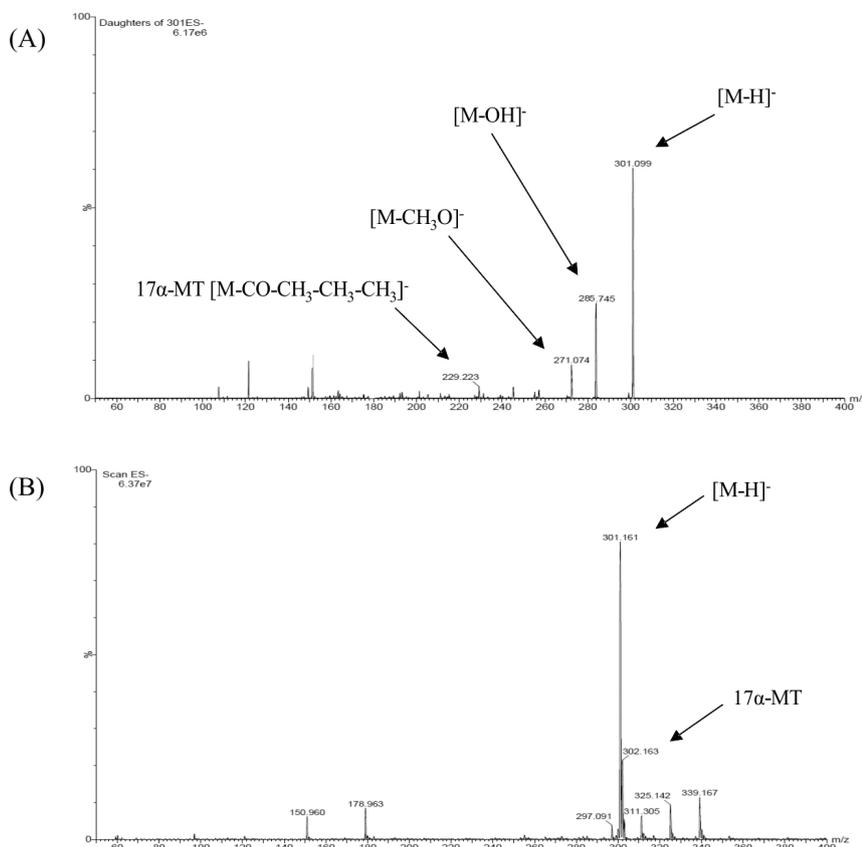
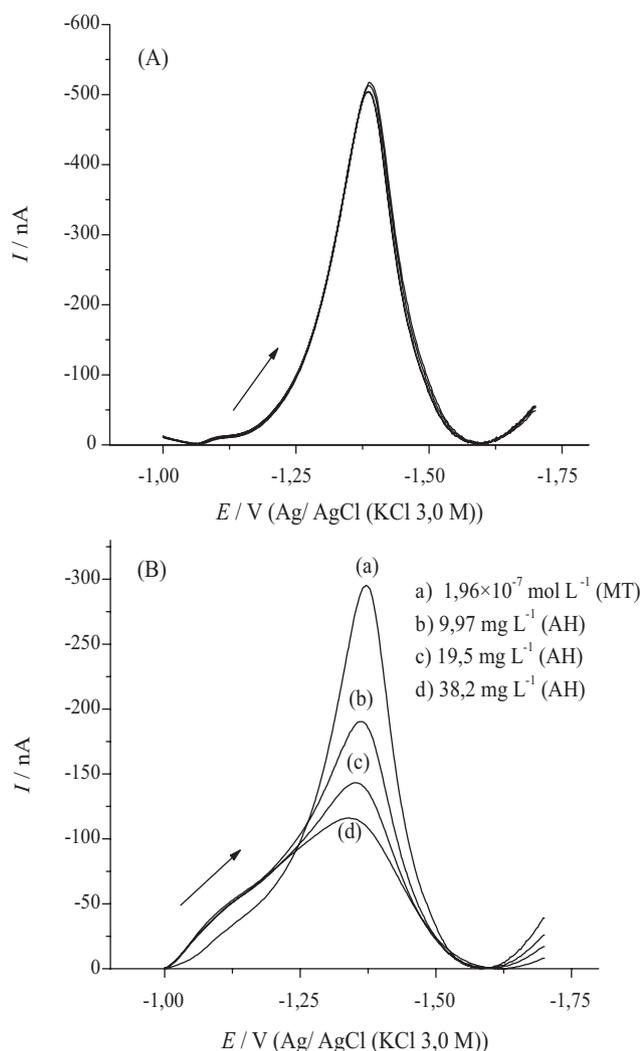
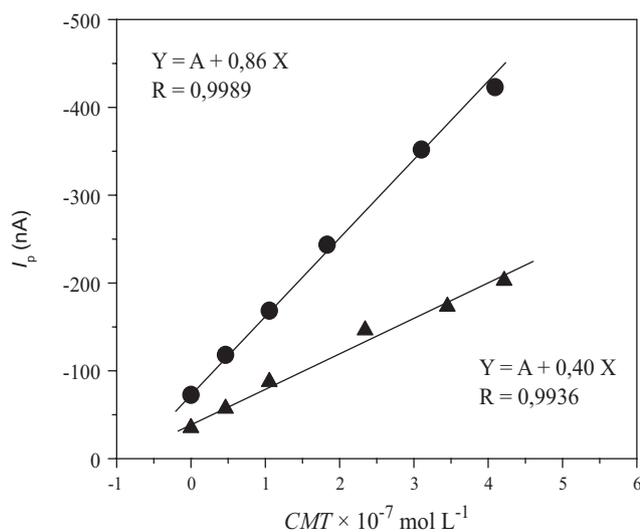


Figura 2. (A) Espectro *ESI(-)/MS/MS* do padrão analítico do hormônio  $17\alpha$ -MT. (B) *Fingerprint ESI(-)/MS* do  $17\alpha$ -MT na amostra de água de rio



**Figura 3.** Voltamogramas de  $17\alpha$ -MT ( $1,96 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ), adições sucessivas de AH. (A) Baixas concentrações de AH ( $4,9 \times 10^{-3}$  a  $0,015 \text{ mg L}^{-1}$ ), (B) Altas concentrações de AH ( $9,97$  a  $38,2 \text{ mg L}^{-1}$ ). Em meio de NaOH  $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$   $\text{pH}_{\text{aparente}} 9,0$ , com  $a = 50 \text{ mV}$ ,  $f = 140 \text{ s}^{-1}$  e  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ . Com ajuste da linha base.



**Figura 4.** Relação entre a intensidade de corrente e a concentração de  $17\alpha$ -MT em relação a matriz, em água ultrapura (●) e em água de tanque de piscicultura (▲) nas concentrações de  $4,6 \times 10^{-8}$  a  $4,2 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$

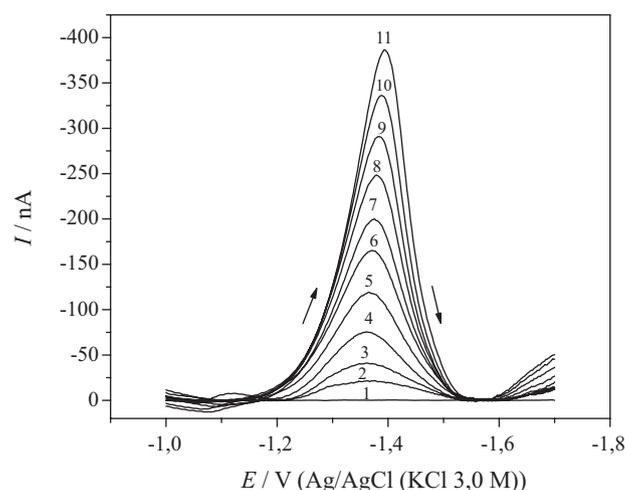
a diminuição da sensibilidade da técnica devido ao efeito de matriz. Vale ressaltar que esses resultados são concordantes com os observados na análise dos espectros de massa e no estudo de adição de AH.

Assim, para suprimir as interferências observadas na quantificação voltamétrica de  $17\alpha$ -MT, as amostras de água foram diluídas antes da determinação do hormônio. Alíquotas de 5,0 mL de amostra foram adicionadas na cela voltamétrica, contendo 10,0 mL de solução de eletrólito suporte preparada em água ultrapura. Desta forma, os interferentes foram diluídos, minimizando o efeito de matriz e permitindo a quantificação do analito nas amostras avaliadas.

### Linearidade

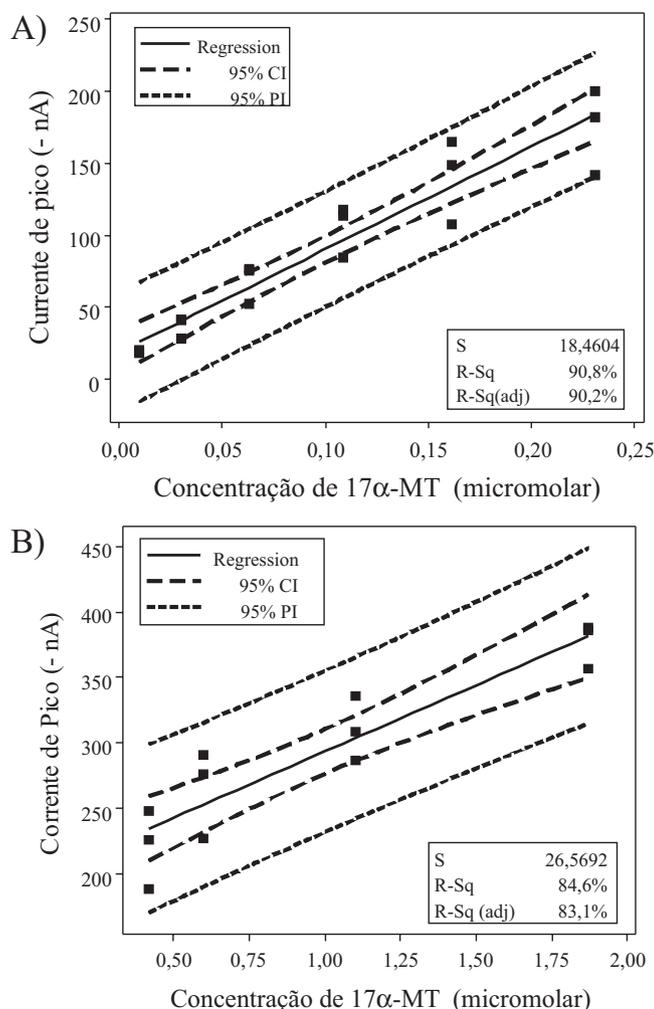
Inicialmente, a faixa de trabalho foi avaliada no intervalo de concentrações de  $1,0 \times 10^{-8}$  a  $1,87 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ , para a quantificação voltamétrica do hormônio  $17\alpha$ -MT utilizando-se os parâmetros previamente otimizados por voltametria de onda quadrada.<sup>19</sup>

A Figura 5, mostrada no trabalho de Miranda *et al.*,<sup>19</sup> apresenta os voltamogramas de dez adições sucessivas de solução padrão de  $17\alpha$ -MT para obtenção da curva analítica com potencial de pico em -1,35 V.



**Figura 5.** Voltamogramas de onda quadrada obtidos para a curva analítica de padrão externo do  $17\alpha$ -MT com HMDE. Parâmetros:  $f$  (140 Hz),  $a$  (50 mV),  $\Delta E_s$  (2 mV), NaOH  $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$   $\text{pH}_{\text{aparente}} 9,0$ . Concentração: (1) 0, (2)  $1,0 \times 10^{-8}$ , (3)  $3,0 \times 10^{-8}$ , (4)  $6,29 \times 10^{-8}$ , (5)  $1,09 \times 10^{-7}$ , (6)  $1,67 \times 10^{-7}$ , (7)  $2,31 \times 10^{-7}$ , (8)  $4,18 \times 10^{-7}$ , (9)  $5,98 \times 10^{-7}$ , (10)  $1,10 \times 10^{-6}$ , (11)  $1,87 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ . Com ajuste da linha base. Reproduzida da ref. 19

Para verificar se havia linearidade em toda a faixa de concentrações investigada foi realizada uma análise de regressão linear, e aplicado um teste de falta de ajuste, no nível de 95% de confiança. Os resultados (dados não mostrados) sugeriram que não é possível ajustar um modelo linear em toda a faixa de trabalho investigada. Neste caso, pode-se optar pelo uso de um modelo matemático de ordem mais alta como um polinômio, ou pela redução da faixa de trabalho até encontrar-se a linearidade entre o sinal eletroanalítico e a concentração da espécie eletroativa.<sup>30</sup> Sendo assim, a faixa de trabalho foi dividida produzindo duas curvas analíticas de padrão externo, no intervalo de  $1,0 \times 10^{-8}$  a  $2,31 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  (curva A, com seis pontos) e de  $4,18 \times 10^{-7}$  a  $1,87 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  (curva B, com quatro pontos), respectivamente, para confirmar qual delas seria a mais adequada para a quantificação do hormônio  $17\alpha$ -MT. As duas curvas analíticas são apresentadas nas Figuras 6-A e 6-B, traçadas como a variação da intensidade de corrente de pico nos voltamogramas versus a concentração de  $17\alpha$ -MT em solução.



**Figura 6.** Curvas analíticas de padrão externo do hormônio  $17\alpha$ -MT sobre HMDE em baixas concentrações,  $1,0 \times 10^{-8}$  a  $2,31 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>, (curva A) e em altas concentrações  $4,18 \times 10^{-7}$  a  $1,87 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> (curva B). (—) Regressão, (---) Intervalos de confiança (95%) e (---) Intervalos de Predição (95%)

Os resultados da análise de regressão linear para a quantificação do hormônio  $17\alpha$ -MT são apresentados na Tabela 1, em ambas as faixas de concentração investigadas.

A curva analítica no intervalo de concentrações de  $1,0 \times 10^{-8}$  a

$2,31 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> (Curva A, Figura 6-A) mostrou-se linear, no nível de 95% de confiança com coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 90,82% e coeficiente de correlação linear ( $r$ ) de 0,9838 (Tabela 1), indicando que o modelo linear se ajusta bem aos dados experimentais. Estes resultados são ressaltados pelo fato da regressão linear ser significativa ( $F_{regressão} > F_{crítico}$ ;  $p < 0,05$ ) e não haver evidências de falta de ajuste do modelo linear ( $F_{faj} < F_{crítico}$ ;  $p > 0,05$ ).

Para a curva analítica construída no intervalo de concentrações de  $4,18 \times 10^{-7}$  a  $1,87 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> (Curva B, Figura 6-B) foi observado também um comportamento linear para o nível de confiança de 95%, com coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 84,62% e coeficiente de correlação linear ( $r$ ) de 0,8749 (Tabela 1) indicando que o modelo linear se ajusta aos dados experimentais. Novamente, foi observado que a regressão linear é significativa ( $F_{regressão} > F_{crítico}$ ;  $p < 0,05$ ) e não há evidências de falta de ajuste do modelo linear ( $F_{faj} < F_{crítico}$ ;  $p > 0,05$ ) (Tabela 1). Em vista dos resultados, pode-se sugerir que as duas curvas analíticas apresentam linearidade na faixa de concentrações investigadas.

Normalmente, o critério de aceitação utilizado para verificar se o método apresenta linearidade na faixa de concentrações investigada é o coeficiente linear ( $r$ ),<sup>28,30</sup> sendo recomendados valores de  $r \geq 0,99$ . Neste trabalho, foram obtidos valores de  $r < 0,99$  para as duas curvas analíticas. Mas, por outro lado, a análise dos resultados da regressão linear e do teste de falta de ajuste (Tabela 1) demonstrou que ambas apresentam linearidade na faixa de concentrações analisada. Embora amplamente utilizado em estudos de validação, o coeficiente de correlação linear não comprova a linearidade do método analítico investigado como já comprovado na literatura. Araújo<sup>33</sup> demonstrou para um método cromatográfico que somente o cálculo do coeficiente linear não é suficiente para determinar a linearidade de um método analítico, pois os valores de  $r > 0,99$  mostraram falta de ajuste do modelo linear após a aplicação da regressão linear simples. As diferenças podem ser explicadas pelo fato do coeficiente de correlação linear descrever apenas o grau de associação entre a resposta eletroanalítica e a concentração da espécie eletroativa, enquanto que a análise de regressão linear permite estabelecer qual o modelo estatístico mais adequado entre estas duas variáveis.<sup>30</sup> Um teste- $t$  foi aplicado aos resultados das duas curvas analíticas de  $17\alpha$ -MT para verificar a significância dos coeficientes (intercepto e inclinação) no nível de confiança de 95% (Tabela 1). A análise do teste- $t$  indicou que os coeficientes linear e angular devem ser inseridos no modelo, porque os valores de  $p$  são menores do que 0,05 e os valores de  $t_{observado}$  são maiores que o valor de  $t_{crítico}$ . Assim, pode-se sugerir que as duas curvas analíticas não passam pela origem e os interceptos são

**Tabela 1.** Dados da análise de regressão linear no nível de 95% de confiança para as curvas A e B na faixa de  $1,0 \times 10^{-8}$  a  $2,31 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>

	Regressão		Teste de Falta de ajuste		$r$	$R^2$
	$F_{regressão}$ *	valor de $p$	$F_{faj}$ **	valor de $p$		
Curva A	158,31	0,000	0,54	0,711	0,9838	90,82 %
	Coeficientes da Retra de Regressão		$t_{observado}^{***}$			
	Intercepto: 19,71		2,71		0,016	
	Inclinação: 712,04		12,58		0,000	
Equação da curva de calibração:					$I_p$ (nA) = 19,41 + 712,04 [MT] (μM)	
	Regressão		Teste de Falta de ajuste		$r$	$R^2$
	$F_{regressão}$	valor de $p$	$F_{faj}$	valor de $p$		
Curva B	55,04	0,000	0,80	0,481	0,8749	84,62 %
	Coeficientes da Retra de Regressão		$t_{observado}^{***}$			
	Intercepto: 192,65		12,36		0,000	
	Inclinação: 100,98		7,42		0,000	
Equação da curva de calibração:					$I_p$ (nA) = 192,65 + 100,98 [MT] (μM)	

\* $F_{crítico}(0,025; 1,16) = 4,49$ ; \*\* $F_{crítico}(0,025; 4,12) = 3,26$ ; \*\*\* $t_{crítico}(0,025; 16) = 2,12$ .

significativos, portanto as equações devem ser representadas considerando os coeficientes angular e linear (Tabela 1). Comparando-se os coeficientes angulares das curvas de calibração observa-se que a curva A (Figura 6-A) tem uma inclinação sete vezes maior do que a curva B (Figura 6-B). Desta forma, pode-se concluir que a curva A apresenta maior sensibilidade para a determinação do hormônio 17 $\alpha$ -MT em água (Tabela 1) e, portanto, foi utilizada na quantificação do mesmo nas amostras de água investigadas neste trabalho.

### Limites de detecção e de quantificação

Como descrito anteriormente, a curva analítica compreendida na faixa de concentrações de  $1,0 \times 10^{-8}$  a  $2,31 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> (Curva A, Figura 6-A) apresentou maior sensibilidade e foi utilizada para o cálculo dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ). Assim, os valores de LD e de LQ para o hormônio 17 $\alpha$ -MT pelo método voltamétrico proposto foram de 3,07  $\mu$ g L<sup>-1</sup> ( $1,02 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup>) e 10,78  $\mu$ g L<sup>-1</sup> ( $3,6 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup>), respectivamente, no tempo de pré-concentração de 120 s.

### Precisão

A precisão foi avaliada pelas estimativas de repetitividade e precisão intermediária. A repetitividade foi calculada a partir de cinco medidas consecutivas de corrente de pico para uma adição de 17 $\alpha$ -MT de  $1,96 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>. A média da corrente de pico entre as medidas foi de 323,72 nA, e um desvio padrão de 9,22 nA. O coeficiente de variação (CV) para a repetitividade foi igual a 2,85%, o qual foi menor do que o máximo recomendado pela AOAC<sup>34</sup> (7,2%) na faixa de concentração investigada. A estimativa de precisão intermediária foi calculada com base em análises realizadas em cinco dias consecutivos com corrente de pico média de 283,2 nA e o desvio padrão de 39,92 nA. O coeficiente de variação (CV) para a precisão intermediária foi de 14,10%. Os CVs para as estimativas de repetitividade e precisão intermediária foram considerados adequados pois, de acordo com Ribani *et al.* (2004),<sup>26</sup> para compostos em níveis traço são aceitos CVs de até 20% considerando-se o grau de complexidade da amostra. Portanto, o método voltamétrico apresenta boa precisão para a determinação do 17 $\alpha$ -MT em amostras aquosas.

### Exatidão

A exatidão da metodologia voltamétrica foi avaliada por estudos de recuperação, por adição de padrão em amostras de águas. As porcentagens de recuperação do hormônio adicionado em eletrólito puro e em água de tanque de criação de peixes, a partir de curvas de adição de padrão foram de 100,4% e 108,7%, respectivamente. De acordo com a AOAC (2002)<sup>34</sup> para comprovar que o método apresenta boa exatidão são recomendadas taxas de recuperação entre 80 a 115%, para valores de concentração maiores que 10 ppm do analito. Desta forma, pode-se sugerir que o método voltamétrico apresenta exatidão adequada para a análise do hormônio investigado neste trabalho.

### CONCLUSÃO

O método voltamétrico desenvolvido foi validado para a quantificação do hormônio 17 $\alpha$ -MT, em matrizes aquosas empregando voltametria de onda quadrada, pois os parâmetros da validação intralaboratorial (seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão) encontraram-se dentro dos limites recomendados na literatura. A seletividade do método foi avaliada em relação à presença de substâncias húmicas e com base na interferência da matriz. Finalmente, através de uma análise por

ESI-MS e ESI-MS/MS tanto do padrão analítico do hormônio 17 $\alpha$ -MT quanto de amostras de água foi possível confirmar a presença do composto. Portanto, constatou-se que o método voltamétrico pode ser considerado seletivo. Uma análise de regressão linear mostrou que as duas curvas analíticas do hormônio investigadas apresentam boa linearidade, no entanto, a faixa linear de menor concentração é mais sensível para a quantificação de 17 $\alpha$ -MT. Em relação aos limites de detecção e de quantificação, o método apresentou sensibilidade analítica utilizando-se o tempo de pré-concentração relativamente baixo, comparado ao método voltamétrico reportado na literatura abordando a quantificação de 17 $\alpha$ -MT. Este fato mostra a viabilidade do uso da voltametria de onda quadrada e do eletrodo de mercúrio em análises de compostos orgânicos em níveis traço. Além disso, com o eletrodo de mercúrio, no modo HMDE foi possível quantificar com boa exatidão e precisão o hormônio 17 $\alpha$ -MT em amostras aquosas. Adicionalmente, o método voltamétrico proposto destaca-se em relação à rapidez e baixo custo, pois não necessita de etapas de pré-tratamento para a concentração do analito, quando comparado a outras técnicas adotadas na análise do 17 $\alpha$ -MT.

### AGRADECIMENTOS

À Fundação Araucária e Fundação Parque Tecnológico Itaipu (FA/ PTI) pela bolsa concedida. À CAPES, CNPq e Unicentro pela infraestrutura. Ao Centro de Estudos Biofarmacêuticos (Biocinese, Toledo-Paraná) por disponibilizar equipamentos e a infraestrutura para realização de parte deste trabalho.

### REFERÊNCIAS

1. Petrovic, M.; Eljarrat, E.; Lopez de Alda, M. J.; Barceló, D.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, 378, 549.
2. Boxall, A. B. A.; *EMBO Rep.* **2004**, 5, 1110.
3. Fent, K.; Weston, A. A.; Caminada D.; *Aquat. Toxicol.* **2006**, 27, 122.
4. Reis-Filho, R. W.; Araújo, J. C.; Vieira, E. M.; *Quim. Nova* **2006**, 29, 817.
5. Bila, D. M.; Dezotti, M.; *Quim. Nova* **2007**, 30, 651.
6. Lopes, L. G.; Marchi, M. R. R.; Souza, J. B. G.; Moura, J. A.; Lorenzon, C. S.; Cruz, C.; Amaral, L. A.; *Quim. Nova* **2010**, 33, 639.
7. Da Silva, P. R. P.; Danielski, R.; Czepielewski, M. A.; *Revista Brasileira de Medicina do Esporte* **2002**, 8, 235.
8. Homklin, S.; Kee Ong, S.; Limpiyakorn, T.; *Chemosphere* **2011**, 82, 1401.
9. Weast, R. C.; *Crc Handbook of Chemistry and Physics*, CRC Press: Boca Raton, 1988.
10. Baghel, D. S.; Lakra, W. S.; Rao, G. P. S.; *Aquacult. Res.* **2004**, 35, 943.
11. Bombardelli, R. A.; Hayashi, C.; *R. Bras. Zootec.* **2005**, 34, 365.
12. Dias-Koberstein, T. C. R.; Neto, A. G.; De-Stéfani, M. V.; Malheiros, E. B.; Zanardi, M. F.; Dos Santos, M. A.; *Revista Acadêmica* **2007**, 5, 391.
13. Oliveira, R. C.; *Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade* **2009**, 2, 71.
14. Marwah, A.; Marwah, P.; Lardy, H.; *J. Chromatogr. B.* **2005**, 824, 107.
15. Urbatzka, R.; Cauwenberge, A. V.; Maggioni, S.; Vigano, L.; Mandich, A.; Benfenati, E.; Lutz, I.; Kloas, W.; *Chemosphere* **2007**, 67, 1080.
16. Tölgyesi, A.; Verebey, Z.; Sharma, V. K.; Kovacsics, L.; Fekete, J.; *Chemosphere* **2010**, 78, 972.
17. Assis, A. P.; Okumura, L. L.; Saczkb, A. A.; Oliveira, M. F.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2014**, 25, 27.
18. Dogan-Topal, B.; Ozkan, A.; Uslu, B.; *The Open Chemical and Biomedical Methods Journal* **2010**, 3, 56.
19. Miranda, L.; Galli, A.; Quináia, S. P.; *Revista Virtual de Química* **2014**, 6, 396.
20. Aleixo, M. L. Disponível em: <http://www.chemkeys.com>, acessada em Janeiro 2015.

21. De Souza, D.; Machado, S. A. S.; Avaca, L. A.; *Quim. Nova* **2003**, *26*, 81.
22. Ghoneim, M. M.; Baumann, W. Hamman, E.; Tawfik, A.; *Talanta* **2004**, *64*, 857.
23. Santos, K.; Braga, O. C.; Vieira, C.; Spinelli, A.; *Talanta* **2010**, *80*, 1999.
24. Wang, J.; Percio, A. M. F.; Mahamoud, J. S.; *Anal. Chim. Acta* **1985**, *171*, 195.
25. Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J.; *Fundamentos de Química Analítica*, Tradução da 8ª ed. Norte-Americana, Thomson Learning Ltda, 2006.
26. Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins C. H.; Jardim, I. C. S. F.; Melo, L. F. C.; *Quim. Nova* **2004**, *27*, 771.
27. Ribeiro, F. A.; Ferreira, M. M. C.; Morano, S. C.; Silva, L. R.; Schneider, R. P.; *Quim. Nova* **2008**, *31*, 164
28. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); Resolução RE nº 899; de 29/05/2003.
29. IMENTRO, Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Brasil) – DOQ-CGCRE-008 – *Orientações sobre validação de Métodos Analíticos*. Jul. 2011. 20 p.
30. Stockl, D.; D'Hondt, H.; Thienpont, L. M. L.; *J. Chromatogr. B* **2009**, *877*, 2180.
31. Gumustas, M.; Ozkan, S. A.; *The Open Analytical Chemistry Journal* **2011**, *5*, 1.
32. Cámara, C. I.; Bornancini, C. A.; Cabrera, J. L.; Ortega, M. G.; Yudi, L. M.; *Talanta* **2010**, *83* 623.
33. Araújo, P.; *J. Chromatogr. B* **2009**, *877*, 2224.
34. AOAC, Association of Official Analytical Chemists; *Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals*, 2002, 38 p.
35. <http://www.earthgoogle.com/intl/pt/>, acessada em Janeiro 2015.
36. Ashok, K.; Pandey, S. D. P.; Misra, V.; *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2000**, *47*, 195.
37. Minitab Incorporation; Minitab versão 16.2.2 for Windows, 2010.
38. Wang, M.; Liao, L.; Zhang, X.; Li, Z.; *Appl. Clay Sci.* **2012**, *67-68*, 164.