

"AVALIAÇÃO DE ESTERÓIDES DERIVADOS DO COLESTEROL EM ÁGUAS DESTINADAS AO ABASTECIMENTO PÚBLICO NA REGIÃO DO RIO PARAÍBA DO SUL, SP. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA"

1. OBJETIVOS

Desenvolver e validar metodologia analítica para determinação de esteróides derivados do colesterol em amostras de água tratada na Região do Rio Paraíba do Sul, SP, utilizando a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS).

2. METODOLOGIA

Para a realização das análises dos compostos coprostanol, colestanol, colesterol e estigmasterol, amostras de água tratada foram coletadas nas estações de tratamento de água (ETA) de 4 municípios na região do Rio Paraíba do Sul: Guararema, Pindamonhangaba, São José dos Campos e Taubaté.

Para preservação das amostras, inicialmente foram adicionados 0,5 g de tiosulfato de sódio anidro a fim de eliminar a presença de cloro residual proveniente da etapa de cloração realizada na ETA. Em seguida, as amostras foram filtradas com membranas filtrantes de 0,45 µm (CETESB, 1987).

Após filtração, as amostras foram acidificadas a pH 3 e pré-concentradas em sistema de extração em fase sólida (SPE), utilizando cartuchos de polipropileno preenchidos com octadecil (C₁₈) polimericamente ligado, da marca *Supelco*.

O cartucho SPE é condicionado com 5 mL de Metanol (100%) seguidos de 5 mL de Metanol:água na proporção 1:9. A etapa seguinte envolve a percolação das amostras de água tratada sob um fluxo constante e contínuo de aproximadamente 5 mL.min⁻¹. Após a percolação, foi realizada a etapa de *clean-up* (lavagem) em que são utilizados 5 mL de Metanol:água na proporção 1:9 a fim de remover possíveis interferentes. Para a remoção de toda a água presente no cartucho, o mesmo foi mantido primeiramente por 10 minutos sob vácuo, logo após foi centrifugado por 30 minutos a 2500 rpm.

Em seguida, foi realizada a eluição dos esteróides derivados do colesterol aprisionados no cartucho com 5 mL da mistura Diclorometano:Metanol na proporção 6:4. Os extratos foram levados a *secura total* sob fluxo suave de nitrogênio. Quando da impossibilidade de realizar o processo todo no mesmo dia, o extrato foi armazenado em geladeira e protegido da incidência de luz.

Ao extrato seco foi adicionado uma alíquota de 100 µL do derivatizante N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida:Trimetilclorosilano (9:1) e a derivatização foi realizada a 100°C por 30 minutos. O produto obtido foi retomado em diclorometano (100%) até o volume de 1mL para posterior análise no Cromatógrafo a gás, *Shimadzu GC-17Ai* acoplado ao detector de espectrometria de massas, *Shimadzu - QP5000*.

A injeção manual de 1 µL foi feita sem divisão de fluxo (*splitless*) com injetor a 300°C e coluna capilar DB-5 (26 m x 0,25 mm d.i. x 0,25 µm da fase dimetilpolisiloxano). Na programação da temperatura utilizou-se: início a 150°C, incrementos de 40°C.min⁻¹ a 300°C permanecendo nesta temperatura por 10 minutos. Hélio foi usado como gás carreador, mantido em fluxo constante na coluna a 1,7 mL.min⁻¹.

O detector de massas operou nos modos varredura de uma faixa determinada de íons (SCAN) e Monitoramento de Íons (SIM), monitorando 5 fragmentos específicos para cada composto estudado, de acordo com o apresentado na tabela 1, com energia de ionização dos fragmentos de 70 eV e voltagem 2,5 kV.

Tabela 1: Íons monitorados em GC/MS para os derivados trimetisilílicos dos esteróides

Derivados Trimetisilílicos	Faixa de tempo (minutos)	Relação massa/carga				
		Ch 1	Ch 2	Ch 3	Ch 4	Ch 5
Coprostanol	6.90 – 8.45	207	215	257	355	370
Colesterol	8.45 – 9.40	129	145	329	368	458
Colestanol	8.45 – 9.40	75	215	355	445	460
Estigmasterol	10.90 – 14.00	129	255	355	394	484

A validação da metodologia foi realizada a partir da avaliação estatística dos seguintes parâmetros analíticos: robustez, seletividade, linearidade, limite de detecção e quantificação, exatidão, precisão e recuperação (INMETRO, 2003).

As injeções foram realizadas em sete replicatas de oito concentrações de todos os compostos nos ensaios com e sem matriz. Para observar a seletividade, utilizou-se o teste *t-Student* que objetiva avaliar a significância das diferenças das médias; teste de inclinação e paralelismo; teste do intercepto e teste *F-Snedecor* que avalia a homogeneidade das variâncias evidenciando se há interferência da matriz nas análises. A linearidade foi avaliada por meio dos coeficientes de determinação (r^2) obtidos pelas curvas analíticas de todos os compostos de estudo.

A exatidão foi avaliada pelo índice *z Score*. A precisão foi avaliada pelos limites de reprodutibilidade e repetitividade. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram avaliados segundo o documento do INMETRO (2003). A robustez foi determinada aplicando-se o teste que consiste no planejamento fatorial (Tabela 2) de 7 variáveis com 8 experimentos (planejamento fracionário saturado) (Furusawa, 2007; Vander Heyden et al. 2001).

Tabela 2: Parâmetros selecionados para os testes de robustez

Fator	Clean - up	pH da amostra	Temp. derivati- zação (°C)	Temp. injetor (°C)	Temp. interfac e (°C)	Fluxo coluna (mL/min)	Voltagem detector (KV)
Nominal	sim	3	100	300	300	1,7	2,5
Varição	não	Original	70	280	280	1,5	2,3

3. RESULTADOS OBTIDOS

A seletividade e especificidade da metodologia desenvolvida foram avaliadas inicialmente pela observação do cromatograma dos compostos na matriz de água tratada (Figura 01) e apenas em solvente (Figura 02). Para este teste, os compostos foram avaliados em diferentes concentrações de acordo com a sensibilidade, na faixa de $0,4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ a $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, tanto na matriz de água tratada como apenas em solvente para que fosse possível a comparação das intensidades dos sinais.

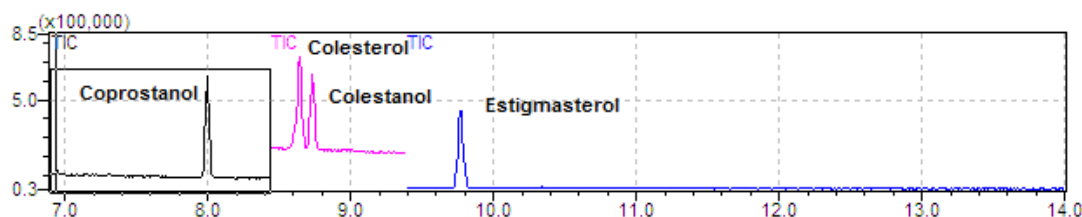


Figura 01: Cromatograma da mistura dos compostos estudados na matriz de água tratada obtido no modo SIM

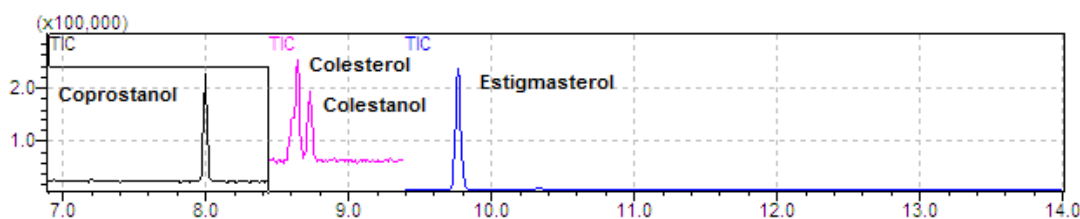


Figura 02: Cromatograma da mistura dos compostos estudados em solventes obtido no modo SIM

Analisando os cromatogramas, observa-se a perfeita separação de todos os picos, evidenciando uma boa seletividade do método. Nota-se ainda que há influência da matriz na sensibilidade dos compostos, pois os sinais analíticos de todos os compostos foram mais intensos na matriz de água tratada do que apenas na mistura de solventes.

Os resultados obtidos pelo teste F (*Snedecor*) e teste t (*Student*), nas medidas de adição padrão nos ensaios com e sem matriz, foram comparados respectivamente com os valores tabelados de $F_{6,6, 95\%} = 4,28$ e $t_{12, 95\%} = 2,179$. Nos ensaios em questão, todos os compostos apresentaram valores de t e F superiores aos valores tabelados indicando que a matriz interfere na precisão do método evidenciando que a quantificação deve ser realizada em uma curva preparada na própria matriz.

A linearidade do método para a matriz de água tratada foi comprovada pela obtenção de valores de coeficiente de correlação (r^2) acima de 0,90 (Tabela 3), requisito recomendado pelo INMETRO (2003).

Tabela 3: Coeficiente de determinação para os esteróides derivados do colesterol na matriz de água tratada

Esteróide	r^2
Coprostanol	0,998
Colesterol	0,994
Colestanol	0,999
Estigmasterol	0,999

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para os compostos de estudo são apresentados na tabela 4.

Tabela 4: Limites de detecção e de quantificação da metodologia desenvolvida

Esteróide	LD ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
Coprostanol	0,04	0,20
Colesterol	0,08	0,24
Colestanol	0,03	0,12
Estigmasterol	0,03	0,23

A exatidão foi avaliada pelo índice z score, em que valores de $z < 2$ indicam um resultado satisfatório. Os resultados dos testes para os compostos do presente estudo apresentaram valores de z abaixo do especificado evidenciando a exatidão do método.

Cada ensaio combinado do planejamento fracionário saturado para robustez gerou resultados que representam a influência que cada fator exerce sobre o composto analisado. Esses resultados foram explorados por meio dos gráficos de significância dos efeitos (Figura 03) e Rankit (Figura 04).

Os quatro compostos apresentaram perfis semelhantes (Figura 03) visto que para todos os compostos, os fatores de maior influência positiva foram a voltagem do detector e a etapa de clean-up durante a pré-concentração. Para os compostos coprostanol, colesterol e estigmasterol, o único fator de influência negativa foi a temperatura da

interface. Para o composto colestanol nenhum dos fatores analisados gerou influências negativas.

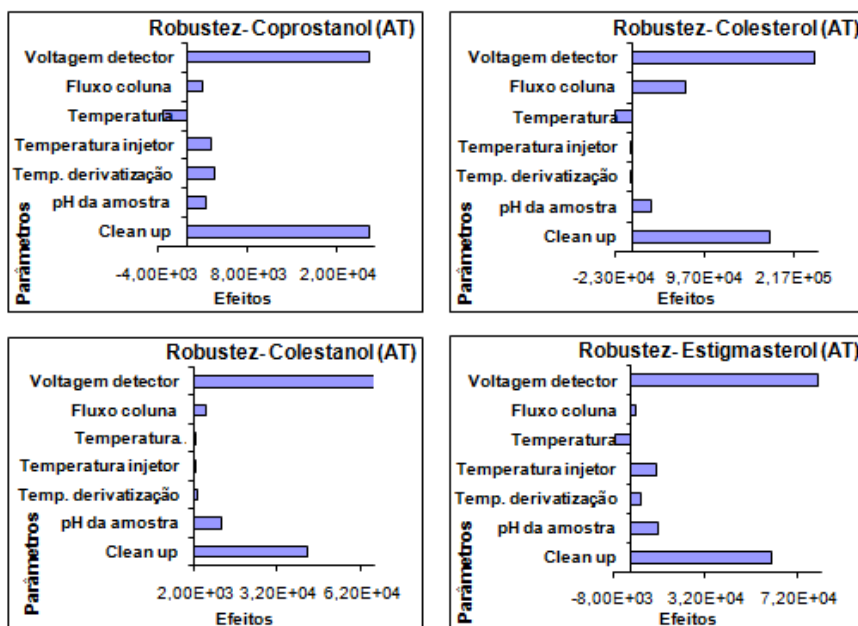


Figura 03: Verificação da significância dos efeitos para os compostos coprostanol, colesterol, colestanol e estigmasterol na matriz de água tratada

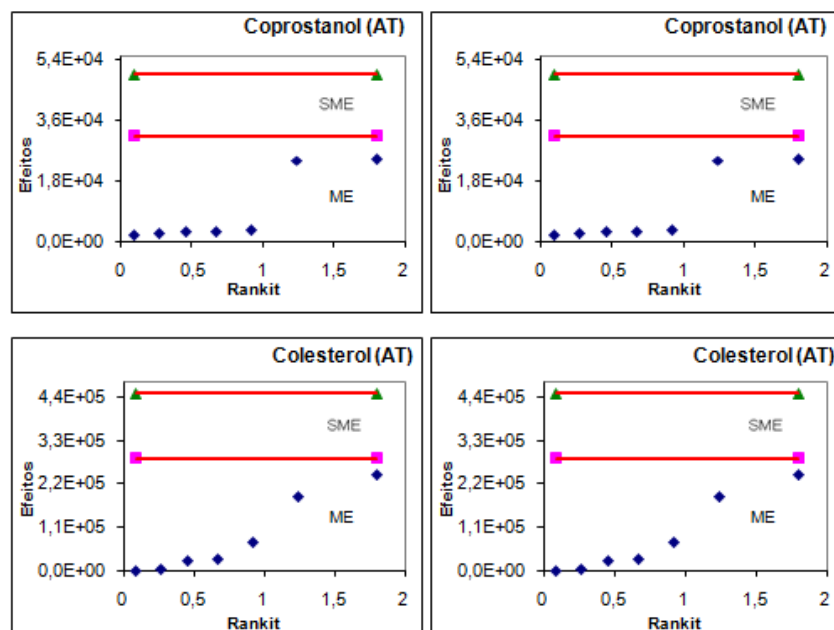


Figura 04: Gráficos de rankit para Coprostanol, Colesterol, Colestanol e Estigmasterol na matriz de água tratada

Quando um fator gera uma influência positiva, sugere que a alteração do mesmo na metodologia possa favorecer a análise dos compostos de interesse. Porém, analisando os resultados dos gráficos de Rankit (Figura 04) para os compostos na amostra de água tratada, observou-se que os efeitos das variações aplicadas não comprometem a robustez da metodologia, pois os valores obtidos encontram-se abaixo do limite mais crítico-ME (Margin of Error) (Furusawa, 2007).

Aplicando-se a metodologia validada nas amostras de água tratada provenientes das quatro ETAs situadas no rio Paraíba do Sul foi possível realizar a avaliação da qualidade da água de distribuição. Na tabela 5 são apresentados os resultados das análises das amostras coletadas durante a 1ª coleta (15/06/2011). Os valores são referentes às médias de 3 replicatas.

Tabela 5 – Resultados da análise da 1ª coleta dos esteróides derivados do colesterol nas amostras (1L) de água tratada (AT) da região do rio Paraíba do Sul (ATP: Pindamonhangaba; ATT: Taubaté; ATSJC: S.José dos Campos e ATG: Guararema) em $\mu\text{g.L}^{-1}$

Amostra	Coprostanol	Colesterol	Colestanol	Estigmasterol
ATP	nd	0,26	nd	nd
ATG	nd	0,67	nd	nd
ATT	nd	<0,24	nd	nd
ATSJC	nd	nd	nd	nd

nd: Não determinado

Com os resultados da primeira coleta, é possível constatar a presença apenas do composto colesterol cuja fonte pode ser natural ou antrópica. Isso indica que o tratamento realizado nas ETAs de estudo não foi eficiente para total remoção do composto.

Nos próximos meses serão realizadas mais duas coletas contemplando as estações secas e chuvosas.

4. CONCLUSÕES

A metodologia desenvolvida se mostrou adequada para a identificação e quantificação dos esteróides derivados do colesterol em virtude de sua exatidão, precisão, robustez e recuperação do método. O processo de validação forneceu confiabilidade estatística aos dados, confirmando a sensibilidade e a seletividade do método, além da boa linearidade nas faixas de trabalho consideradas.

Foi possível com o uso da metodologia desenvolvida, identificar a contaminação do esteróide colesterol com valores acima do LQ definido pelo método.

A aplicação da metodologia nas amostras de água tratada proporcionará uma avaliação precisa da área de estudo contribuindo com o plano de gestão de recursos hídricos da região do Rio Paraíba do Sul, SP indicando o nível de contaminação gerado nas águas de abastecimento público.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. **Guia de coleta e preservação de amostras de água**. 1987.

FURUSAWA, H. A. **Validação de Ensaios Químicos**. São Paulo, IPEN-CNEN/SP, 2007 (adaptação eletrônica baseada no documento DOQ-CGCRE-008 de 01/03/2003 do INMETRO).

INMETRO – Instituto Nacional De Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos**. Rio de Janeiro. DOQ-CGCRE-008. Revisão 01. Mar. 2003.

VANDER HEYDEN, Y.; NIJHUIS, A.; SMEYERS-VERBEKE, J.; VANDEGINSTE, B.G.M.; MASSART, D.L. Guidance for robustness/ruggedness test in method validation. **J. pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 24, p. 723-753, 2001.